

PROLIFERATIVE POTENTIAL OF BONE MARROW CELLS IN MICE OF DIFFERENT AGES AFTER TRANSPLANTATION OF HEMATOPOIETIC STEM CELLS*V.M.Kyryk, A.E.Rodnichenko*, G.M.Butenko*

Abstract. This research presents a change of the proliferative activity of the bone marrow cells in young and old recipients of hematopoietic stem cells from the bone marrow and fetal liver. A decrease of the ratio of stromal progenitor cells to hematopoietic cells indicates a redistribution of the basic subpopulations of the progenitor cells. By transplanting sorted cells, marked by green fluorescent protein, a resettlement and differentiation of hematopoietic stem cells is shown.

Key words: hematopoietic stem cells, bone marrow, fetal liver, transgenic animals.

State Institute of Genetic and Regenerative Medicine of Ukrainian Academy of Medical Sciences (Kyiv)

* State Institute of Gerontology of Ukrainian Academy of Medical Sciences (Kyiv)

Рецензент – доц. Н.В.Черновська

Buk. Med. Herald. – 2009. – Vol.13, №4.–P.129-133

Надійшла до редакції 12.07.2009 року

© В.М.Кирик, А.Є.Родніченко, Г.М.Бутенко, 2009

УДК 616-009.17:591.147.3+576.3

О.М.Клімова, В.В.Бойко, А.І.Божков, І.А.Вотякова, Л.А.Дроздова***ДЕЯКІ МЕХАНІЗМИ ДІЇ ГЕМОПОЕТИЧНИХ КЛІТИН-ПОПЕРЕДНИКІВ ТА КОРЕКЦІЯ МЕТАБОЛІЧНИХ ПОРУШЕНЬ ПРИ ЦУКРОВОМУ ДІАБЕТИ**

Діагностична лабораторія (зав. – д.біол.н. О.М.Клімова)

ДУ «Інститут загальної та невідкладної хірургії АМНУ», м. Харків

* НДІ біології Харківського національного університету імені В.Н.Каразіна

Резюме. В експерименті вивчали механізми репарації печінки після часткової резекції, після трансфузії гемопоетичних клітин-попередників за динамікою синтезу і транспорту нуклеїнових кислот. У хворих на цукровий діабет різного віку на тлі аутоімунного пошкодження острівців підшлункової залози і порушення

регенеративних процесів оцінювали зміни метаболічних показників до і після застосування гемопоетичних клітин-попередників.

Ключові слова: цукровий діабет, стимуляція регенерації, гемопоетичні клітини-попередники.

Вступ. Відомо, що з віком збільшується частота розвитку таких захворювань, як аутоімунні, зокрема, цукровий діабет. Профілактика та лікування цих захворювань є одним із підходів до вирішення проблеми передчасного старіння.

Цукровий діабет (ЦД) I типу – це мультифакторіальне генетично детерміноване аутоімунне захворювання, яке асоційовано з фенотипом лейкоцитарних антигенів першого та другого класів [1].

Патогенез захворювання зумовлений надмірною інфільтрацією острівців підшлункової залози В-лімфоцитами, що виробляють цитотоксичні антитіла проти β -клітин. Клінічна картина діабету залежить від дефекту самих β -клітин. Цукровий діабет другого типу (ЦД II типу) характеризується двома механізмами: зменшенням кількості рецепторів до інсуліну на клітинах і зміною спорідненості до цього гормону, що призводить до активації тромбоутворення і порушення фібринолізу.

Патогенез цукрового діабету другого типу (ЦД II типу) визначається підвищенням концентрації гліколізованого гемоглобіну (Hb A_{1c}). Індуковане зниження цього показника зменшує ризик ускладнень цукрового діабету. Стандартна гіпоглікемічна терапія спрямована на зниження Hb A_{1c}. Аутоімунний компонент часто асоційований із

хронічним ацидозом, що знижує адаптаційні можливості організму в цілому. Що стосується механізмів формування метаболічних порушень при цукровому діабеті, то вони формуються на різних рівнях організації біосистем, у тому числі на рівні зміни швидкості синтезу нуклеїнових кислот [1, 2].

Лікування цукрового діабету повинно бути спрямовано на два патогенетичні механізми: регенерацію β -клітин підшлункової залози і секрецію інсуліну, і покращення резистентності до інсуліну. Комплексне лікування повинно бути спрямовано також на отримання позитивного кардіоваскулярного ефекту, зниження адгезивності тромбоцитів та інших клітин крові, усунення аутоімунного компонента. Немає універсальних фармакологічних засобів, які здатні відновлювати метаболічні процеси.

У класичних роботах А.А.Максимова показано, що стовбурові клітини-попередники різного походження є мультипотентними і здатні до самовідтворення і трансдиференціювання. Ієрархічне положення за здатністю до клітинного диференціювання займають кровотворні стовлові клітини. Стовлові кровотворні клітини можна використовувати для корекції метаболічних порушень, у тому числі ендокринних, зокрема діабету.

© О.М.Клімова, В.В.Бойко, А.І.Божков, І.А.Вотякова, Л.А.Дроздова, 2009

На сьогоднішній день для лікування захворювання, яке супроводжується ендокринними порушеннями, використовують гемопоетичні клітини-попередники, яким властива пластичність, але повністю не з'ясовано механізмів корегувальної дії стовбурових клітин, не розроблено показань відносно оптимальної кількості клітинного матеріалу, який вводиться, і не визначено найбільш адекватного способу уведення стовбурових клітин [3-5]. Не розроблено стандартизованих методів діагностики клінічної ефективності клітинної терапії.

Мета дослідження. Вивчити механізми дії стовбурових клітин на синтез і транспорт нуклеїнових кислот в експерименті за умов стимуляції регенерації, оцінити метаболічні порушення при розвитку цукрового діабету і розробити удосконалений метод проведення корекції метаболічних та імунопатологічних порушень за допомогою гемопоетичних клітин-попередників.

Матеріал і методи. Автори гарантують, що проведені дослідження відповідають принципам Гельсінської декларації, прийнятої Генеральною асамблеєю Всесвітньої медичної асоціації (2000 р.). Догляд за тваринами здійснювали за спеціальними нормами і вимогами, розробленими згідно з етичним кодексом Ради Міжнародних медичних організацій «Міжнародні рекомендації для проведення медико-біологічних досліджень із застосуванням тварин». Забій тварин проводили шляхом декапітації після ефірного наркозу.

Обстежено 82 хворих на цукровий діабет, з них 64 пацієнти до 11 років з діабетом I типу і 18 пацієнтів віком до 58 років з діабетом II типу.

Для визначення впливу гемопоетичних клітин-попередників (ГКП) на процеси регенерації проводили експериментальне дослідження на пошкодженій печінці щурів після її часткової резекції, після дії ГКП та у її відсутність з метаболізму нуклеїнових кислот. Виділення нуклеїнових кислот проводили із печінки інтактних тварин та тварин, яким вводили ксенотрансплантат гемопоетичних клітин-попередників із використанням міченої ^{14}C -оротової кислоти. Концентрацію РНК та ДНК визначали спектрофотометрично.

Рівень субпопуляцій лімфоцитів оцінювали за допомогою непрямого варіанта імунофлуоресцентного методу з використанням специфічних МКАТ і FITC – фарбування. Вміст Ig E у сироватці

крові визначали твердофазним імуноферментним методом із використанням високоспецифічних моноклональних антитіл до Ig E. Концентрацію циркулюючих імунних комплексів визначали методом селективної преципітації комплексів антиген – антитіло в поліетиленгліколі з подальшим фотометричним визначенням щільності преципітату. Константу ЦІК визначали методом, який оснований на різниці преципітації комплексів у поліетиленгліколі різної концентрації. Рівень глікозильованого гемоглобіну (HbA1c) крові визначали спектрофотометричним методом, використовуючи стандартні набори PLIVA-Lachema, Чехія. Рівень ферментів аланінамінотрансфераз (АЛАТ) та аспартатамінотрансфераз (АСАТ) визначали кінетичним методом. Визначення рівня С-реактивного білка проводили методом, який оснований на оцінці реакції аглютинації з антитілами до С-реактивного білка, що адсорбовані на нейтральних часточках латексу (латекс-тест).

Результати дослідження та їх обговорення. Проведено серію експериментальних досліджень впливу клітинних ксенотрансплантатів гемопоетичних клітин-попередників (ГКП) на процеси регенерації ушкодженої печінки лабораторних тварин після часткової гепатектомії. Перша група інтактних тварин використана як контроль. У другій групі тварин не проводили часткової резекції печінки, але вводили гемопоетичні клітини-попередники. Часткову резекцію печінки проводили в третій групі інтактних тварин та в четвертій групі тварин яким після часткової резекції вводили гемопоетичні клітини-попередники в ранньому післяопераційному періоді (табл. 1).

Дослідження показали, що уведення гемопоетичних клітин-попередників інтактним тваринам суттєво не впливало на інтенсивність синтезу РНК (табл. 1). Не змінювалась і швидкість транспорту синтезованої РНК з ядра до цитоплазми (табл. 1). Разом з тим ксенотрансплантація гемопоетичних клітин-попередників інтактним тваринам значно збільшувала співвідношення РНК ядер до ДНК (табл. 1), що свідчить про значне збільшення кількості РНК у ядрах. Це може бути пов'язане з посиленням швидкості синтезу РНК на ранніх етапах експерименту.

При визначенні впливу ГКП на моделі регенеруючої печінки виявлено, що на 8-у добу після початку експерименту не змінилась інтенсивність

Таблиця 1

Інтенсивність синтезу РНК і швидкість транспорту заново синтезованої РНК із ядра в цитоплазму, а також зміна співвідношення РНК ядер до ДНК на 7-у добу після уведення гемопоетичних клітин-попередників

Варіант експериментів	Швидкість синтезу РНК (питома радіоактивність, імп/хв на 1 мг)	Швидкість транспорту РНК (питома радіоактивність, імп/хв на 1 мг)	Співвідношення РНК ядер до ДНК
Інтактний контроль	190 111	13 164	0,139
Ксенотрансплантація ГКП інтактним тваринам	206 019	12 292	0,792
Часткова резекція печінки в інтактних тварин	700 200	54 450	0,520
Ксенотрансплантація ГКП після часткової резекції печінки	775 571	57 033	0,643

Таблиця 2

Рівень субпопуляцій лімфоцитів у пацієнтів з цукровим діабетом до і після трансфузії гемопоетичних клітин-попередників

Терміни обстеження	Субпопуляції Т-лімфоцитів					
	CD3, %	CD4, %	CD8, %	CD16, %	CD25, %	CD34, %
Контрольна група	52,0±11,4	29,0±8,6	18,0±4,5	5,0±1,3	15,4±1,1	8,2±0,9
До застосування трансфузії	24,2±1,1	19,2±2,1	9,7±0,5	15,8±1,7	28,3±2,3	6,1±0,9
Після застосування трансфузії	45,1±2,4	29,2±1,3	17,1±0,6	7,2±1,1	17,3±1,7	16,2±1,0

Примітка. * – всі табличні дані наведено з імовірністю відмінності від контролю $P \leq 0,05$

Таблиця 3

Вміст показників гуморального імунітету в пацієнтів із цукровим діабетом до і після трансфузії гемопоетичних клітин-попередників

Терміни	Показник	ЦІК, од. Е	ЦІКк, од. Е	IgE, МЕ/мл
Контрольна група		98,0±9,5	1,2±0,2	80,0±11,9
До застосування трансфузії		284,1±32,6	0,8±0,1	356,7±24,6
Після застосування трансфузії		169,3±18,5	1,1±0,1	123,9±19,4

Примітка. * – всі табличні дані наведено з імовірністю відмінності від контролю $P \leq 0,05$

Таблиця 4

Вміст HbA1c та С-реактивного білка в пацієнтів із цукровим діабетом до і після трансфузії гемопоетичних клітин-попередників

Терміни обстеження	Показник	HbA1c, мкмоль/г	С-реактивний білок, мг/л
Контрольна група		5,2±1,0	3,1±0,5
До застосування трансфузії		11,2±0,6	28,7±2,2
Після застосування трансфузії		6,1±1,1	5,1±0,4

Примітка. * – всі табличні дані наведено з імовірністю відмінності від контролю $P \leq 0,05$

Таблиця 5

Показники ферментативної активності печінки в пацієнтів із цукровим діабетом до і після трансфузії гемопоетичних клітин-попередників

Група пацієнтів	АСАТ, U/l	АЛАТ, U/l
Контрольна група	23,6±4,1	25,7±3,8
До застосування трансфузії	87,4±6,6	72,9±12,1
Після застосування трансфузії	39,5±9,5	42,1±7,8

Примітка. * – всі табличні дані наведено з імовірністю відмінності від контролю $P \leq 0,05$

експресії геному. Не змінювалась і швидкість транспорту РНК із ядра в цитоплазму, але зросло співвідношення РНК ядер до ДНК, хоч і в меншій мірі ніж у випадку з інтактними хворими.

Отримані результати дозволяють дійти висновку, що трансплантація ембріональних клітин людини шурам може використовуватися як експериментальна модель дослідження механізмів дії цих клітин на організм. Відповідь організму на уведення ембріональних клітин залежить від функціонального стану організму. Уведення ембріональних клітин супроводжується зміною вмі-

ту РНК в ядрах клітин печінки. Необхідні подальші дослідження ролі РНК у формування відповіді на ксенотрансплантацію.

Дослідження показників клітинного імунітету у хворих на цукровий діабет показало значне зниження рівня основних субпопуляцій CD3, CD4, CD8 та підвищення рівня CD16, CD25. Після застосування ГКП спостерігали нормалізацію рівня досліджуваних показників (табл. 2).

Результати показників гуморального імунітету у хворих на цукровий діабет показало підвищений рівень концентрації ЦІК та IgE, та значне

зниження рівня цих показників після застосування ГКП (табл. 3).

У таблиці 4 представлені дані, що свідчать про зниження і нормалізацію рівня глікозильованого гемоглобіну та С-реактивного білка після однократного застосування ГКП у хворих на цукровий діабет (табл. 4).

Середній рівень ферментативної активності аспартаттрансферази та аланінтрансферази в обстежених хворих на цукровий діабет вище референтних значень. Після одноразового застосування ГКП відмітини вірогідне зниження до норми концентрації досліджуваних показників (табл. 5).

Вивчення впливу ГКП на регенерацію і динаміку синтезу нуклеїнових кислот свідчить про позитивну дію клітинних трансплантатів на ці процеси в експерименті.

На першому етапі клінічного застосування ГКП слід проводити індивідуальний підбір клітинних препаратів, що корегують метаболічні, ендокринні та аутоімунні розлади, залежно від типу цукрового діабету, наявності його ускладнень та типу імунофізіологічних порушень. Зазначені клітинні препарати вводять після одноразового уведення антигістамінних препаратів. При ЦД I типу використовують кріоконсервовані препарати гемопоетичних стовбурових клітин фетального походження, що складається з колонієутворювальних одиниць ГМ у кількості від 30 до 80×10^6 /мл. При ЦД II типу використовують гемопоетичні клітини-попередники виготовлені з кордової крові, що містять колонієутворювальні одиниці ГМ у кількості від 1 до 15×10^6 /мл [2]. Ефект лікування оцінюють: за зменшенням дози інсуліну, що вводиться, за зменшенням частоти виникнення гіпоглікемічних станів, за рівнем зниження глікемії, позитивній зміні показників імунного статусу та біохімічних показників: рівень субпопуляцій імунокомпетентних клітин шляхом визначення експресії диференціальних рецепторів CD3, CD4, CD8, CD16, CD25, CD34, концентрації імуноглобулінів, глікозильованого гемоглобіну, ферментів, С-реактивного білка. Особливе значення має підвищення експресії CD34-маркерів та зниження глікозильованого гемоглобіну.

На 7-у та 30-у добу після уведення препарату визначали зміни біохімічних показників імунного статусу для оцінки ефективності проведеного лікування. Позитивним ефект вважали при зниженні рівня глюкози в сироватці крові, норма-

лізації рівня субпопуляцій імунокомпетентних клітин CD3, CD4, CD8, CD16, CD25, CD34, нормалізації концентрації імуноглобулінів, глікозильованого гемоглобіну, ферментів, С-реактивного білка.

Висновок

Запропонований метод дає змогу проводити спрямовану корекцію метаболічних ендокринних та аутоімунних порушень, при цьому знизити гіперглікемію, зменшити дозу інсуліну, зменшити прояви аутоімунного компонента, відновити гемопоез, зменшити ускладнення цукрового діабету.

Перспективи подальших досліджень У перспективі клітинні технології зможуть забезпечити профілактику різних ускладнень аутоімунних захворювань. Подальше вивчення впливу стовбурових гемопоетичних клітин на процеси репарації та регенерації на молекулярному та організменному рівні дозволить розробити методологію індивідуального застосування цього типу поліпотентних пластичних клітин, здатних до трансдиференціювання при захворюваннях, що асоційовані з віком.

Література

1. Мальшев В.А. Инсулинзависимый сахарный диабет как аутоиммунное заболевание. Иммунодиагностика, иммунопрофилактика / В.А.Мальшев // Иммунология и аллергология. – 1998. – № 1. – С. 47-59.
2. Патент на корисну модель № 37684 А6 ІК 35/14, А6ІК 35/24, Державна установа «Інститут загальної та невідкладної хірургії Академії медичних наук України» (UA), пр. 19.05.2008, Бойко В.В., Клімова О.М., Вотякова І.А., Іванов В.М., Дроздова Л.А. Спосіб лікування цукрового діабету I і II типів за допомогою клітинних трансплантатів різного походження.
3. Рахмат-Заде Т.М. Костномозговые стволовые клетки в лечении ишемической болезни сердца / Т.М.Рахмат-Заде, Е.А.Скридловская, Р.С.Акчурин // Кардіологія. – 2007. – № 1. – С. 47-51.
4. Старкова Н.Т. Клиническая эндокринология: [Рук-во для врачей]/ Н.Т.Старкова. – М.: Медицина, 1991. – 320 с.
5. Сухих Г.Т. Иммунологические аспекты клеточной терапии / Г.Т.Сухих, И.М.Богданова, В.В.Мамайцева // Бюл. экспер. биол. и мед. – 1998. – Т. 125, № 2. – С. 122-129.

НЕКОТОРЫЕ МЕХАНИЗМЫ ДЕЙСТВИЯ ГЕМОПОЭТИЧЕСКИХ КЛЕТОК-ПРЕДШЕСТВЕННИКОВ И КОРРЕКЦИЯ МЕТАБОЛИЧЕСКИХ НАРУШЕНИЙ ПРИ САХАРНОМ ДИАБЕТЕ

О.М.Климова, В.В.Бойко, А.И.Божков, И.А.Вотякова, Л.А.Дроздова*

Резюме. В эксперименте изучали механизмы репарации печени после частичной резекции, после трансфузии гемопоэтических клеток-предшественников по динамике синтеза и транспорта нуклеиновых кислот. У больных сахарным диабетом разного возраста на фоне аутоиммунного повреждения островков поджелудочной железы и нарушения регенеративных процессов оценивали изменения метаболических показателей до и после применения гемопоэтических клеток-предшественников.

Ключевые слова: сахарный диабет, стимуляция регенерации, гемопоэтические клетки-предшественники.

SOME MECHANISMS OF THE EFFECT OF HEMOPOIETIC CELLS-PRECURSORS AND A CORRECTION OF METABOLIC DERANGEMENTS IN PANCREATIC DIABETES*E.M.Klimova, V.V.Boiko, A.I.Bozhkov, I.A.Votiakova, L.A.Drozдова*

Abstract. The mechanism of liver reparation following a limited resection after transfusing hemopoietic progenitor cells according to the dynamics of synthesis and transport of nucleic acids were studied in an experiment. Changes of the metabolic indicis prior to and after employing hemopoietic progenitor cells were evaluated in patients with diabetes mellitus of diverse age against a background of an autoimmune lesion of the islets of the pancreas and a disturbance of regenerative processes.

Key words: diabetes mellitus pancreatic diabetes, regeneration stimulation, hemopoietic progenitor cells.

SE — “Institute of General and Urgent Surgery of Ukraine’s AMS” (Kharkiv)
Biology Research Institute of V.N.Karazin National University (Kharkiv)

Рецензент – доц. Р.Є.Булик

Buk. Med. Herald. – 2009.–Vol.13, № 4.–P.133-137

Надійшла до редакції 5.08.2009 року

© О.М.Клімова, В.В.Бойко, А.І.Божков, І.А.Вотьякова, Л.А.Дроздова, 2009

УДК 575.822+574+612.63.021+612.013+616.68

*Л.Є.Ковальчук, Р.В.Козовий, Л.С.Малофій***РОЛЬ СПАДКОВИХ, ЕКОЛОГІЧНИХ, СОЦІАЛЬНИХ ФАКТОРІВ
У ФОРМУВАННІ ТРИВАЛОСТІ ЖИТТЯ І ДОВГОЛІТТЯ**

Кафедра медичної біології з курсом медичної генетики (зав. – проф. Л.Є.Ковальчук)
Івано-Франківського національного медичного університету

Резюме. Встановлено динаміку вікового складу населення Івано-Франківської області за 1995-2005 роки: зменшення кількості людей молодших за працездатний вік на 29 %, незначні коливання частоти осіб працездатного віку та зростання частки людей літнього віку на 14,6 %. Виявлено залежність розподілу довгожителів по районах області від географічних, екологіч-

них та соціальних умов, доведено негативний вплив урбанізованого середовища, шкідливих звичок на тривалість життя та довголіття. Результати генеалогічного аналізу засвідчили спадкову схильність до формування довголіття (від 50 до 75 % у різних популяціях).

Ключові слова: довголіття, спадковість, спосіб життя.

Вступ. За останні десятиліття у більшості країн спостерігається тенденція до збільшення тривалості життя населення, що призводить до зростання кількості людей літнього віку, які прагнуть максимально продовжити період нормальної фізичної, соціальної та психологічної активності. Тому пріоритетним напрямом медицини є розробка програми антистаріння, яка повинна базуватися на глибокому знанні механізмів формування тривалості життя і довголіття. Згідно із сучасними уявленнями старіння – це сповільнення, пригнічення і втрата фізіологічних функцій організму, що супроводжуються підвищеною частотою онкологічних і дегенеративних захворювань [3]. На клітинному рівні в основі старіння лежить накопичення клітинних порушень, послаблення механізмів виживання і відновлення клітин і тканин. До молекулярних причин старіння належать мутації, порушення процесів реплікації і репарації ДНК, гліколіз білків, утворення поперечних зв'язань між макромолекулами, оксидативний стрес, метилювання тощо [1].

Результати досліджень довголіття в близнюків засвідчили, що успадкування тривалості життя в людини становить 30-40 % [7]. Так, нащадки

сторічних мали в чотири рази істотнішу імовірність прожити 85 років і більше, ніж нащадки тих, хто помер до 73 років [9]. Хоча довголіття людини значною мірою зумовлено генетичними чинниками. Екзогенні чинники, такі, як спосіб життя та харчування, також мають велике значення. Тому важливо не лише ідентифікувати гени, які впливають на тривалість життя і розвиток асоційованих з віком захворювань, але й виявити взаємовідносини між генами і чинники навколишнього середовища [2]. Необхідно також враховувати генетичний поліморфізм різних популяцій [8]. Дані досліджень внеску пропорцій генної різноманітності на всіх рівнях ієрархічної структури груп світового народонаселення свідчать, що основна її доля припадає на внутрішньопопуляційний рівень. Цим фактом пояснюються суттєві відмінності в реакції людей на тиск одного і того самого середовища [5]. Саме тому внутрішньогруповий рівень мінливості є оптимальним для визначення генетичної диференціації населення залежно від впливу чинників довкілля.

Мета дослідження. Встановлення розподілу довгожителів у поєднанні з віковою структу-