
ВЛИЯНИЕ ТРАНСПЛАНТАЦИИ ОСТРОВКОВЫХ КЛЕТОК ПОДЖЕЛУДОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ ПЛОДОВ КРОЛИКА НА ТЕЧЕНИЕ ИНДУЦИРОВАННОГО САХАРНОГО ДИАБЕТА У ЛАБОРАТОРНЫХ ЖИВОТНЫХ

И.К. Абдрахманов¹, Н.Б. Савенко², Ю.А. Кузнецов³,
М.А. Селюгин³, Л.П. Дьяконов⁴

¹Кафедра анатомии, физиологии животных и хирургии
Российский университет дружбы народов
ул. Миклухо-Маклая, 8/2, Москва, Россия, 117198

²ОАО «Российский научно-технический центр
по чрезвычайным ситуациям в агропромышленном комплексе»
ул. Садовая-Спаская, 11/1, Москва, Россия, 107139

³Ветеринарная клиника «Аверс-вет»
Машкинское ш., 15, Москва, Россия, 125466

⁴ВНИИ экспериментальной ветеринарии им. Я.Р. Коваленко
Рязанский просп., 24, Москва, Россия, 109428

В данной работе показан опыт по трансплантации островковых клеток поджелудочной железы плодов кролика лабораторным мышам со стрептозотоцин-индуцированным сахарным диабетом. Клетки были трансплантированы в печень в дозе 10^5 кл./0,5 мл. В течение 2 месяцев после ксенотрансплантации у мышей отмечалась стойкая нормогликемия.

Ключевые слова: сахарный диабет, ксенотрансплантация, бета-клетки, островковые клетки поджелудочной железы, плоды кролика, стрептозотоцин, лабораторные мыши.

Введение. Вследствие повреждения островковой ткани поджелудочной железы инсулинозависимый сахарный диабет является тяжелейшим заболеванием; он сопровождается абсолютной инсулиновой недостаточностью с выраженной гипергликемией и сопутствующими осложнениями в виде ангио-, нефро- и ретинопатий.

Трансплантация в организм больного инсулинозависимым сахарным диабетом культуры островковых клеток поджелудочной железы является перспективным способом достижения гликемического контроля, поступления эндогенного инсулина, предотвращения тяжелых гипогликемий и сопутствующих осложнений [10].

Материалом для трансплантации β -клеток поджелудочной железы могут служить клетки как животных одного вида (например, собака \rightarrow собака (аллотрансплантация)), так и разных видов (кролик \rightarrow собака (ксенотрансплантация)).

Использование кроликов в качестве источника островковых клеток для трансплантации определяется биодоступностью материала и позволяет получать значительное количество трансплантируемых клеток.

Одним из самых перспективных направлений в трансплантации островковых клеток является поиск иммунологически привилегированных зон для транспланта-

ции, позволяющих достигать длительного функционирования трансплантированных ксеногенных β -клеток без назначения иммунодепрессантов. При этом отмечается, что наиболее подходящими зонами для трансплантации островковых клеток являются тимус, семенники, костный мозг, почки, печень [2; 8; 10; 12].

Трансплантация β -клеток в печень признается наиболее эффективной многими авторами [6; 7; 10; 12; 14; 16; 18; 20], что объясняется «родственностью» этих тканей в эмбриогенезе: они берут свое начало от одного типа стволовых клеток. Кроме того, в работах по получению и дифференцировке стволовых клеток протокового эпителия поджелудочной железы показана дифференцировка этих клеток не только в β -клетки и ацинарную ткань поджелудочной железы, но и в овальные клетки печени [13].

В данной экспериментальной работе нами исследовалась перспектива использования ксеногенной культуры островковых клеток, полученной из поджелудочных желез плодов кролика, для обеспечения поступления инсулина в организм мышей с экспериментальным (стрептозотоциновым) сахарным диабетом.

Методы. Животные. В работе были использованы мыши породы BALB/c весом 25—30 г, самки, в количестве 30 голов (РОИЦ РАМН). Все эксперименты проводились согласно требованиям Всемирного общества защиты животных (WSPA) и Европейской конвенции по защите экспериментальных животных.

Все животные содержались на базе вивария РОИЦ РАМН. Лабораторный диабет у мышей вызывали внутривенным введением стрептозотоцина (STZ) (Sigma, # S 0130) в дозе 150 мг/кг веса. Через 10 дней после введения стрептозотоцина производили контроль гликемии в крови глюкометром (Accu-Chek Active, Roshe) и при уровне глюкозы выше 10,0 ммоль/л производили ксенотрансплантацию культуры фетальных островковых клеток. Две мыши к этому сроку погибли от гипергликемии. Все животные были разделены на 3 группы:

- здоровые животные без трансплантации (10 гол.) (контроль);
- животные с лабораторным диабетом без трансплантации (9 гол.) (диабет);
- животные с лабораторным диабетом с трансплантацией β -клеток (9 гол.) (диабет + трансплантация).

Получение и культивирование фетальных островковых клеток. Фетальные островковые клетки кролика выделяли из плодов 25—30 сут. развития. Материал для выделения получали в питомнике по выращиванию кроликов ООО «Алькона» (пос. Дубровицы, Московская обл.). Поджелудочные железы плодов стерильно извлекали, измельчали и инкубировали в среде 199 с добавлением 1,5 мг/мл коллагеназы (Sigma, # C-0130). После этого суспензию клеток пипеттировали и переносили в культуральные флаконы (Corning), содержащие среду 199 с добавлением 10% фетальной телячьей сыворотки. Клетки культивировали в течение 7—10 дней до трансплантации. При этом клетки проверялись на бактериальную, вирусную и микоплазменную загрязненность. Кроме того, данные клетки тестировались нами на туморогенность *in vitro* по характеру роста культуры и *in vivo* на иммунодефицитных мышах.

Цитохимическое и иммуноцитохимическое окрашивание клеток. Цитохимическое окрашивание β -клеток на инсулин проводили альдегид-фуксином по методу Гомори. Иммуноцитохимию осуществляли с использованием первичных ан-

тиинсулиновых мышинных антител (Sigma, # I-2018) и вторичных антивидовых антител, меченных FITC (Sigma, # F-8771). Детекцию окрашенных клеток проводили на флуоресцентном инвертированном микроскопе Olympus.

Трансплантация. Перед трансплантацией клетки отмывали от питательной среды и сыворотки, снимали с культурального пластика, центрифугировали и ресуспендировали в физиологическом растворе и помещали в инсулиновый шприц из расчета 10^5 кл./0,5 мл раствора на животное.

Под общей анестезией (рометар, золетил) мышам делали лапаротомию и интрапаренхиматозно вводили суспензию клеток (3 инъекции иглы на печень). После этого мышечный и кожный слои раны ушивали. Оценку эффективности трансплантации оценивали измерением уровня глюкозы в крови глюкометром (Accu-Chek Active, Roshe) на 1-й, 3-й, 7, 14, 21, 28, 35, 42, 49-й, 56-й дни после трансплантации.

Результаты исследования. Нами была получена культура β -клеток плодов кролика, представляющая собой популяцию мелких, округлых клеток, плотно упакованных в кластеры различного размера, свободно плавающих в суспензии либо прикрепляющихся к субстрату на 7—10-й день культивирования (рис. 1, 2). Цитохимическое и иммуноцитохимическое окрашивание показало высокое содержание инсулина в цитоплазме этих клеток (рис. 3).

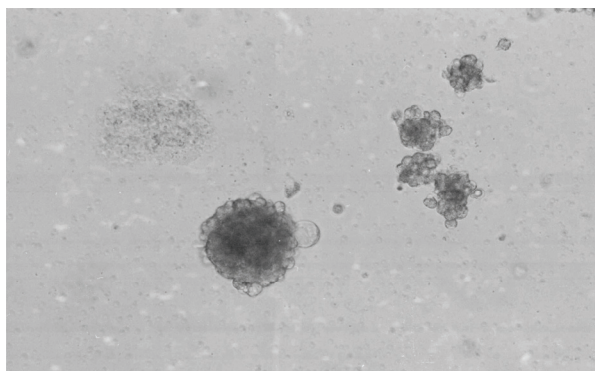


Рис. 1. β -клетки плода кролика, 5-е сутки культивирования (нативный препарат, ув. $\times 100$)

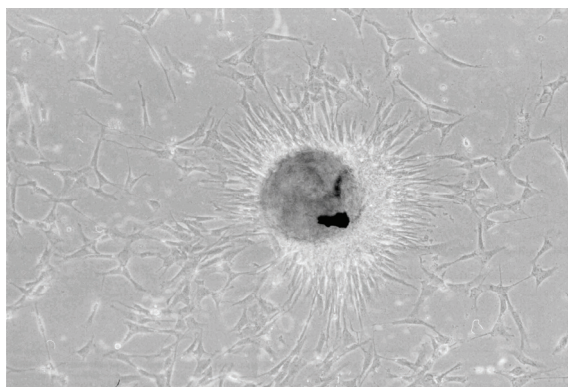


Рис. 2. β -клетки плода кролика, 10-е сутки культивирования (нативный препарат, ув. $\times 100$)

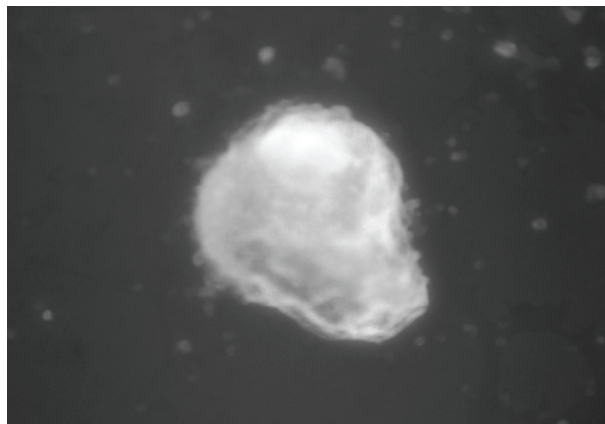


Рис. 3. Иммуноцитохимическое окрашивание β -клеток на инсулин (краситель FITC, ув. $\times 100$)

Определение содержания глюкозы в крови через 10 дней после введения STZ показало, что у всех 18 оставшихся в живых мышей уровень глюкозы был значительно выше нормы и превышал 20 ммоль/л, что позволило говорить о стойкой гипергликемии (табл.).

Таблица

Характеристики экспериментальных групп

Сут. после трансплантации	Группы и показатели					
	контроль		диабет		диабет + трансплантация	
	уровень глюкозы, ммоль/л	вес, г	уровень глюкозы, ммоль/л	вес, г	уровень глюкозы, ммоль/л	вес, г
-1	7,1 \pm 0,3	27 \pm 0,4	20,3 \pm 0,5	23,4 \pm 0,4	20,8 \pm 0,5	22,8 \pm 0,4
1	7,0 \pm 0,2	27,2 \pm 0,5	23,5 \pm 0,7	23,7 \pm 0,5	21,3 \pm 0,8	23,4 \pm 0,5
3	7,5 \pm 0,3	26,8 \pm 0,4	25,8 \pm 0,3	21,9 \pm 0,4	17,5 \pm 0,7	23,0 \pm 0,5
7	7,3 \pm 0,4	28,1 \pm 0,3	38,2 \pm 0,5	20,4 \pm 0,2	12,8 \pm 0,6	23,5 \pm 0,4
14	7,1 \pm 0,4	27,8 \pm 0,5	—	—	10,4 \pm 0,3	23,7 \pm 0,3
21	7,4 \pm 0,3	28,2 \pm 0,4	—	—	8,2 \pm 0,7	24,1 \pm 0,4
28	7,4 \pm 0,2	28,0 \pm 0,3	—	—	8,3 \pm 0,4	25,1 \pm 0,5
35	7,0 \pm 0,3	28,0 \pm 0,4	—	—	7,9 \pm 0,3	27,2 \pm 0,6
42	7,8 \pm 0,4	29,4 \pm 0,5	—	—	7,8 \pm 0,5	28,0 \pm 0,4
49	7,2 \pm 0,3	29,5 \pm 0,3	—	—	7,1 \pm 0,4	27,2 \pm 0,5
56	7,3 \pm 0,3	29,3 \pm 0,4	—	—	6,9 \pm 0,4	28,4 \pm 0,4

После трансплантации в печень суспензии β -клеток у 7 из 8 мышей (88%) группы «диабет + трансплантация» на 21-е сутки установилась нормогликемия (8,2 \pm 0,7), что, в принципе, говорило о сохранившейся способности трансплантированных β -клеток к выделению инсулина. Одновременно произошла стабилизация массы тела и нормализация потребления воды. Эти животные оставались нормогликемическими в течение 8 недель без всякой иммуносупрессии.

В группе «диабет» (животные с экспериментальным диабетом без трансплантации) отмечалось ухудшение общего состояния животных, нарастание всех признаков диабета, стойкая гипергликемия (20—38 ммоль/л). Одна мышь погибла на 13-й день после введения STZ, 3 мыши — на 14-й день, 5 мышей погибли к 17-у дню эксперимента. Вес больных животных (20—23 г) снизился с начала эксперимента на 20—25%.

В группе «контроль» все животные не имели изменений общего состояния и веса, анализ крови показывал стойкую нормогликемию (7,1—7,8 ммоль/л).

Динамика изменений средних значений уровня глюкозы в крови лабораторных мышей в экспериментальных группах отражена на рис. 4.

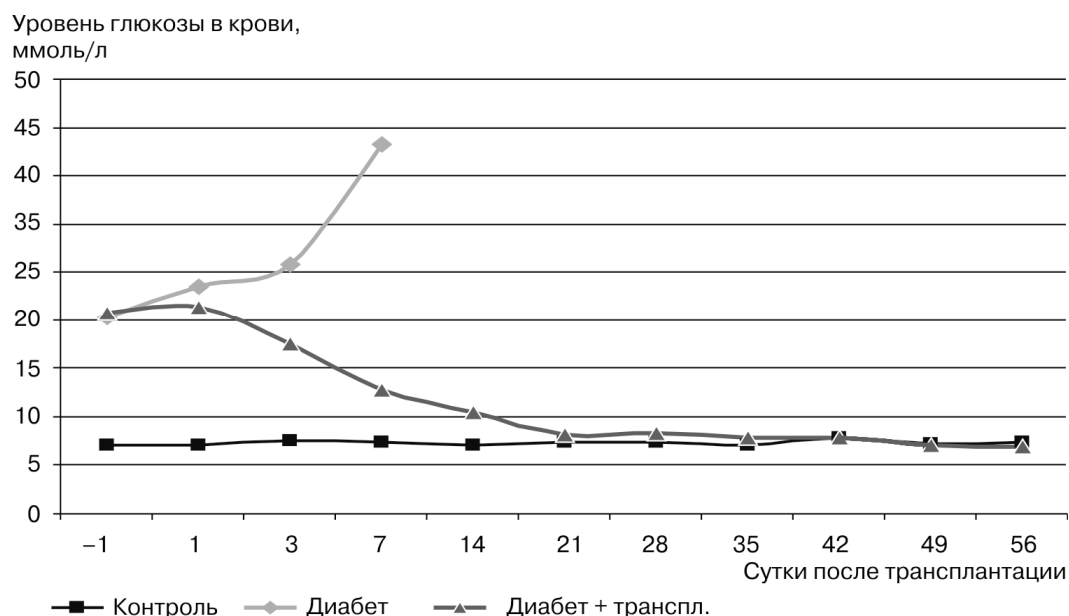


Рис. 4. Динамика изменения уровня глюкозы в крови лабораторных мышей с индуцированным (STZ) сахарным диабетом

Заключение. Данные, представленные в научной литературе, и наши эксперименты показали, что β -клетки плодов кролика в культуре формируют гомогенную популяцию клеток, активно накапливающих в своей цитоплазме инсулин.

Показано, что трансплантация культуры фетальных кроличьих β -клеток животным с экспериментальным сахарным диабетом позволяет добиться снижения уровня сахара в крови и его нормализации на протяжении всего срока наблюдения (60 дней) без введения экзогенного инсулина. Кроме того, нормализация уровня глюкозы после трансплантации происходит без применения каких-либо иммуносупрессантов. Таким образом, очищенные путем культивирования островковые клетки плодов кролика могут быть использованы для ксенотрансплантации животным при лечении инсулинозависимого сахарного диабета.

ЛИТЕРАТУРА

- [1] Дедов И.И., Балаболкин М.И., Клебанова Е.М. Современные аспекты трансплантации островков поджелудочной железы при сахарном диабете / Материалы 3-го Всеросс. диabetологич. конгр. — М., 2004.
- [2] Леонович С.И., Слука Б.А., Игнатович И.Н., Горанов В.А. Трансплантация культуры островковых клеток поджелудочной железы в красный костный мозг // Белорусск. мед. журн. — 2004. — № 1. — С. 44.
- [3] Скалецкий Н.Н., Курсанова Л.А., Блюмки В.Н. // Проблемы трансплантологии и искусственных органов. — М., 1994. — С. 73—80.
- [4] Шумаков В.И., Блюмки В.Н., Игнатенко С.Н. и др. // Пробл. эндокринол. — 1985. — № 5. — С. 67—70.
- [5] Шумаков В.И., Блюмки В.Н., Скалецкий Н.Н. и др. Трансплантация островковых клеток поджелудочной железы. — М.: Канон, 1995.
- [6] Alejandro R., Caulfield A., Fround T. et al. // Cell Transplant. — 2001. — Vol. 10. — P. 520.
- [7] Alejandro R., Ferreira J.V., Caulfield A. et al. // Am. J. Transplant. — 2002. — Vol. 2. — Suppl. 3. — P. 227.
- [8] Berney T., Bühler L., Caulfield A., Oberholzer J., Toso Ch., Alejandro R. Transplantation of islets of Langerhans: new developments // Swiss. Med. Wkly. — 2002. — 132. — P. 671—680.
- [9] Bretzel R.G., Manus E., Schomber C. The liver as a site for implantation of islets of Langerhans in experimental diabetes // Morphologic and metabolic observation. — Acta Endocrinol. — 1978. — 87. — Suppl. 215. — P. 69.
- [10] Federlin K., Pozza G. Indications for clinical islet transplantation today and in the foreseeable future — the diabetologist's point of view // J. Mol. Med. — 1999. — 77. — P. 148—152.
- [11] Henryk Zulewski, Elizabeth J. Abraham, Melissa J. Gerlach, et al. Multipotential Nestin-Positive Stem Cells Isolated From Adult Pancreatic Islets Differentiate Ex Vivo Into Pancreatic Endocrine, Exocrine, and Hepatic Phenotypes // Diabetes. — 2001. — Vol. 50.
- [12] Kolb E., Largiader F. Clinical islet transplantation // Transpl. Proc. — 1980. — 12. — № 4. — P. 205—207.
- [13] Lechner A., Habener J. Stem/progenitor cells derived from adult tissues: potential for the treatment of diabetes mellitus // AJP-Endocrinol Metab. — 2003. — V. 284.
- [14] Najarian J.S., Sutherland D.E.R. et al. Human islet autotransplantation. A preliminary report // Transplant. Proc. — 1977. — 9. — № 1. — P. 233—236.
- [15] Nielsen J., Svensson C., Galsgaard E. Beta cell proliferation and growth factors // J. Mol. Med. — 1999. — 77. — P. 62—66.
- [16] Oberholzer et al. β Cell Replacement for the Treatment of Diabetes // Annals of the New York Academy of Sciences. — 2001. — 944. — P. 373—387.
- [17] Richardt M., Menden A., Bretzel R. Islet transplantation in experimental diabetes of the rat // Hormone and metab. Res. — 1984. — 16. — № 10. — P. 551—552.
- [18] Shapiro A.M., Lakey J.R., Ryan E.A. et al. // N. Engl. J. Med. — 2000. — V. 27. — P. 230—238.
- [19] Song K. et al. In vitro transdifferentiation of adult pancreatic acinar cells into insulin-expressing cells // Biochem Biophys Res Commun. — 2004. — 316. — P. 1094—1100.
- [20] Valente U., Ferro M., Barocci S. Report of clinical cases of human fetal transplantation // Transplant. Proc. — 1980. — 12. — № 4. — P. 213—214.
- [21] Vijayakumar K., Ramiy A., Maraist Met al. Reversal of insulin-dependent diabetes using islets generated in vitro from pancreatic stem cells // Nature Medicine. — 2000. — V. 6. — № 3.
- [22] Berney T., Bühler L., Caulfield A., Oberholzer J., Toso Ch., Alejandro R. Transplantation of islets of Langerhans: new developments // Swiss. Med. Wkly. — 2002. — 132. — P. 671—680.

EFFECT OF TRANSPLANTATION OF FETAL RABBIT ISLETS OF LANGERHANS TO STREPTOZOTOCIN-INDUCED DIABETIC MICE

**I.K. Abdrakhmanov¹, N.B. Savenko², Yu.A. Kuznetsov³,
M.A. Selyugin³, L.P. Dyakonov⁴**

¹Department of anatomy, physiology of animals and surgery
Russian People's Friendship University
Miklukho-Maklaya Str., 8/2, Moscow, Russia, 117198

²JSC «Russian R&D Center of agriculture emergency»
Sadovaya-Spasskaya Str., 11/1, Moscow, Russia, 107139

³Veterinary clinic «Avers-vet»
Mashkinskoe shosse, 15, Moscow, Russia, 125466

⁴Kovalenko Institute of experimental veterinary
Russian People's Friendship University
Ryazansky prospect, 24, Moscow, Russia, 109428

This article is about the trial of transplantation of fetal cells of pancreas to laboratory mice with streptozotocin diabetes. Cells were infused into liver in the dose of 10^5 cells/0,5 ml. Mice that received rabbit β -cells had normal level blood glucose within 2 months after xenotransplantation.

Key words: diabetes, xenotransplantation, beta cells, pancreatic islet cells, rabbit embryo, streptozotocin, laboratory mice.