

---

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

И.К. Абдрахманов<sup>1</sup>, Н.Б. Савенко<sup>2</sup>, Ю.А. Кузнецов<sup>3</sup>,  
М.А. Селюгин<sup>3</sup>, Л.П. Дьяконов<sup>4</sup>

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

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

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

<sup>4</sup>ВНИИ 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  $\beta$ -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  $\beta$ -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  $\beta$ -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  $\beta$ -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  $\beta$ -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.

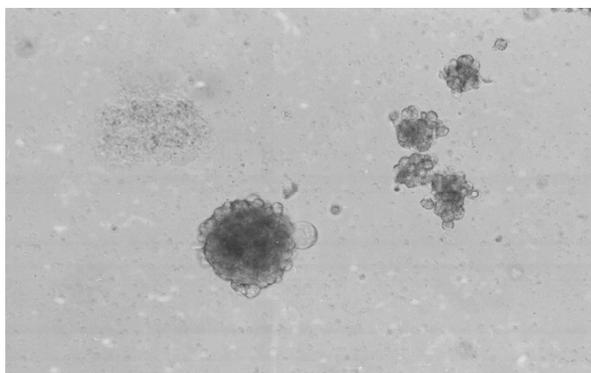
*Цитохимическое и иммуноцитохимическое окрашивание клеток.* Цитохимическое окрашивание  $\beta$ -клеток на инсулин проводили альдегид-фуксином по методу Гомори. Иммуноцитохимию осуществляли с использованием первичных ан-

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

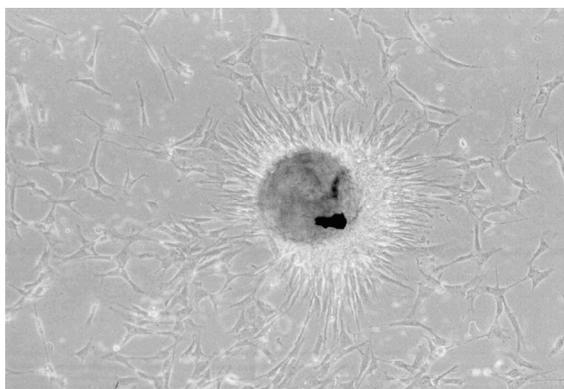
**Трансплантация.** Перед трансплантацией клетки отмывали от питательной среды и сыворотки, снимали с культурального пластика, центрифугировали и ресуспендировали в физиологическом растворе и помещали в инсулиновый шприц из расчета  $10^5$  кл./0,5 мл раствора на животное.

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.

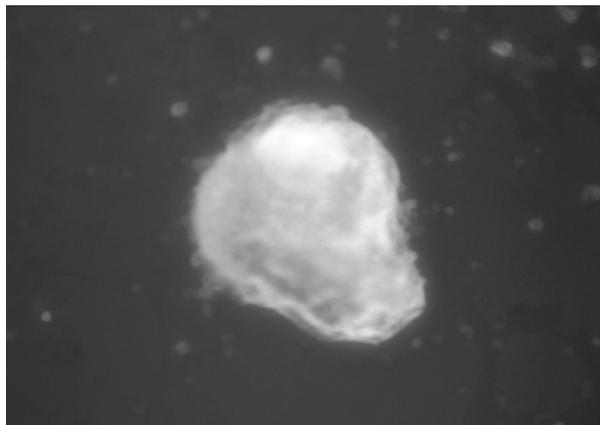
**Результаты исследования.** Нами была получена культура  $\beta$ -клеток плодов кролика, представляющая собой популяцию мелких, округлых клеток, плотно упакованных в кластеры различного размера, свободно плавающих в суспензии либо прикрепляющихся к субстрату на 7—10-й день культивирования (рис. 1, 2).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



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



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



**Рис. 3.** Иммуноцитохимическое окрашивание  $\beta$ -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**

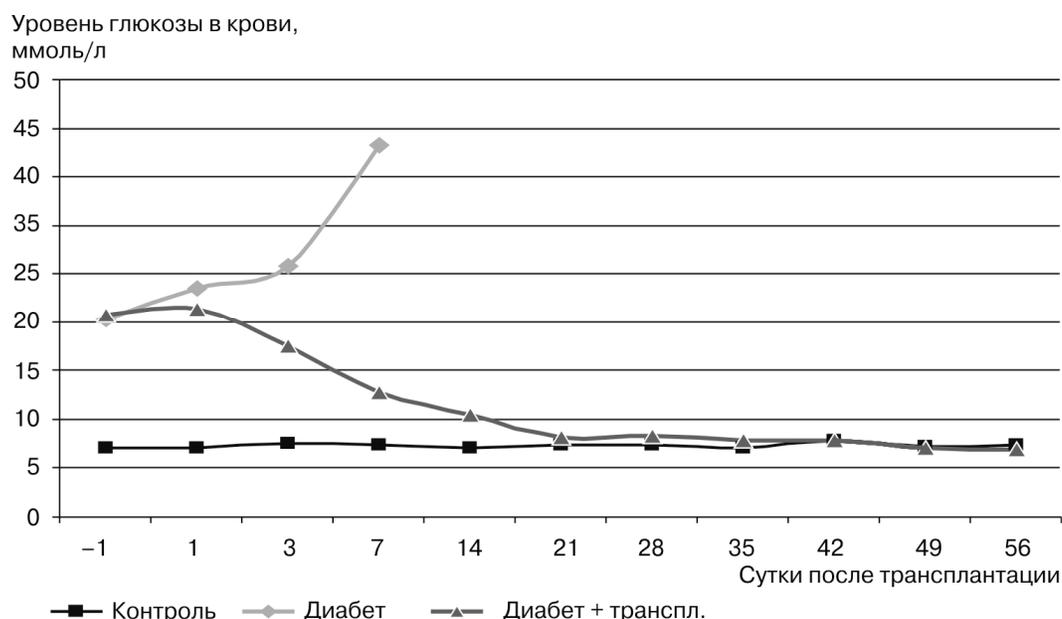
Сут. после трансплантации	Группы и показатели					
	контроль		диабет		диабет + трансплантация	
	уровень глюкозы, ммоль/л	вес, г	уровень глюкозы, ммоль/л	вес, г	уровень глюкозы, ммоль/л	вес, г
-1	7,1 $\pm$ 0,3	27 $\pm$ 0,4	20,3 $\pm$ 0,5	23,4 $\pm$ 0,4	20,8 $\pm$ 0,5	22,8 $\pm$ 0,4
1	7,0 $\pm$ 0,2	27,2 $\pm$ 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  $\beta$ -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  $\beta$ -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  $\beta$ -клетки плодов кролика в культуре формируют гомогенную популяцию клеток, активно накапливающих в своей цитоплазме инсулин.

Показано, что трансплантация культуры фетальных кроличьих  $\beta$ -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., Блюмкин В.Н. // Проблемы трансплантологии и искусственных органов. — М., 1994. — С. 73—80.
- [4] Шумаков В.И., Блюмкин В.Н., Игнатенко С.Н. и др. // Пробл. эндокринол. — 1985. — № 5. — С. 67—70.
- [5] Шумаков В.И., Блюмкин 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.  $\beta$  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. Abdrakhmanov<sup>1</sup>, N.B. Savenko<sup>2</sup>, Yu.A. Kuznetsov<sup>3</sup>,  
M.A. Selyugin<sup>3</sup>, L.P. Dyakonov<sup>4</sup>**

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

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

<sup>3</sup>Veterinary clinic «Avers-vet»  
*Mashkinskoe shosse, 15, Moscow, Russia, 125466*

<sup>4</sup>Kovalenko 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  $\beta$ -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.