

## ••• ФІЗІОЛОГІЯ ЛЮДИНИ ТА ТВАРИН ••• ••• PHYSIOLOGY OF HUMAN AND ANIMALS •••

УДК: 616.37.089.843

### Применение интестинальной подслизистой оболочки для инкапсуляции островков поджелудочной железы при ксенотрансплантации

Г.А.Божок<sup>1</sup>, О.С.Сидоренко<sup>2</sup>, Н.В.Колот<sup>2</sup>, Е.І.Легач<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины (Харьков, Украина)

<sup>2</sup>Харьковский национальный университет имени В.Н.Каразина (Харьков, Украина)  
bozhokgaru@mail.ru

Исследовали динамику изменения уровня глюкозы в крови кроликов с экспериментальным сахарным диабетом 1 типа после ксенотрансплантации островков поджелудочной железы, инкапсулированных в интестинальную подслизистую оболочку (ИПО). Трансплантация островков поджелудочной железы, инкапсулированных в ИПО, не приводит к снижению уровня глюкозы в крови животных-реципиентов из-за гибели инкапсулированных островков вследствие развития фиброза капсулы и нарушения их трофической поддержки.

**Ключевые слова:** сахарный диабет 1 типа, ксенотрансплантация, островки поджелудочной железы, инкапсуляция, интестинальная подслизистая оболочка.

### Застосування інтестинальної підслизової оболонки для інкапсуляції острівців підшлункової залози при ксенотрансплантації

Г.А.Божок, О.С.Сидоренко, Н.В.Колот, Є.І.Легач

Досліджували динаміку змін рівня глюкози в крові кроликів з експериментальним цукровим діабетом 1 типу після ксенотрансплантації острівців підшлункової залози, інкапсульованих в інтестинальну підслизову оболонку (ІПО). Трансплантація острівців підшлункової залози, інкапсульованих в ІПО, не призводить до зниження рівня глюкози в крові тварин-реципієнтів через загибель інкапсульованих острівців внаслідок розвитку фіброзу капсули та порушення їх трофічної підтримки.

**Ключові слова:** цукровий діабет 1 типу, ксенотрансплантація, острівці підшлункової залози, інкапсуляція, інтестинальна підслизова оболонка.

### Application of small intestinal submucosa for the pancreatic islets incapsulation at xenotransplantation

G.A.Bozhok, O.S.Sidorenko, N.V.Kolot, E.I.Legach

Dynamics of glucose blood level changes after xenotransplantation of pancreatic islets incapsulated into small intestinal submucosa (SIS) was investigated in rabbits with experimental type 1 diabetes mellitus. SIS-incapsulated pancreatic islets transplantation did not lead to decrease of glucose blood level in recipient animals due to the death of incapsulated islets as a result of fibrosis and deficit of trophic supply.

**Key words:** type 1 diabetes mellitus, xenotransplantation, pancreatic islets, incapsulation, small intestinal submucosa.

#### Введение

Сахарный диабет – распространённая болезнь, занимает третье место среди причин смертности после сердечно-сосудистых заболеваний и рака. Это хроническое эндокринно-обменное заболевание, характеризующееся гипергликемией, глюкозурией и обусловленное абсолютной или относительной инсулиновой недостаточностью (Балаболкин, 1998). Повышенный уровень глюкозы в крови при инсулинозависимом сахарном диабете (ИЗСД, диабет 1 типа) является причиной гликозилирования белков, что приводит к развитию так называемых поздних осложнений диабета (диабетические макро- и микроангиопатии, нейропатии) (Балаболкин, 1998; Емельянов, 2006). Учитывая, что инсулинозависимый сахарный диабет начинается обычно в юношеском возрасте и

приводит к ранней инвалидизации и уменьшению продолжительности жизни больных, данное заболевание является одной из важнейших медико-социальных проблем.

В настоящее время для стабилизации уровня глюкозы в крови и коррекции состояния больных ИЗСД применяются ежедневные многократные (от 3 до 5) инъекции или непрерывное подкожное введение инсулина с помощью инсулиновых помп (Емельянов, 2006). Но, поскольку заместительная гормональная терапия не может в точности повторить функционирование желез внутренней секреции и не способна предупреждать развитие и прогрессирование поздних осложнений диабета, ведутся активные поиски альтернативных, более «физиологичных» способов коррекции инсулиновой недостаточности. Одним из таких способов является трансплантация островков поджелудочной железы (ОПЖ). Поскольку клиническое применение аллотрансплантации связано с множеством трудностей (недостаточное количество донорского материала, этические и юридические проблемы), перспективным является развитие ксенотрансплантации с использованием органов и тканей новорожденных животных. Эффективность ксенотрансплантации ОПЖ была подтверждена не только в экспериментальных постановках (Прохоров и др., 2004), но и в клинических исследованиях (Luzi et al., 1996).

Как известно, генетически чужеродные трансплантаты подвергаются атаке со стороны иммунной системы реципиента, что приводит к их отторжению. Чтобы избежать применения иммунодепрессантов, оказывающих негативное влияние как на жизнеспособность трансплантированных ОПЖ, так и на организм реципиента в целом, для защиты клеточных трансплантатов применяется макро- и микроинкапсуляция ОПЖ в иммуноизолирующие материалы. Материалы, используемые для изготовления капсул, должны обладать рядом свойств: биосовместимостью, низкой иммуногенностью, пористой структурой, проницаемостью для питательных веществ, кислорода и клеточных метаболитов. С другой стороны, они должны защищать трансплантат от иммунокомпетентных клеток реципиента.

Для изготовления микрокапсул используются различные материалы: альгинат (Наханов и др., 2008), агароза, полибрен, полистироловая сульфоновая кислота, карбоксиметилцеллюлоза (Kawakami et al., 1997). Островки поджелудочной железы, заключенные в капсулы на основе этих материалов, сохраняли функциональную активность при культивировании *in vitro*, а также в организме животных с экспериментальным сахарным диабетом (Наханов и др., 2008; Kawakami et al., 1997; Valerie et al., 2001). При трансплантации островков поджелудочной железы, заключенных в макрокапсулы из нейлона и полиамида (Прохоров и др., 2004), животным с экспериментальным сахарным диабетом наблюдалось снижение уровня глюкозы в крови, что свидетельствовало о функциональной активности таких островков.

Интестинальная подслизистая оболочка (ИПО) – биоматериал, полученный из тонкого кишечника поросят, – рассматривается как один из кандидатов для создания макрокапсулы, окружающей трансплантат. ИПО – сравнительно бесклеточный матрикс с коллагеновой основой, полученный путем механического удаления слизистого и гладкомышечных слоев тонкого кишечника. Коллагеновый матрикс содержит хорошо сохранившийся коллаген, гликопротеин, протеогликан и гликоаминогликан в их естественной конфигурации и концентрации. Кроме того, ИПО содержит различные ростовые факторы, такие как фактор роста фибробластов 2 (FGF-2), трансформирующий фактор роста  $\beta$  (TGF- $\beta$ ) и фактор роста эндотелиальных клеток сосудов (VEGF), которые способствуют росту клеток (Xiao-Hui et al., 2005). ИПО широко применяется в экспериментальной хирургии в качестве биологического каркаса для восстановления поврежденной стенки мочевого пузыря (Badylak et al., 1998), аорты (Hiles et al., 1995) и других органов. Пористая структура и трехмерная микроархитектура ИПО допускает диффузию питательных веществ и индуцирует пролиферацию, восстановление и регенерацию ткани хозяина (Xiao-Hui et al., 2005).

Учитывая механические и морфологические свойства ИПО, содержание в ней различных ростовых факторов, низкую иммуногенность, а также положительное влияние на структурно-функциональные свойства островков поджелудочной железы в условиях *in vitro* (Xiao-Hui et al., 2005), мы исследовали возможность использования ИПО в качестве иммуноизолирующего материала при трансплантации островков поджелудочной железы кроликам с экспериментальным сахарным диабетом 1 типа. Целью данной работы было изучение функциональной активности островков поджелудочной железы половозрелых крыс и новорожденных поросят, заключенных в капсулу из ИПО, *in vivo* в организме кроликов с экспериментальным сахарным диабетом при трансплантации.

#### **Объекты и методы исследования**

Все манипуляции с животными проводили в соответствии с положениями «Европейской конвенции о защите позвоночных животных, используемых для экспериментальных и других научных

целей» (Страсбург, 1985) и национальными нормами по биоэтике (I Национальный конгресс по биоэтике, Киев, 2001).

Исследования проводили на половозрелых самцах кроликов (*Oryctolagus cuniculus*) породы шиншилла возрастом 5–6 месяцев, массой 2,5–3,0 кг. Для получения островков поджелудочной железы использовали половозрелые самцы крыс линии Вистар и новорожденные поросята пород крупная белая и украинская мясная.

Сахарный диабет вызывали однократным введением раствора аллоксана тетрагидрата (Sigma, США) в ушную вену кроликов из расчета 100 мг/1 кг массы тела животного. Непосредственно перед введением необходимую массу кристаллического аллоксана тетрагидрата разводили в 2 мл стерильного физиологического раствора.

Новорожденных поросят после легкого эфирного наркоза забивали гильотированием. Поджелудочные железы после выделения помещали в охлажденный стерильный раствор Хэнкса, содержащий 0,25% BSA, 10 мМ Нерес и антибиотики, в котором производили измельчение панкреатической ткани на фрагменты размером 0,5–1 мм<sup>3</sup>, отмывали 3–4 раза от крови этим же раствором. Инкубировали в течение 15 минут при 37°C в растворе Хэнкса, который содержал 5 мг/мл коллагеназы типа IA, затем дважды отмывали раствором Хэнкса с антибиотиками и протирали через нейлоновую сетку с диаметром ячеек >200 мкм. Полученная суспензия содержала как одиночные клетки, так и ОПЖ в количестве 2–6 × 10<sup>5</sup> островков/мл.

Для выделения островков поджелудочной железы крыс в панкреатический проток животных вводили 2 мл раствора коллагеназы типа IA с концентрацией 1 мг/мл. Затем выделяли поджелудочную железу и помещали ее в питательную среду, приготовленную на основе физиологического раствора и содержащую 0,25% BSA, 10 мМ Нерес и антибиотики. Производили измельчение панкреатической ткани на фрагменты размером около 0,5–1 мм<sup>3</sup>. Затем 2–3 раза отмывали измельченную ткань той же питательной средой от фрагментов жировой ткани. Инкубировали в течение 5 минут при 37°C в питательной среде, содержащей 2,5 мг/мл коллагеназы типа IA, осторожно пипетировали, затем дважды отмывали питательной средой с антибиотиками. Полученная суспензия содержала как одиночные клетки, так и ОПЖ в количестве 6–7 × 10<sup>5</sup> островков/мл.

Полученные 3 мл суспензии клеток и ОПЖ наслаивали на ступенчатый градиент плотности фиколла (1,040, 1,080, 1,089, 1,094, 1,100 г/см<sup>3</sup>) и подвергали центрифугированию в течение 12 минут при 225 g. Затем в стерильных условиях отбирали образовавшиеся при разделении фракции и осадок клеток, дважды отмывали от фиколла средой 199 с антибиотиками.

Идентификацию β-клеток в полученной суспензии проводили, используя раствор дитизона в конечной концентрации 0,15 мг/мл. Клетки, содержащие инсулин, окрашивались в пурпурно-красный цвет (Пирс, 1962).

Фрагменты интестинальной подслизистой оболочки получали из тощей кишки новорожденных поросят путем механического удаления слизистой оболочки и гладкомышечных слоев. Затем полученный материал отмывали 0,4% раствором фурацилина и до использования хранили в 96% этиловом спирте.

Для трансплантации были отобраны экспериментальные животные с сахарным диабетом, у которых уровень глюкозы в крови был выше 22 ммоль/л. Трансплантацию ОПЖ проводили в стерильных условиях с использованием комбинированной кетамин-ксилазиновой анестезии (1 мг кетамин и 0,5 мг ксилазина / 1 кг массы тела животного). Доза трансплантационного материала соответствовала количеству ОПЖ, полученных из 3 ПЖ половозрелых крыс и 3 ПЖ новорожденных поросят на одного реципиента, что составляло 6–7 × 10<sup>5</sup> и 2–6 × 10<sup>5</sup> островков/мл соответственно.

Полученные ОПЖ, ресуспендированные в 2 мл питательной среды, помещали в капсулу из интестинальной подслизистой оболочки и трансплантировали под кожу кроликам с аллоксановым диабетом (рис. 2, а).

Иммуносупрессивная терапия не использовалась. Спустя 28 дней с момента трансплантации проводили забой животных.

Уровень глюкозы в крови определяли еженедельно при помощи индикаторных пластинок «Гемоглан» на глюкометре Глюкофот-II.

Специфическое гистохимическое окрашивание парафиновых срезов для выявления ОПЖ проводили по методу Магера (Пирс, 1962), используя дитизоновый раствор.

Гистологическому исследованию подвергались собственные ПЖ экспериментальных животных, а также трансплантаты, заключенные в ИПО. Органы для гистологического анализа помещали в 10% нейтральный раствор формалина, заливали в парафин; приготовленные на микротоме срезы 5–7 мкм окрашивали гематоксилином и эозином.

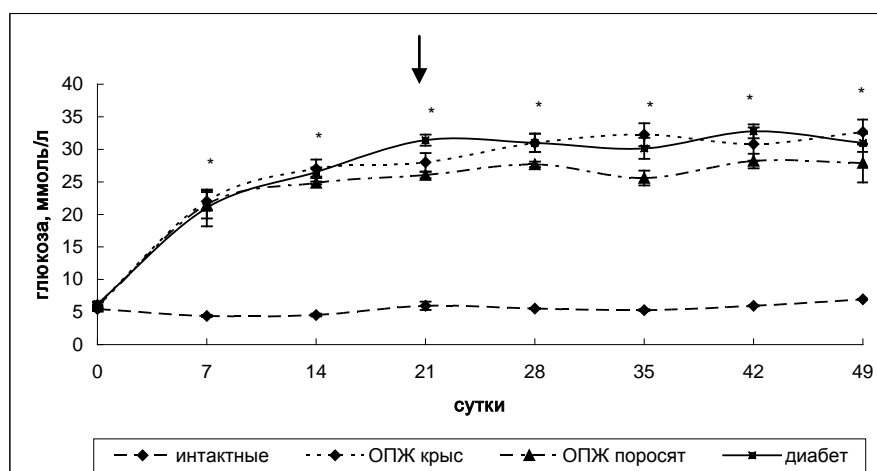
Статистическую обработку данных проводили с использованием критериев Стьюдента и Фишера.

### Результаты и обсуждение

Введение аллоксана экспериментальным животным сопровождается деструкцией и гибелью  $\beta$ -клеток поджелудочной железы, что приводит к сбою физиологических процессов, контролируемых инсулином, и, в первую очередь, нарушению углеводного обмена (Варданян, Галоян, 2002).

В нашем эксперименте уже через несколько дней после введения аллоксана у животных наблюдалось увеличение уровня глюкозы в крови, а к моменту операции, т.е. на 21 сутки, гипергликемия составляла в среднем  $28,75 \pm 2,73$  ммоль/л, превышая среднее значение данного показателя у интактных животных ( $5,95 \pm 0,64$  ммоль/л) более чем в 4 раза (рис. 1).

Гипергликемическое состояние сопровождалось другими признаками развития СД 1 типа: полифагией, полидипсией, полиурией. После трансплантации инкапсулированных ОПЖ не наблюдалось снижения уровня глюкозы в крови животных-реципиентов, который оставался высоким до конца периода наблюдения (рис. 1).



**Рис. 1.** Динамика гликемии у контрольных животных, а также у животных с экспериментальным СД до и после трансплантации. Стрелкой обозначен день введения трансплантата

*Примечание:* \* –  $p < 0,05$  по сравнению с интактными животными.

В наших предыдущих исследованиях интрапортальная и внутриселезеночная ксенотрансплантации ОПЖ способствовали нормализации уровня глюкозы в крови и других показателей углеводного обмена у кроликов с экспериментальным сахарным диабетом 1 типа (Легач и др., 2008).

Однако в данной работе трансплантация инкапсулированных островков как половозрелых крыс, так и новорожденных поросят не привела к уменьшению уровня глюкозы в крови животных с экспериментальным сахарным диабетом.

Известно, что к периоду полового созревания у крыс количество островков в поджелудочной железе и  $\beta$ -клеток в островках заметно снижается (Баранов и др., 1983). Кроме того, клетки и ткани взрослых животных более иммуногенны по сравнению с клетками плодов или новорожденных животных. Но отсутствие сахароснижающего эффекта может быть связано не с возрастом или видом доноров, а с особенностями самой капсулы.

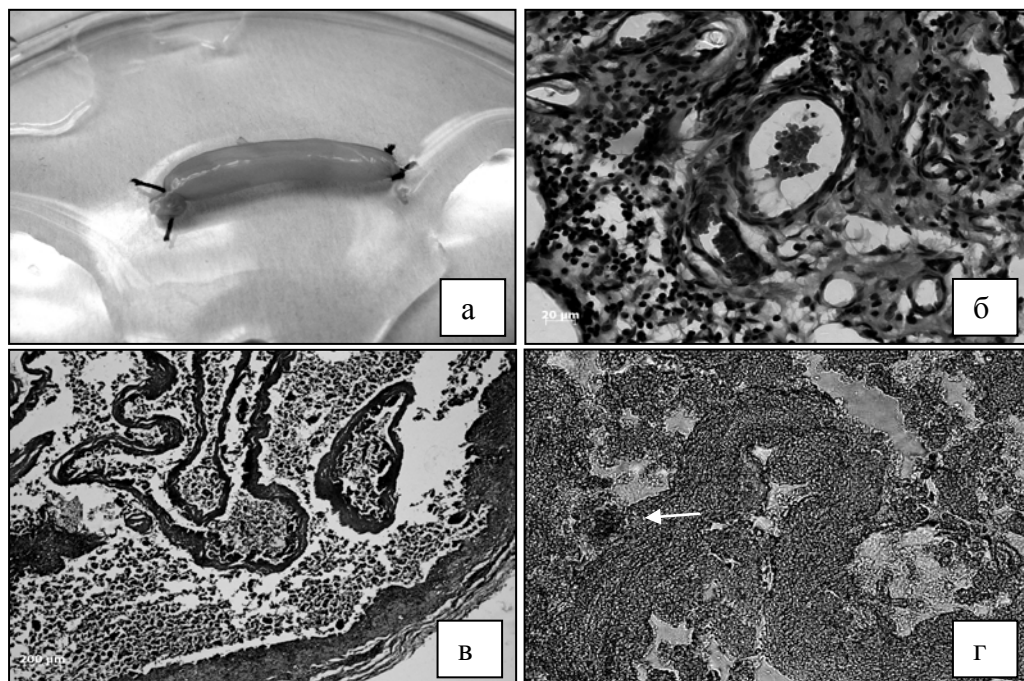
В ряде работ (Прохоров и др., 2004; Fritschy et al., 1994) макро- и микроинкапсуляция ОПЖ сопровождалась развитием фиброза инкапсулированных частиц вследствие недостаточной биосовместимости применяемых материалов, что приводило к недостаточному поступлению питательных веществ к островкам, а также препятствовало оттоку метаболитов, в частности инсулина.

Известно, что для нормального функционирования трансплантированных островков в организме реципиента необходимо формирование полноценной сосудистой сети и адекватного кровоснабжения для поступления кислорода и питательных веществ к трансплантату (Mattsson et al., 2002). В настоящей работе отсутствие сахароснижающего эффекта после трансплантации

инкапсулированных ОПЖ могло быть связано с несколькими факторами: 1) деструкцией островков вследствие недостаточной трофической поддержки; 2) фиброзом капсулы; 3) отсутствием неоваскуляризации. Для проверки этих предположений был проведен гистологический анализ инкапсулированных трансплантатов.

Гистологический анализ капсул, проведенный на 28 сутки посттрансплантационного периода, показал наличие в их стенках кровеносных сосудов, что свидетельствует об активации процессов неоангиогенеза (рис. 2, б).

Внутри капсул были обнаружены многочисленные клетки (рис. 2, в). Однако при специфическом окрашивании дитизиновым раствором были идентифицированы только следовые количества островковоподобных структур (рис. 2, г). Вероятно, отсутствие сахароснижающего эффекта трансплантата связано с деструкцией ОПЖ.



**Рис. 2. а – внешний вид капсулы из ИПО с заключенными в нее островками поджелудочной железы, б – кровеносные сосуды в стенке капсулы на 28 сутки после трансплантации (окраска гематоксилином и эозином), в – клетки в просвете капсулы на 28 сутки после трансплантации (окраска гематоксилином и эозином), г – островковоподобная структура в просвете капсулы на 28 сутки после трансплантации (окраска дитизином)**

Таким образом, трансплантация островков поджелудочной железы, инкапсулированных в ИПО, не позволяет достичь сахароснижающего эффекта в организме кроликов с экспериментальным сахарным диабетом, а также сохранить структурно-функциональную целостность трансплантата.

На завершающем этапе работы был проведен гистологический анализ поджелудочных желез животных-реципиентов. ОПЖ были обнаружены в поджелудочных железах животных с трансплантацией инкапсулированных ОПЖ как новорожденных поросят, так и половозрелых крыс.

В настоящее время общепризнанным является допущение возможности образования островковых клеток *de novo* (с последующим формированием островков) из эпителия мелких выводных протоков. Клетки панкреатических протоков могут утрачивать характерный для них специфический фенотип и приобретать свойства плюрипотентных стволовых клеток, способных дифференцироваться в островковые под действием соответствующих внешних стимулов, таких как различные факторы роста (Cornelius, Tchernev, 1997). При культивировании клеток протоков в среде, содержащей ростовые факторы, а также коллаген в качестве внеклеточного матрикса, наблюдалась их трансформация в островковые клетки (Katdare et al., 2004).

Интестинальная подслизистая оболочка содержит разнообразные ростовые факторы, индуцирующие пролиферацию различных клеточных типов в экспериментальной регенеративно-пластической хирургии. Кроме того, в данной работе проводилась трансплантация ОПЖ новорожденных животных, которые также могут секретировать биологически активные вещества.

Возможно, островки, обнаруженные в поджелудочных железах животных-реципиентов, образовались в процессе неогенеза под влиянием структур новорожденных животных. Скорее всего, стимулирующее влияние на неогенез этих островков могли оказать как ОПЖ новорожденных поросят, так и материалы самой интестинальной подслизистой оболочки.

Обобщая полученные данные, можно сделать вывод, что ксеногенные островки поджелудочной железы, а, возможно, и интестинальная подслизистая оболочка новорожденных животных, способствуют регенерации собственного островкового аппарата у животных с экспериментальным сахарным диабетом. Однако подход и приемы, использованные в представленной работе, не позволяют добиться сохранения структурно-функциональной целостности трансплантированных ОПЖ, инкапсулированных в ИПО, и требуют дальнейшей доработки и усовершенствования.

### **Список литературы**

- Балаболкин М.И. Эндокринология. – М.: Универсум паблишинг, 1998. – 582с.
- Баранов В.Г., Соколова И.М., Гаспарян Э.Г. и др. Экспериментальный сахарный диабет. Роль в клинической диабетологии. – Ленинград: Наука, 1983. – 240с.
- Варданян А.Р., Галоян А.А. Влияние аллоксана на физико-химические свойства металлопротеинов крови *in vitro* // Мед. наука Армении. – 2002. – Т.13, №3. – С. 32–37.
- Емельянов А.О. Опыт применения помповой терапии и CGMS в практической диабетологии // Проблемы эндокринологии. – 2006. – №3. – С. 31–34.
- Легач Е.И., Божок Г.А., Колот Н.В. Внутриселезеночная трансплантация островков Лангерганса как способ лечения сахарного диабета 1 типа // Трансплантология. – 2008. – Т.10, №1. – С. 107–110.
- Наханов А.К., Битов Н.Т., Мамадалиев С.М. Функциональная активность бета-клеток и гепатоцитов, заключенных в барий-альгинатные микрокапсулы // Трансплантология. – 2008. – Т.10, №1. – С. 79–83.
- Пирс Э. Гистохимия. – М.: Изд-во иностранной литературы, 1962. – 962с.
- Прохоров А.В., Третьяк С.И., Руденок В.В. и др. Долговременное сохранение панкреатических островковых клеток без иммуносупрессивной терапии при трансплантации в сосудистое русло реципиента // Трансплантология. – 2004. – Т.7, №3. – С. 337–339.
- Badylak S.F., Kropp B., McPherson T. et al. Small intestinal submucosa: a rapidly resorbed bioscaffold for augmentation cystoplasty // Tissue engineering. – 1998. – Vol.4, №4. – P. 379–387.
- Cornelius J.G., Tchernev V. In vitro generation of islets in long term cultures of pluripotent stem cells from adult mouse pancreas // Hormone Metabolism Research. – 1997. – Vol.29. – P. 271–277.
- Fritschy W.M., de Vos P., Groen H. et al. The capsular overgrowth on microencapsulated pancreatic islet grafts in streptozotocin and autoimmune diabetic rats // Transpl. Int. – 1994. – Vol.7, №4. – P. 264–271.
- Hiles M.C., Badylak S.F., Lantz G.C. Mechanical properties of xenogeneic small-intestinal submucosa when used as an aortic graft in the dog // J. Biomed. Mater. Res. – 1995. – Vol.29, №7. – P. 883–891.
- Katdare M.R., Bhonde R.R., Parab P.B. Analysis of morphological and functional maturation of neo-islets generated in vitro from pancreatic ductal cells and their suitability for islet banking and transplantation // Journal of Endocrinology. – 2004. – №182. – P. 105–112.
- Kawakami Y., Inoue K., Hayashi H. et al. Subcutaneous xenotransplantation of hybrid artificial pancreas encapsulating pancreatic B cell line (MIN6): functional and histological study // Cell Transplant. – 1997. – №6 (5). – P. 541–545.
- Luzi L., Hering B.J., Soggi C. Metabolic effects of successful intraportal islet transplantation in insulin-dependent diabetes mellitus // J. Clin. Invest. – 1996. – Vol.97, №11. – P. 2611–2618.
- Mattsson G., Jansson L., Carlsson P. Decreased vascular density in mouse pancreatic islets after transplantation // Diabetes. – 2002. – Vol.51. – P. 1362–1366.
- Valerie F., Duvivier-Kali, Abdulkadir Omer Complete protection of islets against allo-rejection and autoimmunity by a simple barium-alginate membrane // Diabetes. – 2001. – Vol.50. – P. 1698–1705.
- Xiao-Hui Tian, Wu-Jun Xue, Xiao-Ming Ding et al. Small intestinal submucosa improves islet survival and function during in vitro culture // World J. Gastroenterol. – 2005. – Vol.11, №46. – P. 7378–7383.

**Представлено: Л.О.Бабійчук / Presented by: L.O.Babiychuk**

**Рекомендовано до друку: В.В.Мартиненко / Recommended for publishing by: V.V.Martynenko**

*Подано до редакції / Received: 29.09.2009.*

© Г.А.Божок, О.С.Сидоренко, Н.В.Колот, Е.И.Легач, 2009  
© G.A.Bozhok, O.S.Sidorenko, N.V.Kolot, E.I.Legach, 2009