

УДК: 57.086.164:616.37.089.843

Применение флуоресцентного карбоцианинового красителя DiOC18 для идентификации панкреатических островков после ксенотрансплантации Н.В.Колот

*Харьковский национальный университет имени В.Н.Каразина (Харьков, Украина)
natakolot@mail.ru*

Флуоресцентный карбоцианиновый краситель DiOC18 является маркером для идентификации островков поджелудочной железы неонатальных поросят в печени и селезёнке кроликов с экспериментальным сахарным диабетом на ранних сроках посттрансплантационного периода. Отмечена взаимосвязь гипогликемического эффекта внутривнутрипечёночного и внутриселезёночного ксенотрансплантатов с наличием меченных DiOC18 островков поджелудочной железы в месте трансплантации.

Ключевые слова: островки поджелудочной железы, ксенотрансплантация, сахарный диабет, флуоресцентный краситель DiOC18.

Застосування флуоресцентного карбоціанінового барвника DiOC18 для ідентифікації панкреатичних острівців після ксенотрансплантації Н.В.Колот

Флуоресцентний карбоціаніновий барвник DiOC18 є маркером для ідентифікації острівців підшлункової залози неонатальних поросят у печінці та селезінці кролів з експериментальним цукровим діабетом на ранніх термінах посттрансплантаційного періоду. Визначено взаємозв'язок гіпоглікемічного ефекту внутрішньопечінкового та внутрішньоселезіночного ксенотрансплантатів з присутністю мічених DiOC18 острівців підшлункової залози в місці трансплантації.

Ключові слова: острівці підшлункової залози, ксенотрансплантація, цукровий діабет, флуоресцентний барвник DiOC18.

Application of fluorescent carbocyanine dye DiOC18 for the pancreatic islets identification after xenotransplantation N.V.Kolot

The fluorescent carbocyanine dye DiOC18 is a marker for pancreatic islets of neonatal piglets identification in liver and spleen of rabbits with experimental diabetes mellitus in early terms of postransplantation period. The relationship between hypoglycemic effect of intrahepatic and intrasplenic xenotransplants and presence of dyed by DiOC18 pancreatic islets in transplantation site has been noted.

Key words: pancreatic islets, xenotransplantation, diabetes mellitus, fluorescent dye DiOC18.

Введение

Известно, что одним из способов коррекции инсулиновой недостаточности при сахарном диабете является трансплантация островков поджелудочной железы (ОПЖ) (Ковальська, 2000; Прохоров и др., 2004; Noguchi et al., 2011). Согласно литературным данным, трансплантация ОПЖ, полученных от неонатальных поросят, может приводить к стабилизации углеводного обмена и способствовать предупреждению развития тяжелых диабетических осложнений (Турчин та ін., 2002; Pepper et al., 2009; Dufrane et al., 2009).

В настоящее время является актуальным исследование «судьбы» клеточных трансплантатов в организме реципиента. Иммуногистохимические методы, несмотря на высокоспецифичность, являются весьма трудоёмкими и дорогостоящими. Кроме того, наборы фенотипических маркеров разработаны далеко не для всех типов клеток.

Использование флуоресцентных красителей может являться простым и надёжным способом идентификации клеточного трансплантата в организме реципиента путём флуоресцентной микроскопии или проточной цитофлуориметрии (Melody et al., 2007). Наиболее стабильным в целях

использования при трансплантации клеток является флуоресцентный краситель – 3,3'-диоктадецилоксакарбоцианин перхлорат DiOC18, относящийся к группе триметиновых карбоцианинов (Лебедь и др., 2010; Bhowmik et al., 2001).

J.Leog и соавторы (Leog et al., 2000) обнаружили в месте введения меченные DiOC18 кардиомиоциты через 4 недели после аллотрансплантации их животным-реципиентам. Использование в качестве метки DiOC18 позволяет изучить в условиях *in vitro* процесс адгезии и миграции нейрональных стволовых клеток и образование нейросфер, которые в дальнейшем могут быть использованы в качестве трансплантационного материала при болезни Паркинсона (Wang et al., 2006). Эмбриональные стволовые клетки – предшественники холинергических мотонейронов – инкубировали с DiOC18, после чего часть клеток культивировали с миоцитами, а другую – трансплантировали внутримышечно крысам с периферической денервацией, при этом у животных-реципиентов предотвращалась мышечная атрофия. Флуоресцентная микроскопия позволила идентифицировать трансплантат, меченный DiOC18, на 21 сутки, при этом наблюдалось формирование новых нейромышечных соединений с денервированным мышечным волокном *in vivo* и с миоцитом (на 7 сутки) *in vitro* (Melody et al., 2007).

Однако на сегодняшний день не обнаружено данных, касающихся влияния флуоресцентного карбоцианинового красителя DiOC18 на ОПЖ неонатальных поросят, а также возможность применения данного красителя для идентификации ОПЖ в месте трансплантации.

В связи с этим целью данной работы являлось исследование сохранности ОПЖ неонатальных поросят в печени и селезенке животных-реципиентов на ранних сроках посттрансплантационного периода.

Объект и методы исследования

Все манипуляции с животными проводились в соответствии с положениями «Европейской конвенции защиты позвоночных животных, которые используются с экспериментальной и другой научной целью» (Страсбург, 1985) и национальными нормами по биоэтике (I Национальный конгресс по биоэтике, Киев, 2001).

Исследования проводили на половозрелых самцах кроликов (*Oryctolagus cuniculus*) (n=56) возрастом 5–6 месяцев, массой 2,5–3 кг. Сахарный диабет вызвали однократным введением в ушную вену раствора аллоксана тетрагидрата из расчёта 100 мг/1 кг массы тела животного. Непосредственно перед введением необходимую массу кристаллического аллоксана тетрагидрата разводили в 2 мл стерильного физиологического раствора.

ОПЖ получали из поджелудочных желез неонатальных поросят по методу (Korbitt et al., 1996). Экстирпацию хвостовой части поджелудочной железы неонатальных животных проводили в стерильных условиях с соблюдением всех норм асептики и антисептики.

Хвостовую часть поджелудочной железы неонатальных поросят после выделения помещали в охлаждённый стерильный раствор Хэнкса, содержащий 0,25% BSA, 10 мМ Нерес и антибиотики (75 мкг/мл канамицина и 100 Ед/мл бензилпенициллина натриевой соли), в котором проводили измельчение панкреатической ткани на фрагменты размером 0,5–1 мм³, отмывали 3–4 раза от крови этим же раствором. Инкубировали в течение 15 минут при температуре 37°C в растворе Хэнкса, содержащем 2,5 мг/мл коллагеназы типа IA, после чего дважды отмывали раствором Хэнкса с антибиотиками и протирали через нейлоновую сетку с диаметром ячеек 200 мкм.

После получения ОПЖ неонатальных поросят проводили их мечение неспецифическим флуоресцентным карбоцианиновым красителем DiOC18 в конечной концентрации 5×10^{-6} моль. Инкубировали в течение 2 часов при температуре 37°C, в атмосфере, содержащей 5% CO₂, затем дважды отмывали средой 199 и вводили в паренхиму правой доли печени (объём трансплантационного материала составлял 3 мл) и пульпу селезенки (объём трансплантационного материала составлял 2 мл) кроликов с экспериментальным сахарным диабетом из расчёта 1–2 × 10⁶ ОПЖ/мл на одно животное-реципиента.

Для трансплантации были отобраны половозрелые кролики с экспериментальным сахарным диабетом, у которых содержание глюкозы в крови было не ниже 19–20 ммоль/л. Трансплантацию суспензии ОПЖ неонатальных животных проводили на 21 сутки после введения диабетогенной дозы раствора аллоксана в стерильных условиях под кетамин-ксилазиновой анестезией (1 мг кетамина и 0,5 мг ксилазина на 1 кг массы тела животного).

В качестве контроля были изучены группы животных без и с экспериментальным сахарным диабетом после ложной трансплантации, которым вводили среду 199 в печень и селезёнку, при этом объём введенного раствора соответствовал объёму трансплантационного материала.

Экспериментальные группы животных: 1 – интактные животные (n=8), 2 – животные с экспериментальным сахарным диабетом (n=8), 3–4 – контрольные животные после ложной трансплантации в печень (n=6) и селезёнку (n=6), 5–6 – контрольные животные с экспериментальным сахарным диабетом после ложной трансплантации в паренхиму печени (n=6) и селезёнку (n=6), 7–8 – животные после ксенотрансплантации ОПЖ в паренхиму печени (n=8) и селезёнку (n=8).

Еженедельно контролировали уровень глюкозы в крови экспериментальных животных при помощи индикаторных пластинок «Гемоглан» на глюкометре Глюкофот–II. Содержание глюкозы в моче определяли каждую неделю у всех групп животных, используя индикаторные пластинки «Глюкотест».

На 21 сутки после трансплантации ОПЖ неонатальных поросят животным-реципиентам проводили частичную гепатэктомию и тотальную спленэктомию хирургическим способом. Выделяли фрагмент ткани печени и селезёнки, несущий ксенотрансплантат, помещали в охлаждённый стерильный физиологический раствор, отмывали от крови и помещали в фосфатно-солевой раствор (pH=7,4), измельчали ткань органа на микрофрагменты размером 2–3 мм³ и оставляли в течение 10 минут на шейкере при температуре 38°C, 120 rpm. Надосадочную жидкость собирали в пробирку, стоящую на льду. Затем к микрофрагментам ткани печени и селезёнки добавляли раствор коллагеназы типа IA (2 мг/мл) и помещали на шейкер при температуре 38°C на 10 минут, надосадочную жидкость собирали в ту же пробирку. Этот этап получения клеток повторяли трижды. Затем ткань печени и селезёнки ресуспендировали шприцом и фильтровали через нейлоновую сетку с диаметром ячеек 200 мкм, полученную суспензию клеток помещали в ту же пробирку, отмывали от коллагеназы фосфатно-солевым раствором в течение 5 минут и разделяли в ступенчатом градиенте плотности фиколла (1,060; 1,070; 1,074; 1,076, 1,080 г/см³) в течение 10 минут центрифугированием при 225 g. После градиентного центрифугирования клеточные фракции собирали в отдельные пробирки, дважды отмывали от фиколла фосфатно-солевым раствором. Присутствие объектов, имеющих зелёную флуоресценцию, определяли с помощью проточного цитофлуориметра BD Bioscience FACS Calibur. Суспензию клеток (50–100 мкл) из каждой полученной фракции помещали на предметное стекло, высушивали без доступа света и исследовали под люминесцентным микроскопом при увеличении $\times 40$. Микрофотосъёмку осуществляли с помощью люминесцентного микроскопа Olympus IX-71.

Статистический анализ результатов проводили при использовании t-критерия Стьюдента – для количественных нормально распределённых признаков и однофакторного дисперсионного анализа (ANOVA) – для непараметрических данных с помощью приложения пакета программ Microsoft Office 2007 – “Excel”. Данные представлены как средние значения, полученные в 2 аналогичных экспериментах и измеренные в 2 параллельных пробах, \pm стандартная ошибка; достоверными считались отличия при $p < 0,05$.

Результаты и обсуждение

В данной работе была предпринята попытка использовать неспецифический флуоресцентный карбоцианиновый краситель DiOC18 для визуализации и наблюдения за функцией ОПЖ неонатальных поросят на ранних сроках посттрансплантационного периода, чтобы доказать связь гипогликемического эффекта ксенотрансплантата с наличием β -клеток или ОПЖ в месте трансплантации. Известно, что гидрофобный карбоцианиновый краситель DiOC18 имеет длинноцепочечный (C18) углеводородный «хвост», благодаря которому может встраиваться в мембранный бислой клетки или во внешнюю мембрану митохондрий и сохраняться там на протяжении 3–4 недель за счёт мембранного потенциала, существенно не влияя на жизнеспособность и клеточные функции (Лебедь и др., 2010; Bhowmik et al., 2001).

Однократное введение раствора аллоксана у кроликов уже на 5–7 сутки вызывало увеличение содержания глюкозы в крови. А на 21 сутки у кроликов наблюдалась стойкая гипергликемия, при этом показатель глюкозы в крови составлял в среднем $26,83 \pm 3,90$ моль/л, превышая среднее значение данного показателя у интактных животных ($5,95 \pm 0,50$ ммоль/л) в 4,5 раза (рис. 1). Кроме того, у животных наблюдались другие признаки сахарного диабета: полифагия, полиурия, полидипсия, потеря массы тела. На 7–14 сутки после ксенотрансплантации DiOC18-меченных ОПЖ в селезёнку и

правую долю печени у животнох-реципієнтів наблюдалось снижение содержания глюкозы в крови до значений интактного контроля ($6,50 \pm 0,38$ и $6,75 \pm 0,78$ ммоль/л соответственно) (рис. 1). Ранее в наших работах (Колот и др., 2007) была изучена динамика глюкозы после трансплантации неокрашенных DiOC18 ОПЖ неонатальных поросят в печень и селезёнку, при этом были получены подобные результаты. В связи с чем, было сделано заключение о том, что флуоресцентный карбоцианиновый краситель DiOC18 не оказывает негативного влияния на инсулин-продуцирующую функцию β -клеток ОПЖ неонатальных поросят.

Для доказательства функции ОПЖ неонатальных поросят на 21 сутки посттрансплантационного периода у животнох-реципієнтів осуществляли удаление ксенотрансплантата путём частичной гепатэктомии и тотальной спленэктомии. Это приводило к повышению содержания глюкозы в крови животнох-реципієнтів, который не снижался на протяжении всего последующего периода наблюдения и превышал среднее значение данного показателя у интактных животных в 3 раза (рис. 1), а также наблюдалось повторное проявление других клинических признаков сахарного диабета.

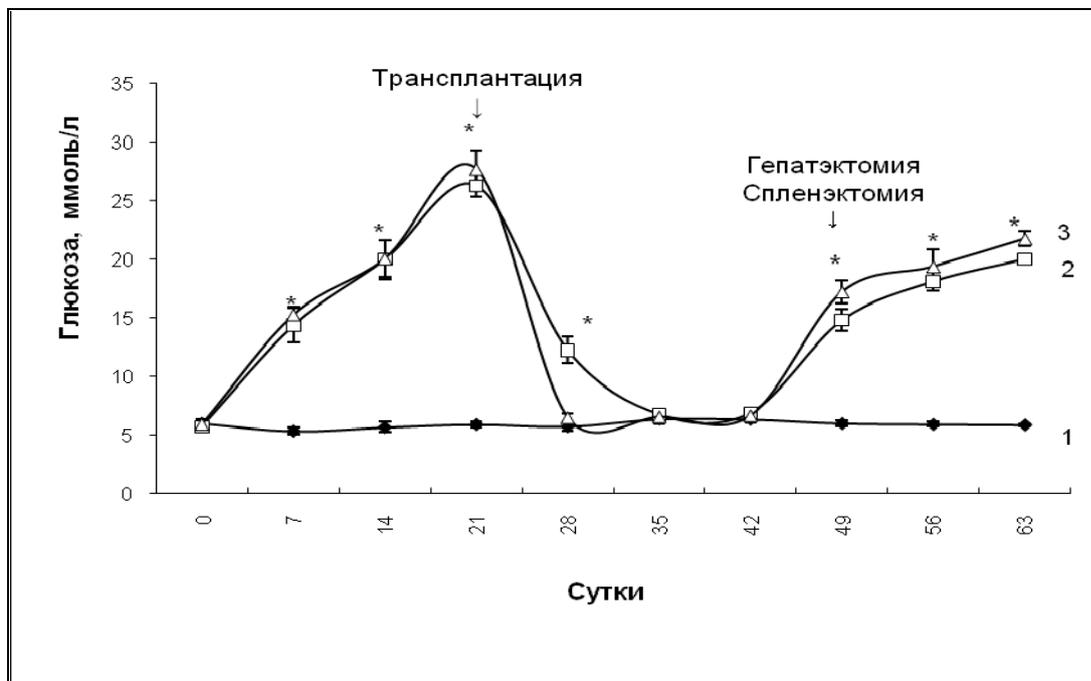


Рис. 1. Динамика содержания глюкозы в крови кроликов: 1 – интактных; после ксенотрансплантации ОПЖ неонатальных животных: 2 – в паренхиму печени; 3 – в селезёнку
 Примечание: * – $p < 0,05$ по сравнению с интактными животными.

Независимо от проведения частичной гепатэктомии и тотальной спленэктомии у контрольных животных после ложной трансплантации содержание глюкозы в крови оставалось неизменным на протяжении всего периода наблюдения и составляло $5,46 \pm 0,43$ и $5,85 \pm 0,39$ ммоль/л соответственно. Кроме того, частичная гепатэктомия и тотальная спленэктомия не оказывала влияния на содержание глюкозы в крови у кроликов с экспериментальным сахарным диабетом после ложной трансплантации, и данный показатель составлял $20,35 \pm 1,17$ и $21,16 \pm 1,97$ ммоль/л соответственно.

Важным показателем сахарного диабета и развития тяжёлого диабетического осложнения – нефропатии является наличие гликозурии, которая является следствием снижения реабсорбции глюкозы в почечных канальцах и нарушения процессов фильтрации плазмы крови, и, как следствие, развития гломерулосклероза (Балаболкин, 2000; Казьмин, 2000; Соорер, 1998).

Содержание глюкозы в моче определяли во всех экспериментальных группах животных каждую неделю на протяжении всего периода наблюдения. При этом у животных интактных и после ложной

трансплантации глюкоза в моче не обнаруживалась, тогда как у кроликов с экспериментальным сахарным диабетом независимо от ложной трансплантации содержание глюкозы в моче составляло $1,9 \pm 0,2$ %.

Уменьшение суточной гликозурии до полного её исчезновения наблюдалось в первый месяц у кроликов после ксенотрансплантации ОПЖ неонатальных животных в паренхиму печени и селезёнку. Однако с повторным ростом содержания глюкозы в крови, которое наблюдалось у кроликов после проведения частичной гепатэктомии и тотальной спленэктомии, было обнаружено появление глюкозы в моче ($1,7 \pm 0,3$ и $1,9 \pm 0,1$ % соответственно).

Таким образом, удаление ксенотрансплантата из печени и селезёнки животных-реципиентов приводит к возвращению экспериментального сахарного диабета, что подтверждали показатели, отражающие состояние углеводного обмена. Это говорит о наличии корректирующей функции трансплантируемых ксеногенных ОПЖ неонатальных животных на углеводный обмен при экспериментальном сахарном диабете.

После удаления правой доли печени и селезёнки с ксенографтом проводили коллагенизацию ткани органов и разделение в ступенчатом градиенте плотности фикола с целью отделения ОПЖ от гепатоцитов или спленоцитов, а также клеток крови. Цитофлуориметрический анализ суспензии, полученной из фрагмента печени животных-реципиентов, в интерфазе с плотностью $1,070-1,074$ г/см³, показал наличие 2,3% (рис. 2) объектов, имеющих зелёную флуоресценцию.

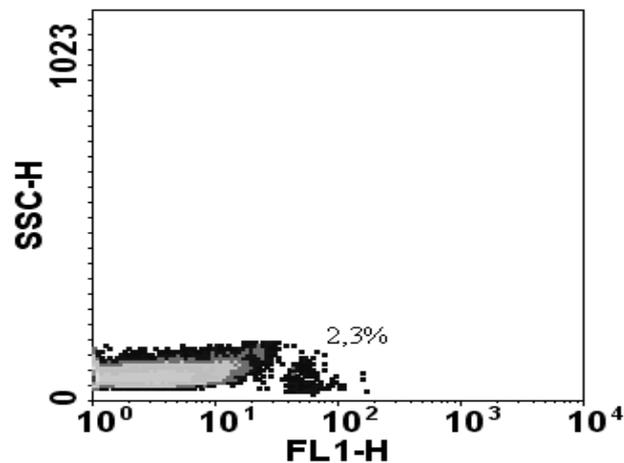


Рис. 2. Цитофлуориметрический анализ суспензии, полученной из фрагмента печени кролика на 21 сутки после ксенотрансплантации ОПЖ неонатальных животных, в интерфазе фикола с плотностью $1,070-1,074$ г/см³: денсити плот; ось x – FL1-H – зелёная флуоресценция (волна возбуждения 488 нм, волна испускания 510 нм); ось y – SSC – боковое светорассеивание

При разделении в ступенчатом градиенте плотности фикола суспензии, полученной из селезёнки животных-реципиентов, в интерфазе фикола с плотностями $1,070-1,074$ и $1,074-1,076$ г/см³ были обнаружены 0,6% (рис. 3, А) и 0,5% (рис. 3, Б) объектов, имеющих зелёную флуоресценцию.

Образцы суспензий, полученные из правой доли печени и селезёнки животных-реципиентов, также исследовались при помощи флуоресцентной микроскопии. В суспензии, выделенной из фрагмента печени и селезёнки кроликов, в интерфазе фикола с плотностями $1,070-1,074$ и $1,074-1,076$ г/см³ были обнаружены структуры, имеющие зелёную флуоресценцию.

Следует отметить, что DiOC18-меченные островковоподобные структуры в интерфазе фикола с плотностью $1,070-1,074$ г/см³ имели меньший размер и были неоднородно прокрашены, чем те, которые изначально трансплантировали животным. Это может быть связано как с деструкцией клеток после трансплантации, так и с дезинтеграцией островков на одиночные клетки в процессе

коллагенизації. Этот факт подкрепляется тем, что в интерфазе фикола с плотностью 1,074–1,076 г/см³ присутствовали только одиночные клетки.

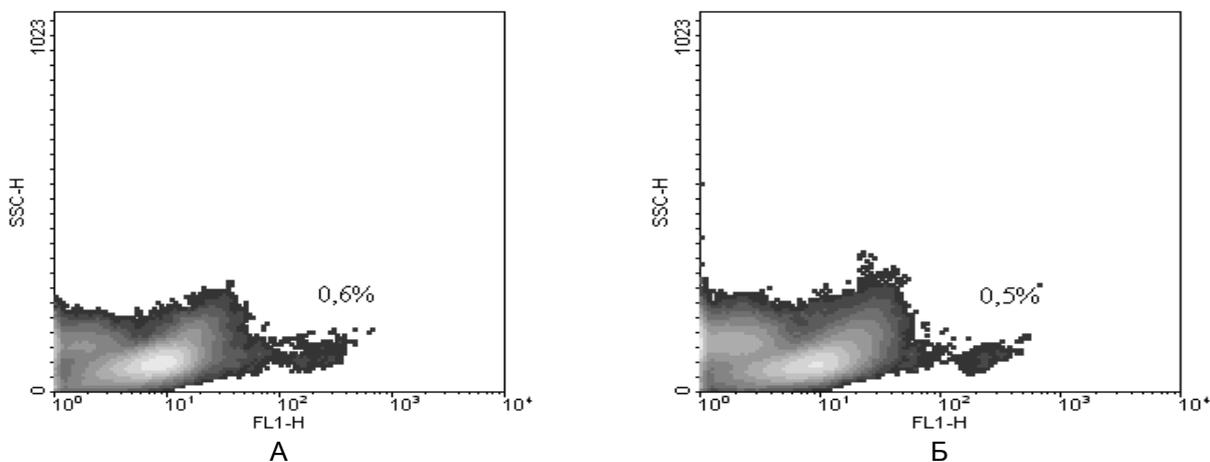


Рис. 3. Цитофлуориметрический анализ суспензии, полученной из селезёнки кролика на 21 сутки после ксенотрансплантации ОПЖ неонатальных животных, в интерфазе фикола с плотностью 1,070–1,074 (А) и 1,074–1,076 г/см³ (Б): денсити плот; ось x – FL1-H – зелёная флуоресценция (волна возбуждения 488 нм, волна испускания 510 нм); ось y – SSC – боковое светорассеивание

Таким образом, наличие островковоподобных структур в печени и селезёнке кроликов на 21 сутки после ксенотрансплантации свидетельствовало о том, что снижение содержания глюкозы в крови животных-реципиентов на данном этапе происходит за счёт функции трансплантированных ОПЖ неонатальных поросят. Использование флуоресцентного полиметинового красителя DiOC18 на ранних сроках посттрансплантационного периода позволяет идентифицировать трансплантат, а также способствует выявлению взаимосвязи гипогликемического эффекта ксеногенных островков поджелудочной железы с наличием меченых DiOC18 островковоподобных структур в месте трансплантации.

Список литературы

- Балаболкин М.И. Диабетология. – М.: Медицина, 2000. – 672с. /Balabolkin M.I. Diabetologiya. – M.: Meditsina, 2000. – 672s./
- Казьмин В.Д. Сахарный диабет. – Ростов-на-Дону: Феникс, 2000. – 320с. /Kaz'min V.D. Sakharnyy diabet. – Rostov-na-Donu: Feniks, 2000. – 320s./
- Ковальська І.О. Цукровий діабет та трансплантація // Трансплантологія. – 2000. – Т.1, №1. – С. 140–142. /Koval's'ka I.O. Tsukrovyy diabet ta transplantatsiya // Transplantologiya. – 2000. – Т.1, №1. – С. 140–142./
- Колот Н.В., Божок Г.А., Легач Е.И. и др. Влияние места трансплантации островков поджелудочной железы на компенсацию углеводного обмена у кроликов с экспериментальным сахарным диабетом 1 типа // Пробл. эндокринол. – 2007. – №4. – С. 71–76. /Kolot N.V., Bozhok G.A., Legach Ye.I. i dr. Vliyaniye mesta transplantatsii ostrovkov podzheludochnoy zhelezy na kompensatsiyu uglevodnogo obmena u krolikov s eksperimental'nym sakharnym diabetom 1 tipa // Probl. endokrinol. – 2007. – №4. – С. 71–76./
- Лебедь А.С., Ефимова С.Л., Гуральчук Г.Я. и др. Влияние гидрофобности катионных карбоцианиновых красителей DiOCn на эффективность связывания с мицеллами анионного поверхностно-активного вещества // Журнал прикладной спектроскопии. – 2010. – Т.77, №2. – С. 198–203. /Lebed' A.S., Yefimova S.L., Gural'chuk G.Ya. i dr. Vliyaniye gidrofobnosti kationnykh karbotsianinovykh krasiteley DiOCn na effektivnost' svyazyvaniya s mitsellami anionnogo poverkhnostno-aktivnogo veschestva // Zhurnal prikladnoy spektroskopii. – 2010. – Т.77, №2. – С. 198–203./
- Проخورов А.В., Третьяк С.И., Руденок В.В. и др. Долговременное сохранение панкреатических островковых клеток без иммуносупрессивной терапии при трансплантации в сосудистое русло реципиента // Трансплантологія. – 2004. – Т.7, №3. – С. 337–339. /Prokhorov A.V., Tre't'yak S.I., Rudenok V.V. i dr. Dolgovremennoye sokhraneniye pankreaticheskikh ostrovkovykh kletok bez immunosupressivnoy terapii pri transplantatsii v sosudistoye ruslo retsiyepiyenta // Transplantologiya. – 2004. – Т.7, №3. – С. 337–339./

-
- Турчин І.С., Зубкова Г.А., Давидова Г.І. та ін. Проблеми ксенотрансплантації // Трансплантологія. – 2002. – Т.3, №2. – С. 137–145. /Turchin I.S., Zubkova G.A., Davydova G.I. ta in. Problemy ksenotransplantatsii // Transplantologiya. – 2002. – Т.3, №2. – С. 137–145./
- Bhownik B.B., Basu S., Ray D. Photophysical studies of 3,3' diocetadecyloxycarbocyanine dye in model biological membranes and different solvents // Chem. Phys. Lipids. – 2001. – Vol.109, №2. – P. 175–183.
- Cooper M.E. Pathogenesis, prevention, and treatment of diabetic nephropathy // Lancet. – 1998. – Vol.352. – P. 213–219.
- Dufrane D., Gianello P. Pig islets for clinical islet xenotransplantation // Curr. Opin. Nephrol. Hypertens. – 2009. – Vol.18, №6. – P. 495–500.
- Korbutt G.S., Elliot J.F., Zilianc A.O. et al. Large-scale isolation, growth and function of neonatal islet cells // Clin. Invest. – 1996. – №97. – P.2119.
- Leor J., Aboulafia-Etzion S., Dar A. et al. Bioengineered cardiac grafts. A new approach to repair the infarcted myocardium? // Circulation. – 2000. – Vol.102. – P. 42–56.
- Mellody C., Zebalious Ph.D., Jose L. et al. Embrionic stem cell-derived motor neurons preserve muscle after peripheral nerve injury // Plastics & Reconstruct. Surg. – 2007. – Vol.119, №1. – P. 235–245.
- Noguchi H., Yamada T., Tanaka K. Islet transplantation // Nihon Rinsho. – 2011. – Vol.69, №12. – P. 2209–2213.
- Pepper A.R., Gall C., Mazzuca D.M. et al. Diabetic rats and mice are resistant to porcine and human insulin: flawed experimental models for testing islet xenografts // Xenotransplantation. – 2009. – Vol.16, №6. – P. 502–510.
- Wang T.Y., Seu A., Behie L.A. et al. Dynamic behavior of cells within neurospheres in expanding populations of neuronal precursors // Brain research. – 2006. – Vol.1107, Issue 1. – P. 82–96.

Представлено: Т.П.Бондаренко / Presented by: T.P.Bondarenko

Рецензент: В.В.Мартиненко / Reviewer: V.V.Martynenko

Подано до редакції / Received: 14.03.2012