

## Трансплантация культуры островковых клеток поджелудочной железы в красный костный мозг

Обоснование Трансплантация в организм больного инсулинозависимым сахарным диабетом культуры островковых клеток поджелудочной железы является перспективным методом лечения. Но иммуносупрессия снижает антидиабетический эффект трансплантации. Это исследование направлено на изучение возможности трансплантации культуры островковых клеток без назначения иммунодепрессантов в иммунологически выгодную зону – красный костный мозг. Методы. Островковые клетки выделяли из эмбриональной кроличьей поджелудочной железы с использованием коллагеназы. Культивирование проводили при температуре 37°C в контакте с газовой средой, содержащей 95% кислорода. Начиная с 7-х суток культура островковых клеток подвергалась температурной адаптации при медленном снижении температуры культивирования до 24°C в течение 7-ми суток с дальнейшим постепенным подъемом температуры до 37°C за то же время. Трансплантацию осуществляли в эпифиз трубчатой кости задней конечности у 5-ти собак с экспериментальным сахарным диабетом. Исследовалась активность инсулина на стороне трансплантации и на противоположной стороне. Проводилось морфометрическое и иммунологическое исследование клеток на стороне трансплантации и на противоположной стороне. Результаты. При исследовании активности инсулина в оттекающей венозной крови на 30-ый и 90-ый дни после трансплантации отмечено достоверное ( $p < 0,05$ ) повышение активности инсулина на стороне трансплантации в сравнении с противоположной стороной. При морфометрическом исследовании мазков из красного костного мозга через 12 месяцев. после трансплантации отмечено статистически достоверное ( $p < 0,05$ ) увеличение популяции клеток с параметрами  $\beta$ -клеток. На противоположной стороне таких изменений не отмечено. Обсуждение. Трансплантированная в красный костный мозг ксеногенная культура островковых клеток длительно сохраняется и функционирует без назначения иммунодепрессантов.

Ключевые слова. Трансплантация, островковые клетки, сахарный диабет, иммунологически привилегированные зоны.

Background. Transplantation of pancreatic islet cells to patients with Insulin-Dependent Diabetes Mellitus (IDDM, DM by omission) is the promising treatment modality. Yet immunosuppression interferes with the contradiabetic effect of transplantation. The present research aims to study the feasibility of transplantation of islet cells without immunosuppressants administration into immunologically privileged site - red bone marrow.

Methods. Islet cells were recruited from embryonal rabbit pancreatic gland using collagenase. Cultivating was performed at 37°C temperature in contact with gaseous matter of 95% oxygen content. Starting on day 7, islet cell culture was subject to temperature adaptation with slow lowering of the cultivating temperature to 24°C during 7 days and subsequent gradual rise to 37°C during the same time. Transplantation was committed into epiphysis of long bone of hind limb to the 5 dogs with experimental DM. Insulin activity in draining venous blood on the side of transplantation and on the contralateral side was

analyzed. Morphometric study of cells on the side of transplantation and on the contralateral side was performed.

Results. The study of insulin activity in draining venous blood on days 30 and 90 following transplantation has revealed the statistically significant ( $p < 0,05$ ) activity rise on the side of transplantation in comparison with the contralateral side. The morphometric study of red bone marrow smears taken 12 months after the transplantation revealed the statistically significant ( $p < 0,05$ ) rise of population with  $\beta$ -cells parameters. No such changes were revealed on the contralateral side.

Conclusion. Xenogenous culture of islet cells transplanted into red bone marrow functions without immunodepressants' administration and preserves for 12 months. Keywords: transplantation; islet cells; diabetes mellitus; immunologically privileged site.

## Введение

Трансплантация в организм больного инсулинозависимым сахарным диабетом культуры островковых клеток поджелудочной железы является перспективным способом достижения гликемического контроля, поступления эндогенного инсулина, предотвращения тяжелых гипогликемий[1].

Иммуносупрессия у таких больных не желательна в связи с имеющимся снижением иммунитета, риском развития гнойных осложнений. Стероиды обладают выраженной диабетогенностью[2]. Циклоспорин А токсичен для изолированных островковых клеток[3], индуцирует инсулинорезистентность[4]. Это снижает антидиабетический эффект трансплантации.

Перспективным направлением в достижении длительного функционирования трансплантированных островковых клеток в организме реципиента без назначения иммунодепрессантов является трансплантация в иммунологически привилегированные зоны для трансплантации.

Иммунологически привилегированные зоны для трансплантации исследованы А.В.Шоттом и С.И.Третьяком[5], R.Billingham and C.F.Barker [6]. Исходя из отсутствия лимфатического дренажа, R.Billingham отнес к этой категории щечный мешок грызунов и головной мозг.

Изучение этой перспективной проблемы продолжено работами C.F.Barker et al.[7]. Авторы отнесли к списку иммунологически привилегированных мест для трансплантации тимус в силу особенностей строения его лимфоидной ткани.

Длительное функционирование алло- и ксеногенных тканей, трансплантированных в головной мозг и тимус без назначения иммунодепрессантов свидетельствовало об атипичной иммунной реакции организма реципиента, при которой иммунокомпетентные клетки длительно не распознавали чужеродные антигены.

В данной экспериментальной работе исследовалась перспектива использования ксеногенной культуры островковых клеток, полученной из поджелудочных желез эмбрионов кроликов, для обеспечения поступления в организм собак с экспериментальным сахарным диабетом инсулина. Для предотвращения отторжения, трансплантацию осуществляли в красный костный мозг, который рассматривали в качестве иммунологически привилегированной зоны для трансплантации. Это связано с особенностями строения и функции костного мозга: отсутствием лимфатических сосудов, наличием ретикулярной ткани, наличием стволовых клеток. Иммунодепрессанты не назначали.

В постановке эксперимента руководствовались «Правилами проведения работ с использованием экспериментальных животных», утвержденных Советом Белорусского Государственного Медицинского Университета 24.06.1995г., которые соответствуют требованиям Всемирного общества защиты животных (WSPA) и Европейской конвенции по защите экспериментальных животных.

#### Материалы и методы

Культура островковых клеток выделялась из эмбриональной ксеногенной кроличьей (20-30 дней) поджелудочной железы с использованием коллагеназы по методике S.Misler[8] в нашей модификации. Сразу после получения ткань поджелудочных желез эмбрионов кроликов помещали в среду RPMI 1640 температуры 8°C. Железы рассекали до фрагментов размером 0,3 мм. В течение 15 минут производили промывание фрагментов средой RPMI температуры 8°C, в которую добавлен гентамицин в количестве 40 мкг/мл. После этого полученные фрагменты обрабатывали коллагеназой (Sigma, Type XI, C9407) в концентрации 1 ЕД/мл в течение 35 минут. После отмывки в течение 10 минут средой RPMI температуры 15°C осадок помещали во флаконы, содержащие 10%-й раствор эмбриональной телячьей сыворотки (серия 11) в среде RPMI с добавлением гентамицина в количестве 20 мкг/мл.

Культивирование проводили при температуре 37°C в контакте с газовой средой, содержащей 95% кислорода. К 7-м суткам вся площадь дна используемой посуды была занята монослоем клеток, состоящим преимущественно из полигональных элементов с редко встречающимися веретенообразными клетками фибробластоподобного типа. Начиная с 7-х суток культура островковых клеток подвергалась температурной адаптации при медленном снижении температуры культивирования до 24°C в течение 7-ми суток с дальнейшим постепенным подъемом температуры до 37°C за то же время.

При гистологическом исследовании с окраской альдегид-фуксином, гематоксилин-эозином было выявлено преобладание в культуре клеток, имеющих альдегид-фуксинпозитивные гранулы, что характерно для островковых клеток. (Рис. 1)

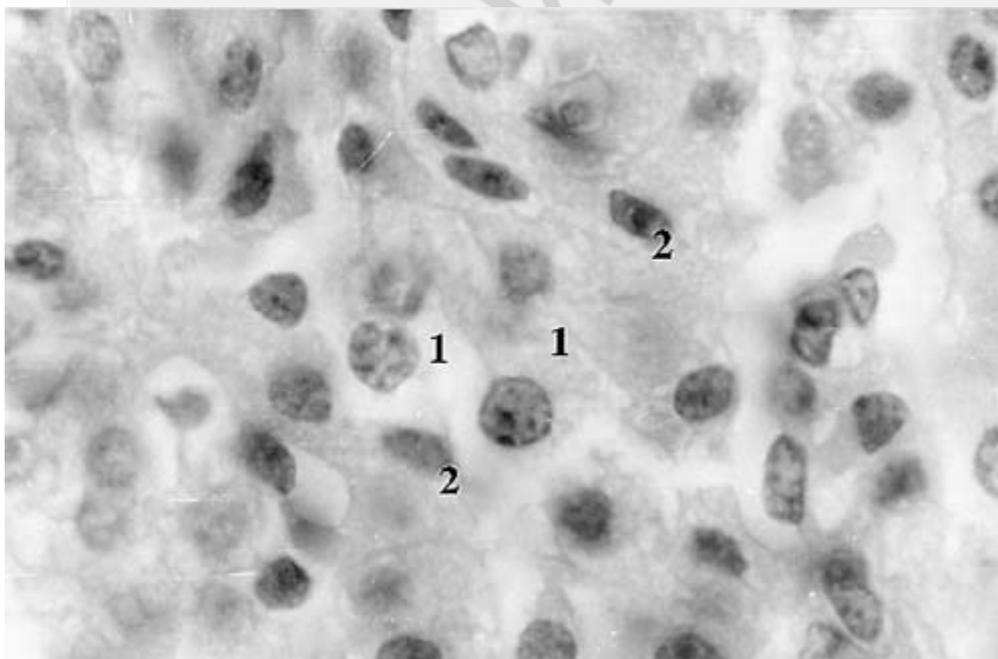


Рис.1. бетта- и альфа- Инсулоциты в культуре островковых клеток поджелудочной железы эмбрионов кроликов. 1-бетта-клетка, 2-альфа-клетка. Окраска альдегид-фуксином. Микрофото: об. 90, ок. 7.

Для подтверждения функционирования полученной культуры эмбриональных островковых клеток определяли активность инсулина в культуральной среде при помощи радиоиммуноферментного анализа с фиксацией показателей с помощью цитофлюориметра ES-300. Активность инсулина во всех исследуемых флаконах колебалась в пределах  $24,7 \pm 2,7$  мк ЕД /мл в сутки (после полной смены среды). Стимуляция 8 мМоль глюкозы приводила к увеличению активности инсулина до 150 мк ЕД /мл.

Экспериментальное исследование проводилось на 5-и беспородных собаках массой 10-12 кг. Сахарный диабет вызывали внутривенным введением аллоксана в дозе 45 мг/кг веса лабораторного животного. При гистологическом исследовании поджелудочной железы после введения аллоксана отмечены некротические изменения в ее островках. Через 10 дней после введения аллоксана производили контроль гликемии методом фотометрического микроанализа и при уровне глюкозы выше 10,0 ммоль/л производили ксенотрансплантацию культуры эмбриональных островковых клеток. Перед трансплантацией взвесь островковых клеток сепарировали, используя градиент фикола 1020,1045,1075,1085. Биомасса островковых клеток отбиралась после центрифугирования при 550g в течение 20 минут из среднего слоя. Содержание островковых клеток во взвеси составляло около 3 миллионов.

После создания туннеля в кости шилообразным стилетом, взвесь островковых клеток через толстую иглу медленно вводили в красный костный мозг эпифиза бедренной кости собаки под тиопенталовым наркозом.

В течение 5 дней в послеоперационном периоде назначали инсулин в дозе 0,5 ЕД/кг один раз в день подкожно.

Для оценки функционирования трансплантированной в красный костный мозг культуры островковых клеток активность инсулина определяли на стороне трансплантации и на противоположной стороне. Кровь для исследования брали из вены задней конечности выше места трансплантации. Более высокий уровень инсулина на стороне трансплантации культуры островковых клеток, в сравнении с противоположной стороной, и нормализация гликемии подтверждали функционирование трансплантата в организме реципиента.

Проводили морфометрическое исследование клеток в мазках из красного костного мозга реципиента через 12 месяцев после ксенотрансплантации у животных с нормогликемией.

Оценку статистической достоверности между различными выборочными совокупностями проводили с помощью критериев Фишера (F), Стьюдента (t), и ?. Различия считали достоверными при  $P < 0,05$  (вероятность свыше 95%, доверительный интервал  $-1,96 \dots +1,96$ ) и высоко достоверными при  $P < 0,001$  (вероятность свыше 99,9%, а доверительный интервал  $-3,09 \dots +3,09$ ).

Результаты

К 10-му дню после трансплантации отмечено увеличение активности инсулина на стороне трансплантации ( $15,64 \pm 1,67$ ) и на противоположной стороне ( $12,86 \pm 0,67$ ). При этом достоверных различий между этими показаниями не выявлено ( $p > 0,05$ ).

Уровень гликемии у 3-х собак (№№ 1, 3 и 4) уменьшился до 8.1, 9.2 и 11.3 ммоль/л соответственно, у 2-х собак оставался высоким – 11,5 и 17,1 ммоль/л.

К 30-му дню отмечалось увеличение активности инсулина на стороне трансплантации – 15,68±2,44 мкЕД/мл, на противоположной стороне – 9,54±0,42 мкЕД/мл. При этом у 3-х собак, у которых отмечено дальнейшее снижение уровня гликемии (6.4, 8.4 и 4.2 ммоль/л), различия активности инсулина на стороне трансплантации и на противоположной стороне были достоверными ( $p < 0,05$ ). Проявления сахарного диабета в виде полидипсии, конъюнктивита, снижения массы тела отсутствовали.

Две другие собаки, у которых достоверных различий в активности инсулина на стороне трансплантации и на противоположной стороне отмечено не было, сохраняли гипергликемию (14,5 и 21,2 ммоль/л).

К 90-му дню у 3-х собак (№№ 1, 3 и 4) отмечалось дальнейшее увеличение активности инсулина на стороне трансплантации – 22,67±2,92 мкЕД/мл, на противоположной стороне – 13,3±0,49 мкЕД/мл, при этом различия были достоверными ( $p < 0,05$ ). Уровень гликемии у этих собак нормализовался (6.0, 4.7 и 5.2 ммоль/мл соответственно), проявления сахарного диабета отсутствовали. Это свидетельствует о функционировании трансплантированной культуры островковых клеток.

На 31-й день в связи с некомпенсированной гипергликемией (21,2 ммоль/л) снята с эксперимента собака № 5.

На 97 день в связи с некомпенсированной гипергликемией (27,3 ммоль/л) снята с эксперимента собака № 2.

Динамика изменений активности инсулина и уровня глюкозы у собак № 2 и № 5 свидетельствует о том, что трансплантат не функционировал (или функционировал кратковременно), а аллоксановый диабет был вызван адекватно.

Исследованы мазки из пунктата, полученного из костномозгового канала бедренной кости в области трансплантации и из костномозгового канала на противоположной стороне. Для оценки клеточного состава пунктата красного костного мозга на интактной стороне (контроль), пунктата красного костного мозга на стороне трансплантации культуры островковых клеток, мазков из культуры островковых клеток использован метод морфометрии. По отношению максимального и минимального размеров определялся показатель элонгации клеток. Выявлено, что клеточный состав мазков красного костного мозга на стороне трансплантации более разнообразен (коэффициент вариации 20,49%), в сравнении с противоположной стороной (коэффициент вариации 14,10%).

При морфометрическом исследовании мазков культуры островковых клеток, в которой преобладали ?-клетки, выявлено, что наиболее многочисленную популяцию (29%) составляют клетки с показателем элонгации 1,8. В контрольных мазках красного костного мозга клетки с показателем элонгации 1,8 составляли 1%. В мазках из красного костного мозга через 12 месяцев после трансплантации культуры островковых клеток популяция клеток с элонгацией 1,8 возросла до 6% (Рис 2).

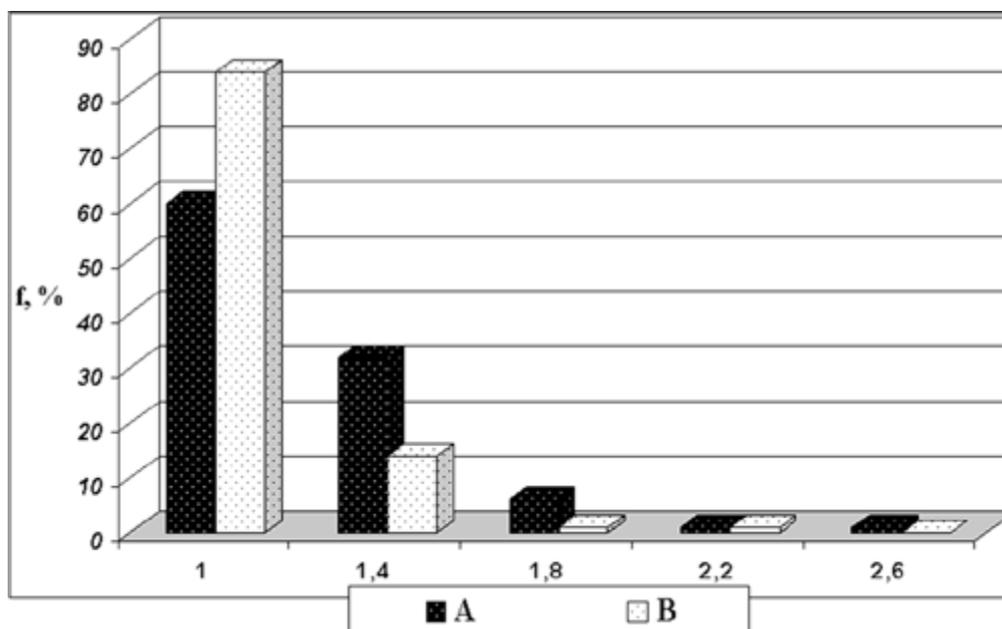


Рис.2 Элонгация (соотношение максимального и минимальной диаметров клетки) гистограмм красного костного мозга на стороне трансплантации культуры островковых клеток (А) и на интактной стороне (В)

Сравнение формы распределения гистограмм культуры островковых клеток, клеток красного костного мозга на стороне трансплантации и на интактной стороне по критерию  $\chi^2$  показывает достоверность выявленных различий ( $P < 0,05$ ).

Для подтверждения феномена развития в организме реципиента толерантности к трансплантированным в красный костный мозг ксеногенным островковым клеткам использовалась тест-система, включающая: 1) лимфоциты, полученные от экспериментальных животных (3 собаки после трансплантации культуры ОКПЖ кроличьих эмбрионов в красный костный мозг, контрольные здоровые собаки); 2) среду RPMI1640 с 20% сывороткой соответствующих животных; 3) суспензию культивированных  $\gamma$ -клеток кроличьих эмбрионов. Известно, что механизмы иммунообусловленного повреждения не могут быть полностью симитированы в модели *in vitro*, в данном случае возможно оценить качественный уровень реакции клона цитотоксических лимфоцитов, специфически взаимодействующих с  $\gamma$ -клетками.

Процент поврежденных  $\gamma$ -клеток культуры кроличьих эмбрионов определялся с помощью этидиума бромида на аппарате FACS vantage после 2 часовой коинкубации при 37°C, исходя из факта, что специфические цитотоксические лимфоциты, взаимодействуя с  $\gamma$ -клетками, дестабилизируют их мембрану и тем самым определяют позитивность этих клеток на окраску этидиумом бромидом (этидиум-бромид – позитивные клетки, т.е. поврежденные клетки). В результате проведенного исследования было установлено, что при уровне контрольных показателей, соответствующих 5,1% этидиум-бромид – позитивных клеток, количество их при инкубации с компонентами крови собак после трансплантации культуры ОКПЖ кроличьих эмбрионов в красный костный мозг составляет 14,6,8%. В то же время количество этидиум-бромид – позитивных клеток в экспериментальных сериях, включающих контрольных собак достигает 40,5±11,2%. Иммунокомпетентные клетки в присутствии сывороточного компонента крови, полученной от собак после трансплантации культуры ОКПЖ кроличьих эмбрионов в красный костный мозг, оказывают меньшее дестабилизирующее влияние на клеточную мембрану

культивированных эмбриональных ОКПЖ. Это свидетельствует о развитии толерантности к антигенам островковых клеток кроличьих эмбрионов со стороны иммунной системы организма реципиента-собаки.

#### Результаты

Приведенные данные демонстрируют, что в мазках красного костного мозга через 12 месяцев после трансплантации культуры островковых клеток присутствует популяция клеток, не характерная для контрольных мазков красного костного мозга. Эта популяция клеток по морфометрическим параметрам достоверно отличается от клеток красного костного мозга в контрольных мазках. Морфометрические параметры указанной популяции клеток сходны с параметрами  $\beta$ -клеток.

Полученные гистологические и морфометрические различия на стороне трансплантации и на противоположной стороне согласуются с асимметрией активности инсулина в венозной крови на стороне трансплантации и противоположной стороне и свидетельствуют о длительном эффекте ксенотрансплантации культуры островковых клеток в красный костный мозг.

#### Литература

1. 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;77:148-152
2. Reach G. Islet transplantation: a field on the move. *Nephrol Dial Transplant* 2001;16:893-896
3. Basadonna G, Montorci F, Kakizaki K, Merrell RC. Cyclosporin A and islet function. *A J Surg* 1988;156:191-193
4. Menegazzo LA, Ursich MJ, Fukui RT et al. Mechanism of the diabetogenic action of cyclosporin A. *Horm Metab Res* 1998;30:663-667
5. Шотт А.В., Третьяк С.И. и др. Необычная реакция на чужеродные ткани.-в 2-х частях.-Минск.-1992.
6. Barker C.F., Billingham R.E. Immunologically privileged sites *Advances in Immunology*. Academic Press, New York, 1977;24-25
7. Barker C.F., Markmann J.F., Posselt A.M., Naji A. Studies of privileged sites and islet transplantation. *Transplant Proc.* 1991; 23: 2138-2142
8. Misler S., Falke L., Gillis A. Tissue culture of fetal pancreas *Proc Nat Acad Sci USA*.1986; 83: 7119-7123