

DOI: 10.15825/1995-1191-2023-2-107-117

ВНУТРИБРЮШИННОЕ ВВЕДЕНИЕ КЛЕТОЧНО-ИНЖЕНЕРНОЙ КОНСТРУКЦИИ ПОДЖЕЛУДОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ КРЫСАМ С ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫМ САХАРНЫМ ДИАБЕТОМ (ПРЕДВАРИТЕЛЬНЫЕ РЕЗУЛЬТАТЫ)

А.С. Пономарева, Н.В. Баранова, А.О. Никольская, Л.А. Кирсанова, Н.А. Онищенко, З.З. Гоникова, Г.Н. Бубенцова, Е.А. Волкова, Ю.Б. Басок, В.И. Севастьянов

ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр трансплантологии и искусственных органов имени академика В.И. Шумакова» Минздрава России, Москва, Российская Федерация

Создание биоискусственной поджелудочной железы (ПЖ), в том числе клеточно-инженерной конструкции (КИК), сформированной на основе островков Лангерганса и биосовместимого матрикса, имитирующего нативное микроокружение панкреатической ткани, является одним из подходов к лечению сахарного диабета I типа (СД I). **Целью** работы было проведение предварительных исследований *in vivo* функциональной эффективности внутрибрюшинного введения клеточно-инженерной конструкции эндокринного отдела поджелудочной железы и суспензии панкреатических островков крысы в экспериментальной модели СД I. **Материалы и методы.** Тканеспецифический матрикс получали в результате децеллюляризации фрагментов ПЖ человека. Определяли жизнеспособность и функциональную активность островков крысы, выделенных с помощью коллагеназы. Экспериментальный СД I моделировали путем внутрибрюшинного введения малых доз стрептозотоцина и неполного адьюванта Фрейнда крысам. Крысам дважды вводили внутрибрюшинно КИК ПЖ ($n = 2$) или суспензию островков ($n = 1$). Оценивали уровень глюкозы в крови и моче крыс, а также проводили гистологическое исследование органов (поджелудочная железа и почки) экспериментальных животных. **Результаты.** После первого введения отмечали постепенное снижение уровня глюкозы в крови всех животных более чем на 47% от исходных значений, у которых к 24 суткам наблюдения происходил подъем уровня глюкозы до исходных гипергликемических показателей. После повторного введения наблюдали снижение уровня гликемии у животных с КИК ПЖ на 63,4% и на 47,5% – у крысы с суспензией островков. Через 5 недель эксперимента происходило постепенное повышение уровня глюкозы в крови у всех животных. При этом гликемический показатель крысы с введенной КИК ПЖ был на 62% ниже показателя гликемии у крысы с введенными островками. **Заключение.** В предварительных экспериментах показано, что аллогенные панкреатические островки в составе КИК ПЖ увеличивают длительность стабильного уровня гликемии у крыс с СД I.

Ключевые слова: поджелудочная железа, островки Лангерганса, клеточно-инженерная конструкция, тканеспецифический матрикс, модель сахарного диабета.

Для корреспонденции: Пономарева Анна Сергеевна. Адрес: 123182, Москва, ул. Щукинская, д. 1. Тел.: (499) 196-26-61; (926) 585-23-73. E-mail: a.s.ponomareva@gmail.com

Corresponding author: Anna Ponomareva. Address: 1, Shchukinskaya str., Moscow, 123182, Russian Federation. Phone: (499) 196-26-61; (926) 585-23-73. E-mail: a.s.ponomareva@gmail.com

INTRAPERITONEAL INJECTION OF CELL-ENGINEERED PANCREAS IN RATS WITH EXPERIMENTAL TYPE I DIABETES (PRELIMINARY RESULTS)

A.S. Ponomareva, N.V. Baranova, A.O. Nikolskaya, L.A. Kirsanova, N.A. Onishchenko, Z.Z. Gonikova, G.N. Bubentsova, E.A. Volkova, Yu.B. Basok, V.I. Sevastianov

Shumakov National Medical Research Center of Transplantology and Artificial Organs, Moscow, Russian Federation

Creation of a bioartificial pancreas, including a cell-engineered construct (CEC) formed from pancreatic islets (islets of Langerhans) and a biocompatible matrix mimicking the native microenvironment of pancreatic tissue, is one of the approaches to the treatment of type 1 diabetes mellitus (T1D). **Objective:** to conduct preliminary in vivo studies of the functional efficacy of intraperitoneal injection of a cell-engineered pancreatic endocrine construct and a suspension of rat pancreatic islets in an experimental T1D model. **Materials and methods.** Tissue-specific scaffold was obtained by decellularization of human pancreatic fragments. The viability and functional activity of rat islets isolated with collagenase were determined. Experimental T1D was modeled by intraperitoneal injection of low-dose streptozotocin and incomplete Freund's adjuvant into rats. The rats were intraperitoneally injected twice with pancreatic CEC (n = 2) or islet suspension (n = 1). Glucose levels in the blood and urine of the rats were assessed. Histological examination of organs (pancreas and kidneys) of the experimental animals was carried out. **Results.** After the first injection, blood glucose levels gradually decreased in all animals by more than 47% of the initial values; by follow-up day 24, the glucose level rose to the initial hyperglycemic values. After repeated administration, a 63.4% decrease in glycemic level was observed in the rats with pancreatic CEC and a 47.5% decrease in the one with islet suspension. At week 5 of the experiment, blood glucose levels gradually increased in all animals. At the same time, the glycemic index of the rat with injected pancreatic CEC was 62% lower than the glycemic index of the rat with injected islets. **Conclusion.** Allogeneic pancreatic islets in pancreatic CEC increase the duration of stable glycemic level in T1D rats.

Keywords: pancreas, islets of Langerhans, cell-engineered construct, tissue-specific scaffold, diabetes model.

1. ВВЕДЕНИЕ

Сахарный диабет I типа (СД I) – аутоиммунное заболевание с критической потерей инсулинпродуцирующих β -клеток, для лечения которого представляется перспективным применение клеточной терапии. Современным методом лечения тяжелых случаев СД I является трансплантация панкреатических островков согласно Эдмонтонскому протоколу [1–4], для проведения которой требуется значительная масса островков от нескольких доноров [5]. После трансплантации уменьшается риск развития осложнений СД, снижается количество гипергликемических эпизодов, а в некоторых случаях достигается полная инсулиннезависимость [6, 7].

Однако проблема нехватки донорских органов и ограниченного времени функционирования островков *in vivo* стимулирует поиск технологий тканевой инженерии и регенеративной медицины, направленных на долгосрочное сохранение их жизнеспособности и функциональной активности. В процессе выделения, культивирования и трансплантации островки утрачивают васкуляризацию, иннервацию, связь с внеклеточным матриксом (ВКМ), что делает их еще более восприимчивыми к окислительному

стрессу [8]. Кроме того, посттрансплантационное повреждение островков связано с мгновенными воспалительными реакциями, опосредованными кровью, иммунной реакцией, гипоксией и токсическим действием иммуносупрессоров [9–11].

В настоящее время совершенствование методов биотехнологии позволяет надеяться на перспективность применения технологий, базирующихся на создании тканевого эквивалента эндокринного отдела поджелудочной железы (ПЖ), сформированного на основе длительно сохраняющих жизнеспособность и функциональную активность инсулинпродуцирующих клеточных компонентов и биосовместимого матрикса, обеспечивающего им наилучшие условия. Преимущество использования островков при создании тканевого эквивалента ПЖ перед инсулинпродуцирующими клетками другого происхождения заключается в сохранении для β -клеток паракринных связей со всеми типами островковых клеток [12].

Важными составляющими тканевого эквивалента ПЖ являются компоненты ВКМ, предотвращающие клеточный стресс и способствующие сохранению жизнеспособности и функции островков. Биоматрикс с компонентами ВКМ представляют собой универсальные платформы для создания тканевого

эквивалента, так как обеспечивают структурно-механическую поддержку островкам, служат резервуаром ростовых факторов, цитокинов, антиоксидантов и передают через интегринные сигналы островковым клеткам [13–15].

Ранее исследования биоматрикс для тканевого эквивалента ПЖ были сосредоточены на искусственном конструировании каркасов, сходных с нативным ВКМ панкреатической ткани, но ни один из них не смог точно имитировать сложность фактического состава и структуры ВКМ [16–18].

М. Buitinga et al. [19] сообщили, что аллогенные островки, трансплантированные на пористом каркасе мышам с экспериментальным СД, способны восстанавливать стабильную нормогликемию по сравнению с островками, трансплантированными без каркаса. Показано, что при культивировании на коллагенсодержащих матриксах длительное время после выделения островки сохраняли жизнеспособность и проявляли секреторную активность [20, 21]. Трансплантация культивированных на таких матриксах островков становилась более успешной [22].

Последнее время в качестве альтернативы получения матрикса с сохраненными особенностями структуры и состава панкреатической ткани используются технологии децеллюляризации ПЖ. При разработке протоколов получения тканеспецифического децеллюляризованного матрикса важно учитывать для его функциональной активности сохранение в нем нативных компонентов ВКМ: структурных белков, гликопротеинов и факторов клеточной адгезии, при максимально полном удалении ДНК для минимизации иммунного ответа при имплантации тканевого эквивалента ПЖ [23–27].

Установлено, что островки, культивированные в присутствии тканеспецифического матрикса из децеллюляризованной ПЖ, увеличивали секрецию инсулина по сравнению с изолированными островками в монокультуре [28, 29]. D. Wu et al. [30] на экспериментальной модели СД I показали, что рецеллюляризованная популяцией инсулинпродуцирующих клеток ткань ПЖ способна контролировать уровень глюкозы в крови мышей по сравнению с такими же клетками, культивированными на чашках Петри.

Ранее нами были описаны подходы к получению тканеспецифических матриксов из децеллюляризованной ПЖ крысы [31] и человека [28], показано

сохранение структуры, пролонгирование жизнеспособности и функции, культивируемых с тканеспецифическим матриксом островков по сравнению с островками, культивированными без биоматрикса.

Таким образом, функциональность тканевого эквивалента ПЖ *in vitro* напрямую связана с сохранностью клеточного компонента, входящего в его состав, что в конечном итоге может иметь решающее значение *in vivo* [32].

Целью настоящей работы было проведение предварительных исследований *in vivo* функциональной эффективности КИК ПЖ и изолированных островков Лангерганса крысы при внутрибрюшинном введении крысам с экспериментальной моделью СД I.

2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

2.1. Экспериментальные животные

Эксперименты проводили на крысах-самцах породы Wistar, полученных из питомника лабораторных животных ООО «КролИнфо» с представлением ветеринарного свидетельства, подтверждавшего отсутствие в хозяйстве инфекционных заболеваний. Акклиматизацию и содержание лабораторных животных осуществляли в соответствии с межгосударственным стандартом ГОСТ ISO 10993-2-2009 «Изделия медицинские. Оценка биологического действия медицинских изделий». Часть 2. «Требования к обращению с животными».

Все манипуляции с животными проводили с соблюдением биоэтических принципов, утвержденных Европейской конвенцией о защите позвоночных животных (European Convention for the Protection of Vertebrate Animals Used for Experimental and other Scientific Purposes, 2005) и в соответствии с Правилами лабораторной практики, утвержденными приказом Минздрава России № 708 от 23.08.2010. Получено заключение об одобрении проведения экспериментальных исследований от Локального этического комитета при ФГБУ «НМИЦ ТИО им. ак. В.И. Шумакова» Минздрава России, Москва, Российская Федерация от 28 января 2021, протокол № 280121-1/1e.

2.2. Модель экспериментального сахарного диабета I типа

СД I моделировали согласно известному запатентованному способу на крысах-самцах породы Wistar в течение 16 суток (табл. 1) путем внутрибрюшин-

Таблица 1

Схема моделирования сахарного диабета I типа

Scheme for T1D modeling

Сутки	1	2	...	8	9	...	15	16
Введение стрептозотоцина		25 мг/кг			20 мг/кг			25 мг/кг
Введение неполного адьюванта Фрейнда	1 мл			1 мл			1 мл	

ного введения малотоксичных доз стрептозотоцина каждые 7 суток [33]. Стрептозотозин вводили после 12 часов голодания, дозу препарата определяли из расчета 25 мг/кг массы тела животного при первом введении, 20 мг/кг при повторном введении и 25 мг/кг при третьем введении. Для индукции аутоиммунного воспаления животным внутривентрально трехкратно вводили 1 мл неполного адьюванта Фрейнда за сутки перед каждым введением стрептозотоцина.

Ежедневно проводили наблюдения за животными, оценивали внешний вид, измеряли количество потребляемой животными воды. Каждую неделю проводили измерения уровня глюкозы в крови и в моче животных натошак, отслеживали динамику изменения веса. Для дальнейшего исследования отбирали крыс, высокий уровень гликемии которых оставался стабильным на протяжении двух недель.

2.3. Технология получения тканеспецифического матрикса из децеллюляризованной ткани поджелудочной железы

Для формирования тканевого эквивалента ПЖ в качестве биомиметика ВКМ был выбран тканеспецифический мелкодисперсный матрикс, полученный в результате децеллюляризации фрагментов ПЖ человека (ДПЖч-матрикс) по разработанному ранее протоколу [28]. Проведенные исследования показали, что ДПЖч-матрикс сохраняет морфофункциональные свойства нативного ВКМ панкреатической ткани, содержит основные фибриллярные белки (коллаген I типа, эластин), обладает низкой иммуногенностью (не более 0,1% ДНК), не цитотоксичен относительно адгезии и пролиферации клеточных культур [28].

На разработку технологии получения и исследования тканеспецифического матрикса было получено заключение об одобрении проведения экспериментальных исследований от Локального этического комитета при ФГБУ «НМИЦ ТИО им. ак. В.И. Шумакова» Минздрава России, Москва, Российская Федерация от 16 марта 2018, протокол № 160318-1/1э.

2.4. Выделение, идентификация и культивирование островков Лангерганса крысы

Выделение островков проводили из ПЖ крыс-самцов породы Wistar (ПЖкр). Животных подвергали ингаляционной эвтаназии с помощью изофлурана (Laboratories Karigzo, Испания), затем в стерильных условиях иссекали ПЖкр, которую сразу помещали в чашку Петри с холодным (+4 °C) раствором Хенкса без ионов Ca^{2+} и Mg^{2+} (Thermo Fisher Scientific, США), содержащим амфотерицин В. Все дальней-

шие манипуляции, требующие стерильности, проводили в условиях ламинарного бокса, обеспечивающего поток стерильного воздуха.

В панкреатическую ткань последовательными инъекциями интрапаренхиматозно вводили 2 мл раствора коллагеназы NB1 (активность 20 PZ U/g ткани) с нейтральной протеазой NP (активность 1,5 DMC U/g ткани) (Serva, Германия). Растянутую ткань ПЖкр, не разрезая, аккуратно разделяли микропинцетами на 10–12 примерно равных частей, переносили во флакон и инкубировали 7–10 мин в орбитальном шейкер-инкубаторе (Biosan, Латвия) при температуре 37,0 °C со скоростью вращения 150 об/мин. Действие коллагеназы останавливали добавлением холодного (+4 °C) раствора Хенкса. Образовавшиеся мелкие фрагменты фильтровали через стрейнер (Corning-Costar, США) с диаметром ячеек 100 мкм, собирали фильтрат в конические пробирки и центрифугировали 1 мин при скорости 800 об/мин. Супернатант дважды отмывали свежим раствором Хенкса в течение 1–1,5 мин при 1200–1300 об/мин для получения островковой суспензии.

Островки идентифицировали с помощью окрашивания дитизоном (Sigma-Aldrich, США) непосредственно после выделения. Для этого часть суспензии смешивали с раствором дитизона (1 мг/мл) в соотношении объемов 2 : 1 и инкубировали 20–30 мин при температуре 37 °C.

Свежевыделенные островки ресуспендировали в полной ростовой среде, содержащей DMEM (глюкоза 1,0 г/л) (ПанЭко, Россия), 10% эмбриональной телячьей сыворотки (HyClone, США), Hepes (Thermo Fisher Scientific, США), 2 mM аланил-глутамин (ПанЭко, Россия), 1% антибиотика/антимикотика (Thermo Fisher Scientific, США), вносили в культуральные флаконы и культивировали 24 часа в стандартных условиях при 37 °C в CO₂-инкубаторе в увлажненной атмосфере, содержащей 5% CO₂.

2.5. Оценка жизнеспособности и функциональной активности островков Лангерганса

Жизнеспособность культивируемых в течение 24 часов островков определяли путем флуоресцентного окрашивания акридиновым оранжевым и йодистым пропидием (АО/PI) (ПанЭко, Россия).

Для окрашивания часть островковой суспензии помещали в чашку Петри, смешивали с приготовленным рабочим раствором красителя в соотношении объемов 2 : 1 и инкубировали в темноте в течение 15–30 мин. Подсчет жизнеспособных островков проводили с помощью люминесцентного микроскопа Nikon Eclipse 50i (Nikon, Япония) при увеличении объектива $\times 10$.

Для определения функциональной активности островков после 24 часов культивирования проводили измерение содержания инсулина под влиянием традиционного стимулятора секреции гормона. Для этого ростовую среду заменяли свежей с низким содержанием глюкозы 1,0 г/л (2,8 ммоль/л). После 60-минутной инкубации в стандартных условиях отбирали пробы культуральной среды. Затем удаляли ростовую среду и заменяли свежей с высокой концентрацией глюкозы – 4,5 г/л (25 ммоль/л). Через 60 минут инкубации в стандартных условиях также отбирали пробы культуральной среды (по 2 пробы для каждого срока культивирования) для проведения иммуноферментного анализа (ИФА), используя набор Ra Insulin ELISA Kit (Thermo Fisher Scientific, США).

2.6. Получение клеточно-инженерной конструкции поджелудочной железы

В качестве клеточного инсулинпродуцирующего компонента КИК ПЖ использовали очищенную суспензию культивированных островков. Островковую суспензию получали в результате центрифугирования в ростовой среде в течение 2 мин при скорости 1200 об/мин, затем очищали в растворе Хенкса при том же режиме.

Для каждого образца КИК ПЖ отбирали 2000 островков, полученных в среднем из 1,5 ПЖ крыс-доноров, ресуспендировали в 1,0–1,2 мл раствора Хенкса и смешивали с мелкодисперсным стерильным ДПЖч-матриксом ($10,0 \pm 0,1$ мг) из ПЖ человека.

Полученный образец КИК ПЖ помещали в шприц с размером иглы 23 G непосредственно перед введением крысам-реципиентам.

2.7. Внутривентриальное введение клеточно-инженерной конструкции поджелудочной железы и островков Лангерганса

Для корригирующей терапии отобрали трех крыс с выраженным и стабильным аутоиммунным СД I: инъекционно внутривентриально в нижнюю треть живота крысам № 1 и № 3 вводили образец КИК ПЖ (2000 аллогенных островков Лангерганса с ДПЖч-матриксом); крысе № 2 – 2000 аллогенных панкреатических островков в виде суспензии.

Наблюдение за всеми животными продолжалось более 12 недель. Проводили ежедневный мониторинг количества потребляемой животными воды. Ежедневно контролировали массу тела животных, а также определяли содержание глюкозы в крови и в моче. Уровень гликемии в капиллярной крови животных измеряли натощак ежедневно с помощью глюкометра Accu-Check Active (Roche, Швейцария). Все манипуляции проводили в утренние часы (в период с

9 до 12 часов). Содержание глюкозы и кетоновых тел в моче оценивали с помощью индикаторных полосок Кетоглюк-1 (Биосенсор АН, Россия).

2.8. Гистологическое исследование

Извлеченные ПЖ и почки всех экспериментальных животных фиксировали в 10% забуференном формалине, обезвоживали в спиртах восходящей концентрации, затем выдерживали в смеси хлороформа и этанола, после чего переносили в хлороформ и заливали в парафиновые блоки.

Срезы толщиной 5 мкм получали с помощью микротомы RM2245 (Leica, Германия) и в дальнейшем окрашивали гематоксилином и эозином (H&E) и на общий коллаген (метод Массона). Иммуногистохимическое окрашивание основных типов островковых клеток проводили с использованием антител к инсулину и глюкагону (Abcam, Великобритания) и системы визуализации Rabbit Specific HRP|DAB (ABC) Detection IHC kit (Abcam, Великобритания).

2.9. Статистический анализ

Статистическую обработку данных проводили с использованием программного обеспечения Microsoft Excel (2016). Для определения статистической достоверности различий средних между выборками при оценке функциональной активности островков Лангерганса здоровой крысы (содержание инсулина в культуральной среде при стимуляции глюкозой) применяли t-критерий Стьюдента. Различия считали статистически достоверными в том случае, если уровень значимости p не превышал порогового значения 0,05.

3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

3.1. Модель экспериментального сахарного диабета I типа

Для эксперимента было отобрано 4 крысы с экспериментальным СД I с глюкозой в крови натощак: 15,8; 26,7; 28,1; 18,6 ммоль/л. У животных отмечали значительную потерю массы тела (с 350 до 260 г), гиподинамию, появление незаживающих ран на хвосте, пожелтение шерсти, истончение волос, полиурию, выраженную полидипсию. Каждое животное потребляло в среднем 209 ± 6 мл воды в сутки, в то время как здоровая крыса выпивает 14 ± 3 мл воды/сут.

Гистологическое исследование образцов ПЖ крысы с уровнем гликемии 18,6 ммоль/л выявило изменения как в экзокринной паренхиме железы, так и в островках Лангерганса по сравнению с морфологической картиной здорового животного (рис. 1, а–в). В паренхиме некоторые дольки претерпевали дистрофические изменения, в отдельных случаях вплоть до некроза. В островках отмечалась инфильтрация клетками воспалительного ряда: в толще островка и

по периметру обнаруживались полиморфно-ядерные лейкоциты и одиночные макрофаги. В центре островка выявляли вакуолизированные и некротизированные инсулоциты, кроме того, изменялась и форма островка (рис. 1, г). Иммуногистохимическое окрашивание антителами к инсулину было негативным, что подтверждало гибель β -клеток (рис. 1, д), в то же время глюкагонпозитивные клетки в островках сохранялись (рис. 1, е). Полученные результаты могут свидетельствовать об эффективности примененной модели индукции СД I.

3.2. Жизнеспособность и функциональная активность изолированных островков Лангерганса

Значительная часть свежевыделенных островков имели округлую или овальную форму и в основном сохраняли целостность, что свидетельствовало о том, что в процессе выделения макроструктура островков не была повреждена (рис. 2, а). Дитизон избирательно окрашивал панкреатические островки в красно-

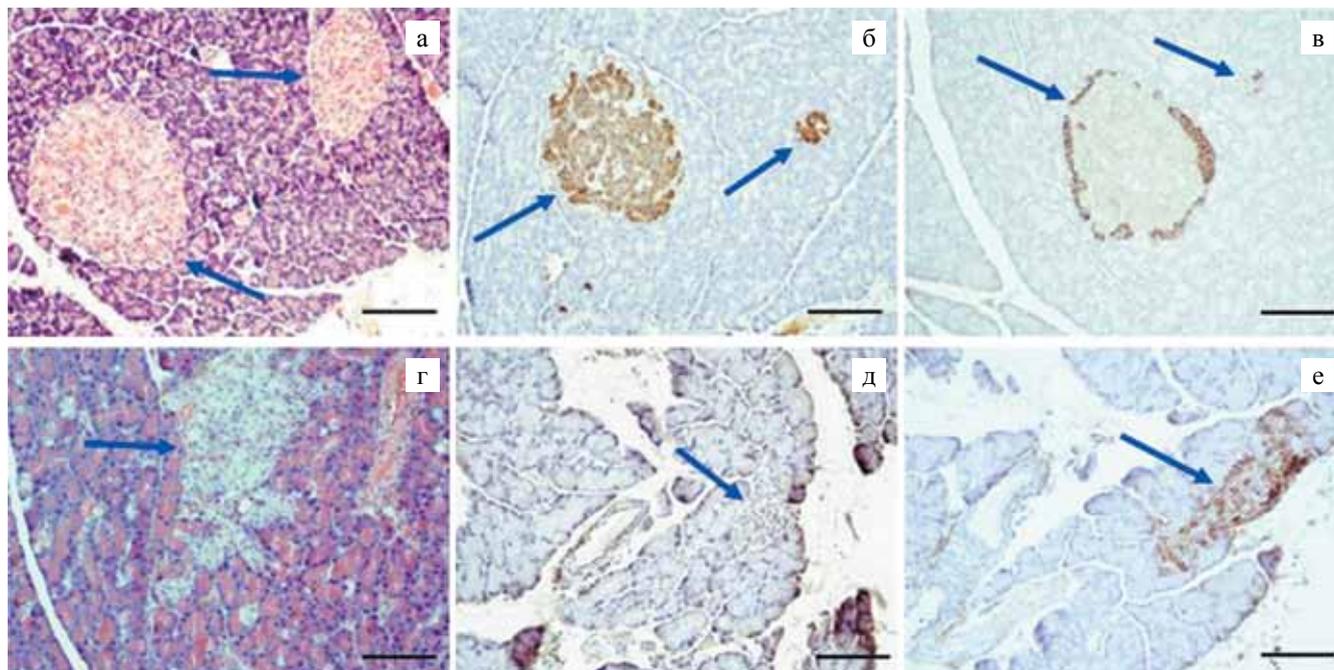


Рис. 1. Поджелудочная железа крысы: а-в – здоровая крыса; г-е – крыса с экспериментальным сахарным диабетом I типа; а, г – гематоксилин и эозин; б, д – иммуногистохимическое окрашивание на инсулин; в, е – иммуногистохимическое окрашивание на глюкагон. Стрелками отмечены островки Лангерганса. Бар 100 мкм

Fig. 1. Rat pancreas: а-в – healthy rat; г-е – rat with experimental T1D; а and г – H&E stain; б and д – insulin immunohistochemical staining; в and е – glucagon immunohistochemical staining. Arrows indicate pancreatic islets. Scale bar = 100 μ m

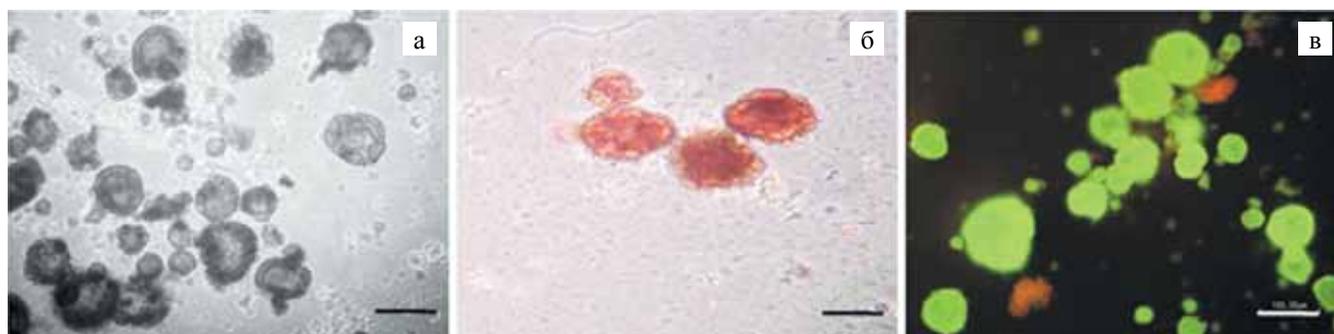


Рис. 2. Изолированные островки Лангерганса крысы: а – световая микроскопия без окрашивания; б – окрашивание дитизоном; в – островки, культивированные 24 часа, флуоресцентное окрашивание акридиновым оранжевым и йодистым пропидием (АО/ПИ). Бар 100 мкм

Fig. 2. Isolated rat pancreatic islets: а – light microscopy without staining; б – dithizone staining; в – islets cultured for 24 hours, acridine orange/propidium iodide (AO/PI) staining. Scale bar = 100 μ m

оранжевый цвет, при этом ацинарные клетки оставались неокрашенными (рис. 2, б).

Через сутки после выделения проводили окрашивание панкреатических островков крысы витальным

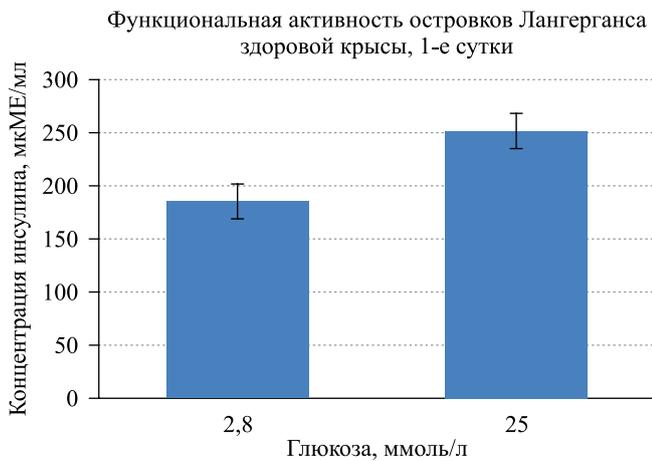


Рис. 3. Сравнительный анализ концентрации инсулина до и после стимуляции глюкозой культивированных 1 сутки изолированных панкреатических островков крысы

Fig. 3. Comparative analysis of insulin levels before and after glucose stimulation of cultured 1-day isolated rat pancreatic islets

красителем для определения их жизнеспособности. Было установлено, что более 95% островков остаются жизнеспособными (рис. 2, в).

Подтверждением функциональной активности (наличия гормонально активных β -клеток) культивированных островков явились результаты анализа проб культуральной жидкости, взятых через 1 сутки инкубации до и после стимуляции «гипергликемическим» уровнем глюкозы – 4,5 г/л (25 ммоль/л) (рис. 3). Показатели концентраций инсулина до и после стимуляции в пробах составили $185,4 \pm 16,4$ и $251,7 \pm 16,6$ мкМЕ/мл соответственно, что является увеличением на 35,8%.

3.3. Результаты внутрибрюшинного введения клеточно-инженерной конструкции поджелудочной железы и островков Лангерганса

Наблюдение за животными продолжалось 87 суток после первого введения КИК ПЖ крысам № 1 и № 3 и островковой суспензии крысе № 2 (рис. 4, табл. 2). На 24-е сутки эксперимента проводили повторное введение КИК ПЖ и суспензии островков. Крысу № 1 вывели из эксперимента на 65-е сутки для гистологического анализа состояния ПЖ.

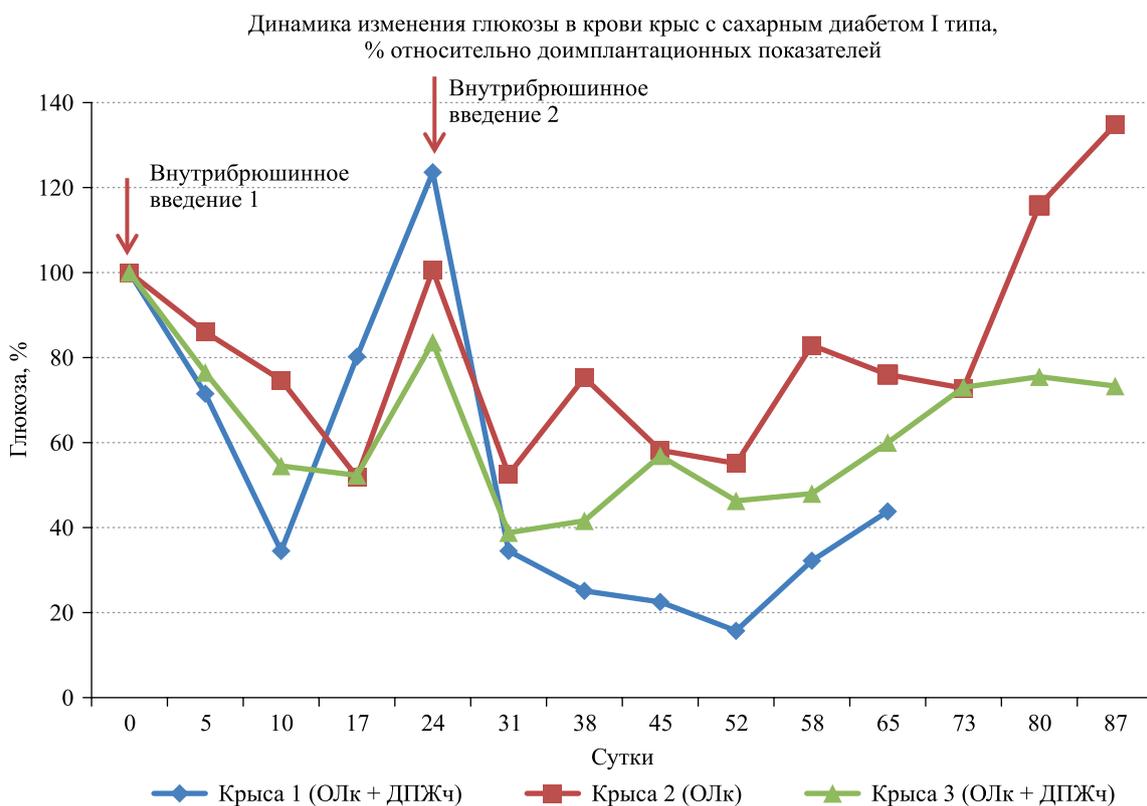


Рис. 4. Изменение уровня глюкозы в крови крыс с моделью сахарного диабета I типа после внутрибрюшинного введения клеточно-инженерной конструкции поджелудочной железы или островковой суспензии. ОЛк – островки Лангерганса крысы, ДПЖч – матрикс из децеллюляризованной поджелудочной железы человека

Fig. 4. Changes in blood glucose levels in rats with T1D model after intraperitoneal injection of cell-engineered pancreatic construct or islet suspension. ОЛк – rat pancreatic islets; ДПЖч – decellularized human pancreas scaffold

На 5-е сутки после внутрибрюшинного введения КИК ПЖ уровень гликемии у крыс № 1 и № 3 снизился на 28,5 и 23,5% от исходных значений соответственно, в то время как у крысы № 2 (введение суспензии островков) – на 13,9%. На 10-е сутки у крысы № 1 уровень гликемии достиг минимального значения 9,2 ммоль/л (снижение на 65,5%). У крысы № 3 минимальное значение глюкозы – 14,7 ммоль/л (снижение на 47,7%) установилось к 17-м суткам наблюдения. У крысы № 2 с 1-х по 10-е сутки достижение минимального уровня гликемии наблюдали (снижение на 48,1%) на 17-е сутки.

На 24-е сутки у всех крыс отмечалось резкое повышение уровня глюкозы, поэтому было принято решение провести повторное введение КИК ПЖ и суспензии островков этим же животным. Через неделю резкое снижение уровня гликемии наблюдали у всех крыс, при этом у крысы № 2 глюкоза снизилась на 47,5%, а у крыс № 1 и № 3 – на 65,5 и 61,2% соответственно.

На протяжении последующих 3 недель у крысы № 1 продолжалось снижение гликемии и к 52-м суткам составило 4,2 ммоль/л, затем происходило постепенное ее повышение. На момент вывода из эксперимента (65 суток) крысы № 1 концентрация глюкозы в крови у нее составляла 11,7 ммоль/л.

У крысы № 3 вплоть до 87 суток отмечали незначительные колебания уровня гликемии с тенденцией к повышению (от 10,9 до 16,9 ммоль/л).

У крысы № 2 наблюдали неустойчивый уровень гликемии до 73 суток, далее произошел возврат к первоначальным значениям глюкозы в крови (выше 20 ммоль/л), а затем превышение на 34,8% относительно исходных значений. К 87-м суткам показатель

глюкозы у крысы № 3 был на 62% ниже показателя гликемии у крысы № 2.

После первого внутрибрюшинного введения было отмечено снижение концентрации глюкозы в моче, которое коррелировало с уровнем гликемии в крови всех животных, но к 24-м суткам значение глюкозы в моче резко увеличилось до максимального (табл. 3). При повторном введении у всех крыс наблюдали существенное снижение глюкозы в моче вплоть до 65-х суток, при этом у крысы № 1 в течение 3 недель глюкоза в моче отсутствовала при стабильной нормогликемии в крови (4,2–6,7 ммоль/л). После 65-х суток у крысы № 1 произошел резкий скачок глюкозы в моче при некотором увеличении глюкозы в крови (11,7 ммоль/л), что послужило поводом для вывода животного из эксперимента с целью оценки состояния ПЖ и почек. У крысы № 3 происходило снижение уровня глюкозы в моче до 2,8 ммоль/л, а затем постепенно повышалось. У крысы № 2 также наблюдали снижение уровня глюкозы в моче на короткий срок, после которого происходило повышение значений до 112 ммоль/л к 87-м суткам, что в свою очередь коррелировало с уровнем гликемии в крови.

Оценка содержания кетоновых тел в моче экспериментальных животных позволила выявить снижение кетона с 1,5 до 0,5 ммоль/л у всех трех экспериментальных крыс.

После внутрибрюшинного введения КИК ПЖ или суспензии островков у всех животных наблюдали снижение потребления питьевой воды с 209 ± 16 до 151 ± 11 мл/сут. Отмечена прибавка в массу тела животных на 30–40 г, заживление ран на хвосте, восстановление структуры и окраса волос.

Таблица 2

Изменение уровня глюкозы в крови экспериментальных животных
Changes in blood glucose levels in the experimental animals

Сутки	Крыса № 2 (ОЛк), глюкоза в крови, ммоль/л	Крыса № 1 (ОЛк + ДПЖч), глюкоза в крови, ммоль/л	Крыса № 3 (ОЛк + ДПЖч), глюкоза в крови, ммоль/л
0 (введение 1)	15,8	26,7	28,1
5	13,6	19,1	21,5
10	11,8	9,2	15,3
17	8,2	21,4	14,7
24 (введение 2)	15,9	33,0	23,5
31	8,3	13,3	10,9
38	11,9	9,2	11,7
45	9,2	6,7	16,0
52	8,7	6,0	13,0
58	13,1	4,2	13,5
65	12,0	8,6	16,9
73	11,5	11,7	25
80	18,3	–	21,2
87	21,3	–	20,6

Морфологический анализ образцов ПЖ и почек не выявил отличий в органах трех экспериментальных животных. В ПЖ, как непосредственно

в островках, так и в паренхиме железы в целом, иммунопозитивные β -клетки не были обнаружены (рис. 5, а), что свидетельствовало об отсутствии реге-

Таблица 3

Изменение уровня глюкозы в моче экспериментальных животных
Changes in urine glucose levels in the experimental animals

Сутки	Крыса № 2 (ОЛк), глюкоза в моче, ммоль/л	Крыса № 1 (ОЛк + ДПЖч), глюкоза в моче, ммоль/л	Крыса № 3 (ОЛк + ДПЖч), глюкоза в моче, ммоль/л
0 (введение 1)	14–28	14–28	28–56
5	14	14	28
10	14–28	5,6	14
17	14–28	2,8–5,6	2,8
24 (введение 2)	56–112	112	56–112
31	2,8–5,6	5,6–14	2,8–5,6
38	2,8–5,6	5,6–14	2,8
45	14	0	14–28
52	5,6–14	0–2,8	14–28
58	14–28	0–2,8	14
65	14–28	112	5,6–14
73	28	–	14–28
80	14–56	–	28
87	56–112	–	28–56

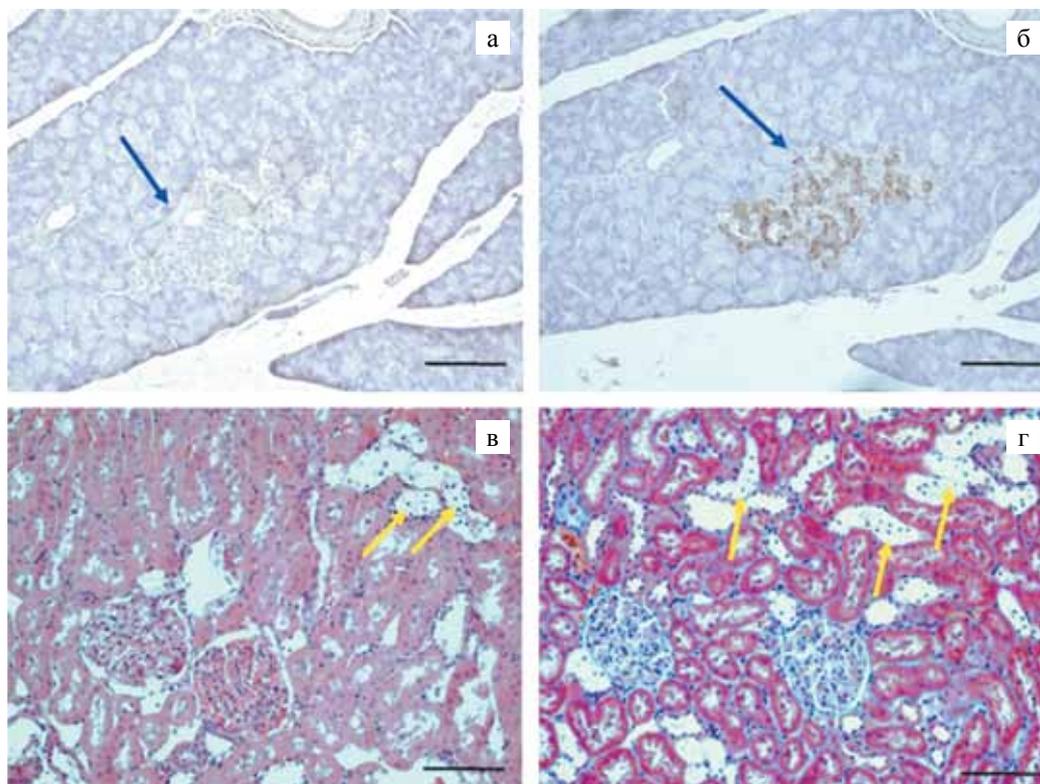


Рис. 5. Поджелудочная железа (а, б) и почка (в, г) экспериментальных крыс: а – отсутствие инсулинпозитивных β -клеток в островке; б – глюкагонпозитивные α -клетки в островке; в – гематоксилин и эозин; г – окрашивание по методу Массона. Синими стрелками отмечены островки Лангерганса, желтыми – клетки Armanni–Ebstein в эпителии канальцев. Бар 100 мкм

Fig. 5. Pancreas (а, б) and kidney (в, г) of experimental rats: а – no insulin positive beta cells in the islet; б – glucagon positive alpha cells in the islet; в – H&E stain; г – Masson's trichrome stain. Blue arrows indicate islets of Langerhans, yellow arrows indicate Armanni–Ebstein cells in tubular epithelium. Scale bar = 100 μ m

неративных процессов и индукционного воздействия трансплантированных островков на прогениторные клетки-предшественники. При этом глюкоагонпозитивные α -клетки в островках отчетливо определялись (рис. 5, б). В гистологических препаратах почки выраженных дегенеративных изменений сосудисто-клубочкового аппарата не отмечалось. В то же время в эпителии канальцев выявлялись многочисленные вакуолизированные клетки. Мы полагаем, что это так называемые клетки Armanni–Ebstein, которые считаются патогномичными при сахарном диабете (рис. 5, в, г).

В технологиях тканевой инженерии и регенеративной медицины можно выделить два механизма действия КИК *in vivo*, которые лежат в основе двух подходов к лечению патологических состояний органов [34]:

- стимулирование внутренней (физиологической) регенерации поврежденных тканевых структур;
- частичная или полная временная замена функций поврежденных тканевых структур.

Это относится и к КИК ПЖ, в которой тканеспецифический матрикс обеспечивает панкреатическим островкам более длительное выживание и эффективное функционирование *in vivo*.

Анализ полученных результатов позволяет предположить, что снижение гликемического уровня происходит не в результате стимулирования процессов регенерации (восстановления) β -клеток в собственных островках, а вследствие функциональной эффективности аллогенных островков. При этом при внутрибрюшинном введении КИК ПЖ достигается более выраженный антидиабетический эффект у крыс с СД I по сравнению с внутрибрюшинным введением суспензии островков.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Из предварительных результатов, полученных в экспериментальной модели СД I, можно предположить, что при внутрибрюшинном введении КИК ПЖ (ксеногенный тканеспецифический матрикс в сочетании с аллогенными островками Лангерганса) происходит значительно большее снижение концентрации глюкозы в крови крыс по сравнению с суспензией островков. Повторное внутрибрюшинное введение КИК ПЖ и островковой суспензии увеличивает длительность стабильного уровня гликемии, но, вероятно, не индуцирует процессы восстановительной регенерации островковой ткани ПЖ.

Следует отметить, что, во-первых, для подтверждения или опровержения полученных результатов требуется проведение экспериментов на достаточной для получения статистически достоверных результатов выборке животных. Во-вторых, механизм гипогликемического действия аллогенных островков может зависеть от места локализации КИК ПЖ и

островковой суспензии. Кроме внутрибрюшинного введения необходимо исследовать в экспериментальной модели СД I функциональное действие островков при их трансплантации в виде суспензии или имплантации в составе КИК, например в селезенку, брыжейку, сальник или под капсулу почки.

Авторы заявляют об отсутствии

конфликта интересов.

The authors declare no conflict of interest.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ / REFERENCES

1. Fiorina P, Shapiro AM, Ricordi C, Secchi A. The clinical impact of islet transplantation. *Am J Transplant.* 2008; 8: 1990–1997.
2. Shapiro AM, Lakey RT, Ryan EA, Korbitt GS, Toth E, Warnock GL et al. Islet transplantation in seven patients with type 1 diabetes mellitus using a glucocorticoid-free immunosuppressive regimen. *N Engl J Med.* 2000; 343 (4): 230–238. doi: 10.1056/NEJM200007273430401.
3. Hering BJ, Clarke WR, Bridges ND, Eggerman TL, Alejandro R, Bellin MD et al. Phase 3 trial of transplantation of human islets in type 1 diabetes complicated by severe hypoglycemia. *Diabetes Care.* 2016; 39 (7): 1230–1240. doi: 10.2337/dc15-1988.
4. Barton FB, Rickels MR, Alejandro R, Hering BJ, Wease S, Naziruddin B et al. Improvement in outcomes of clinical islet transplantation: 1999–2010. *Diabetes Care.* 2012; 35 (7): 1436–1445. <https://doi.org/10.2337/dc12-0063>.
5. Ryan EA, Paty BW, Senior PA, Bigam D, Alfadhli E, Kneteman NM et al. Five-year follow-up after clinical islet transplantation. *Diabetes.* 2005; 54: 2060–2069. <https://doi.org/10.2337/diabetes.54.7.2060>.
6. Gerber PA, Lehmann R. Islet transplantation in type I diabetes mellitus. *Diabetologie.* 2015; 11 (7): 545–552.
7. Vantyghem MC, de Koning EJP, Pattou F, Rickels MR. Advances in beta-cell replacement therapy for the treatment of type 1 diabetes. *Lancet.* 2019; 394 (10205): 1274–1285.
8. Eguchi N, Damyar K, Alexander M, Dafoe D, Lakey JRT, Ichii H. Anti-Oxidative Therapy in Islet Cell Transplantation. *Antioxidants.* 2022; 11: 1038. <https://doi.org/10.3390/antiox11061038>.
9. Korsgren O, Nilsson B, Berne C, Felldin M, Foss A, Kallén R et al. Current status of clinical islet transplantation. *Transplantation.* 2005; 79: 1289–1293. doi: 10.1097/01.tp.0000157273.60147.7c.
10. Shapiro AM, Gallant HL, Hao EG, Lakey JR, McCready T, Rajotte RV et al. The portal immunosuppressive storm: relevance to islet transplantation. *Ther Drug Monit.* 2005; 27 (1): 35–37. doi: 10.1097/00007691-200502000-00008.
11. Bennet W, Sundberg B, Groth CG, Brendel MD, Brandhorst D, Brandhorst H et al. Incompatibility between human blood and isolated islets of Langerhans: a finding with implications for clinical intraportal islet transplantation? *Diabetes.* 1999; 48 (10): 1907–1914. doi: 10.2337/diabetes.48.10.1907.

12. Kumar N, Joisher H, Ganguly A. Polymeric scaffolds for pancreatic tissue engineering: a review. *Rev Diabet Stud.* 2018; 14 (4): 334–353.
13. Riopel M, Wang K. Collagen matrix support of pancreatic islet survival and function. *Frontiers in Bioscience.* 2014; 19: 77–90. doi: 10.2741/4196.
14. Lemos NE, de Almeida Brondani L, Dieter C, Rheinheimer J, Bouças AP, Bauermann Leitão C et al. Use of additives, scaffolds and extracellular matrix components for improvement of human pancreatic islet outcomes in vitro: A systematic review. *Islets.* 2017; 9 (5): 73–86. doi: 10.1080/19382014.2017.1335842.
15. Salvatori M, Katari R, Patel T, Peloso A, Mugweru J, Owusu K, Orlando G. Extracellular matrix scaffold technology for bioartificial pancreas engineering: state of the art and future challenges. *J Diab Sci Technol.* 2014; 8 (1): 159–169. doi: 10.1177/1932296813519558.
16. Gazia C, Gaffley M, Asthana A. Scaffolds for pancreatic tissue engineering. *Handbook of Tissue Engineering Scaffolds: Volume Two.* 2019; 765–786. doi: 10.1016/B978-0-08-102561-1.00032-4.
17. Fisher SA, Tam RY, Shoichet MS. Tissue mimetics: engineered hydrogel matrices provide biomimetic environments for cell growth. *Tissue Engineering.* 2014; 20 (5–6): 895–898. doi: 10.1089/ten.tea.2013.0765.
18. Coronel M, Stabler C. Engineering a local microenvironment for pancreatic islet replacement. *Curr Opin Biotechnol.* 2013; 24 (5): 900–908. doi: 10.1016/j.cop-bio.2013.05.004.
19. Buitinga M, Assen F, Hanegraff M. Micro-fabricated scaffolds lead to efficient remission of diabetes in mice. *Biomaterials.* 2017; 135: 10–22.
20. Abualhassan N, Sapozhnikov L, Pawlick RL, Kahana M, Pepper AR, Bruni A et al. Lung-derived microscaffolds facilitate diabetes reversal after mouse and human intraperitoneal islet transplantation. *PLoS One.* 2016; 11 (5): e0156053. doi: 10.1371/journal.pone.0156053.
21. Szebeni GJ, Tancos Z, Feher LZ, Alfoldi R, Kobolak J, Dinnyes A, Puskas LG. Real architecture for 3D Tissue (RAFT) culture system improves viability and maintains insulin and glucagon production of mouse pancreatic islet cells. *Cytotechnology.* 2017; 69 (2): 359–369. doi: 10.1007/s10616-017-0067-6.
22. Amer LD, Mahoney MJ, Bryant SJ. Tissue engineering approaches to cell-based type 1 diabetes therapy. *Tissue engineering.* 2014; 20 (5): 455–467.
23. Damodaran G, Vermette P. Decellularized pancreas as a native extracellular matrix scaffold for pancreatic islet seeding and culture. *J Tissue Eng Regen Med.* 2018; 12 (5): 1230–1237. doi: 10.1002/term.2655.
24. Mendibil U, Ruiz-Hernandez R, Retegi-Carrion S, Garcia-Urquia N, Olalde-Graells B, Abarrategi A. Tissue-specific decellularization methods: rationale and strategies to achieve regenerative compounds. *Int J Mol Sci.* 2020; 21: 5447. doi: 10.3390/ijms21155447.
25. Rana D, Zreigat H, Benkirane-Jessel N, Ramakrishna S, Ramalingam M. Development of decellularized scaffolds for stem cell-driven tissue engineering. *J Tissue Eng Regen Med.* 2017; 11 (4): 942–965. doi: 10.1002/term.2061.
26. Shirakigawa N, Ijima H. Decellularized tissue engineering. *Advances in Biomaterials for Biomedical Applications.* Springer Nature Singapore Pte Ltd. 2017; 66: 185–226. doi: 10.1007/978-981-10-3328-5_5.
27. Sevastianov VI, Basok YuB, Grigoriev AM, Nemets EA, Kirillova AD, Kirsanova LA et al. Decellularization of cartilage microparticles: Effects of temperature, supercritical carbon dioxide and ultrasound on biochemical, mechanical, and biological properties. *J Biomed Mater Res A.* 2023; 111 (4): 543–555. doi: 10.1002/jbm.a.37474.
28. Sevastianov VI, Ponomareva AS, Baranova NV, Kirsanova LA, Basok YuB, Nemets EA et al. Decellularization of Human Pancreatic Fragments with Pronounced Signs of Structural Changes. *Int J Mol Sci.* 2023; 24: 119. <https://doi.org/10.3390/ijms24010119>.
29. Mirmalek-Sani SH, Orlando G, McQuilling JP, Pareta R, Mack DL, Salvatori M et al. Porcine pancreas extracellular matrix as a platform endocrine pancreas bioengineering. *Biomaterials.* 2013; 34 (22): 5488–5495. doi: 10.1016/j.biomaterials.2013.03.054.
30. Wu D, Wan J, Huang Y, Guo Y, Xu T, Zhu M et al. 3D culture of MIN-6 cells on decellularized pancreatic scaffold: in vitro and in vivo study. *Biomed Res Int.* 2015; 2015: 432645. doi: 10.1155/2015/432645.
31. Sevastianov VI, Baranova NV, Kirsanova LA, Ponomareva AS, Basok YuB, Nemets EA, Gautier SV. Comparative analysis of the influence of extracellular matrix biomimetics on the viability and insulin-producing function of isolated pancreatic islets. *J Gene Engg Bio Res.* 2021; 3 (2): 17–25. doi: 10.33140/igerb.03.02.02.
32. Karaoz E, Genç ZS, Demircan PÇ, Aksoy A, Duruksu G. Protection of rat pancreatic islet function and viability by coculture with rat bone marrow-derived mesenchymal stem cells. *Cell Death Dis.* 2010; 1: e36. doi: 10.1038/cddis.2010.14.
33. Великий ДА, Закирьянов АР, Клименко ЕД, Онищенко НА, Поздняков ОМ. Патент на изобретение «Способ моделирования сахарного диабета I типа у крыс» от 27.09.2010. *Velikiy DA, Zakir'yanov AR, Klimentko ED, Onishchenko NA, Pozdnyakov OM.* Patent na izobretenie «Sposob modelirovaniya sakharnogo diabeta I tipa u krysov» от 27.09.2010.
34. Севастьянов ВИ. Технологии тканевой инженерии и регенеративной медицины. *Вестник трансплантологии и искусственных органов.* 2014; 16 (3): 93–108. Sevastianov VI. Technologies of tissue engineering and regenerative medicine. *Russian Journal of Transplantation and Artificial Organs.* 2014; 16 (3): 93–108. doi: 10.15825/1995-1191-2014-3-93-108.

Статья поступила в редакцию 10.04.2023 г.
The article was submitted to the journal on 10.04.2023