РАЗРАБОТКА МЕТОДИЧЕСКИХ ПОДХОДОВ К ПОЛУЧЕНИЮ ОСТРОВКОВЫХ КЛЕТОК НА ОСНОВАНИИ РЕЗУЛЬТАТОВ МОРФОЛОГИЧЕСКОГО АНАЛИЗА ПОДЖЕЛУДОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ КРОЛИКОВ РАЗЛИЧНОГО ВОЗРАСТА

Скалецкий Н.Н., Кирсанова Л.А., Баранова Н.В., Бубенцова Г.Н.

Лаборатория клеточной трансплантации (зав. – д. м. н. Н.Н. Скалецкий) ФГБУ «Федеральный научный центр трансплантологии и искусственных органов им. ак. В.И. Шумакова» Минздрава РФ (директор – академик РАН, проф. С.В. Готье), Москва, Российская Федерация

Цель. Проведение сравнительного морфологического анализа поджелудочной железы взрослых и новорожденных кроликов как приемлемой модели для получения культур островковых клеток, обладающих низкой иммуногенностью, являлось целью настоящего исследования. **Материалы и методы.** Поджелудочную железу взрослых и новорожденных кроликов и полученные культуры островковых клеток исследовали с помощью гистологических и иммуногистохимических методов. **Результаты.** Показано, что поджелудочная железа взрослых кроликов содержит большое количество экзокринной ткани, и ее культивирование не позволяет получить очищенные от примесей островковые клетки. В противоположность этому из поджелудочной железы новорожденных кроликов, в которой соотношение островков и экзокринной ткани гораздо выше, можно получить высокоочищенные культуры островковых клеток. **Заключение.** Морфологические особенности поджелудочной железы новорожденных кроликов позволяют использовать ее как модель для получения культур островковых клеток, обладающих низкой иммуногенностью.

Ключевые слова: поджелудочная железа, культуры островковых клеток.

DEVELOPMENT OF METHODOLOGICAL APPROACHES TO OBTAINING ISLET CELLS BASED ON THE RESULTS OF THE MORPHOLOGICAL ANALYSIS OF THE PANCREAS OF RABBITS OF DIFFERENT AGES

Skaletskiy N.N., Kirsanova L.A., Baranova N.V., Bubentsova G.N.

Cell transplantation laboratory (Head – Doctor of med. sci N.N. Skaletskiy) Academician V.I. Shumakov Federal Research Center of Transplantation and Artificial Organs, Ministry of Health of the Russian Federation (Director – academician of RAMSci, prof. S.V. Gautier), Moscow, Russian Federation

Purpose. A comparative morphological analysis of adult pancreas and newborn rabbits as acceptable model for obtaining of islet cell cultures having a low immunogenicity was a goal of this study. **Materials and methods.** Pancreas from adult and newborn rabbits and islet cell culture was examined by histological and immunohistochemical techniques. **Results.** Shown, the pancreas of adult rabbits contains great amount of exocrine tissue and culturing it does not allow to obtain the purified islets of impurities. By contrast, pancreas of newborn rabbits in which the ratio of the islets and the exocrine tissue is much higher, it is possible to obtain highly purified cultures of islet cells. **Conclusion.** Morphological features of newborn rabbit pancreas can use it as a model for obtaining cultures of islet cells having low immunogenicity.

Key words: pancreas, islet cell cultures.

ВВЕДЕНИЕ

Применение интрапортальной аллотрансплантации островков поджелудочной железы при лечении тяжелых форм сахарного диабета 1-го типа позволяет добиться инсулинонезависимости у 50–60% реципиентов в течение 1 года при обеспечении иде-

ального глюкозного метаболизма [1]). Однако широкое применение указанного трансплантационного метода невозможно по двум основным причинам, первая из которых – дефицит доноров, которыми являются чаще всего люди, погибшие от черепно-мозговой травмы, и вторая – необходимость посто-

янного приема иммуносупрессивных препаратов. Если первая причина в той или иной степени будет сохраняться всегда и не зависит от уровня научных знаний, то устранение второй причины возможно благодаря проведению необходимых научных исследований.

В течение многих лет предпринимаются попытки избежать иммуносупрессии при трансплантации островков с помощью их иммунологической изоляции. Последняя чаще всего осуществляется путем микроинкапсуляции выделенных островков. Наибольшего успеха в этом направлении добились новозеландские ученые [2]). Ими проведены масштабные доклинические исследования по ксенотрансплантации островков, выделенных из поджелудочной железы новорожденных свиней и помещенных в микрокапсулы, различным животным, включая приматов. Однако при проведении ограниченных клинических испытаний были выявлены клиничко-лабораторные и гистологические данные, свидетельствовавшие о наступлении сверхострого отторжения части пересаженных островков, произошедшего, по-видимому, вследствие разрушения или повреждения микрокапсул и нарушения их иммуноизолирующих свойств.

По нашему мнению, более надежным и перспективным является снижение иммуногенности, которое можно достигнуть путем предтрансплантационной обработки донорской островковой ткани, прежде всего с помощью ее культивирования *in vitro*. Применяемые в процессе культивирования методические приемы имеют своей целью удаление экзокринной ткани при селективном выживании эндокринных (островковых) клеток, а также удаление тех клеточных элементов (клетки эндотелия, лейкоциты и др.), которые могут инициировать отторжение трансплантата после его введения чужеродному реципиенту. Для проведения экспериментов по разработке метода инкубации панкреатической ткани, обеспечивающего ее очистку от «ненужных» клеток, нами в качестве доступного донорского мате-

риала была использована кроличья поджелудочная железа. Главной целью настоящего исследования явилось изучение морфологических особенностей поджелудочной железы кроликов различного возраста (новорожденных и взрослых) как потенциального источника получения островковых клеток. Аналогичных исследований, судя по данным, опубликованным в доступной нам литературе, проведено не было.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Лабораторные животные-доноры

Кроликов породы «Российская шиншилла» получали из специального питомника РАМН, обеспечивающего отсутствие у животных инфекционных заболеваний. В качестве доноров поджелудочной железы использовали взрослых (3-месячных) и новорожденных (1–3-дневных) кроликов.

Гистологические исследования

С целью морфологического анализа поджелудочной железы применяли как общегистологические, так и специфические иммуногистохимические методы. Для гистологического исследования материал (поджелудочная железа новорожденных кроликов и образцы различных отделов поджелудочной железы взрослых кроликов) фиксировали в жидкости Буэна, обезжизняли рутинным способом и заливали в парафин. Срезы толщиной 4–5 мкм окрашивали гематоксилином и эозином и по методу Маллори. Выявление основных типов островковых клеток поджелудочной железы проводили с помощью иммуногистохимического окрашивания, следуя классической методике с пероксидазой хрена и использованием моноклональных антител к инсулину и глюкагону (Sigma).

Наблюдение за процессом формирования культур островковых клеток проводили с помощью инвертированного микроскопа Nikon Eclipse TS 100.

Скалецкий Николай Николаевич – д. м. н., заведующий лабораторией клеточной трансплантации ФГБУ «Федеральный научный центр трансплантологии и искусственных органов им. ак. В.И. Шумакова» Минздрава РФ (директор – академик РАМН, проф. С.В. Готье), Москва, Российская Федерация. *Кирсанова Людмила Анфилофьевна* – к. б. н., старший научный сотрудник той же лаборатории. *Баранова Наталья Владимировна* – научный сотрудник той же лаборатории. *Бубенцова Галина Николаевна* – научный сотрудник той же лаборатории.

Для корреспонденции: Скалецкий Николай Николаевич. Адрес: 123182, г. Москва, ул. Щукинская, д. 1.

Телефон: 8 (499) 190-42-66. E-mail: NSkaletsky@mail.ru

Skaletskiy Nikolay Nikolaevich – doctor of med. sci., head of cell transplantation laboratory, Academician V.I. Shumakov Federal Research Center of Transplantology and Artificial Organs, Ministry of Health of the Russian Federation (Director – academician of RAMSci, prof. S.V. Gautier), Moscow, Russian Federation. *Kirsanova Lyudmila Anfilofievna* – cand. of biol. sci., senior researcher at the same laboratory. *Baranova Natalia Vladimirovna* – researcher at the same laboratory. *Bubentsova Galina Nikolaevna* – researcher at the same laboratory.

For correspondence: Skaletskiy Nikolay Nikolaevich. Address: 123182, Moscow, Shchukinskaya, 1.

Tel.: 8 (499) 190-42-66. E-mail: NSkaletsky@mail.ru

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

С помощью проведенных гистологических и иммуногистохимических исследований показано, что в поджелудочной железе взрослых кроликов островки преимущественно расположены в хвостовой части органа и более или менее четко отделены прослойками соединительной ткани от окружающих их ацинусов экзокринной ткани (рис. 1–3). В поджелудочной железе новорожденных кроликов островки равномерно распределены по всей массе органа без видимого их отграничения от ацинарной ткани, в связи с чем изоляция островков как дискретных структур даже теоретически представляется невозможной. В неонатальной поджелудочной железе было отмечено существенно меньшее по сравнению со «взрослой» поджелудочной железой развитие экзокринной ткани и диффузное расположение небольших островков (рис. 4–6). Кроме того, выявлены гистологические признаки высокого про-

лиферативного потенциала островковых клеток поджелудочной железы новорожденных кроликов (рис. 7, 8). Все это позволило рассчитывать на успешное применение культивирования панкреатической ткани как единственной реальной альтернативы получения жизнеспособных островковых клеток без использования сложных и травмирующих эндокринную ткань стандартных манипуляций, используемых при выделении островков. В несколько раз более выраженное развитие экзокринной ткани в поджелудочной железе взрослых кроликов потребовало бы применения ферментного переваривания панкреатической ткани с последующей фильтрацией и центрифугированием в градиентах плотности, традиционно используемых при изоляции островков. Однако даже при успешном применении этих сложных и дорогостоящих процедур и получении какого-то количества изолированных островков последние наверняка будут содержать кровеносные

Рис. 1. Поджелудочная железа взрослого кролика, хвостовая часть. Окрашивание гематоксилином и эозином. $\times 200$

Рис. 2. Поджелудочная железа взрослого кролика, хвостовая часть. Окрашивание по Маллори. $\times 200$

Рис. 3. Поджелудочная железа взрослого кролика, хвостовая часть. Иммуногистохимическое окрашивание антителами к инсулину. $\times 400$

Рис. 4. Поджелудочная железа новорожденного кролика. Диффузное распределение большого количества островков. Окрашивание альдегидфуксином. $\times 400$

Рис. 5. Поджелудочная железа новорожденного кролика. Иммуногистохимическое окрашивание островков бета-клеток антителами к инсулину. $\times 200$

Рис. 6. Поджелудочная железа новорожденного кролика. Иммуногистохимическое окрашивание островков альфа-клеток антителами к глюкагону. $\times 400$

Рис. 7. Поджелудочная железа новорожденного кролика. Окрашивание гематоксилином и эозином. Множество митотически делящихся клеток паренхимы. $\times 400$

Рис. 8. Поджелудочная железа новорожденного кролика. Окрашивание островковых бета-клеток альдегидфуксином и альфа-клеток – смесью Хелми. В центре – митоз в островке. $\times 1000$

сосуды, и естественно, эндотелиальные клетки, а также различные иммунокомпетентные клетки, в связи с чем наша основная цель – получение неиммуногенного клеточного препарата – не будет достигнута. Поэтому было решено не делать попытки изолировать островки, а провести культивирование как поджелудочной железы новорожденных кроликов, так и поджелудочной железы взрослых кроликов, а именно ее хвостовой части.

Ниже приводятся основные этапы и результаты проведенных опытов по получению культур островковых клеток.

При обработке неонатальной поджелудочной железы проводилась тщательная очистка органа от соединительно-тканной капсулы, крупных сосудов и разветвлений выводных протоков. Шестдесят очищенных таким образом желез измельчали и рав-

ными порциями помещали в 3 культуральных флакона (каждый площадью 75 см^2) с ростовой средой 199 и добавлением фетальной телячьей сыворотки. При наблюдении под инвертированным микроскопом уже в первые дни культивирования в CO_2 -инкубаторе при 37°C была выявлена гибель экзокринной ткани. Образующийся при этом детрит удаляли при регулярной (каждые 2–3 дня) смене ростовой среды. На 3–4-е сутки инкубации на поверхности панкреатических микрофрагментов, в значительной степени очистившихся от экзокринной ткани, стали появляться отдельные клетки, которые, отщепляясь, оседали на дно культурального флакона (рис. 6). К 10-му дню культивирования эпителиоподобные «клетки-мигранты» заполняли почти всю поверхность культурального флакона. При этом они образовывали диплеты, триплеты, более крупные

клеточные скопления – кластеры (рис. 9). В то же время часть микрофрагментов поджелудочной железы оседала и прикреплялась к дну культурального флакона. В дальнейшем вокруг очага прикрепления происходило формирование однослойной зоны роста эпителиоподобных клеток (рис. 10). В определенной степени нами проведена идентификация клеток, входящих в состав обеих фракций полученных культур, в основном однослойных. В последних выявлены клетки, происходящие из протокового эпителия поджелудочной железы и являющиеся прогениторными – предшественниками островковых клеток [3, 4].

При обработке поджелудочной железы взрослых кроликов требовалось значительно больше времени на ее очистку от соединительно-тканых элементов, составляющих капсулу и межацинарные прослойки, а также на измельчение и промывание панкреатической ткани от выделившихся пищеварительных ферментов. Это, безусловно, существенно увеличивало срок ее ишемии и повышало опасность самопереваривания, что, вероятно, снижало выживаемость островковых клеток. Результаты достаточно длительного (14 дней) культивирования полученных микрофрагментов в условиях, аналогичных инкубации неонатальной поджелудочной железы, дали неудовлетворительные результаты. Сохранение значительного количества экзокринной ткани, в основном в виде детрита, при небольшой доле выжившей эндокринной (островковой) ткани позволило сделать вывод о нецелесообразности использования поджелудочной железы взрослых кроликов как источника культур островковых клеток.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Поджелудочная железа новорожденных кроликов является наиболее перспективной моделью для разработки высокопродуктивных методов получения культур островковых клеток. Она соответствует сформулированным нами критериям «оптимальной» донорской поджелудочной железы как экспериментальной модели: 1) достаточное – для проявления специфической функциональной активности – развитие островковой ткани; 2) минимально возможная доля экзокринной ткани, которая при ее разрушении может привести к перевариванию эндокринных (островковых) клеток, а при сохранении в трансплантате способствовать его отторжению из-за своей высокой иммуногенности; 3) отсутствие необходимости при выделении островковой ткани в традиционном применении мощной ферментной обработки, продавливания через сито, центрифугирования в градиентах плотности и других «насилованных» процедур, которые существенно

Рис. 9. Культура, состоящая только из мигрировавших островковых клеток. $\times 200$

Рис. 10. Формирование моно слоя прогениторных клеток вокруг очага прикрепления микрофрагмента поджелудочной железы новорожденного кролика. $\times 200$

уменьшают количество получаемой островковой ткани и приводят к нарушению ее морфологической целостности и функциональной способности. В пользу использования неонатальной поджелудочной железы как источника жизнеспособных островковых клеток свидетельствуют также данные [5] о резистентности островков поджелудочной железы плодов и новорожденных животных к гипоксическим повреждениям. Авторы приведенного исследования объясняют этот феномен способностью фетальной и неонатальной островковой ткани экспрессировать высокий уровень антиапоптотического протеина X-linked IAP, который экспрессируется в островках «взрослой» поджелудочной железы на низком уровне.

Возможность достижения высокой степени очистки островковых клеток от «ненужных» тканевых структур и клеток позволит значительно снизить их иммуногенность и сделать реальным выжи-

вание чужеродных островковых клеток в организме реципиента с сахарным диабетом без применения иммуносупрессии.

Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ в рамках научного проекта № 13-04-12017офи_м

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Fiorina P., Shapiro A.M.J., Ricordi C., Secchi A. The clinical impact of islet transplantation. *American J. of Transplantation*. 2008; 8: 1990–1997.
2. Elliott R.B., Escobar L., Calafiore R., Garkavenko O.S. Transplantation of micro- and macroencapsulated piglet islets into mice and monkeys. *Transplant. Proc.* 2005; 37: 466–469.
3. Кирсанова Л.А., Баранова Н.В., Скалецкий Н.Н., Зайденев В.А., Бубенцова Г.Н., Пушкова И.А. Поджелудочная железа новорожденных кроликов как источник прогениторных клеток. *Вестн. транспл. и искусств. органов*. 2011; 1: 61–64.
4. Кирсанова Л.А., Бубенцова Г.Н., Баранова Н.В., Скалецкий Н.Н., Зайденев В.А., Пушкова И.А. Особенности формирования островкоподобных кластеров при культивировании монослоя протокового эпителия. *Вестн. транспл. и искусств. органов*. 2012; 4: 74–79.
5. Hawthorne W.Y., Simond D.M., Stokes R. et al. Subcapsular fetal pig pancreas fragment transplantation provides normal blood glucose control in a preclinical model diabetes. *Transplantation*. 2011; 91 (5): 1515–1521.

REFERENCES

1. Fiorina P., Shapiro A.M.J., Ricordi C., Secchi A. The clinical impact of islet transplantation. *American J. of Transplantation*. 2008; 8: 1990–1997.
2. Elliott R.B., Escobar L., Calafiore R., Garkavenko O.S. Transplantation of micro- and macroencapsulated piglet islets into mice and monkeys. *Transplant. Proc.* 2005; 37: 466–469.
3. Kirsanova L.A., Baranova N.V., Skaletskiy N.N., Zaydenov V.A., Bubentsova G.N., Pushkova I.A. Newborn rabbits pancreas as a source of progenitor cells. *Vestnik transplantologii i iskusstvennyh organov*. 2011; 1: 61–64 (in rus).
4. Kirsanova L.A., Bubentsova G.N., Baranova N.V., Skaletskiy N.N., Zaydenov V.A., Pushkova I.A. Features of the formation of islet-like clusters from cultured ductal epithelial monolayer. *Vestnik transplantologii i iskusstvennyh organov*. 2012; 4: 74–79 (in rus).
5. Hawthorne W.Y., Simond D.M., Stokes R. et al. Subcapsular fetal pig pancreas fragment transplantation provides normal blood glucose control in a preclinical model diabetes. *Transplantation*. 2011; 91 (5): 1515–1521.