

DOI: 10.15825/1995-1191-2024-2-94-104

ФУНКЦИОНАЛЬНАЯ ЭФФЕКТИВНОСТЬ КЛЕТОЧНО-ИНЖЕНЕРНОЙ КОНСТРУКЦИИ ПОДЖЕЛУДОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ В ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ МОДЕЛИ САХАРНОГО ДИАБЕТА I ТИПА

Н.В. Баранова, А.С. Пономарева, Л.А. Кирсанова, А.О. Никольская, Г.Н. Бубенцова,
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 клеточно-инженерной конструкции поджелудочной железы (КИК ПЖ), сформированной на основе островков Лангерганса и биосовместимого матрикса-носителя (каркаса/скаффолда), имитирующего нативное микроокружение панкреатической ткани, является одним из подходов к лечению пациентов с сахарным диабетом I типа (СД I). **Целью** работы был сравнительный анализ функциональной эффективности КИК ПЖ и изолированных островков Лангерганса крысы после их внутрибрюшинного введения крысам с экспериментальным СД I. **Материалы и методы.** СД I у крыс индуцировали введением малых доз (15 мг/кг) стрептозотоцина в течение 5 суток. Образцы КИК ПЖ формировали на основе жизнеспособных и функциональных аллогенных изолированных островков Лангерганса и тканеспецифического скаффолда, полученного в результате децеллюляризации фрагментов ПЖ человека. Крысам проводили внутрибрюшинное введение аллогенных островков Лангерганса (опытная группа 1, $n = 4$) и КИК ПЖ (опытная группа 2, $n = 4$). Крысам контрольной группы лечение не проводили ($n = 4$). Оценивали уровень глюкозы в крови крыс, а также проводили гистологическое исследование органов (поджелудочная железа и почки) экспериментальных животных. Наблюдение за всеми животными продолжалось в течение 10 недель. **Результаты.** В опытной группе 1 на седьмые сутки после введения островков Лангерганса отмечали заметное снижение уровня гликемии – с $28,2 \pm 4,2$ до $13,4 \pm 2,6$ ммоль/л, которое сохранялось на протяжении 7 недель, после чего происходило повышение гликемии до уровней, близких к исходным значениям (до введения островков). В опытной группе 2 на седьмые сутки после введения КИК ПЖ отмечали более выраженное по сравнению с опытной группой 1 снижение гликемии – с $25,8 \pm 5,1$ до $6,3 \pm 2,7$ ммоль/л. Уровень глюкозы к 10-й неделе эксперимента был ниже исходного в среднем в 2 раза. Установлено более выраженное снижение концентрации глюкозы в крови крыс-реципиентов после введения образцов КИК ПЖ по сравнению с уровнем гликемии крыс-реципиентов после введения суспензии островков (на 75,6 и 52,5% соответственно). **Заключение.** Введение КИК ПЖ оказывает более выраженный антидиабетический эффект у крыс с СД I по сравнению с введением островков Лангерганса. Таким образом, показана перспективность использования тканеспецифического скаффолда для создания биоискусственной ПЖ с целью повышения функциональной эффективности островков.

Ключевые слова: сахарный диабет I типа, островки Лангерганса, клеточно-инженерная конструкция, поджелудочная железа, децеллюляризация, тканеспецифический скаффолд.

Для корреспонденции: Баранова Наталья Владимировна. Адрес: 123182, Москва, ул. Щукинская, д. 1.
Тел. (917) 568-98-22. E-mail: barnats@yandex.ru

Corresponding author: Natalia Baranova. Address: 1, Shchukinskaya str., Moscow, 123182, Russian Federation.
Phone: (917) 568-98-22. E-mail: barnats@yandex

FUNCTIONAL EFFICIENCY OF PANCREATIC CELL-ENGINEERED CONSTRUCT IN AN ANIMAL EXPERIMENTAL MODEL FOR TYPE I DIABETES

N.V. Baranova, A.S. Ponomareva, L.A. Kirsanova, A.O. Nikolskaya, G.N. Bubentsova, Yu.B. Basok, V.I. Sevastianov

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

The creation of a cell-engineered pancreatic construct (CEPC) from islets of Langerhans and biocompatible matrix carrier (framework/scaffold), which imitates the native microenvironment of pancreatic tissue, is an approach to the treatment of type I diabetes mellitus (T1D). The **objective** of this work is to conduct a comparative analysis of the functional efficacy of CEPC and isolated rat islets of Langerhans after intraperitoneal administration into rats with experimental T1D. **Materials and method.** T1D was induced in rats by injecting low-dose (15 mg/kg) streptozotocin (STZ) for 5 days. CEPC samples were created using viable and functional allogeneic isolated islets of Langerhans and tissue-specific scaffold obtained by decellularization of human pancreatic fragments. The rats received intraperitoneal injection of allogeneic islets of Langerhans (experimental group 1, $n = 4$) and CEPC (experimental group 2, $n = 4$). Control group rats received no treatment ($n = 4$). Blood glucose levels in the rats were measured, and the pancreas and kidneys of the experimental animals were examined histologically. The follow-up period for all animals continued for 10 weeks. Results. In experimental group 1, on day 7 after injection of Langerhans islets, glycemia decreased significantly from 28.2 ± 4.2 mmol/L to 13.4 ± 2.6 mmol/L. This fall persisted for 7 weeks, following which blood sugar increased to nearly their initial levels (prior to islets administration). In experimental group 2, on day 7 after CEPC administration, there was a more noticeable drop in blood sugar levels from 25.8 ± 5.1 mmol/L to 6.3 ± 2.7 mmol/L compared to experimental group 1. By the 10th week of the experiment, the average glucose level was two times lower than it was at the beginning. Blood glucose levels dropped more sharply in the CEPC group than in the islet group (by 75.6% and 52.5%, respectively). **Conclusion.** In T1D rats, CEPC has a more potent antidiabetic effect than islets of Langerhans. Thus, it has been shown that a tissue-specific scaffold may be used to create bioartificial pancreas in order to increase the functional efficiency of islets.

Keywords: type I diabetes mellitus, islets of Langerhans, cell-engineered construct, pancreas, decellularization, tissue-specific scaffold.

ВВЕДЕНИЕ

Замещение поврежденных β -клеток у пациентов с тяжелым течением сахарного диабета I типа (СД I) в результате трансплантации островков Лангерганса является эффективным методом лечения, позволяющим установить долгосрочную стабильную эугликемию [1], улучшить качество жизни и снизить вторичные осложнения по сравнению с инсулинотерапией [2]. Однако во время процедуры выделения панкреатических островков происходит снижение их функциональной активности вследствие действия ряда повреждающих факторов, таких как утрата васкуляризации, иннервации и связей с внеклеточным матриксом (ВКМ). После трансплантации процесс реваскуляризации островков завершается через 10–14 суток. В этот период доставка кислорода и питательных веществ к островковым клеткам происходит только посредством диффузии, что может быть недостаточно для поддержания жизнеспособности клеток в центральной части островка [3, 4]. Таким образом, ограниченное время функционирования трансплан-

тата в определенной степени связано с гипоксией островков в посттрансплантационный период [5].

Представляется существенным обеспечить для островков Лангерганса условия, способствующие сохранению их жизнеспособности и функции *in vitro* и *in vivo*. Существует необходимость разработки новых стратегий замены β -клеток, в том числе создание биоэквивалента поджелудочной железы (ПЖ) на основе инсулинпродуцирующих клеток и матрикса-носителя (каркаса/скаффолда), имитирующего ВКМ ПЖ. Так, децеллюляризованная ПЖ с сохраненной биохимической, пространственной и сосудистой структурой нативного ВКМ может быть использована в качестве каркаса для последующей рецеллюляризации инсулинпродуцирующими клетками и дальнейшей трансплантации [6–9].

Децеллюляризованная панкреатическая ткань в наибольшей степени имитирует микроокружение нативного ВКМ ПЖ, т. е. обладает тканевой специфичностью с характерными особенностями структуры и состава. Значительное снижение иммуногенности, достигаемое за счет удаления клеточного и

ядерного материала из децеллюляризованных скаффолдов, способствует формированию идеальной системы поддержки для островковых клеток при трансплантации [10, 11]. Успешное изготовление и рецеллюляризация скаффолда из децеллюляризованной панкреатической ткани является существенной составляющей тканевой инженерии ПЖ [12].

Проведенные ранее исследования позволили нам разработать протоколы получения тканеспецифических скаффолдов из децеллюляризованной ПЖ крысы [13] и человека [14]. В экспериментальных исследованиях *in vitro* было установлено, что культивирование островков Лангерганса в присутствии таких скаффолдов способствует сохранению их структуры, пролонгирует жизнеспособность и инсулинпродуцирующую функцию по сравнению с островками, культивированными в стандартных условиях [6, 13–15]. В других работах показано, что скаффолд из децеллюляризованной ПЖ также обеспечивает островковым клеткам пролонгированное выживание и функционирование *in vivo* [5, 9, 10].

Скаффолды из децеллюляризованной панкреатической ткани, засеянные островковыми клетками, представляют собой сформированную клеточно-инженерную конструкцию эндокринной части поджелудочной железы (КИК ПЖ), часто называемой биоискусственной ПЖ. Представляется возможным применение КИК ПЖ для клинической трансплантации пациентам с СД I с целью компенсации эндокринной функции ПЖ [8].

Целью настоящей работы был сравнительный анализ функциональной эффективности КИК ПЖ и изолированных островков Лангерганса крысы после внутрибрюшинного введения крысам с экспериментальным СД I.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Экспериментальные животные

Для моделирования стрептозотоцинового СД I с последующей имплантацией КИК ПЖ (животные-реципиенты) и выделения островков Лангерганса (животные-доноры) использовали крыс-самцов породы Wistar весом 300–380 г ($n = 30$) из питомника лабораторных животных ООО «КролИнфо». Аклиматизацию 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».

Манипуляции с животными проводили в соответствии с Европейской конвенцией о защите позвоночных животных (European Convention for the Protection of Vertebrate Animals Used for Experimental and other Scientific Purposes, 2005) и 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 № 280121-1/1е.

Моделирование сахарного диабета I типа

Для индукции СД I крысам осуществляли дробное введение стрептозотоцина (СТЗ) (Biorbyt, Индия): внутрибрюшинно вводили по 15 мг/кг/сут в течение 5 суток подряд (суммарная доза – 75 мг/кг) [16]. Препарат для инъекций готовили *ex tempore* путем разведения СТЗ в 0,9% растворе хлористого натрия и вводили в полость брюшины. Динамику уровня гликемии ежедневно определяли с помощью глюкометра Accu-Check Active (Roche, Швейцария).

Проверка стабильности экспериментальной модели сахарного диабета I типа

Для исключения спонтанной реверсии диабетического статуса за животными проводили наблюдение в течение последующих 14 суток после последнего введения СТЗ. Ежедневно контролировали уровень гликемии в крови натошак и массу тела, ежедневно оценивали внешний вид, количество потребляемой животными воды.

СД I считали стабильным, если через 2 недели после введения последней дозы СТЗ уровень гликемии в крови крыс превышал 20,0 ммоль/л.

У крыс с концентрацией глюкозы менее 20,0 ммоль/л клинические признаки диабета были выражены слабо. Таких животных не использовали в эксперименте. Животных с уровнем гликемии, превышающим предельно допустимое значение глюкометра (33,0 ммоль/л), считали не пригодными для последующей имплантации КИК ПЖ.

Технология получения КИК ПЖ

Для формирования КИК ПЖ в качестве биомиметика ВКМ был выбран тканеспецифический мелкодисперсный скаффолд, полученный в результате децеллюляризации фрагментов ПЖ человека (ДПЖч-скаффолд) [13, 14]. Проведенные исследования показали, что ДПЖч-скаффолд сохраняет морфофункциональные свойства нативного ВКМ панкреатической ткани, содержит основные фибриллярные белки (коллаген I типа, эластин), обладает низкой иммуногенностью (не более 0,1% ДНК) и не является цитотоксичным относительно адгезии и пролиферации клеточных культур. В качестве инсулинпродуцирующего компонента в составе КИК ПЖ

использовали аллогенные изолированные островки Лангерганса крысы. Свежевыделенные островки идентифицировали с помощью окрашивания дитизоном (Sigma-Aldrich, США) и культивировали в полной ростовой среде, содержащей DMEM (глюкоза 1,0 г/л) («ПанЭко», Россия), 10% эмбриональной телячьей сыворотки (ЭТС) (HyClone, США), Neres (Thermo Fisher Scientific, США), 2 mM аланил-глутамина («ПанЭко», Россия), 1% антибиотика/антимикотика (Thermo Fisher Scientific, США), 24 часа в стандартных условиях при 37 °C в CO₂-инкубаторе в увлажненной атмосфере, содержащей 5% CO₂.

С помощью прижизненного флуоресцентного окрашивания акридиновым оранжевым и йодистым пропидием (АО/PI) («ПанЭко», Россия) определяли жизнеспособность культивированных в течение 24 часов островков.

Проводили оценку функциональной активности островков после 24 часов культивирования, используя набор Rat Insulin ELISA Kit (Thermo Fisher Scientific, США) для измерения концентрации инсулина под нагрузкой стимулятора секреции гормона (глюкозы).

Концентрированную суспензию островков получали в результате центрифугирования в полной ростовой среде в течение 2 мин при скорости 1200 об/мин, затем отмывали от ростовой среды в растворе Хенкса при том же режиме.

Для каждого образца КИК ПЖ отбирали 2000 островков, полученных из 1–2 ПЖ крысы, ресуспендировали в 1,0–1,2 мл раствора Хенкса и смешивали с мелкодисперсным стерильным ДПЖч-скаффолдом ($10,0 \pm 0,1$ мг в 100 мкл раствора Хенкса) из ПЖ человека. Полученные образцы КИК ПЖ помещали в шприцы объемом 2 мл с размером иглы 23 G.

Внутрибрюшинное введение КИК ПЖ крысам с экспериментальным сахарным диабетом I типа

Исследование функциональной эффективности КИК ПЖ проводили на крысах с выраженным и стабильным СД I, индуцированным ежедневным дробным введением малых доз СТЗ.

Животные, отобранные для эксперимента, были распределены на группы:

- 1) контрольная группа (животные без лечения – без введения островков Лангерганса или КИК ПЖ) – 4 крысы;
- 2) опытная группа 1 (внутрибрюшинное введение 2000 аллогенных островков Лангерганса в виде суспензии) – 4 крысы;
- 3) опытная группа 2 (внутрибрюшинное инъекционное введение КИК ПЖ, сформированной на основе 2000 аллогенных островков Лангерганса и тканеспецифического скаффолда (ДПЖч-скаффолда) из децеллюляризованной ПЖ человека) – 4 крысы.

фолда) из децеллюляризованной ПЖ человека) – 4 крысы.

Наблюдение за всеми животными продолжалось в течение 10 недель. Уровень гликемии в капиллярной крови животных измеряли натошак еженедельно через 12 часов после последнего приема пищи.

Гистологическое исследование

Выявление структурных нарушений в паренхиме ПЖ и почек проводили в результате морфологического исследования. Фиксацию извлеченных органов экспериментальных животных проводили в 10% забуференном формалине в течение 24 часов, затем обезживали в спиртах восходящей концентрации, выдерживали в смеси этанола и хлороформа, чистом хлороформе, после чего заливали в парафин.

С помощью микротомы RM2245 (Leica, Германия) получали срезы толщиной 5 мкм, которые окрашивали гематоксилином и эозином и на общий коллаген по методу Массона. Клеточный состав панкреатических островков в ПЖ крыс контрольной и опытных групп оценивали с помощью иммуногистохимического окрашивания основных типов островковых клеток с использованием антител к инсулину и глюкагону (Abcam, Великобритания) и системы визуализации Rabbit Specific HRP/DAB (ABC) Detection IHC kit (Abcam, Великобритания).

Выявление и оценку степени структурных нарушений в почках экспериментальных животных проводили с помощью окрашивания срезов гематоксилином и эозином.

Статистический анализ

Статистическую обработку данных проводили с использованием программного обеспечения Microsoft Excel (2016). Различия считали статистически достоверными в том случае, если уровень значимости p не превышал порогового значения 0,05.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Экспериментальный сахарный диабет I типа

Для экспериментов по исследованию функциональной эффективности КИК ПЖ использовали крыс ($n = 13$) с показателями уровня глюкозы в крови натошак от 20,4 до 32,6 ммоль/л через 2 недели после окончания введения СТЗ (табл. 1). Клинически у этих животных отмечали гиподинамию, склонность к образованию ран и гнойников, полиурию, значительную полидипсию и снижение массы тела по сравнению с интактными животными.

Для подтверждения развития СД I проводили гистологическое исследование ПЖ крысы с уровнем гликемии 25,3 ммоль/л через 2 недели после последнего введения СТЗ. Была выявлена в целом сохран-

ность экзокринной паренхимы, лишь в отдельных долях отмечали умеренную очаговую лимфоидно-клеточную инфильтрацию. В немногочисленных островках Лангерганса нерегулярной формы выявлялись вакуолизированные клетки (вероятно, β -клетки) (рис. 1, а). При окрашивании антителами к инсулину наблюдали негативную реакцию, что свидетельствовало о гибели β -клеток (рис. 1, б). При этом глюкагонпозитивные α -клетки обнаруживались не только на периферии, но и в центральной части островков и в значительно большем количестве, чем у здоровой крысы (рис. 1, в). При гистологическом исследовании почек крысы с клиническими признаками СД I выявлены выраженные изменения, в том числе наличие множественных вакуолизированных клеток канальцевого эпителия (клетки Armanni–Ebstein, являющиеся патогномоничными при сахарном диабете) (рис. 1, г). Наблюдались очаги воспалительной инфильтрации (лимфоидноклеточная с примесью плазмоцитов). Изредка в просвете канальцев обнаруживались белковые цилиндры.

При формировании экспериментальной модели СД I дробное введение СТЗ было применено в связи с тем, что такой подход позволял обеспечить стойкий диабетический статус у животных при исключении их гибели и спонтанной реверсии диабета [16]. Полученный СД I характеризовался стабильными гипер-

гликемическими показателями (от 20 до 33 ммоль/л) в крови опытных животных и другими признаками диабета: полидипсией, полиурией.

Морфофункциональный анализ изолированных островков Лангерганса крысы до формирования КИК ПЖ

Свежевыделенные островки Лангерганса преимущественно округлой формы в основном сохраняли целостность макроструктуры, не поврежденной в процессе выделения островков (рис. 2, а). Панкреатические островки при окрашивании дитизоном избирательно приобретали красно-оранжевый цвет, при этом ацинарные клетки оставались неокрашенными (рис. 2, б).

Для определения жизнеспособности панкреатических островков крысы, культивированных 24 часа, проводили окрашивание витальным красителем акридиновым оранжевым и йодистым пропидием (АО/PI). Выявлена жизнеспособность островков выше 96% (рис. 2, в).

В пробах культуральной среды, отобранных через 24 часа культивирования островков, базальная концентрация инсулина составила $178,6 \pm 13,3$ мкЕД/мл, после стимуляции «гипергликемическим» уровнем глюкозы 4,5 г/л (25 ммоль/л) увеличилась на 35,4% ($241,8 \pm 14,2$ мкЕД/мл), что стало подтверждением

Таблица 1

Динамика уровня глюкозы и массы тела у крыс с СД I
Changes in glucose levels and body weight in T1D rats

Сутки после введения последней дозы СТЗ	Уровень глюкозы, ммоль/л			Масса тела, г		
	1	7	14	1	7	14
Норма, n = 4	$5,5 \pm 0,7$	$5,9 \pm 0,3$	$5,8 \pm 0,9$	345 ± 15	350 ± 18	365 ± 24
СД I, n = 13	$17,8 \pm 3,3$	$19,1 \pm 3,5$	$26,5 \pm 6,1$	310 ± 25	295 ± 27	280 ± 23

Примечание. $p < 0,05$ по сравнению со значениями аналогичных показателей нормы (интактные крысы).

Note. $p < 0.05$ compared with the values of similar indicators of the norm (intact rats).

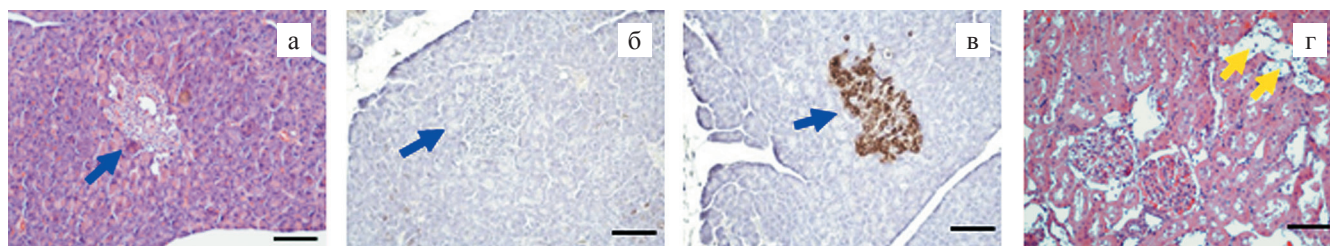


Рис. 1. Поджелудочная железа (а–в) и почка (г) крысы с экспериментальным СД I; а, г – гематоксилин и эозин; б – иммуногистохимическое окрашивание на инсулин; в – иммуногистохимическое окрашивание на глюкагон. Синими стрелками отмечены островки Лангерганса. Желтыми стрелками отмечены клетки Armanni–Ebstein в эпителии канальцев. Размер масштабной линейки 100 мкм

Fig. 1. Pancreas (a–b) and kidney (c) of a rat with experimental T1D; a, c – H&E stain; b – immunohistochemical staining for insulin; d – immunohistochemical staining for glucagon. Blue arrows indicate islets of Langerhans. Yellow arrows indicate tubular epithelial Armanni–Ebstein cells. Scale bar: 100 μ m

функциональной активности изолированных островков (рис. 2, г).

Таким образом, было установлено, что выделенные островки Лангерганса крысы по своему морфофункциональному состоянию (уровню жизнеспособности и функциональной активности) могут быть использованы в качестве клеточного инсулинпродуцирующего компонента для формирования КИК ПЖ.

Сравнительный анализ функциональной эффективности КИК ПЖ и островков Лангерганса у крыс с экспериментальным сахарным диабетом I типа

Функциональную эффективность КИК ПЖ, сформированного на основе аллогенных островков Лангерганса и тканеспецифического скаффолда из децеллюляризованной ПЖ человека, оценивали относительно способности восстанавливать физиологический уровень глюкозы в крови крыс с экспери-

ментальным СД I, индуцированным СТЗ, в течение 10 недель.

Контрольная группа

У всех животных контрольной группы на протяжении срока наблюдения сохранялись выраженные клинические признаки СД I, общее состояние крыс ухудшалось. У животных отмечали полидипсию, полиурию, гиподинамию, незаживающие гнойные раны на хвостах, дальнейшую потерю массы тела (с 280 ± 23 до 170 ± 35 г). Уровень гипергликемии в крови животных контрольной группы ($n = 4$) в течение срока наблюдения повышался (табл. 2). Из четырех контрольных крыс две погибли на сроках 3 и 8 недель.

В гистологических образцах ПЖ крыс контрольной группы после вывода из эксперимента (10 недель) обнаруживали немногочисленные островки Лангерганса нерегулярной формы, с практически полным отсутствием в них инсулинпозитивных

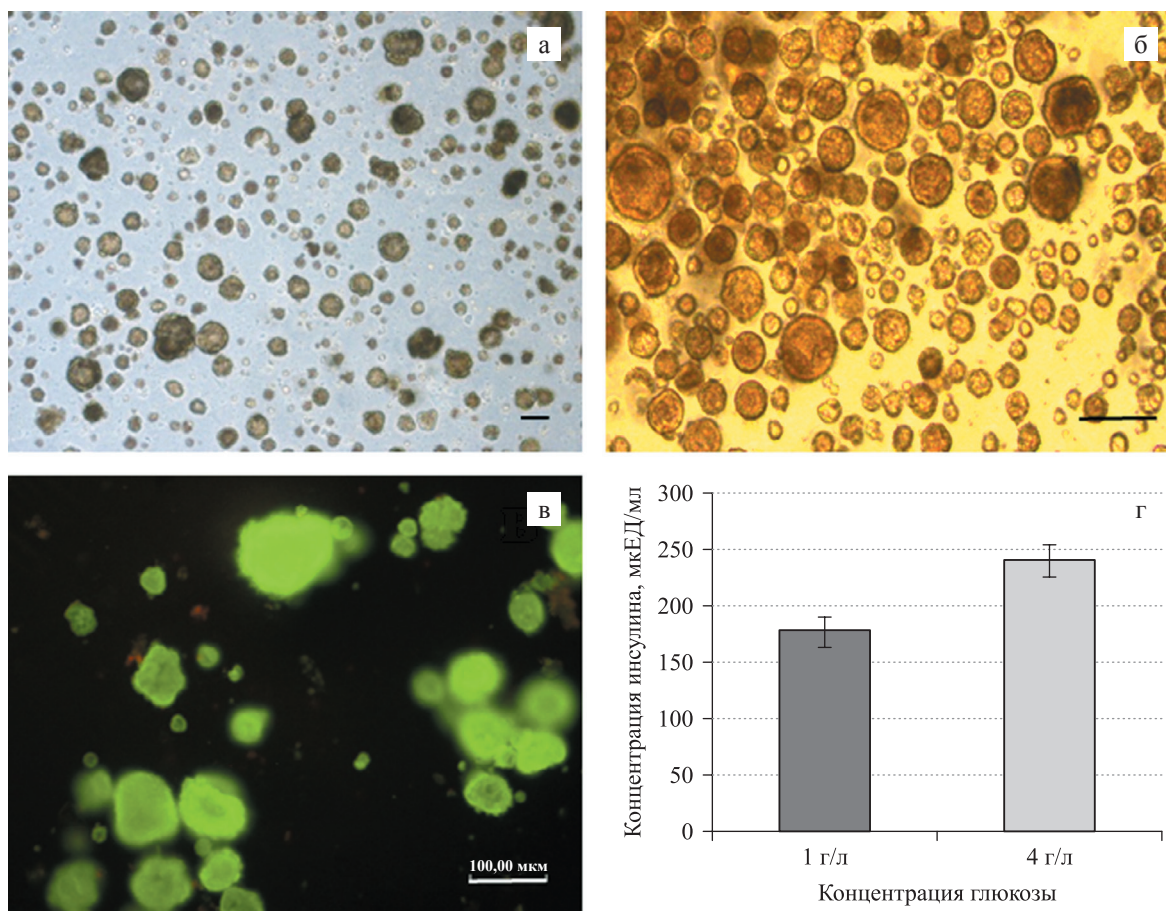


Рис. 2. Изолированные островки Лангерганса здоровой крысы: а – фазово-контрастная микроскопия; б – окрашивание дитизоном; в – островки, культивированные 24 часа, флуоресцентное окрашивание акридиновым оранжевым и йодистым пропидием (АО/ПИ); г – функциональная активность изолированных островков Лангерганса здоровой крысы, культивированных 24 часа. Размер масштабной линейки 100 мкм

Fig. 2. Isolated islets of Langerhans of a healthy rat: а – phase-contrast microscopy; б – dithizone staining; в – islets cultured for 24 hours, acridine orange and propidium iodide (AO/PI) fluorescent staining; г – functional activity of isolated islets of Langerhans of a healthy rat cultured for 24 hours. Scale bar: 100 μ m

β -клеток и многочисленными глюкагонпозитивными α -клетками (рис. 3, а–в). При гистологическом исследовании почек крыс контрольной группы выявили морфологические изменения органа, наличие очагов воспалительной инфильтрации и многочисленных клеток Armanni–Ebstein, что является одним из признаков диабетической нефропатии, развивающейся на фоне СД I без лечения (рис. 3, г). Кроме того, в просвете отдельных канальцев обнаруживались отложения плотного материала – белковые цилиндры.

Опытная группа 1 (введение островков Лангерганса)

У крыс опытной группы 1 ($n = 4$) после внутрибрюшинного введения островков Лангерганса уже через неделю замедлились характерные клинические признаки СД I, отмечали прибавку в весе (от 280 ± 23 до 305 ± 15 г). При этом у всех крыс-реципиентов через трое суток после введения островков было отмечено существенное снижение уровня гипергликемии – на $12,5 \pm 3,2$ ммоль/л (табл. 3). В дальнейшем у трех крыс содержание глюкозы в крови стабилизировалось на уровне, в среднем в 2,5 раза меньше по сравнению с уровнем до введения островков. Однако после 7 недель наблюдения уровень глюкозы в опытной группе 1 стал возрастать и к 10-й неделе у двух крыс достиг уровня выше исходного (до введения островков), у одной крысы – на 7,3 ммоль/л ниже исходного уровня. На 6-й неделе крыса с уровнем глюкозы в крови 27,3 ммоль/л погибла, несмотря на то что после введения островков у нее наблюдали стабильное снижение гипергликемии.

Гистологическая картина ПЖ крыс опытной группы 1 выявила хорошую сохранность эндокринной паренхимы без признаков воспаления и островки нерегулярной формы, как и в ПЖ крыс контрольной группы, с редкими вакуолизированными клетками, вероятно, β -клетками (рис. 4, а–в). У двух крыс (крыса 2 и крыса 4) при иммуногистохимическом окраши-

вании инсулинпозитивных β -клеток не обнаружили, при этом в островках присутствовали многочисленные глюкагонпозитивные α -клетки. У одной крысы (крыса 3) отмечали наличие единичных β -клеток в островках (рис. 4, г). Морфологическое исследование почек крыс опытной группы 1 не выявило выраженных дегенеративных изменений сосудисто-клубочкового аппарата, однако в эпителии канальцев обнаружено наличие многочисленных вакуолизированных клеток – клеток Armanni–Ebstein (рис. 4, д). В просвете некоторых канальцев визуализировался хлопьевидный материал.

Опытная группа 2 (введение КИК ПЖ)

У крыс опытной группы 2 ($n = 4$) через неделю после внутрибрюшинного введения КИК ПЖ на основе аллогенных островков Лангерганса с ДПЖ-скаффолдом наблюдали замедление клинических проявлений СД I, как и у животных опытной группы.

Таблица 2

Динамика уровня гликемии у крыс контрольной группы без лечения

Dynamics of blood glucose level in control group rats without treatment

Сутки	Глюкоза в крови, ммоль/л			
	Крыса 1	Крыса 2	Крыса 3	Крыса 4
0	22,1	20,7	29,5	32,2
4	20,2	22,0	$\geq 33,0$	31,5
7	22,7	19,3	30,7	$\geq 33,0$
14	27,8	18,8	28,8	24,3
21	25,3	25,5	погибла	28,0
28	28,0	26,3	–	$\geq 33,0$
35	30,4	28,0	–	$\geq 33,0$
42	$\geq 33,0$	26,8	–	$\geq 33,0$
49	$\geq 33,0$	28,4	–	$\geq 33,0$
56	погибла	26,5	–	$\geq 33,0$
63	–	31,2	–	$\geq 33,0$
70	–	32,5	–	$\geq 33,0$

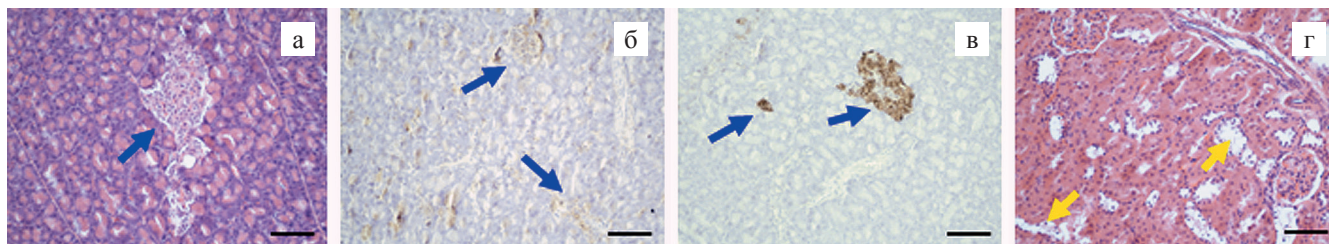


Рис. 3. Поджелудочная железа (а–в) и почка (г) крысы контрольной группы с экспериментальным СД I; а, г – гематоксилин и эозин; б – иммуногистохимическое окрашивание на инсулин; в – иммуногистохимическое окрашивание на глюкагон. Синими стрелками отмечены островки Лангерганса. Желтыми стрелками отмечены клетки Armanni–Ebstein в эпителии канальцев. Размер масштабной линейки 100 мкм

Fig. 3. Pancreas (a–v) and kidney (r) of control group rats with experimental T1D; a, r – H&E stain; б – immunohistochemical staining for insulin; в – immunohistochemical staining for glucagon. Blue arrows indicate islets of Langerhans. Yellow arrows indicate tubular epithelial Armanni–Ebstein cells. Scale bar: 100 μ m

У крысы 3 практически полностью исчезли такие признаки СД I, как полидипсия и полиурия, отмечали значительную прибавку массы тела – с 303 г в момент введения КИК ПЖ до 555 г к 10-й неделе

Таблица 3

Динамика уровня гликемии у крыс опытной группы 1 с СД I после введения островков Лангерганса

Changes in blood glucose levels in T1D rats of experimental group 1 after injection of islets of Langerhans

Сутки	Глюкоза в крови, ммоль/л			
	Крыса 1	Крыса 2	Крыса 3	Крыса 4
0	26,7	30,7	23,0	32,5
4	11,6	15,3	12,9	23,1
7	13,0	13,5	9,5	18,8
14	11,5	16,0	15,3	10,9
21	15,8	22,3	14,8	12,3
28	23,0	20,9	15,7	14,9
35	27,3	22,6	12,4	14,1
42	погибла	18,9	12,1	16,3
49	–	19,1	14,8	15,9
56	–	26,1	23,0	18,7
63	–	25,4	22,3	21,7
70	–	33,0	27,6	25,2

эксперимента. У крыс-реципиентов 3 и 4 отмечено пролонгированное снижение уровня гликемии более чем в 3 раза по сравнению с исходным значением и достижение нормогликемических показателей (до 7,5 ммоль/л) в отдельных измерениях у крысы 1 (табл. 4). К окончанию эксперимента (10 недель наблюдения) у указанных крыс регистрировали уровни глюкозы в крови 9,5 и 7,9 ммоль/л соответственно, что оказалось намного ниже исходного среднего уровня ($25,8 \pm 5,1$ ммоль/л). У крысы 1 не наблюдали стойкого снижения гипергликемии: после введения КИК ПЖ уровень глюкозы в крови колебался от 4,9 до 17,3 ммоль/л. На момент вывода из эксперимента (70 суток) концентрация глюкозы в крови крысы 1 не превышала исходного значения и составила 17,0 ммоль/л.

На четвертой неделе наблюдения крыса 2 с уровнем глюкозы 5,9 ммоль/л погибла.

Гистологическое исследование ПЖ крыс опытной группы 2 выявило сохранение экзокринной паренхимы без признаков воспаления и отсутствие инфильтратов (рис. 5, а, г). В островках как округлой, так и нерегулярной формы наблюдали немногочисленные вакуолизированные клетки. Иммуногистохимическое окрашивание на инсулин выявило наличие немногочисленных β -клеток в островках ПЖ крыс 1 и 4 (рис. 5, б); у крысы 3 увеличение

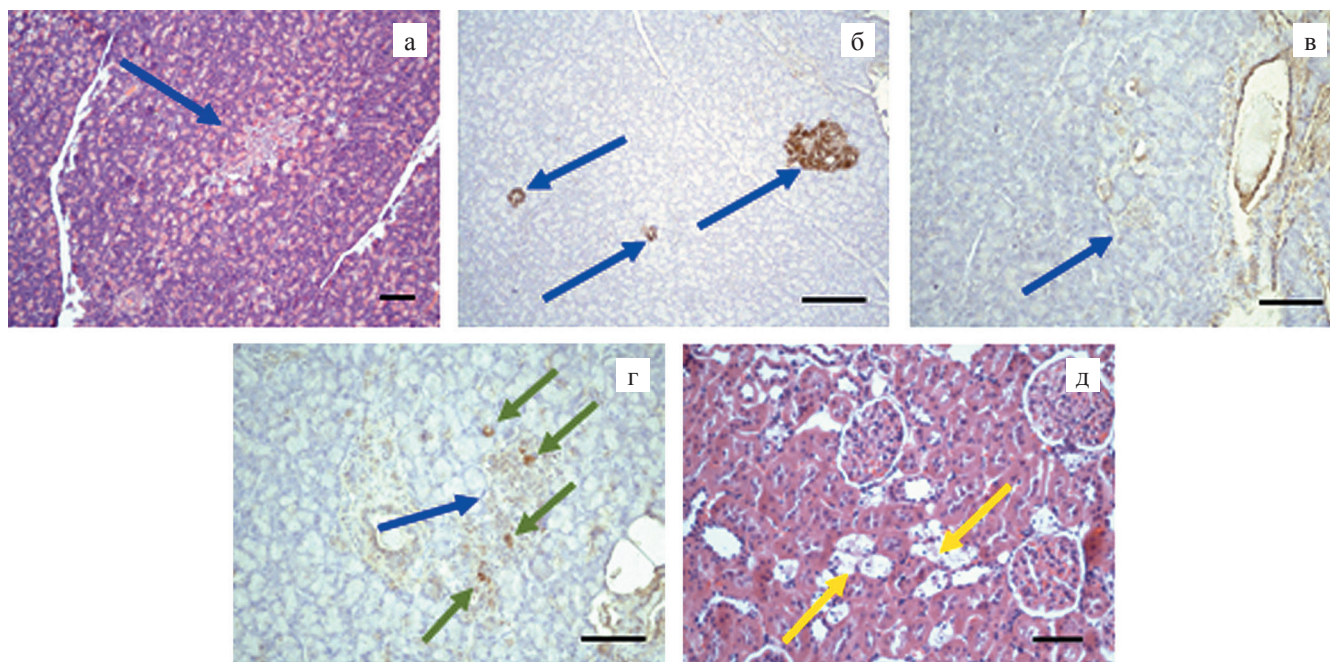


Рис. 4. Поджелудочная железа (а–г) и почка (д) крыс опытной группы 1 с экспериментальным СД I после внутрибрюшинного введения островков Лангерганса; а, д – гематоксилин и эозин; б – иммуногистохимическое окрашивание на глюкагон; в, г – иммуногистохимическое окрашивание на инсулин. Синими стрелками отмечены островки Лангерганса, зелеными – инсулинпозитивные клетки. Желтыми стрелками отмечены клетки Armanni–Ebstein в эпителии канальцев. Размер масштабной линейки 100 мкм

Fig. 4. Pancreas (a–g) and kidney (д) of experimental group 1 rats with T1D after intraperitoneal injection of islets of Langerhans; а, д – H&E stain; б – immunohistochemical staining for glucagon; в, г – immunohistochemical staining for insulin. Blue arrows indicate islets of Langerhans. Yellow arrows indicate tubular epithelial Armanni–Ebstein cells. Scale bar: 100 μ m

количества инсулинпозитивных клеток оказалось более существенным (рис. 5, д), при этом отмечалось снижение количества глюкагонпозитивных клеток в островках (рис. 5, в, е). Исходя из экспериментальных данных [16], можно предположить, что кроме непосредственного антидиабетического действия имплантация КИК ПЖ может оказывать положительное влияние на процессы восстановления пула активно функционирующих β -клеток реципиента, что подтверждалось результатами проведенного нами гистологического исследования. Морфологическая картина почек крыс опытной группы 2 в отличие от почек животных контрольной группы и опытной группы 1 демонстрировала немногочисленные клетки Argmanni–Ebstein и отсутствие белковых цилиндров в просвете канальцев (рис. 5, ж).

На рис. 6 представлена сравнительная диаграмма динамики изменения уровней глюкозы в крови животных контрольной и опытных групп. График гликемических показателей контрольной группы

Таблица 4

Динамика уровня гликемии у крыс опытной группы 2 с СД I после введения КИК ПЖ

Changes in blood glucose levels in T1D rats of group 2 after CEPC injection

Сутки	Глюкоза в крови, ммоль/л			
	Крыса 1	Крыса 2	Крыса 3	Крыса 4
0	20,4	25,6	24,7	32,6
4	17,9	23,0	5,7	19,5
7	4,9	3,9	10,0	6,5
14	9,0	7,4	3,6	7,9
21	10,8	5,9	6,9	9,2
28	13,2	погибла	10,7	10,7
35	17,3	–	13,9	7,2
42	15,6	–	9,6	8,5
49	11,8	–	12,4	10,3
56	12	–	10,6	6,8
63	11,1	–	6,5	8,9
70	17,0	–	9,5	7,9

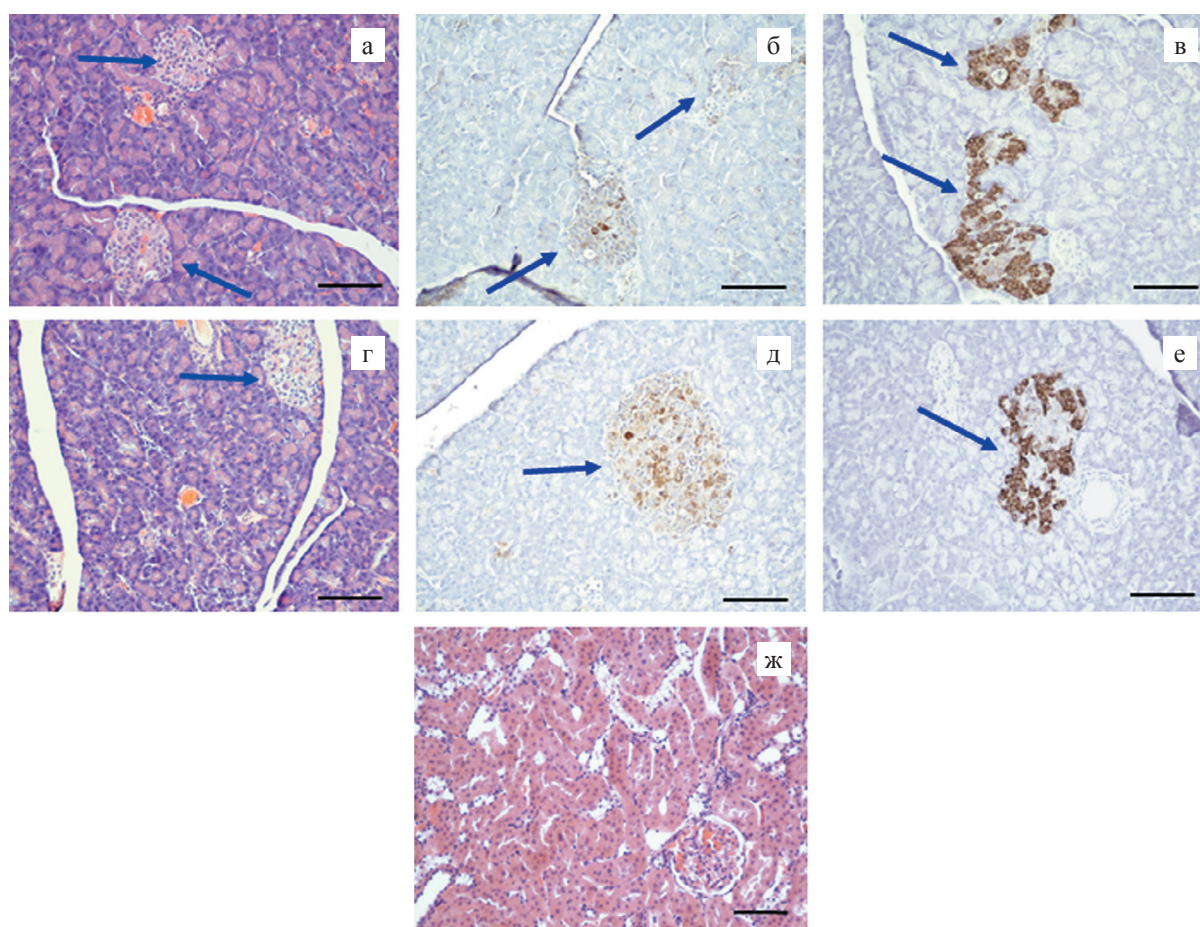


Рис. 5. Поджелудочная железа (а–е) и почка (ж) крыс опытной группы 2 с экспериментальным СД I после внутрибрюшинного введения КИК ПЖ; а, г, ж – гематоксилин и эозин; б, д – иммуногистохимическое окрашивание на инсулин; в, е – иммуногистохимическое окрашивание на глюкагон. Стрелками отмечены островки Лангерганса. Размер масштабной линейки 100 мкм

Fig. 5. Pancreas (a–e) and kidney (ж) of rats of experimental group 2 with T1D after intraperitoneal injection of CEPC; а, г, ж – H&E; б, д – immunohistochemical staining for insulin; в, е – immunohistochemical staining for glucagon. Arrows indicate islets of Langerhans. Scale bar: 100 μ m

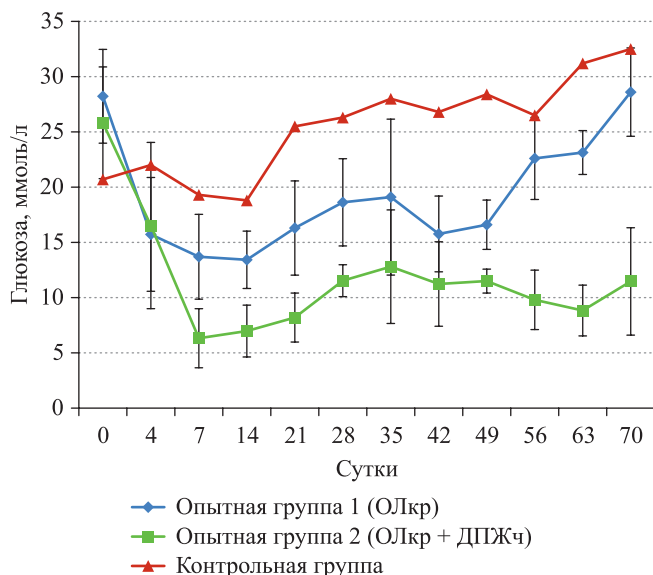


Рис. 6. Динамика уровня глюкозы в крови крыс с экспериментальным СД I контрольной (без лечения) и опытных групп после внутривентриального введения КИК ПЖ (ОЛкр + ДПЖч) или суспензии островков Лангерганса (ОЛкр). Гликемические показатели контрольной группы представлены по уровням глюкозы в крови одной крысы. Гликемические показатели опытной группы 1 представлены по уровням глюкозы в крови четырех крыс до 42 суток, далее из-за гибели одного животного учитывали показатели трех крыс. Гликемические показатели опытной группы 2 представлены по уровням глюкозы в крови четырех крыс до 28 суток, далее из-за гибели одного животного учитывали показатели трех крыс

Fig. 6. Changes in blood glucose levels in T1D rats of the control group (without treatment) and experimental groups after intraperitoneal injection of CEPK (islets of Langerhans (rIsL) + decellularized human pancreas (DHP)) or suspension of islets of Langerhans (rIsL). Glycemic indicators of the control group are presented according to blood glucose levels of one rat. Glycemic indicators of experimental group 1 are presented by blood glucose levels of four rats up to 42 days, and then due to the death of one animal, the indicators of three rats were considered. Glycemic indicators of experimental group 2 are presented by blood glucose levels of four rats up to 28 days, and then due to the death of one animal, the indicators of three rats were considered

приведен по уровням гликемии одной крысы, не превышающим предельное значение глюкометра – 33,0 ммоль/л, на протяжении всего срока наблюдения. В контрольной группе показатели гипергликемии стабильно повышались на протяжении всего эксперимента.

В опытной группе 1 происходило заметное снижение уровня гликемии после введения островков Лангерганса – с $28,2 \pm 4,2$ до $13,4 \pm 2,6$ ммоль/л, которое сохранялось на протяжении 7 недель, после чего происходило повышение гликемии до уровней, близких к исходным значениям (до введения островков).

В опытной группе 2 отмечали более выраженное по сравнению с опытной группой 1 снижение

гликемии – с $25,8 \pm 5,1$ до $6,3 \pm 2,7$ ммоль/л. Такие значения концентраций глюкозы в крови животных сохранялись на протяжении всего срока наблюдения. Уровень глюкозы к 10-й неделе эксперимента был ниже исходного в среднем в 2 раза.

У крыс опытной группы 2 после введения КИК ПЖ наблюдали максимальное снижение уровня гликемии относительно исходных гипергликемических показателей на 75,6%; у крыс опытной группы 1 после введения суспензии островков – на 52,5%.

Таким образом, проведенные исследования показали функциональную эффективность *in vivo* аллогенных островков Лангерганса, введенных как без скаффолда, так и в составе КИК эндокринного отдела ПЖ. При этом установлено более выраженное снижение концентрации глюкозы в крови крыс-реципиентов после введения экспериментальных образцов КИК ПЖ по сравнению с уровнем гликемии крыс-реципиентов после введения островков без скаффолда (на 75,6 и 52,5% соответственно).

Полученные результаты коррелируют с данными предварительного исследования [17], где при внутривентриальном введении КИК ПЖ тканеспецифический скаффолд обеспечивал панкреатическим островкам более длительное выживание и эффективное функционирование *in vivo*.

Таким образом, показана важная роль тканеспецифического скаффолда в создании биоискусственной ПЖ. Оптимальный скаффолд, полученный из децеллюляризованной панкреатической ткани для формирования КИК ПЖ, должен: 1) соответствовать критериям эффективной децеллюляризации, 2) максимально сохранять нативную структуру, 3) обеспечивать сайты, необходимые для клеточной адгезии и пролиферации, 4) равномерно заселяться инсулин-продуцирующими клетками [6, 14]. Синтетические искусственные каркасы могут не соответствовать некоторым из этих требований, и соответственно, позитивно влиять на выживаемость и функционирование островков *in vivo*. Присутствие в скаффолде из децеллюляризованной ПЖ нативных белков (различные типы коллагена, эластин, фибронектин и ламинин), а также факторов клеточной адгезии позволяет создавать условия для пролонгированной жизнедеятельности островковых клеток, тем самым поддерживая критическую массу островков, необходимую для трансплантации пациентам с СД I [18].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В результате проведенного исследования было установлено, что внутривентриальное введение образцов КИК ПЖ крысам с экспериментальным СД I приводило к значительному стабильному снижению уровня гликемии, который сохранялся в течение 10 недель. Таким образом, применение КИК ПЖ выявило более выраженный антидиабетический эффект у крыс с

СД I по сравнению с введением суспензии островков Лангерганса. Исходя из этого, можно сделать вывод о перспективности использования тканеспецифического скаффолда для создания биоискусственной ПЖ с целью повышения функциональной эффективности островков. Настоящая работа представляет собой основу для проведения исследований по созданию КИК эндокринного отдела ПЖ человека на основе тканеспецифического скаффолда из децеллюляризованной панкреатической ткани человека и островков Лангерганса посмертных доноров для частичной или полной замены утраченной эндокринной функции ПЖ у пациентов с тяжелым течением СД I.

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

The authors declare no conflict of interest.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ / REFERENCES

1. Shapiro AM, Pokrywczynska AM, Ricordi C. Clinical pancreatic islet transplantation. *Nat Rev Endocrinol*. 2017; 13 (5): 268–277. doi: 10.1038/nrendo.2016.178.
2. Cayabyab F, Nih LR, Yoshihara E. Advances in Pancreatic Islet Transplantation Sites for the Treatment of Diabetes. *Front Endocrinol (Lausanne)*. 2021; 12: 732431. doi: 10.3389/fendo.2021.732431.
3. Reid L, Faye Baxter F, Forbes S. Effects of islet transplantation on microvascular and macrovascular complications in type 1 diabetes. *Diabet Med*. 2021; 38 (7): e14570. doi: 10.1111/dme.14570.
4. Eguchi N, Damyar K, Alexander M, Dafoe D, Lakey JRT, Ichii H. Anti-Oxidative Therapy in Islet Cell Transplantation. *Antioxidants (Basel)*. 2022; 11 (6): 1038. doi: 10.3390/antiox11061038.
5. Amer LD, Mahoney MJ, Bryant SJ. Tissue engineering approaches to cell-based type 1 diabetes therapy. *Tissue Eng Part B Rev*. 2014; 20 (5): 455–467. doi: 10.1089/ten.TEB.2013.0462.
6. Mirmalek-Sani S-H, Orlando G, McQuilling JP, Pareta R, Mack DL, Salvatori M et al. Porcine pancreas extracellular matrix as a platform for endocrine pancreas bioengineering. *Biomaterials*. 2013; 34 (22): 5488–5495. doi: 10.1016/j.biomaterials.2013.03.054.
7. 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.
8. 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.
9. Lim LY, Ding SSL, Muthukumaran P, Teoh SH, Koh Y, Teo AKK. Tissue engineering of decellularized pancreas scaffolds for regenerative medicine in diabetes. *Acta Biomater*. 2023; 157: 49–66. doi: 10.1016/j.actbio.2022.11.032.
10. 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.
11. Goh S-K, Bertera S, Olsen P, Candiello JE, Halfter W, Uechi G et al. Perfusion-Decellularized Pancreas As A Natural 3d Scaffold For Pancreatic Tissue And Whole Organ Engineering. *Biomaterials*. 2013; 34 (28): 6760–6772. doi: 10.1016/j.biomaterials.2013.05.066.
12. Sabetkish S, Kajbafzadeh AM. The Most Ideal Pancreas Extracellular Matrix as a Platform for Pancreas Bioengineering: Decellularization/Recellularization Protocols. *Adv Exp Med Biol*. 2021; 1345: 61–70. doi: 10.1007/978-3-030-82735-9_6.
13. Biomimetics of Extracellular Matrices for Cell and Tissue Engineered Medical Products / Eds. Victor I. Sevastianov and Yulia B. Basok. – Newcastle upon Tyne, UK: Cambridge Scholars Publishing, 2023; 339.
14. 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 (1): 119. doi: 10.3390/ijms24010119.28.
15. Napierala H, Hillebrandt K-H, Haep N, Tang P, Tintemann M, Gassner J et al. Engineering an endocrine neopancreas by repopulation of a decellularized rat pancreas with islets of Langerhans. *Sci Rep*. 2017 Feb 2; 7: 41777. doi: 10.1038/srep41777.
16. Скалецкая ГН, Скалецкий НН, Кирсанова ЛА, Бубенцова ГН, Волкова ЕА, Севастьянов ВИ. Экспериментальная имплантация тканеинженерной конструкции поджелудочной железы. *Вестник трансплантологии и искусственных органов*. 2019; 21 (2): 104–111. Skaletskaya GN, Skaletskiy NN, Kirsanova LA, Bubentsova GN, Volkova EA, Sevastyanov VI. Experimental implantation of tissue-engineering pancreatic construct. *Russian Journal of Transplantology and Artificial Organs*. 2019; 21 (2): 104–111. (In Russ.). doi: 10.15825/1995-1191-2019-2-104-111.
17. Пономарева АС, Баранова НВ, Никольская АО, Кирсанова ЛА, Онищенко НА, Гоникова ЗЗ и др. Внутривнутрибрюшинное введение клеточно-инженерной конструкции поджелудочной железы крысам с экспериментальным сахарным диабетом (предварительные результаты). *Вестник трансплантологии и искусственных органов*. 2023; 25 (2): 107–117. Ponomareva AS, Baranova NV, Nikolskaya AO, Kirsanova LA, Onishchenko NA, Gonikova ZZ et al. Intraperitoneal injection of cell-engineered pancreas in rats with experimental type I diabetes (preliminary results). *Russian Journal of Transplantology and Artificial Organs*. 2023; 25 (2): 107–117. doi: 10.15825/1995-1191-2023-2-107-117.
18. Smink AM, de Vos P. Therapeutic strategies for modulating the extracellular matrix to improve pancreatic islet function and survival after transplantation. *Curr Diab Rep*. 2018; 18 (7): 39. doi: 10.1007/s11892-018-1014-4.

*Статья поступила в редакцию 04.03.2024 г.
The article was submitted to the journal on 04.03.2024*