## ВЛИЯНИЕ ИМПЛАНТАЦИИ КЛЕТОЧНО-ИНЖЕНЕРНОЙ КОНСТРУКЦИИ ПОДЖЕЛУДОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ НА ОСТРОВКОВЫЙ АППАРАТ КРЫС-РЕЦИПИЕНТОВ С САХАРНЫМ ДИАБЕТОМ I ТИПА

Н.В. Баранова<sup>1</sup>, Л.А. Кирсанова<sup>1</sup>, Г.Н. Бубенцова<sup>1</sup>, А.С. Пономарева<sup>1</sup>, А.О. Никольская<sup>1</sup>, Ю.Б. Басок<sup>1</sup>, В.И. Севастьянов<sup>1, 2</sup>

<sup>1</sup> ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр трансплантологии и искусственных органов имени академика В.И. Шумакова» Минздрава России, Москва, Российская Федерация <sup>2</sup> АНО «Институт медико-биологических исследований и технологий», Москва, Российская Федерация

Современные исследования направлены на изучение методов стимулирования регенераторной способности β-клеток поджелудочной железы (ПЖ) как возможного терапевтического средства при сахарном диабете. Цель: провести сравнительный анализ гистологической картины островкового аппарата у крыс со стрептозотоциновым сахарным диабетом после введения клеточно-инженерной конструкции поджелудочной железы (КИК ПЖ) на основе изолированных аллогенных островков Лангерганса и скаффолда из децеллюляризованных фрагментов ПЖ человека. Материалы и методы. ПЖ крыс контрольной группы (n = 4; СД I без лечения), опытной группы 1 (n = 4; внутрибрюшинное введение островков Лангерганса) и опытной группы 2 (n = 4; внутрибрюшинное введение КИК ПЖ) подвергали гистологическому исследованию. Выполняли иммуногистохимическое окрашивание на инсулин и глюкагон с использованием антител и системы визуализации. Результаты. В островках ПЖ крыс контрольной группы иммунопозитивные клетки к инсулину не выявлялись или обнаруживались одиночными, при этом α-клетки становились превалирующим клеточным типом. В ПЖ крыс опытной группы 1 в большинстве островков и окружающей экзокринной паренхиме β-клетки наблюдались в количестве 1–2 в поле зрения; α-клетки продолжали оставаться основной клеточной популяцией. В ПЖ крыс опытной группы 2 определялось значительное увеличение инсулинпозитивных клеток, при этом отмечалось снижение количества глюкагонпозитивных клеток. Заключение. Морфологическое исследование островкового аппарата ПЖ экспериментальных животных показало, что имплантация КИК ПЖ положительно влияла на восстановление пула активно функционирующих β-клеток реципиента, выполняя роль триггера регенеративного процесса.

Ключевые слова: сахарный диабет, поджелудочная железа, островки Лангерганса, регенерация.

### IMPACT OF PANCREATIC CELL-ENGINEERED CONSTRUCTS ON THE ISLET APPARATUS IN RECIPIENT RATS WITH TYPE I DIABETES MELLITUS

*N.V. Baranova<sup>1</sup>*, *L.A. Kirsanova<sup>1</sup>*, *G.N. Bubentsova<sup>1</sup>*, *A.S. Ponomareva<sup>1</sup>*, *A.O. Nikolskaya<sup>1</sup>*, *Yu.B. Basok<sup>1</sup>*, *V.I. Sevastianov<sup>1, 2</sup>* 

<sup>1</sup> Shumakov National Medical Research Center of Transplantology and Artificial Organs, Moscow, Russian Federation

<sup>2</sup> Institute of Biomedical Research and Technology, Moscow, Russian Federation

Current research focuses on exploring strategies to stimulate the regenerative capacity of pancreatic beta cells as a potential therapeutic approach for diabetes mellitus (DM). **Objective:** this study aims to perform a comparative histological analysis of the islet apparatus in rats with streptozotocin (STZ)-induced DM following the implantation

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.ru

of a pancreatic cell-engineered construct (PCEC). The PCEC consists of isolated allogeneic islets of Langerhans embedded within a scaffold derived from decellularized human pancreatic fragments. **Materials and methods.** The pancreases of rats from the control group (n = 4; untreated type 1 DM – T1DM), experimental group 1 (n = 4; intraperitoneal injection of pancreatic islets), and experimental group 2 (n = 4; intraperitoneal injection of PCEC) underwent histological analysis. Immunohistochemical staining for insulin and glucagon was performed using specific antibodies and an imaging system. **Results.** In the pancreatic islets of the control group, insulinimmunopositive beta cells were either absent or detected as isolated cells, with alpha cells predominating. In the pancreases of experimental group 1 rats, beta cells were observed in most islets and within the surrounding exocrine parenchyma, albeit in low numbers (1-2 per field of view), while alpha cells remained the dominant population. A significant increase in insulin-positive cells was observed in the pancreas of rats in experimental group 2, along with a reduction in glucagon-positive cell numbers. **Conclusion.** Morphological examination of the pancreatic islet apparatus in the experimental animals revealed that implantation of the PCEC had a beneficial effect on restoration of the recipient's pool of functionally active beta cells, serving as a trigger for the regenerative process.

Keywords: diabetes mellitus, pancreas, pancreatic islets, regeneration.

#### введение

Восстановление функциональной массы инсулинпродуцирующих β-клеток, утраченных при развитии сахарного диабета I типа (СД I), до сих пор остается неразрешенной задачей. Известно, что регенераторный потенциал островкового аппарата поджелудочной железы (ПЖ) ограничен [1]. В связи с этим современные исследования фокусируются на подходах, направленных на стимулирование образования β-клеток из альтернативных клеточных популяций ПЖ [2] и/или генерации β-клеток из стволовых клеток различного происхождения [3].

В настоящее время внимание исследователей обращено на детальное изучение регенерации β-клеток ПЖ и лежащих в основе этого процесса молекулярных механизмов. Результаты таких исследований могут способствовать развитию новых эффективных и безопасных методов терапевтического лечения сахарного диабета (СД) [4, 5].

Механизмы восстановления пула β-клеток включают их лимитированную пролиферацию, гипертрофию, трансдифференцировку других типов инсулоцитов, клеток протокового эпителия и ацинарных клеток [5-8]. Недавние исследования в клеточной биологии продемонстрировали пластичность различных типов клеток ПЖ, основанную на изменении клеточной идентичности вследствие гибкости процесса дифференцировки [5]. Показано, что у мышей некоторые глюкагонпродуцирующие α-клетки и соматостатинпродуцирующие δ-клетки становятся экспрессорами инсулина при повреждении инсулинсекретирующих β-клеток [9]. М.S. Remedi et al. продемонстрировали, что клетки ПЖ, такие как протоковые клетки, центроацинарные клетки, α-клетки [10] и б-клетки [11], способны трансдифференцироваться в функциональные β-клетки, чтобы компенсировать нарушение секреции инсулина для поддержания нормогликемии. Механизм регенерации, с помощью которого клетки протоков воспроизводят аспекты эмбриональной дифференцировки, также основан на пластичности клеток панкреатической ткани [12, 13]. W.-C. Li et al. подтвердили, что процесс регенерации β-клеток может быть осуществлен путем дедифференцировки до фенотипа предшественника, а затем повторной дифференцировки с помощью определенного сигнального пути, который используется при нормальном эмбриональном развитии [14].

Поскольку ацинарные клетки являются наиболее распространенным типом клеток ПЖ, они представляют собой привлекательный источник для новой генерации β-клеток. [15–19]. В исследовании Q. Zhou et al. было продемонстрировано, что дифференцированные ацинарные клетки взрослых мышей способны трансдифференцироваться в β-клетки, подобные эндогенным островковым инсулиноцитам, экспрессирующим инсулин и снижающим гипергликемию [20].

Восстановление недостающих клеточных популяций путем стимулирования врожденной адаптивной пластичности *in situ* является многообещающей перспективой лечения дегенеративных заболеваний [21]. Однако проявляют ли клетки ПЖ человека такую же пластичность, особенно при диабетических состояниях, остается неизвестным, поскольку сигнальные пути регенерации β-клеток и их медиаторы (глюкоза, гормоны, факторы роста) могут в значительной степени различаться [9].

Одной из стратегий клеточной заместительной терапии у пациентов с СД I является трансплантация панкреатических островков, которая может не только обеспечивать поступление инсулина физиологическим путем, но и оказывать стимулирующее действие на процесс регенерации β-клеток. Так, А. Jörns et al. обосновывают концепцию о том, что долгосрочное поддержание нормогликемии посредством адекватного снабжения инсулином из эндокринных

трансплантатов является идеальной предпосылкой для восстановления β-клеток, а также репликации β-клеток в ПЖ [22]. По всей вероятности, стимуляция регенерации β-клеток островков Лангерганса осуществляется за счет паракринного эффекта клеточного трансплантата при выделении биологически активных полипептидов с собственными физиологическими свойствами (С-пептид, амилин и другие) [23]. Продемонстрированы результаты, свидетельствующие о том, что трансплантация островков после частичной панкреатэктомии у мышей усиливает регенерацию и сохранность эндогенных β-клеток, приводит к увеличению массы β-клеток и стабилизации гликемии [24].

Ранее нами было выявлено более выраженное по сравнению с введением островков Лангерганса снижение уровня гликемии у крыс с СД I после внутрибрюшинного введения клеточно-инженерной конструкции поджелудочной железы (КИК ПЖ), сформированной на основе изолированных аллогенных островков Лангерганса и скаффолда, полученного в результате децеллюляризации фрагментов ПЖ человека [25]. При этом были обнаружены морфологические особенности ПЖ, связанные с процессами регенерации β-клеток.

Сравнительный анализ гистологической картины островкового аппарата животных в контрольной и опытных группах стал целью настоящей работы.

#### МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

# Состав клеточно-инженерной конструкции поджелудочной железы (КИК ПЖ)

КИК ПЖ формировали на основе двух компонентов: жизнеспособных инсулинпродуцирующих островков Лангерганса крысы, культивированных 24 часа в стандартных условиях (37 °C, 5% CO<sub>2</sub>), и тканеспецифического мелкодисперсного скаффолда, полученного из децеллюляризованных фрагментов ПЖ человека (ДПЖч-скаффолд) [26–28].

Каждый образец КИК ПЖ содержал 2000 островков, иммобилизованных в стерильный ДПЖч-скаффолд ( $10,0 \pm 0,1$  мг в 100 мкл раствора Хенкса).

Жизнеспособность островков в составе КИК ПЖ определяли с помощью окрашивания витальными красителями – акридиновым оранжевым и пропидием йодидом (AO/PI) (ПанЭко, Россия).

Полученные образцы КИК ПЖ вводили инъекционно (размер иглы шприца 23G) внутрибрюшинно крысам с индуцированным стрептозотоцином СД I.

#### Дизайн эксперимента in vivo

Модель СД I индуцировали путем дробного введения стрептозотоцина (СТЗ) (Biorbyt, Индия) крысам-самцам породы Wistar весом 300–380 г: внутрибрюшинно вводили по 15 мг/кг/сут в течение каждых 5 суток. Для исключения спонтанной реверсии диабета проводили проверку стабильности стрептозотоциновой модели СД I, определяя уровень гликемии в крови крыс по истечении 14 суток после введения последней дозы СТЗ. Животных с показателями глюкозы выше 20,0 ммоль/л отбирали для дальнейшего исследования.

Экспериментальных животных (n = 12) делили на три группы: контрольную группу (n = 4; 6e3 проведения лечения), опытную группу 1 <math>(n = 4; внутрибрюшинное введение 2000 островков Лангерганса)и опытную группу 2 <math>(n = 4; внутрибрюшинное введение КИК ПЖ).

Еженедельно на протяжении 10 недель натощак проводили измерение концентрации глюкозы в капиллярной крови всех животных. После вывода животных из эксперимента осуществляли забор ПЖ для морфологического исследования панкреатической ткани.

#### Гистологическое исследование

Гистологическое исследование ПЖ крыс контрольной и опытных групп проводили с целью выявления морфологических особенностей островкового аппарата ПЖ. Извлеченную ПЖ экспериментальных животных фиксировали в 10% забуференном формалине в течение 24 часов. Обезвоживание исследуемого материала проводили в этаноле восходящей концентрации (50, 60, 70, 80, 95%), затем последовательно выдерживали в смеси этанола и хлороформа, чистом хлороформе, в смеси хлороформа и парафина при +37 °C. Материал заливали в парафин (Paraplast<sup>®</sup> X-tra<sup>TM</sup>, Leica, Германия) и получали срезы толщиной 4–5 мкм, используя микротом RM2245 (Leica, Германия).

Полученные парафиновые срезы окрашивали гематоксилином и эозином. С целью определения основных типов островковых клеток проводили постановку иммуногистохимической (ИГХ) реакции на инсулин и глюкагон с помощью антител к инсулину (Abcam, Великобритания) и глюкагону (Merck, Германия). Для визуализации инсулина и глюкагона использовали систему Rabbit Specific HRP/DAB (ABC) Detection IHC kit (Abcam, Великобритания), следуя протоколу производителя.

#### РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

## Клеточно-инженерная конструкция поджелудочной железы (КИК ПЖ)

Формирование КИК ПЖ осуществляли непосредственно перед внутрибрюшинным введением крысам с экспериментальным СД I. Культивированные 24 часа островки Лангерганса крысы проявляли адгезивные качества и иммобилизовались на поверхность ДПЖ-скаффолда (рис. 1, а), при этом лишь отдельные островки оставались флотирующими в культуральной среде. Прижизненное окрашивание островков витальным красителем акридиновым АО/ РІ подтвердило их жизнеспособность в составе КИК ПЖ (рис. 1, б), которая составила 95 ± 2%.

#### Сравнительная оценка функциональной эффективности КИК ПЖ и островков Лангерганса у крыс со стрептозотоциновым сахарным диабетом

В результате проведенного исследования было установлено, что внутрибрюшинное введение КИК ПЖ крысам опытной группы 2 способствовало снижению уровня гликемии в среднем на  $19,5 \pm 3,9$  ммоль/л (с  $25,8 \pm 5,1$  до  $6,3 \pm 2,7$  ммоль/л). К 10-й неделе эксперимента показатели глюкозы оказывались в два раза ниже первоначальных значений. Введение суспензии островков Лангерганса крысам опытной группы 1 приводило к снижению уровня гликемии в среднем на  $14,8 \pm 3,4$  ммоль/л (с  $28,2 \pm 4,2$  до  $13,4 \pm 2,6$  ммоль/л), сохраняющегося около 7 недель, после чего показатели глюкозы повышались и могли достигать исходных значений.

Таким образом, введение КИК ПЖ крысам с СД I выявило более выраженный и пролонгированный эффект по сравнению с введением суспензии островков Лангерганса [25, 29].

#### Морфологические изменения островкового аппарата крыс с СД I после внутрибрюшинного введения островков Лангерганса или КИК ПЖ

ПЖ здоровой крысы характеризуется диффузным строением, выраженной дольчатостью экзокринной паренхимы с разбросанными в ней дискретными островками Лангерганса. Островки, как правило, имеют стандартную сферическую или овальную форму, четко очерченный контур. Островковые клетки-инсулоциты располагаются довольно равномерно в пределах островка и характеризуются бледно окрашенной мелкозернистой цитоплазмой и округлым, хорошо структурированным ядром с 1-2 ядрышками (рис 2, а). Основные клеточные типы в островке крысы при этом имеют строгую локализацию: инсулинпозитивные β-клетки располагаются в центральной части островка (рис 2, б), а глюкагонпозитивные α-клетки располагаются по периметру и создают так называемую «мантию» (рис. 2, в).

Введение стрептозотоцина, действие которого носит избирательный характер и затрагивает в островках только один клеточный тип инсулоцитов – инсулинпродуцирующие β-клетки, приводило к преобразованиям морфологической картины островка. В образцах ПЖ крыс контрольной группы (10 недель без лечения) выявляли изменение формы островков, которая становилась нерегулярной, с неровным контуром и небольшими выступами в окружающую экзокринную паренхиму (рис. 3, а). Проникая в клетку, стрептозотоцин оказывал токсическое воздействие и в конечном итоге приводил к ее гибели.



Рис. 1. Клеточно-инженерная конструкция поджелудочной железы (КИК ПЖ) на основе островков Лангерганса крысы и тканеспецифического скаффолда из децеллюляризованной поджелудочной железы человека (ДПЖч-скаффолд): а – инвертированная фазово-контрастная микроскопия; б – флуоресцентное окрашивание АО/РІ. Размер масштабной линейки 100 мкм

Fig. 1. Pancreatic cell-engineered construct (PCEC) composed of rat Pancreatic islets and a tissue-specific scaffold derived from decellularized human pancreas (DHP scaffold): a – Inverted phase-contrast microscopy; 6 – Acridine Orange/Propidium Iodide (AO/PI) fluorescence staining. Scale bar: 100 μm

В островках контрольной группы патологические изменения проявлялись прежде всего в центральной зоне, где обнаруживались гипертрофированные клетки, некротические клетки с признаками кариолиза, вакуолизованные клетки, а также участки детрита. Наблюдались также изменения в распределении клеток. В островках появлялись участки гиперклеточности, в которых определялся иммунопозитивный сигнал на глюкагон (рис. 3, в). Гиперклеточность, судя по всему, являлась результатом пролиферативной активности α-клеток в ответ на высокий уровень гликемии и изменений паракринных отношений, связанных с утратой основной популяции β-клеток. В результате α-клетки становились превалирующим клеточным типом в островках крыс контрольной группы. При этом иммунопозитивные к инсулину клетки в большинстве островков не выявлялись или обнаруживались одиночными в отдельных островках (рис. 3, б).

По окончании эксперимента (10 недель) гистологическая картина ПЖ крыс после внутрибрюшинного введения островков Лангерганса (опытная группа 1) не выявила значимых морфологических изменений по сравнению с контрольной группой.

Островки характеризовались нерегулярной формой с неровными контурами, наличием вакуолизованных и некротических клеток, а также участками гиперклеточности. (рис. 4, а). Иммуногистохимическое окрашивание выявило, что  $\beta$ -клетки в малом количестве (1–2 в поле зрения) наблюдались в большинстве островков, а также и в окружающей экзокринной паренхиме (рис. 4, б), однако вследствие малочисленности оказывать значимого влияния на уровень гликемии, скорее всего, не могли. Отметим, что  $\alpha$ -клетки оставались основной клеточной популяцией в островках (рис. 4, в).

Таким образом, можно предположить, что снижение высоких значений глюкозы в капиллярной крови у животных опытной группы 1 связано в первую очередь с действием экзогенного инсулина, внесенного имплантированными островками.



Рис. 2. Гистологическая картина поджелудочной железы здоровой крысы: а – окрашивание гематоксилином и эозином; б – иммуногистохимическое (ИГХ) окрашивание на инсулин; в – ИГХ-окрашивание на глюкагон. Синими стрелками отмечены островки Лангерганса. Размер масштабной линейки 100 мкм

Fig. 2. Histological appearance of the pancreas in a healthy rat: a – Hematoxylin and eosin (H&E) staining; 6 – Immunohistochemical (IHC) staining for insulin; B – IHC staining for glucagon. Blue arrows indicate pancreatic islets. Scale bar: 100  $\mu$ m



Рис. 3. Гистологическая картина поджелудочной железы крысы контрольной группы с экспериментальным СД I, 10 недель без лечения: а – окрашивание гематоксилином и эозином; б – ИГХ-окрашивание на инсулин; в – ИГХ-окрашивание на глюкагон. Синими стрелками отмечены островки Лангерганса. Размер масштабной линейки 100 мкм

Fig. 3. Histological appearance of the pancreas in a control group rat with experimental T1DM (10 weeks without treatment): a – Hematoxylin and eosin (H&E) staining;  $\delta$  – Immunohistochemical (IHC) staining for insulin; B – IHC staining for glucagon. Blue arrows indicate pancreatic islets. Scale bar: 100 µm

Внутрибрюшинное введение КИК ПЖ вносило определенные изменения в морфологическую картину островкового аппарата крыс опытной группы 2. Так, наряду с описанными ранее островками с гиперклеточностью и признаками некроза у половины крыс (n = 2) опытной группы 2 в ПЖ обнаруживались островки необычной формы с характерными ответвлениями, уходящими в окружающую паренхиму (рис. 5, а). В таких островках участки гиперклеточности не определялись и клетки распределялись довольно равномерно (рис. 5, б). Количество иммунопозитивных к инсулину клеток в таких островках значительно увеличивалось относительно контрольных образцов и достигало 1-2 десятков и более (рис. 5, в), а глюкагонпозитивные клетки уже не были превалирующей популяцией (рис. 5, г). При этом в прилежащих ацинусах, непосредственно в выстилке, выявлялись светлые клетки с отсутствием апикально-базальной полюсности, мелкозернистой цитоплазмой и крупным, хорошо структурированным ядром. Количество таких клеток, морфологически не характерных для ацинусов, варьировало от одной до нескольких. В описываемых клетках (в определенной пропорции) фиксировался иммунопозитивный сигнал к инсулину (рис. 5, д) или глюкагону (рис. 5, е), гормонов, характерных для β-и α-клеток соответственно.

Отметим, что описанные нами структуры, так называемые ацино-инсулярные комплексы (рис. 5, б), наблюдаются в ПЖ некоторых видов животных в период внутриутробного развития и играют важную роль в формировании островкового аппарата [30–32].

В островках стандартной формы мы также обнаруживали пополнение инсулинпозитивных клеток, более выраженное, чем при введении суспензии островков Лангерганса (рис. 5, ж), при этом отмечали снижение количества глюкагонпозитивных клеток относительно контрольной группы (рис. 5, 3). Такие островки наблюдались у остальных крыс (n = 2) опытной группы 2.

Мы полагаем, что восполнение пула β-клеток в нашем эксперименте явилось результатом индукции перепрограммирования и трансдифференцировки как ацинарного эпителия, так и определенных типов инсулоцитов непосредственно в островках, что можно расценивать как процесс компенсаторной регенерации. Наиболее выраженное снижение уровня гликемии в эксперименте, по нашему мнению, достигалось не только пролонгированным действием имплантированных КИК ПЖ, но и синтезом инсулина обновленной популяцией β-клеток собственной железы.

Таким образом, наша работа подтверждает современную концепцию пластичности различных типов клеток ПЖ, в соответствии с которой регенерация β-клеток может происходить не только из других типов инсулоцитов, но и из экзокринных компонентов ПЖ [7, 19, 21]. Представляется целесообразным проведение дальнейших исследований в данном направлении.

Частичное восстановление пула собственных β-клеток в островках ПЖ крыс-реципиентов с экспериментальным СД I наблюдали после внутрибрюшинной имплантации тканеинженерной конструкции ПЖ, сформированной из флотирующих островковоподобных культур ПЖ новорожденных кроликов и коллагенсодержащего гидрогеля [33].

Факторы, индуцирующие регенераторную способность  $\beta$ -клеток ПЖ, могут быть использованы в качестве терапевтического средства при СД. Тем не менее требуется дальнейшее исследование аспектов и механизмов, лежащих в основе этого процесса в физиологических и патологических условиях и типов клеток, вовлеченных в этот процесс [21].



Рис. 4. Гистологическая картина поджелудочной железы крысы опытной группы 1 с экспериментальным СД I после внутрибрюшинного введения островков Лангерганса, 10 недель эксперимента: а – окрашивание гематоксилином и эозином; б – ИГХ-окрашивание на инсулин; в – ИГХ-окрашивание на глюкагон. Синими стрелками отмечены островки Лангерганса. Размер масштабной линейки 100 мкм

Fig. 4. Histological appearance of the pancreas in a rat from experimental group 1 with experimental T1DM after intraperitoneal injection of pancreatic islets (10 weeks post-treatment): a – Hematoxylin and eosin (H&E) staining;  $\delta$  – Immunohistochemical (IHC) staining for insulin; B – IHC staining for glucagon. Blue arrows indicate pancreatic islets. Scale bar: 100 µm



Рис. 5. Гистологическая картина поджелудочной железы крысы опытной группы 2 с СД I после внутрибрюшинного введения КИК ПЖ, 10 недель эксперимента: а, б – окрашивание гематоксилином и эозином; в, д, ж – ИГХ-окрашивание на инсулин; г, е, з – ИГХ-окрашивание на глюкагон. Синими стрелками отмечены островки Лангерганса, зелеными – инсулинпозитивные клетки в ацинусах, желтыми – глюкагонпозитивные клетки в ацинусах, красными – ацино-инсулярные комплексы. Размер масштабной линейки 100 мкм

Fig. 5. Histological appearance of the pancreas in rats from experimental group 2 with T1DM after intraperitoneal injection of pancreatic cell-engineered construct (10 weeks post-treatment): a,  $\delta$  – Hematoxylin and eosin (H&E) staining; B,  $\pi$ ,  $\pi$  – Immunohistochemical (IHC) staining for insulin; r, e, 3 – IHC staining for glucagon. Blue arrows indicate pancreatic islets; green arrows indicate insulin-positive cells in the acinus; yellow arrows indicate glucagon-positive cells in the acinus; red arrows indicate acino-insular complexes. Scale bar: 100 µm

#### ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Исходя из представленных данных, можно предположить, что имплантация КИК ПЖ крысам со стрептозотоциновым СД I не только замещает функцию утраченных  $\beta$ -клеток и оказывает непосредственно антидиабетическое действие, но и выполняет роль триггера регенеративного процесса, положительно влияя на восстановление пула активно функционирующих инсулиноцитов реципиента.

Таким образом, применение КИК ПЖ для стимулирования процессов регенерации β-клеток может рассматриваться в качестве потенциальной терапевтической стратегии, имеющей значение в лечении СД при дефиците функциональных β-клеток.

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов. The authors declare no conflict of interest.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ / REFERENCES

- Wang KL, Tao M, Wei TJ, Wei R. Pancreatic β cell regeneration induced by clinical and preclinical agents. World J Stem Cells. 2021 Jan 26; 13 (1): 64–77. doi: 10.4252/ wjsc.v13.i1.64.
- Zhong F, Jiang Y. Endogenous Pancreatic β Cell Regeneration: A Potential Strategy for the Recovery of β Cell Deficiency in Diabetes. *Front Endocrinol (Lausanne)*. 2019 Feb 20; 10: 101. doi: 10.3389/fendo.2019.00101.
- Hogrebe NJ, Maxwell KG, Augsornworawat P, Millman JR. Generation of insulin-producing pancreatic β cells from multiple human stem cell lines. Nat Protoc. 2021 Sep; 16 (9): 4109–4143. doi: 10.1038/s41596-021-00560-y.
- Spears E, Serafimidis I, Powers AC, Gavalas A. Debates in Pancreatic Beta Cell Biology: Proliferation Versus Progenitor Differentiation and Transdifferentiation in Restoring β Cell Mass. Front Endocrinol (Lausanne). 2021 Aug 6; 12: 722250. doi: 10.3389/fendo.2021.722250.
- Пылаев ТЕ, Смышляева ИВ, Попыхова ЭБ. Регенерация β-клеток островкового аппарата поджелудочной железы. Обзор литературы. *Сахарный диабет.* 2022; 25 (4): 395–404. *Pylaev TE, Smyshlyaeva IV, Popyhova EB*. Regeneration of β-cells of the islet apparatus of the pancreas. Literature review. *Diabetes mellitus.* 2022; 25 (4): 395–404. (In Russ.). doi: 10.14341/DM12872.
- Lu J, Jaafer R, Bonnavion R, Bertolino P, Zhang CX. Transdifferentiation of pancreatic α-cells into insulinsecreting cells: From experimental models to underlying mechanisms. World J Diabetes. 2014 Dec 15; 5 (6): 847–853. doi: 10.4239/wjd.v5.i6.847.
- Aguayo-Mazzucato C, Bonner-Weir S. Pancreatic β Cell Regeneration as a Possible Therapy for Diabetes. *Cell Metab.* 2018 Jan 9; 27 (1): 57–67. doi: 10.1016/j. cmet.2017.08.007.
- 8. Courtney M, Gjernes E, Druelle N, Ravaud C, Vieira A, Ben-Othman N et al. The inactivation of Arx in pancreatic alpha-cells triggers their neogenesis and conversion

into functional beta-like cells. *PLoS Genet*. 2013 Oct; 9 (10): e1003934. doi: 10.1371/journal.pgen.1003934.

- Furuyama K, Chera S, van Gurp L, Oropeza D, Ghila L, Damond N et al. Diabetes Relief in Mice by Glucose-Sensing Insulin-Secreting Human α-Cells. Nature. 2019 Mar; 567 (7746): 43–48. doi: 10.1038/s41586-019-0942-8.
- Thorel F, Népote V, Avril I, Kohno K, Desgraz R, Chera S, Herrera PL. Conversion of adult pancreatic alphacells to beta-cells after extreme beta-cell loss. Nature. 2010 Apr 22; 464 (7292): 1149–1154. doi: 10.1038/nature08894.
- Remedi MS, Emfinger C. Pancreatic β-cell identity in diabetes. Diabetes Obes Metab. 2016 Sep; 18 Suppl 1 (Suppl 1): 110–116. doi: 10.1111/dom.12727.
- Bonner-Weir S, Toschi E, Inada A, Reitz P, Fonseca SY, Aye T, Sharma A. The pancreatic ductal epithelium serves as a potential pool of progenitor cells. *Pediatr Diabetes*. 2004; 5 (Suppl 2): 16–22. doi: 10.1111/j.1399-543X.2004.00075.x.
- Bonner-Weir S, Inada A, Yatoh S, Li WC, Aye T, Toschi E, Sharma A. Transdifferentiation of pancreatic ductal cells to endocrine beta-cells. *Biochem Soc Trans*. 2008 Jun; 36 (Pt 3): 353–356. doi: 10.1042/BST0360353.
- Li W-C, Rukstalis JM, Nishimura W, Tchipashvili V, Habener JF, Sharma A, Bonner-Weir S. Activation of pancreatic-duct-derived progenitor cells during pancreas regeneration in adult rats. J Cell Sci. 2010 Aug 15; 123 (Pt 16): 2792–2802. doi: 10.1242/jcs.065268.
- Bouwens L. Transdifferentiation versus stem cell hypothesis for the regeneration of islet beta-cells in the pancreas. *Microsc Res Tech.* 1998 Nov 15; 43 (4): 332–336. doi: 10.1002/(SICI)1097-0029(19981115)43:4<332::AIDJEMT7>3.0.CO;2-1.
- Kim HS, Lee MK. β-Cell regeneration through the transdifferentiation of pancreatic cells: Pancreatic progenitor cells in the pancreas. J Diabetes Investig. 2016 May; 7 (3): 286–296. doi: 10.1111/jdi.12475.
- Baeyens L, Lemper M, Leuckx G, De Groef S, Bonfanti P, Stange G et al. Transient cytokine treatment induces acinar cell reprogramming and regenerates functional beta cell mass in diabetic mice. Nat Biotechnol. 2014 Jan; 32 (1): 76–83. doi: 10.1038/nbt.2747.
- Miyazaki S, Tashiro F, Miyazaki J. Transgenic Expression of a Single Transcription Factor Pdx1 Induces Transdifferentiation of Pancreatic Acinar Cells to Endocrine Cells in Adult Mice. *PLoS One.* 2016 Aug 15; 11 (8): e0161190. doi: 10.1371/journal.pone.0161190.
- Baeyens L, De Breuck S, Lardon J, Mfopou JK, Rooman I, Bouwens L. In vitro generation of insulin-producing beta cells from adult exocrine pancreatic cells. Diabetologia. 2005 Jan; 48 (1): 49–57. doi: 10.1007/ s00125-004-1606-1.
- 20. *Zhou Q, Brown J, Kanarek A, Rajagopal J, Melton DA. In vivo* reprogramming of adult pancreatic exocrine cells to beta-cells. *Nature.* 2008 Oct 2; 455 (7213): 627–632. doi: 10.1038/nature07314.
- Docherty FM, Sussel L. Islet Regeneration: Endogenous and Exogenous Approaches. Int J Mol Sci. 2021 Mar 24; 22 (7): 3306. doi: 10.3390/ijms22073306.

- Jörns A, Klempnauer J, Tiedge M, Lenzen S. Recovery of pancreatic beta cells in response to long-term normoglycemia after pancreas or islet transplantation in severely streptozotocin diabetic adult rats. *Pancreas.* 2001 Aug; 23 (2): 186–196. doi: 10.1097/00006676-200108000-00009.
- 23. Михайличенко ВЮ, Столяров СС. Эффект трансплантации культуры клеток поджелудочной железы при аллоксановом сахарном диабете у крыс в эксперименте. Международный журнал прикладных и фундаментальных исследований. 2015; 9 (4): 670– 672. Mikhailichenko VYu, Stolyarov SS. Effect tranplantation of pancreas islet cell cultures at alloxan diabetes at rats in experiment. International Journal of Applied and fundamental research. 2015; 9 (4): 670–672.
- 24. Jung HS, Ahn YR, Oh SH, Kim YS, No H, Lee MK, Kim KW. Enhancement of beta-cell regeneration by islet transplantation after partial pancreatectomy in mice. *Transplantation*. 2009 Aug 15; 88 (3): 354–359. doi: 10.1097/TP.0b013e3181b07a02.
- 25. Баранова НВ, Пономарева АС, Кирсанова ЛА, Никольская АО, Бубенцова ГН, Басок ЮБ, Севастьянов ВИ. Функциональная эффективность клеточно-инженерной конструкции поджелудочной железы в экспериментальной модели сахарного диабета I типа. Вестник трансплантологии и искусственных органов. 2024; 26 (2): 94–104. Baranova NV, Ponomareva AS, Kirsanova LA, Nikolskaya AO, Bubentsova GN, Basok YuB, Sevastianov VI. Functional efficiency of pancreatic cell-engineered construct in an animal experimental model for type I diabetes. Russian Journal of Transplantology and Artificial Organs. 2024; 26 (2): 94–104. [In Russ, English abstract]. doi: 10.15825/1995-1191-2024-2-94-104.
- 26. Пономарева АС, Кирсанова ЛА, Баранова НВ, Сургученко ВА, Бубенцова ГН, Басок ЮБ и др. Децеллюляризация фрагмента донорской поджелудочной железы для получения тканеспецифического матрикса. Вестник трансплантологии и искусственных органов. 2020; 22 (1): 123–133. Ponomareva AS, Kirsanova LA, Baranova NV, Surguchenko VA, Bubentsova GN, Basok YuB et al. Decellularization of donor pancreatic fragment to obtain a tissue-specific matrix scaffold. Russian Journal of Transplantology and Artificial Organs.

2020; 22 (1): 123–133. [In Russ, English abstract]. doi: 10.15825/1995-1191-2020-1-123-133.

- Sevastianov VI, Basok YB. Biomimetics of Extracellular Matrices for Cell and Tissue Engineered Medical Products. Newcastle upon Tyne, UK: Cambridge Scholars Publishing, 2023; 339.
- 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 Dec 21; 24 (1): 119. doi: 10.3390/ijms24010119.
- 29. Sevastianov VI, Ponomareva AS, Baranova NV, Belova AD, Kirsanova LA, Nikolskaya AO et al. A Tissue-Engineered Construct Based on a Decellularized Scaffold and the Islets of Langerhans: A Streptozotocin-Induced Diabetic Model. *Life (Basel)*. 2024 Nov 19; 14 (11): 1505. doi: 10.3390/life14111505.
- Sanchez A, Lawzewitsch J. Histological study of endocrine pancreas: cell differentiation process in Langerhans islets of bovine fetus and adult bovines. *Commun Biol.* 1985; 5 (3): 345–365.
- Riadinskaia NI, Siraziev RZ. [Histological and histochemical characteristics of pancreas of deer at the Altay]. *Tsitologiia*. 2008; 50 (8): 719–724. [In Russ]. PMID: 18822792.
- Kirsanova LA, Bliumkin VN. [Some characteristics of the histological structure of the fetal bovine pancreas]. Biull Eksp Biol Med. 1990 Sep; 110 (9): 330–332. [In Russ]. PMID: 2268733.
- 33. 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, English abstract]. doi: 10.15825/1995-1191-2019-2-104-111.

Статья поступила в редакцию 14.03.2025 г. The article was submitted to the journal on 14.03.2025