

УДК: 591.147.7:57.085.2

СРАВНИТЕЛЬНОЕ ИЗУЧЕНИЕ ИНСУЛИНПРОДУЦИРУЮЩЕЙ СПОСОБНОСТИ ОСТРОВКОВ ПОДЖЕЛУДОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ НОВОРОЖДЕННЫХ ПОРОСЯТ И НОВОРОЖДЕННЫХ КРОЛИКОВ IN VITRO

Н.В.Скрипниченко¹, Г.А.Божок², Т.П.Бондаренко²

¹Харьковский национальный университет имени В.Н.Каразина (Харьков, Украина)

²Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины (Харьков, Украина)

Исследовали секрецию инсулина в культурах островков поджелудочной железы (ОПЖ) новорожденных поросят и новорожденных кроликов на протяжении 8-ми суток культивирования. Показана высокая способность к базальной и стимулированной 10 мМ глюкозы секреции инсулина ОПЖ обоих видов животных.

Ключевые слова: *островки поджелудочной железы, культивирование, инсулин, глюкоза.*

Введение

Сахарный диабет (СД) является без преувеличения одним из самых распространенных заболеваний во всем мире и занимает третье место после сердечно-сосудистых заболеваний и злокачественных опухолей по инвалидизации и смертности населения. Инсулин-зависимый сахарный диабет (ИЗСД) характеризуется повреждением β -клеток островков Лангерганса поджелудочной железы, которое развивается под действием разнообразных факторов окружающей среды при условии генетической предрасположенности.

На сегодняшний день одним из основных подходов лечения больных ИЗСД является коррекция гипергликемии путем введения экзогенного инсулина. Однако в большинстве случаев применение инсулинотерапии не способно снизить частоту развития вторичных диабетических осложнений и предупредить развитие нефропатии, полинейропатии, ретинопатии и т. д. Проблема обеспечения стабильного течения ИЗСД и борьбы с вторичными осложнениями может быть решена единственно с помощью метода трансплантации поджелудочной железы или менее инвазивного метода – введения ОПЖ.

В настоящее время уже разработан и начал широко внедряться в клиническую практику Эдмонтонский протокол, согласно которому трансплантация человеческих островков, выделенных из поджелудочной железы двух и более доноров, приводит к инсулинонезависимости на длительное время, улучшает состояние больных ИЗСД, а также препятствует развитию вторичных осложнений (Bretzel et al., 2004; Sawada et al., 2003; Shapiro et al., 2003). Однако ряд проблем, связанных с дефицитом донорского материала, ограничивают широкое использование человеческих ОПЖ для трансплантации.

В то же время для трансплантации также используются ОПЖ, полученные от новорожденных поросят и от новорожденных кроликов (Алиев и др., 2000; Скалецкий и др., 2003; Brandhorst et al., 1999; Korbutt et al., 1996). Преимущество этого способа в том, что количество трансплантационного материала практически не ограничено, его легче стандартизировать, тестировать на стерильность во время культивирования, также существует идентичность химической и молекулярной структуры, антигенных особенностей инсулина человека и свиньи (Турчин и др., 2002; Biarnés et al., 2002; Weir et al., 1997), значительная функциональная активность тканей неонатальных доноров (Гринь та ін., 2003). ОПЖ новорожденных поросят и новорожденных кроликов при трансплантации больным СД оказывают положительное влияние на сосудистые и неврологические осложнения СД, успешно замещают функцию поврежденных β -клеток островков Лангерганса поджелудочной железы реципиентов, что приводит к нормогликемии и длительной инсулинонезависимости (Алиев и др., 2000; Скалецкий и др., 2003; Bretzel et al., 2004; Groth et al., 1999; Kang, Singh, 2005; Prochorov et al., 2005; Triverdi et al., 2001; Weir et al., 1997).

Известно, что культивирование является одним из основных способов снижения иммуногенности островков поджелудочной железы (Зубкова и др., 2000; Nicolls et al., 2001). Однако в процессе культивирования возможно изменение гормон-продуцирующих свойств клеток за счет их структурно-функциональных перестроек при адаптации к условиям культивирования, некроза и дегенерации секреторного эпителия.

Цель работы – сравнить максимальный выход островков из поджелудочных желез новорожденных поросят и новорожденных кроликов при использованном методе получения и инсулинпродуцирующую способность культур островков поджелудочной железы в условиях культивирования и стимулированной секреции.

Объекты и методы исследования

Культуры островков поджелудочной железы новорожденных поросят и новорожденных кроликов получали по методу (Korbitt et al., 1996). Эндокринную часть поджелудочной железы измельчали на фрагменты в растворе Hank's, содержащем 0,25% BSA, 10 мМ Hepes и антибиотики, отмывали 3–4 раза и инкубировали в течение 15 минут при 37°C в растворе, содержащем 1,1 мг/мл коллагеназы, отмывали 2 раза раствором Hank's, содержащем 0,25% BSA, 10 мМ Hepes и антибиотики, и протирали через нейлоновую сетку с диаметром ячеек >200 мкм. ОПЖ в количестве 60–96 × 10⁴/мл помещали для дальнейшего культивирования в среду DMEM или среду 199, содержащие 5% эмбриональной телячьей сыворотки, 0,5% BSA, 10 мМ глюкозы, 2 мМ глутамина и антибиотики. Культивирование проводили на протяжении 8-ми суток в атмосфере 5% CO₂ при 37°C. Замену среды не проводили на протяжении всего эксперимента.

Уровень инсулина в культуральной жидкости определяли каждый день на протяжении всего периода культивирования ОПЖ иммуноферментным методом с помощью набора INSULIN ELISA KIT (DRG Diagnostic, США).

Жизнеспособность клеток ОПЖ определяли при получении культуры и на 6–8-е сутки культивирования методом окрашивания трипановым синим. Она в среднем составляла 80% во все периоды наблюдения.

Стимуляцию инсулиновой секреции ОПЖ осуществляли добавлением в среду культивирования 10 мМ концентрации глюкозы.

Статистическую обработку полученных данных проводили с помощью программного приложения Excel. Данные представлены как среднее значений, полученных в 3-х аналогичных экспериментах и измеренных в двух параллельных пробах, ± стандартная ошибка. Статистическую достоверность оценивали с помощью ANOVA, достоверными считались различия при p<0,05.

Результаты и обсуждение

При использовании стандартного метода получения ОПЖ (Korbitt et al., 1996) из одной поджелудочной железы новорожденных поросят нами было получено 96,2969 ± 23,078 × 10⁴ островков/мл, а из одной ПЖ новорожденных кроликов – 67,5 ± 10,9622 × 10⁴ островков/мл (рис. 1). Это согласуется с результатами, полученными ранее в работе (Korsgren et al., 1988), и является приемлемым для дальнейшей трансплантации, так как известно, что для этой цели кролям с аллоксановым диабетом используют островки поджелудочной железы в концентрации 50 × 10⁴ островков/мл (Triverdi et al., 2001).

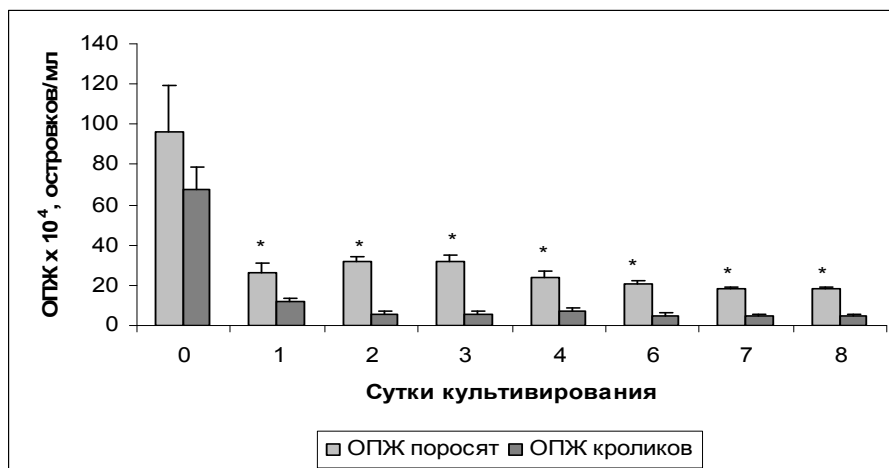


Рис. 1. Содержание островков новорожденных поросят и новорожденных кролей в надосадовой культуральной жидкости

*Примечание: * – отличия достоверны между двумя видами ОПЖ, p<0,05.*

На протяжении всего периода культивирования проводили подсчет ОПЖ в надосадовой жидкости. На 1-е сутки культивирования ОПЖ новорожденных поросят надосадовая культуральная жидкость содержала 26,625 ± 4,5 × 10⁴ островков/мл, а ОПЖ кроликов – 12 ± 1,7222 × 10⁴ островков/мл (рис. 1). На 2-е сутки культивирования было показано, что концентрация ОПЖ поросят составляет 31,7188 ± 2,8438 × 10⁴ островков/мл; а ОПЖ кроликов – 5,25 ± 2,25 × 10⁴ островков/мл. Эти показатели оставались практически без изменения для обоих видов ОПЖ на протяжении остального периода культивирования.

При морфометрическом анализе культур было отмечено, что ОПЖ новорожденных кроликов практически полностью прикреплялись к дну, тогда как значительное количество ОПЖ поросят оставалось свободно плавающим в питательной среде. В течение первых дней культивирования наблюдался клеточный рост фибробластоподобных клеток на поверхности культуральной чашки. Монослой клеток полностью покрывал дно чашки на 4–5-е сутки культивирования, после чего наблюдалось формирование выступающих клеточных агрегатов, имеющих сферическую форму.

При измерении инсулина в питательной среде была установлена секреторная способность ОПЖ новорожденных поросят и новорожденных кроликов, которая оставалась на достаточно высоком уровне на протяжении всего периода культивирования. Уровень содержания инсулина на 1-е сутки культивирования ОПЖ новорожденных поросят составлял $13,2746 \pm 2,1842$ мкМЕ/мл/количество островков, а ОПЖ новорожденных кроликов – $20,3019 \pm 1,6851$ мкМЕ/мл/количество островков (рис. 2). Сходные значения уровня инсулина сохранялись до 6 суток включительно. На 7–8-е сутки содержание инсулина снижалось в культурах ОПЖ обоих видов животных. В культуре ОПЖ новорожденных поросят наблюдалось $10,6420 \pm 1,7114$ мкМЕ/мл/количество островков инсулина, а в культуре ОПЖ новорожденных кроликов – $15,0775 \pm 3,0288$ мкМЕ/мл/количество островков, что составляло соответственно 80 и 74% от значений первого дня культивирования. Уменьшение уровня инсулина в среде культивирования связано с уменьшением в среде культивирования питательных веществ и с накоплением в среде продуктов метаболизма островков, так как на протяжении всего эксперимента замену среды не проводили. В целом из полученных данных следует, что ОПЖ новорожденных кроликов обладают большей инсулинпродуцирующей способностью.

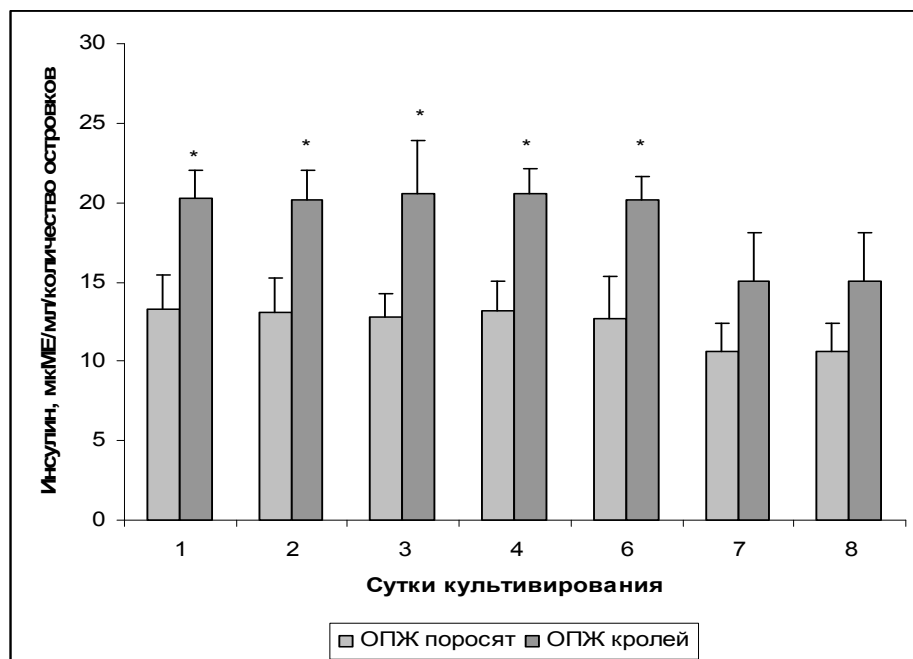


Рис. 2. Динамика изменения секреции инсулина в процессе культивирования островков поджелудочной железы новорожденных поросят и новорожденных кролей

*Примечание: * – отличия достоверны между двумя видами ОПЖ, $p < 0,05$.*

Из литературных данных известно, что глюкоза во время культивирования активирует секрецию инсулина β -клетками, это обуславливает целесообразность ее использования и при выращивании культуры островков поджелудочной железы новорожденных поросят и новорожденных кроликов. Доказано, что жизнеспособность β -клеток можно повышать при добавлении глюкозы определенной концентрации в питательную среду (Brandhorst et al., Lao Shi-Youn et al., 1999), что приводит к стимулированию секреции инсулина β -клетками. Важным является то, что необходимо использовать глюкозу в такой концентрации, чтобы она не вызывала функциональное перенапряжение клеток.

С другой стороны, при подборе условий получения и культивирования эндокринной ткани особенно важно сохранить не только ее базальную гормональную функцию, но и способность адекватно отвечать на специфические стимулирующие факторы. В связи с этим, в ходе дальнейших исследований необходимо было провести анализ секреторной активности ОПЖ в условиях активации секреции инсулина глюкозой.

Способность к стимулированной продукции инсулина ОПЖ двух видов животных была изучена на 8-е сутки культивирования. При инкубации в питательной среде, содержащей 1,67 мМ глюкозы, продукция инсулина ОПЖ новорожденных поросят составляла $9,9284 \pm 5,460$ мкМЕ/мл (рис. 3). При добавлении в питательную среду глюкозы в концентрации 10 мМ содержание инсулина возросло до $98,7792 \pm 17,5986$ мкМЕ/мл. Стимулированный глюкозой уровень инсулина в культуре ОПЖ новорожденных кроликов составил $119,0768 \pm 11,7407$ мкМЕ/мл при базальном $26,6049 \pm 3,062$ мкМЕ/мл.

Следовательно, при использовании стимулирующей концентрации глюкозы в среде инкубации наблюдается адекватный секреторный ответ ОПЖ обоих видов животных.

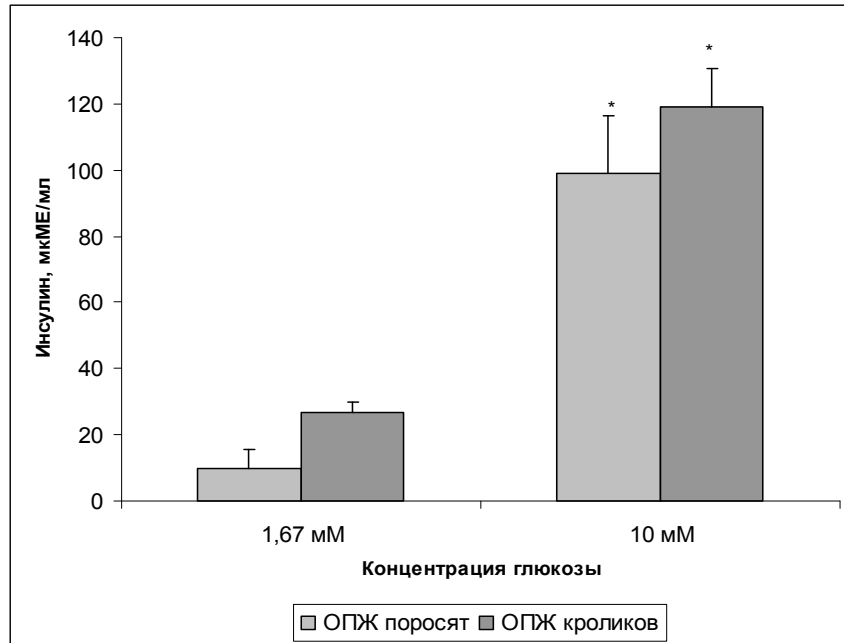


Рис. 3. Секреция инсулина ОПЖ новорожденных поросят и новорожденных кроликов в среде с различным содержанием глюкозы

Примечание: * – отличия достоверны по сравнению со значениями инсулина в среде с 1,67 мМ глюкозы, $p < 0,05$.

Таким образом, при сравнительном анализе инсулинпродуцирующей функции культур ОПЖ новорожденных поросят и кроликов установлено, что при использованном методе получения больший выход островков наблюдался из поджелудочной железы новорожденных поросят. Динамика изменения уровня инсулина в процессе культивирования, а также способность отвечать на изменение концентрации глюкозы являются сходными для обоих видов животных. Однако, абсолютные значения секреции гормона выше в культуре ОПЖ новорожденных кроликов. Культуры обоих видов животных могут быть использованы для трансплантации и адекватно заместить утраченную функцию собственной железы реципиента.

Список литературы

- Алиев М.А., Исмагилов Р.З., Рысбеков М.М. и др. Трансплантация культуры островковых клеток поджелудочной железы большим сахарным диабетом // Трансплантологія. – 2000. – Т.1, №1. – С. 147–149.
- Гринь В.К., Михайліченко В.Ю., Попандопуло А.Г., Разенкова І.А. Эндокринокоригувальний ефект трансплантації клітинної культури підшлункової залози при алоксановому цукровому діабеті // Трансплантологія. – 2003. – Т.4, №1. – С. 74–76.
- Зубкова Г.А., Турчин І.С., Давидова Т.І. та ін. Імуногенність органної культури підшлункової залози новонароджених поросят // Трансплантологія. – 2000. – Т.1, №1. – С. 239–242.
- Скалецкий Н.Н., Кирсанова Л.А., Скалецкая Г.Н. и др. Трансплантация культур островковых клеток поджелудочной железы у крыс-реципиентов с экспериментальным сахарным диабетом // Трансплантологія. – 2003. – Т.4, №1. – С. 108–109.
- Турчин І.С., Зубкова Г.А., Давидова Г.І. та ін. Проблеми ксенотрансплантації // Трансплантологія. – 2002. – Т.3, №2. – С. 137–145.

- Biarnés M., Montolio M., Nacher V. et al. β -Cell death and mass in syngeneically transplanted islets exposed to short- and long-term hyperglycemia // *Diabetes*. – 2002. – №51. – P. 66–72.
- Brandhorst D., Brandhorst H., Hering B.J. et al. Long-term survival, morphology and in vitro function of isolated pig islets under different culture conditions // *Transplantation*. – 1999. – №67. – P. 1533–1541.
- Bretzel R.G., Eckhard M., Brendel M.D. Pancreatic islet and stem cell transplantation: new strategies in cell therapy of diabetes mellitus // *Panminerva Med.* – 2004. – Vol.46. – P. 25–42.
- Groth C.G., Tibell A., Wennberg L. et al. Xenoislet transplantation: experimental and clinical aspects // *Mol. Med.* – 1999. – №77. – P. 153–154.
- Kang F., Singh J. Preparation, in vitro release, in vivo absorption and biocompatibility studies of insulin-loaded microspheres in rabbits // *AAPS Pharm. Sci. Tech.* – 2005. – Vol.6, №3. – P. 487–494.
- Korbitt G.S., Elliot J.F., Zilianc A.O. et al. Large-scale isolation, growth and function of neonatal islet cells // *Clin. Invest.* – 1996. – №97. – P.2119.
- Korsgren O., Sandler S., Landstrom A.S. et al. Large-scale production of fetal porcine pancreatic isletlike cell clusters // *Transplantation*. – 1988. – Vol.45, №3. – P. 509–514.
- Lao Shi-Youn, Li Luizhu, Wolf B.A. et al. Glucose regulation of glutaminolysis and its role in insulin secretion // *Diabetes*. – 1999. – Vol.48. – P. 1535–1542.
- Nicolls M.R., Coulombe M., Gill R.G. The basis of immunogenicity of endocrine allografts // *Crit. Rev. Immunol.* – 2001. – Vol.21. – P. 87–101.
- Prochorov A.V., Roudenok V.V., Goranov V.A. Histological study of macroencapsulation of pancreatic islet cells after transplantation into the bloodstream // *Transplantation Proceedings*. – 2005. – Vol.37. – P. 4446–4448.
- Sawada T., Matsumoto I., Nakano M. et al. Improved islet yield and function with ductal injection of university of Wisconsin solution before pancreas preservation // *Transplantation*. – 2003. – Vol.75, №12. – P. 1965–1969.
- Shapiro A.M., Ricordi C., Hering B. Edmonton's islet success has indeed been replicated elsewhere // *Lancet*. – 2003. – Vol.361. – P.2054.
- Triverdi N., Hollistor-Lock J., Lopez-Avalos M.D. et al. Increase in β -cell mass in transplanted porcine cell clusters is due to proliferation of β -cells and differentiation of duct cells // *Endocrinology*. – 2001. – Vol.142, №5. – P. 2115–2122.
- Weir G.C., Quicquel R.R., Kun-Ho Y. et al. Porcine neonatal pancreatic cell clusters: a potential source of tissue for islets transplantation // *Transplantation*. – 1997. – №2. – P.63.

**ПОРІВНЯЛЬНЕ ВИВЧЕННЯ ІНСУЛІНПРОДУКУЮЧОЇ ВЛАСТИВОСТІ ОСТРІВЦІВ
ПІДШЛУНКОВОЇ ЗАЛОЗИ НОВОНАРОДЖЕНИХ ПОРОСЯТ І НОВОНАРОДЖЕНИХ
КРОЛІВ IN VITRO**

Н.В.Скрипниченко, Г.А.Божок, Т.П.Бондаренко

Досліджували секрецію інсуліну в культурах острівців підшлункової залози (ОПЖ) новонароджених поросят і новонароджених кролів протягом 8-ми діб культивування. Показана висока властивість до базальної та стимульованої 10 мМ глюкози секреції інсуліну ОПЖ обох видів тварин.

Ключові слова: *острівці підшлункової залози, культивування, інсулін, глюкоза.*

**COMPARATIVE STUDY OF INSULIN-PRODUCING ABILITY OF NEONATAL PORCINE AND
NEONATAL RABBITS ISLETS IN VITRO**

N.V.Skripnichenko, G.A.Bozhok, T.P.Bondarenko

The insulin secretion by islets from neonatal porcine and neonatal rabbit pancreata during 8 days in culture was under study. There was shown the high ability to basal and stimulated by 10 mM glucose insulin release by islets of both animal species.

Key words: *islets, culture, insulin, glucose.*

**Представлено А.М.Компанієць
Рекомендовано до друку П.А.Каліманом**