

МЕТОДИ І МЕТОДИКИ

© Ю. І. Копич, Н. В. Колот*, Г. А. Божок, Є. І. Легач, В. І. Єгоров**

УДК 612.349.7:57.08

Ю. І. Копич, Н. В. Колот*, Г. А. Божок, Є. І. Легач, В. І. Єгоров**

ОТРИМАННЯ ОСТРІВЦІВ З ПІДШЛУНКОВОЇ ЗАЛОЗИ НЕОНАТАЛЬНИХ СВИНЕЙ

Інститут проблем кріобіології і кріомедицини НАН України (м. Харків)

*Харківський національний університет ім. В. Н. Каразіна (м. Харків)

**Міська Клінічна лікарня № 14 ім. В. Г. Короленко (м. Москва, Росія)

Дослідження виконано в рамках науково-дослідної теми «Структурно-функціональні властивості і проліферативний потенціал ендокринних тканин при культивуванні, кріоконсервуванні та трансплантації», шифр 2. 2. 6. 64, № державної реєстрації 0111U001196)

Вступ. В теперішній час спостерігається неухильне зростання захворювань на цукровий діабет (ЦД). Збільшення кількості випадків та тяжкість ускладнень віднесли ЦД до тріади найпоширеніших захворювань у світі. Стурбованість світової медичної спільноти щодо поширеності ЦД неодноразово висловлювалась у заявах Всесвітньої організації охорони здоров'я [10]. Важливість проблеми підкреслює той факт, що 14 листопада відзначається Всесвітній день боротьби з цукровим діабетом.

Не викликає сумніву той факт, що інсулінозамісна гормональна терапія (ІЗГТ) є «золотим стандартом» лікування хворого на діабет 1 типу. Однак, за останніми даними, ІЗГТ може лише частково попередити пізні діабетичні ускладнення та підвищує ризик фатальних гіпоглікемічних епізодів [2].

Іншим терапевтичним підходом, який набирає популярності у теперішній час, є трансплантація підшлункової залози, її тканини або ізольованих острівців. Встановлено, що після трансплантації гальмується розвиток кардіоваскулярних, урогенітальних, неврологічних та офтальмологічних ускладнень діабету або спостерігається покращення функції скомпроментованих діабетом органів [7, 8, 13].

В даний час розроблений і почав впроваджуватися в клінічну практику Едмонтонський протокол, згідно з яким алотрансплантація людських острівців, виділених з підшлункової залози двох чи більше донорів, приводить до інсулінонезалежності на тривалий час [20]. В системі охорони здоров'я Європейських країн та США вже розроблені основні критерії, за якими трансплантація показана пацієнтам з важкими неодноразовими гіпоглікемічними комами («severe hypoglycemia») та порушеним суб'єктивним відчуттям симптомів гіпоглікемії [9]. Вказується, що трансплантація може використовуватися в комплексі

з ІЗГТ, дозволяючи знизити кількість інсулінових ін'єкцій, що покращує «якість життя» реципієнта.

Однак одним з бар'єрів для широкого використання у медичній практиці метода трансплантації острівців є недостатня кількість донорського матеріалу.

Свиня є видом, який має геномні, анатомічні та фізіологічні параметри схожі до людських [16] та давно вважається найбільш вірогідним з тварин для вирішення проблеми забезпечення достатньої кількості донорських органів. Підставами для цього є те, що органи свині фізично такого ж розміру як і органи людини; цей вид має короткий період вагітності, виробляє багато потомства, може бути генетично модифікований та успішно вирощуваний в умовах зниженої патогенності.

Однією з основних технологій передтрансплантаційної підготовки тканини підшлункової залози (ПЗ) є виділення та культивування острівців Лангерганса. Виділення острівців з неонатальної ПЗ є заманливим, тому що кількість їх складає до 20%, тоді як у зрілому віці цей показник дорівнює 1-2%. У зв'язку з тим, що ПЗ має в собі екзокринний компонент, одним з необхідних етапів підготовки матеріалу до трансплантації є виділення острівців. Але такий підхід є типовим при використанні залоз людини або дорослих експериментальних тварин, в ПЗ яких зрілі острівці добре сформовані і відособлені. В фетальній ПЗ острівцевий компартмент є недостатньо оформленим; частина острівцевих клітин локалізована поблизу стінки вивідних протоків або зовсім не відокремлена від неї [28]. У науковій літературі до таких об'єктів часто застосовують назву острівцево-подібні клітинні кластери. Такі кластери спостерігаються і на більш пізніх строках онтогенезу, а також в неонатальній підшлунковій залозі [14].

В науковій літературі не існує однозначної відповіді відносно можливості отримання повноцінних острівців з ПЗ неонатальних свиней. Частіше зустрічаються роботи, в яких описується отримання острівцево-подібних клітинних кластерів [3, 11, 14, 29].

Мета дослідження – вивчення можливості отримання острівців з підшлункової залози неонатальних

свиней та тестування їх гормональної активності в умовах культивування.

Об'єкт і методи дослідження. Острівці були отримані з підшлункової залози неонатальних свиней (P1-3) першого покоління порід велика біла і українська м'ясна (n = 20), які були привезені з племінного господарства «Агрокомбінат Слобожанський» (Харківська обл.). Всі маніпуляції з тваринами проводились відповідно до положень «Європейської конвенції про захист хребетних тварин, які використовуються для експериментальних та інших наукових цілей» (Страсбург, 1986) і «Загальних етичних принципів експериментів на тваринах», схвалених І Національним конгресом з біоетики (Київ, 2001) та затверджених Комітетом з біоетики ІПКіК НАН України.

Хвостову частину ПЗ після виділення поміщали в охолоджене середовище DMEM/Ham's F12 (PAA, Австрія), що містило 0,25% бичачого сироваткового альбуміну (BCA, Sigma, США), 10 мМ Hepes (Sigma), антибіотики (75 мкг/мл канаміцину і 100 Од/мл пеніциліну) та антимікотик (5 мкг/мл амфотерицину В). Подрібноували тканину на фрагменти розміром 3-4 мм³, відмивали 3-4 рази від крові середовищем. Фрагменти інкубували в середовищі, яке містило 2,5 мкг/мл колагенази типу ІА (Sigma), протягом 15 хвилин при 37°C при неперервному струшуванні. Переносили надосад у середовище з 0,25% BCA і продавлювали через нейлонову сітку (Cell Dissociation Sieve TGK, Sigma) з діаметром пор > 200 мкм.

Отриману суспензію нашаровували на ступінчастий градієнт щільності фіколу (Sigma). Використовували шари фіколу зі щільністю 1,040, 1,080, 1,089, 1,094, 1,100 г/см³. Суспензію піддавали центрифугуванню протягом 15 хвилин при 225g. В стерильних умовах у різні пробірки відбирали фракції, що утворилися при розподілі клітин, після чого двічі відмивали біоматеріал від фіколу середовищем з антибіотиками.

Культивування острівців проводили за методом Korbitt G. S. з співавт. [11]. Отриману після розподілу у градієнті щільності фіколу суспензію приміщували у живильне середовище, приготоване на основі середовища DMEM/Ham's F12 з додаванням 5% фетальної телячої сироватки (ФТС), 0,5% BCA, 10 мМ глюкози, 2 мМ глутаміну та антибіотиків. Культивування проводили при 37°C в атмосфері 5% CO₂.

Ідентифікацію β-клітин проводили за методом Soria B. з співавт. [24], використовуючи специфічний барвник дитизон. Дитизон у концентрації 100 мкг/мл готували на ДМСО. До 1 мл суспензії додавали 10 мкл розчину дитизона та інкубували протягом 15 хвилин при 37°C, після чого відмивали від барвника один раз середовищем. Мікрофотозйомку здійснювали на мікроскопі Olympus X171 (Японія). Морфометричний аналіз виконували за допомогою програми для обробки зображення AxioVision Rel. 4. 7.

Рівень інсуліну визначали імуноферментним методом за допомогою стандартного набору INSULIN ELISA KIT (DRG Diagnostic, США). Щодня відбирали проби живильного середовища для визначення

базального рівня інсуліну. Для визначення стимульованого рівню гормону відбирали повністю середовище культивування і додавали до культури живильне середовище, що містило 1,67 мМ глюкози. Проводили інкубацію протягом 1 години при 37°C, потім збирали отримане середовище, а до культури додавали середовище з 10 мМ глюкози, інкубували протягом 1 год при температурі 37°C, збирали інкубаційне середовище для аналізу.

Статистичну обробку результатів проводили за допомогою програм «Excel» та «Statistica 10», використовували t-критерій Стьюдента для даних з нормальним розподілом, для непараметричних даних застосовувався однофакторний дисперсійний аналіз (ANOVA).

Результати досліджень та їх обговорення.

При розділенні отриманої після ферментації тканини ПЗ суспензії у градієнті щільності фіколу утворювалися три клітинні фракції в шарах фіколу зі щільностями 1,089; 1,094 і 1,100 г/см³ (рис. 1). Проведення мікроскопічного аналізу біологічного матеріалу, отриманого з різних фракцій фіколу, показало, що клітинні агрегати, схожі на острівці Лангерганса знаходилися лише в шарі фіколу зі щільністю 1,089 г/см³ (рис. 2, А). В шарах фіколу зі щільністю 1,094 або 1,100 г/см³ перебували поодинокі клітини (рис. 2, Б). Клітинний дебрис знаходився у шарі фіколу зі щільністю 1,040 г/см³.

Дитизон є барвником, що селективно забарвлює інсулін-вмісний апарат живих β-клітин, утворюючи в них дитизонат цинку, який має пурпурно-червону зернистість [22]. Забарвлення більш виражене в гранулярному апараті клітин і в меншій мірі в її цитоплазмі. Нами було використано цей специфічний барвник для ідентифікації острівців після розділення в градієнті щільності фіколу.

Забарвлення дитизоном біоматеріалу, отриманому з фракцій фіколу різної щільності, показало, що

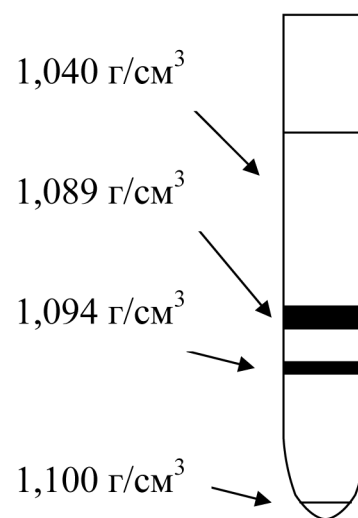


Рис. 1. Розділення суспензії клітин, отриманих з ПЗ неонатальних свиней, в ступінчастому градієнті щільності фіколу.

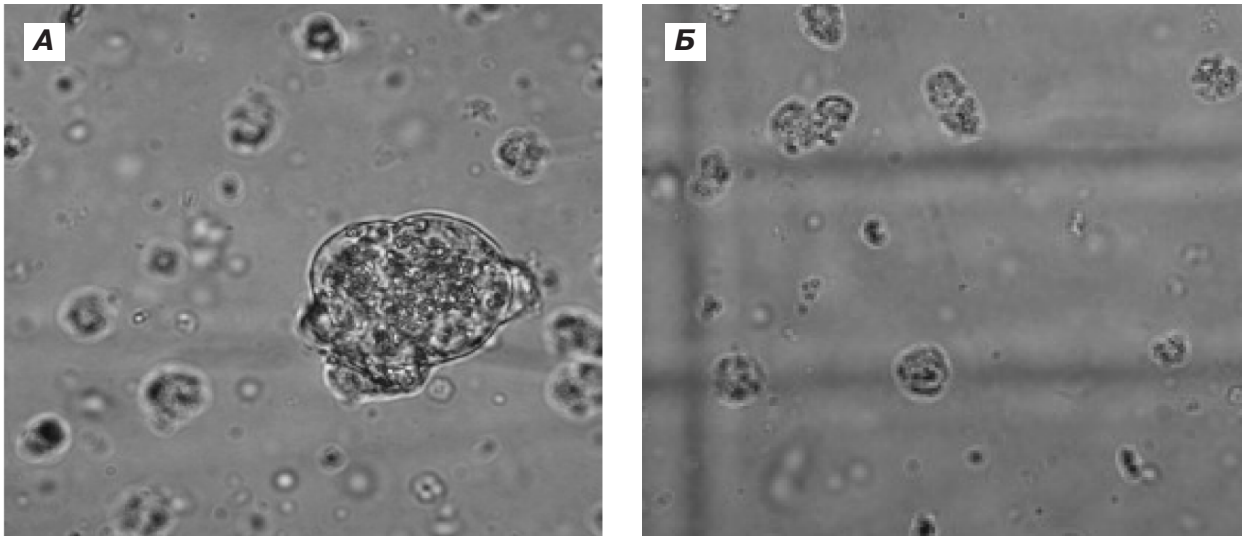


Рис. 2. Острівцево-подібні клітинні агрегати (А) та поодинокі клітини (Б), отримані в шарах фіколу зі щільністю 1,089 г/см³ та 1,094 г/см³, відповідно. Ок. 10, об. 40.

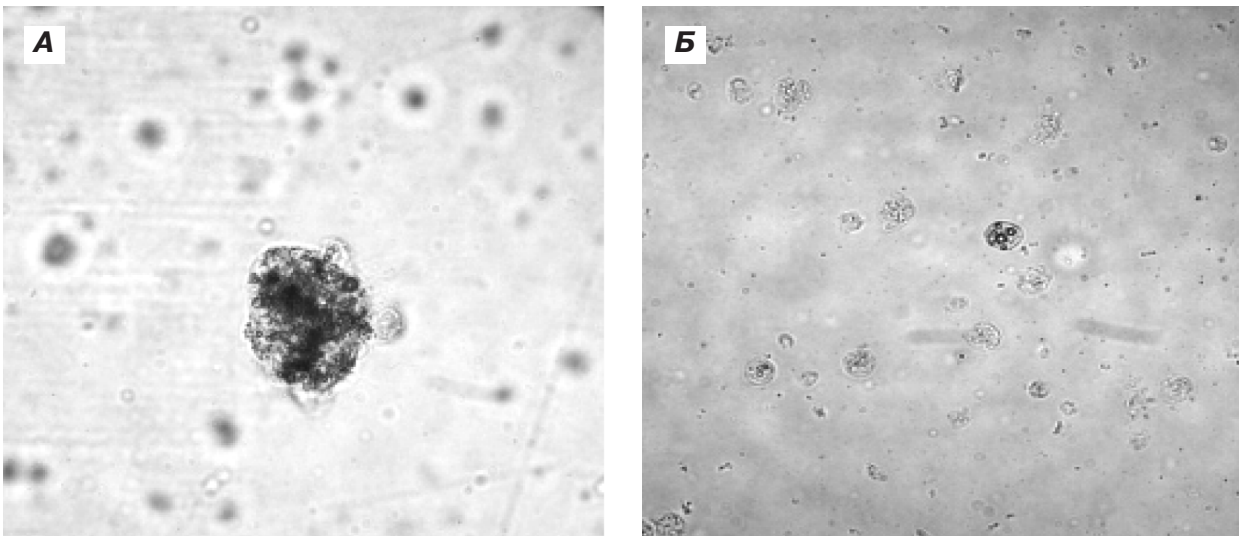


Рис. 3. Позитивна реакція на дитизон в біоматеріалі ПЗ, отриманому в шарах фіколу зі щільністю 1,089 г/см³ (А) та 1,094 г/см³ (Б). Ок. 10, об. 40.

дитизон-позитивні клітинні кластери перебували у фракції зі щільністю 1,089 г/см³ (рис. 3, А). У фракції фіколу зі щільністю 1,094 було відмічено присутність поодиноких клітин. Деякі з них позитивно забарвлювалися дитизоном (рис. 3, Б). В шарі фіколу зі щільністю 1,100 г/см³ були виявлені клітини, які не забарвлювалися дитизоном.

Суспензію, отриману з шарів фіколу зі щільністю 1,089 г/см³ та 1,094 г/см³, приміщували в умови культивування на 4 доби. Острівцево-подібні клітинні агрегати перебували у флотуючому стані, тоді як поодинокі клітини прикріплювались до дна культурального посуду. Позитивна реакція на дитизон зберігалася у культивованому матеріалі на протязі всього періоду культивування.

Для підтвердження того, що клітинні агрегати, отримані нами з ПЗ неонатальних свиней, є

острівцями, необхідно було перевірити їх базальну та стимульовану секрецію у відповідь на присутність глюкози у культуральному середовищі. Рівень інсуліну на першу добу культивування складав $95,37 \pm 7,19$ мкМО/мл. У наступні три доби рівень гормону дещо знижувався та в середньому дорівнював $81,47 \pm 12,22$ мкМО/мл. Принцип стимуляції секреції інсуліну полягав у змінній концентрації глюкози у живильному середовищі з низької (1,67 мМ) на високу (10 мМ), при цьому послідовно відбирали проби середовища після годинної інкубації культур з кожною концентрацією. При стимуляції продукція інсуліну вірогідно ($p < 0,05$) змінювалася з $9,93 \pm 5,46$ до $98,78 \pm 17,59$ мкМО/мл, що становило практично 10-кратне збільшення секреції.

Таким чином, спираючись на те, що клітинні агрегати безпосередньо після виділення мають

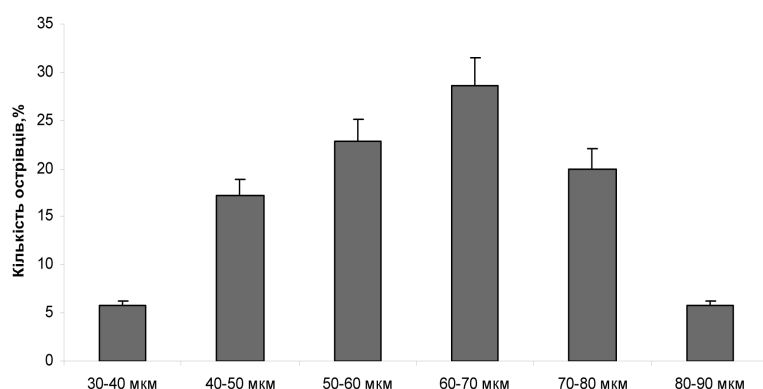


Рис. 4. Розмір острівців, отриманих з фракції фіколу зі щільністю 1,089 г/см³.

чіткі границі, округлу форму, добре забарвлюються дитизоном та відповідають на стимуляцію глюкозою, можна заключити, що отримані агрегати є острівцями.

В результаті проведення кількісного морфометричного аналізу було встановлено, що розмір отриманих острівців розподілявся в межах від 30 до 90 мкм (рис. 4), причому найбільший процент у фракції складала острівці розміром 60-70 мкм. Кількість дитизон-позитивних клітин у складі свіжовиділених острівців складає 55,3 ± 13,9%. З однієї неонатальної ПЗ в описаних нами умовах можливо було отримати в середньому 96,3 ± 23,1 острівців.

Розробка протоколів отримання острівців змінила можливості корекції інсулінової недостатності не тільки у хворих на діабет 1 типу, але й у пацієнтів, які перенесли тотальну панкреатодуоденектомію (ТП) з приводу хронічного панкреатиту з вираженим больовим синдромом. В даний час метод аутотрансплантації острівців після ТП досить широко представлений в університетських клініках Міннеаполіса (США), Цинцинаті (США) і Лестера (Великобританія): 200, 130 і 50 спостережень, відповідно [1, 5, 15, 25]. Однак проблему компенсації ендокринної недостатності після ТП та аутотрансплантації острівців не можна вважати остаточно вирішеною, оскільки тільки 40% хворих мають потребу у екзогенному інсуліні на протязі першого року, причому цей показник має тенденцію до зменшення на віддаленому терміні спостереження. Такі результати аутотрансплантації пояснюються недостатньою β-клітинною масою внаслідок істотного ушкодження паренхіми залози на момент операції. У зв'язку з цим, актуальним є питання щодо способів ізоляції острівців, їх культивування для нарощування необхідної кількості β-клітин, а також пошуку альтернативних джерел донорського трансплантаційного матеріалу.

В науковій літературі існує декілька робіт, які присвячені методу отримання острівців з ПЗ неонатальних або статевозрілих свиней [3, 17, 18, 23]. Куо С. Ү. з співавт. описали можливість отримання острівців з ПЗ неонатальних свиней методом, що

включав ферментативну обробку тканини колагеназою та механічну дисоціацію [12]. Результативність такого методу, яка оцінювалась за кількістю отриманого матеріалу, дорівнювала в середньому 116 ± 45 острівців з однієї залози. Цікаво, що в роботі Korbitt з співавт., де автори застосували практично такий самий метод, однак з послідовним культивуванням на протязі 9 діб, кількість отриманих острівцевих агрегатів оцінюється в ~50 000 [11]. Кількість дитизон-позитивних клітин у отриманих острівцях була в першому випадку близько 50%, тоді як у другому – 25%. Розбіжність даних в кількості острівців, отриманих в цих двох статтях, може пояснюватися тим, що в останньому випадку разом з

β-клітинами в агрегати попадають інші (ациноцити, клітини протоків). При культивуванні вони можуть зберігатися, проліферувати та округлятися, формуючи острівцево-подібні клітинні кластери. Але залишається питання, чи є ці кластери оригінальними острівцями, в яких присутня належна паракринна регуляція.

Результати щодо кількості острівців та дитизон-позитивних клітин у їхньому складі, отримані в нашій роботі, є близькими до результатів Куо С. Ү. з співавт. [12]. На основі комплексу даних, які включали морфологічні, гістохімічні (забарвлення дитизоном) та біохімічні (рівень базальної та стимульованої секреції інсуліну) показники, нами було встановлено можливість отримання острівців з ПЗ неонатальних свиней. Відсоток позитивно-забарвлених клітин в складі острівців, отриманих в нашій роботі, був вище на 30%, ніж в роботі Korbitt з співавт. [11].

Досвід спостереження за пацієнтами з цукровим діабетом після аутотрансплантації свідчить, що основним фактором досягнення інсулінової незалежності є кількість введених острівців [4, 6, 27]. Кількість острівців у підшлунковій залозі людини, становить близько мільйона. Вважається, що принаймні 60% від загальної маси острівців необхідно для підтримки нормального вуглеводного гомеостазу організму. У клініці, Wahoff D. з співавт. спостерігали досягнення довгострокової інсулінової незалежності в разі трансплантації більш ніж 300 000 острівців [27]. В роботах Shapiro AMJ з співавт. цей показник оцінюється як 9000 острівців/кг маси тіла [19, 21]. Технологія криоконсервування та довготривалого зберігання у банку є єдиним способом накопичення необхідної кількості трансплантаційного матеріалу. Однак було встановлено, що великі за розміром острівці є більш чутливими до факторів криоконсервування, ніж середні та маленькі [26].

Розділення первинної суспензії клітин у градієнті щільності фіколу, яке було використано в нашій роботі, дозволяє отримати острівці, середній розмір яких коливається в досить вузьких межах (60-70 мкм). В роботі Куо С. Ү. з співавт. інтервал варіації розміру

острівців був значно ширшим (<50-150 мкм). Більша одноманітність розміру острівців, отриманих при використаному нами способі, є позитивним результатом для застосування кріоконсервування біоматеріалу в подальшому. Крім того, використаний нами спосіб не включає культивування як необхідний етап процесу отримання острівців, що значно знижує як ризик контамінації, так і матеріало- та трудомісткість методу.

Висновки.

1. В результаті застосування методу ферментативної дезагрегації тканини та послідовного розділення в градієнті щільності фіколу можливо отримати острівці з підшлункової залози неонатальних свиней у кількості $96,3 \pm 23,1$ /залозу.

2. Встановлено, що отримані за таким способом острівці містять близько 55% дитизон-позитивних клітин, які здатні до глюкозо-стимульованої секреції інсуліну

3. Використаний в роботі спосіб отримання острівців з підшлункової залози неонатальних сви-

ней має переваги перед попередніми за рахунок збільшення кількості інсулін-продукуючих клітин у складі острівців та одноманітності розміру острівців, а також зменшення матеріало- та трудомісткості методу.

Перспективи подальших досліджень. Підшлункова залоза неонатальних свиней є корисним джерелом для отримання повноцінних острівців, вивчення їх функціонування *in vitro* та при трансплантації у моделях експериментального цукрового діабету 1 типу. Описаний спосіб може бути апробований в майбутньому на генетично-модифікованих свинях, які мають знижену експресію головного ксеноантигену Gal- α -1,3-Gal, за рахунок чого їх органи не викликають гіпергострого відторгнення та можуть бути застосовані для трансплантації. Необхідна для трансплантації маса острівців може бути накопичена при застосуванні технологій культивування, кріоконсервування та створення низькотемпературних банків.

Література

1. Ahmad S. Factors associated with insulin and narcotic dependence after islet autotransplantation in patients with severe chronic pancreatitis / S. Ahmad, A. Lowy, C. Wray [et al.] // *J. Am. Coll. Surg.* – 2005. – Vol. 201, № 5. – P. 680-687.
2. Bloomgarden Z. T. Diabetes complications / Z. T. Bloomgarden // *Diabetes Care.* – 2004. – Vol. 27. – P. 1506-1514.
3. Britt L. D. Neonatal pig pseudo-islets: A product of selective aggregation / L. D. Britt, P. C. Stojeba, C. R. Scharp [et al.] // *Diabetes.* – 1981. – Vol. 30. – P. 580-583.
4. Clayton H. A. Pancreatectomy with islet autotransplantation for the treatment of severe chronic pancreatitis: the first 40 patients at the leicester general hospital / H. A. Clayton, J. E. Davies, C. A. Pollard [et al.] // *Transplantation.* – 2003. – Vol. 76, № 1. – P. 92-98.
5. Garcea G. Total pancreatectomy with and without islet cell transplantation for chronic pancreatitis: a series of 85 consecutive patients / G. Garcea, J. Weaver, J. Phillips [et al.] // *Pancreas.* – 2009. – Vol. 38, № 1. – P. 1 – 7.
6. Johnson P. R. Pancreatic islet autotransplantation combined with total pancreatectomy for the treatment of chronic pancreatitis – the Leicester experience / P. R. Johnson, S. A. White, G. S. Robertson [et al.] // *J. Mol. Med.* – 1999. – Vol. 77, № 1. – P. 130-132.
7. Fiorina P. Islet transplantation is associated with an improvement of cardiovascular function in type 1 diabetic kidney transplant patients / P. Fiorina, C. Gremizzi, P. Maffi [et al.] // *Diabetes Care.* – 2005. – Vol. 28. – P. 1358-1365.
8. Fiorina P. Natural history of kidney graft survival, hypertrophy, and vascular function in end-stage renal disease type 1 diabetic kidney-transplanted patients: beneficial impact of pancreas and successful islet cotransplantation / P. Fiorina, M. Venturini, F. Folli [et al.] // *Diabetes Care.* – 2005. – Vol. 28. – P. 1303-1310.
9. <http://www.nice.org.uk/nicemedia/live/11963/40436/40436.pdf>.
10. <http://www.who.int/diabetes/ru/index.html>.
11. Korbutt G. S. Large-scale isolation, growth and function of neonatal islet cells / G. S. Korbutt, J. F. Elliot, A. O. Zilianc [et al.] // *Clin. Invest.* – 1996. – Vol. 97, № 9. – P. 2119-2129.
12. Kuo C. Y. Isolation of islets from neonatal pig pancreatic tissue / C. Y. Kuo, G. A. Burghen, A. Myracle [et al.] // *J. Tissue Culture Meth.* – 1994. – Vol. 16, № 1. – P. 73-79.
13. Lee T. C. The effect of pancreatic islet transplantation on progression of diabetic retinopathy and neuropathy / T. C. Lee, N. R. Barshes, C. A. O'Mahony [et al.] // *Transplant Proc.* – 2005. – Vol. 37. – P. 2263-2265.
14. Nielsen T. B. Functional and immunohistochemical evaluation of porcine neonatal islet-like cell clusters / T. B. Nielsen, K. B. Yderstraede, H. D. Schrøder [et al.] // *Cell Transplant.* – 2003. – Vol. 12, № 1. – P. 13-25.
15. Ong S. L. Total pancreatectomy with islet autotransplantation: an overview / S. L. Ong, G. Gravante, C. A. Pollard [et al.] // *HPB (Oxford).* – 2009. – Vol. 11, № 8. – P. 613 – 621.
16. Rothschild M. F. The genetics of the pig / M. F. Rothschild, A. Ruvinsky // *CAB International.* – 2011. – P. 426-444.
17. Ricordi C. A method for the mass isolation of islets from the adult pig pancreas / C. Ricordi, E. H. Finke, P. E. Lacy // *Diabetes.* – 1986. – Vol. 35. – P. 649-653.
18. Ricordi C. Isolation of the elusive pig islet / C. Ricordi, C. Socci, A. M. Davalli [et al.] // *Surgery.* – 1990. – Vol. 107. – P. 688-694.
19. Shapiro A. M. J. Could fewer islet cells be transplanted in type 1 diabetes? Insulin independence should be dominant force in islet transplantation / A. M. J. Shapiro, E. A. Ryan, G. L. Warnock [et al.] – *B. M. J.* – 2001. – Vol. 322. – P. 861.
20. Shapiro A. M. International trial of the Edmonton protocol for islet transplantation / A. M. Shapiro, C. Ricordi, B. J. Hering [et al.] // *N. Engl. J. Med.* – 2006. – Vol. 355, № 13. – P. 1318-1330.
21. Shapiro A. M. J. Islet transplantation in seven patients with type 1 diabetes mellitus using a glucocorticoid-free immunosuppressive regimen / A. M. J. Shapiro, J. R. T. Lakey, E. A. Ryan [et al.] // *N. Engl. J. Med.* – 2000. – Vol. 343. – P. 230 – 238.

22. Shiroy A. Identification of insulin-producing cells derived from embryonic stem cells by zinc-chelating dithizone / A. Shiroy, M. Yashikawa, M. Yohota [et al.] // *Stem Cells*. – 2002. – Vol. 20, № 4. – P. 284-292.
23. Simeonovic C. J. Effect of GK15 monoclonal antibody dosage on survival of pig proislet xenografts in CD4 T-cell-depleted mice / C. J. Simeonovic, R. Ceredig, J. D. Wilson // *Transplantation*. – 1990. – Vol. 49. – P. 849-856.
24. Soria B. In vitro differentiation of pancreatic beta-cells / B. Soria // *Differentiation*. – 2001. – Vol. 68. – P. 205-219.
25. Sutherland D. E. Islet autotransplant outcomes after total pancreatectomy: a contrast to islet allograft outcomes / D. E. Sutherland, A. C. Gruessner, A. M. Carlson [et al.] // *Transplantation*. – 2008. – Vol. 86, № 12. – P. 1799-1802.
26. von Mach M. A. Size of pancreatic islets of Langerhans: a key parameter for viability after cryopreservation / M. A. von Mach, J. Schlosser, M. Weiland [et al.] // *Acta Diabetol.* – 2003. – Vol. 40, № 3. – P. 123-129.
27. Wahoff D. C. Autologous islet transplantation to prevent diabetes after pancreatic resection / D. C. Wahoff, B. E. Papalois, J. S. Najarian [et al.] // *Ann Surg.* – 1995. – Vol. 222, № 4. – P. 562-575.
28. Watanabe T. Changing distribution of islets in the developing human pancreas: a computer-assisted three-dimensional reconstruction study / T. Watanabe, H. Yaegashi, M. Koizumi // *Pancreas*. – 1999. – Vol. 18, № 4. – P. 349 – 354.
29. Yoon K. H. Differentiation and expansion of beta cell mass in porcine neonatal pancreatic cell clusters transplanted into nude mice / K. H. Yoon, R. R. Quickel, K. Tatkiewicz [et al.] // *Cell Transplant.* – 1999. – Vol. 8, № 6. – P. 673-689.

УДК 612. 349. 7:57. 08

ОТРИМАННЯ ОСТРІВЦІВ З ПІДШЛУНКОВОЇ ЗАЛОЗИ НЕОНАТАЛЬНИХ СВИНЕЙ

Копич Ю. І., Колот Н. В., Божок Г. А., Легач Є. І., Єгоров В. І.

Резюме. В роботі вивчено можливість отримання острівців з підшлункової залози неонатальних свиней. В результаті застосування методу ферментативної дезагрегації тканини та розділення в градієнті щільності фіколу можливо отримати в середньому $96,3 \pm 23,1$ острівців з однієї неонатальної підшлункової залози. Встановлено, що острівці, отримані за таким способом, містять близько 55 % дитизон-позитивних клітин, які здібні до глюкозо-стимульованої секреції інсуліну. Середній розмір острівців складав 60-70 мкм. Розроблений спосіб отримання острівців з підшлункової залози неонатальних свиней має переваги перед існуючими за рахунок збільшення кількості інсулін-продукуючих клітин у складі острівців та одноманітності розміру острівців, а також зменшення матеріало- та трудомісткості.

Ключові слова: підшлункова залоза, острівці, інсулін, дитизон, неонатальні свині.

УДК 612. 349. 7:57. 08

ПОЛУЧЕНИЕ ОСТРОВКОВ ИЗ ПОДЖЕЛУДОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ НЕОНАТАЛЬНЫХ СВИНЕЙ

Копич Ю. И., Колот Н. В., Божок Г. А., Легач Е. И., Егоров В. И.

Резюме. В работе изучена возможность получения островков из поджелудочной железы неонатальных свиней. В результате применения метода ферментативной дезагрегации ткани и разделения в градиенте плотности фикола можно получить в среднем $96,3 \pm 23,1$ островков из одной неонатальной поджелудочной железы. Установлено, что островки, полученные таким способом, содержат около 55 % дитизон-позитивных клеток, которые способны к глюкозо-стимулированной секреции инсулина. Средний размер островков составлял 60-70 мкм. Разработанный способ получения островков из поджелудочной железы неонатальных свиней имеет преимущества перед существующими за счет увеличения количества инсулин-продуцирующих клеток в составе островков и унификации размера островков, а также уменьшения материало- и трудоемкости метода.

Ключевые слова: поджелудочная железа, островки, инсулин, дитизон, неонатальные свиньи.

UDC 612. 349. 7:57. 08

Isolation of Islets from Neonatal Pig Pancreas

Kopich Y. I., Kolot N. V., Bozhok G. A., Legach E. I., Egorov V. I.

Abstract. Diabetes mellitus type I is one of the most widespread diseases, which characterized by insulin insufficiency. Another insulin-requiring group is the patients after total pancreatectomy in severe cases of chronic pancreatitis pain relief. No doubt that the insulin hormone replacement therapy is the “gold standard” of current treatment of the insulin-dependent patients. However, it can only partially prevent the late diabetic complications and increases the risk of fatal episodes of hypoglycemia. Another popular approach of treatment is the islet auto- and allotransplantation. Islet transplantation can prevent insulin insufficiency as well as inhibits the development of diabetic cardiovascular, urogenital, neurological and ophthalmological complications improving function of damaged organs and systems of the body. However, shortage of human donors is the main obstacle of islet transplantation. Pig has genomic, anatomical and physiological parameters similar to human and has been considered as the most likely species of animals to solve the problem of organ shortage.

Neonatal pancreas contain several times greater islets, so the use of this biomaterial for islet isolation has more benefit. In the scientific literature, there is no clear answer concerning the possibility of obtaining of complete islets from neonatal pig pancreas. More often the receiving of islet-like cell clusters is described.

Objective. To investigate the possibility of islet isolation from neonatal pig pancreas and test their hormonal activity under culture conditions.

МЕТОДИ І МЕТОДИКИ

Methods. Pancreases were dissected onto fragments, digested in 2,5 mg/ml collagenase type IA solution and purified by Ficoll density gradient separation. Insulin-producing cells were assessed by dithizone staining. Obtained islets were tested by ELISA to measure glucose-induced insulin release in culture.

Results. Dithizone-positive cell clusters were found in Ficoll fractions with a density of 1.089 g/cm³. The presence of single cells was observed in Ficoll fraction with a density of 1.094 g/cm³. Some cells were positively stained by dithizone. In Ficoll layer with a density of 1.100 g/cm³ dithizone-negative cells were identified. Cellular debris was in Ficoll layer with density of 1,040 g/cm³. As a result of applying method of enzymatic tissue disaggregation and separation in a Ficoll density gradient about 96,3±23,1 islets can be obtained from pig neonatal pancreas. Mean islet size ranged from 60 to 70 mm.

Developed method for islet isolation from the pancreas of neonatal pigs has advantages over the existing by increasing the number of insulin-producing islet cells and unification of islet size, as well as reducing the complexity of the method. Uniformity of size of islets obtained by the method used by us is a positive outcome for technologies of cryopreservation and low-temperature storage of biological material. In addition, the method does not include cultivation as a necessary stage of the islet isolation, which significantly reduces the risk of bacterial contamination.

Conclusion. Based on the obtaining data, which included morphological, histochemical and biochemical indices, we have established the possibility of islet isolation from neonatal pig pancreas. It was found that islets contain approximately 55% dithizone-positive cells which are capable for glucose-induced insulin release.

Key words: pancreas, islets, insulin, dithizone, neonatal pigs.

Рецензент – проф. Бабаджан В. Д.

Стаття надійшла 17. 12. 2013 р.