

**Показатели крови при ксенотрансплантации островков поджелудочной железы кроликам с аллоксан-индуцированным диабетом**

UDC 612.11:615.361.37:616.379-008.64-092.4

N.V. KOLOT<sup>1</sup>, G.A. BOZHOK<sup>2</sup>, E.I. LEGACH<sup>2</sup>, T.P. BONDARENKO<sup>2\*</sup>**Blood Indices During Pancreas Islet Xenotransplantation to Rabbits with Alloxan-Induced Diabetes**

В настоящее время альтернативным способом инсулинотерапии при сахарном диабете (СД) является ксенотрансплантация островков поджелудочной железы (ОПЖ). Однако основной проблемой ксенотрансплантации остается развитие иммунологической реакции в организме реципиента, которая приводит к быстрой потере ксенографта [2]. Для защиты трансплантата от иммунной агрессии возможно использование при трансплантации так называемых иммунопривилегированных органов. При изучении результатов трансплантации ОПЖ в различные “сайты” организма были получены противоречивые данные относительно длительности выживания трансплантата ОПЖ и наличия антидиабетического эффекта [3, 5]. В наших исследованиях ранее был получен позитивный эффект долгосрочной коррекции гипергликемии при трансплантации ОПЖ в селезенку [1]. Не изученным остался вопрос о том, приводит ли трансплантация ОПЖ к повреждению функции селезенки и развитию воспалительных процессов в организме реципиента.

Цель работы – оценить влияние ксенотрансплантации ОПЖ в селезенку на показатель гликемии и другие показатели крови (количество эритроцитов, лейкоцитов, тромбоцитов, ретикулоцитов, наличие сидероцитов, времени свертывания крови и скорости оседания эритроцитов), на основе которых можно определить наличие патологии селезенки в организме кроликов с аллоксан-индуцированным диабетом.

**Материалы и методы**

Сахарный диабет вызывали у кроликов однократной инъекцией в ушную вену раствора аллоксана тетрагидрата (100 мг/кг массы тела). Остров-

Nowadays the xenotransplantation of pancreas islets (PIs) is an alternative way of insulin therapy at Diabetes mellitus (DM). However the development of immunological response in recipient's organism, resulting in a rapid loss of xenograft remains the principal problem for xenotransplantation [2]. The use of so-called immune-privileged organs during transplantation is possible to protect a transplant against immune aggression. There were obtained the contradictory data in respect of survival duration of PIs transplant and the presence of anti-diabetic effect, when studying the results of PIs transplantation into various organism sites [3, 5]. Previously in our research there was obtained a positive effect of a long-term hyperglycemia correction when transplanted PIs into spleen [1]. The question whether PIs transplantation results in a damage of spleen function and inflammatory process development in a recipient's organism is still open.

The research was aimed to evaluate the effect of PIs xenotransplantation into spleen on glycemia index and other blood indices (number of erythrocytes, leukocytes, platelets, reticulocytes, siderocyte presence, blood clotting time and blood sedimentation rate), basing on which it is possible to determine a spleen pathology presence in organism of the rabbits with alloxan-induced diabetes.

**Materials and methods**

Diabetes mellitus was induced in rabbits by the alloxan tetrahydrate solution (100 mg/kg of body weight) single injection into auricular vein. Pancreas islets were obtained from newborn piglets by the method described in the paper [4]. To the 21<sup>st</sup> day when glucose level in animals was 27.53±2.54 mmol/l, the PIs were transplanted by injection into spleen of 2 ml

<sup>1</sup>Харьковский национальный университет им. В.Н. Каразина, г. Харьков

<sup>2</sup>Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, г. Харьков

\* Автор, которому необходимо направлять корреспонденцию: ул. Переяславская, 23, г. Харьков, Украина 61015; тел.: +38 (057) 373-30-07, факс: +38 (057) 373-30-84, электронная почта: cryo@online.kharkov.ua

<sup>1</sup>V.N. Karazin Kharkov National University, Kharkov, Ukraine

<sup>2</sup>Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine of the National Academy of Sciences of Ukraine, Kharkov, Ukraine

\* To whom correspondence should be addressed: 23, Pereyaslavskaya str., Kharkov, Ukraine 61015; tel.: +380 57 373 3007, fax: +380 57 373 3084, e-mail: cryo@online.kharkov.ua

ки поджелудочной железы получали от новорожденных поросят по методу [4]. На 21-е сутки, когда уровень глюкозы у животных в среднем составлял  $27,53 \pm 2,54$  ммоль/л, проводили трансплантацию ОПЖ путем инъекции в селезенку 2 мл суспензии, содержащей  $8-9 \times 10^6$  островков/кг и антибиотики, под кетамин-ксилазиновым наркозом. Все экспериментальные манипуляции с животными выполняли в соответствии с положениями «Европейской Конвенции о защите позвоночных животных, используемых для экспериментальных и других научных целей» (Страсбург, 1985) и Национальными нормами по биоэтике (I Национальный конгресс по биоэтике, Киев, 2001). Животных разделили на 3 группы: 1 – интактные, 2 – с аллоксан-индуцированным диабетом и тотальной спленэктомией, 3 – с ксенотрансплантатом ОПЖ. Период наблюдения за животными составлял 49 суток. Еженедельно определяли уровень глюкозы в крови кроликов с помощью индикаторных пластинок «Гемоглан» и глюкометра Глюкофот-II («Норма», Украина) и контролировали показатели крови. Скорость оседания эритроцитов (СОЭ) определяли с помощью капилляра и штатива Панченкова; количество эритроцитов, тромбоцитов, лейкоцитов – в счетной камере Горяева при использовании световой микроскопии; количество ретикулоцитов – в тонких мазках крови, окрашенных азуром II, сидероцитов – с помощью реакции на берлинскую лазурь; время свертывания крови – по методу Моравица. Для статистической обработки данных использовали t-критерий Стьюдента и однофакторный дисперсионный анализ.

### Результаты и обсуждение

Ксенотрансплантация ОПЖ в селезенку приводила к снижению уровня глюкозы в крови кроликов группы 3 до нормогликемии на 7-е сутки посттрансплантационного периода. Уровень глюкозы достоверно не отличался от такового у интактных животных и в среднем составлял  $6,98 \pm 0,07$  ммоль/л на 7-е сутки и  $7,8 \pm 0,19$  ммоль/л – на 49-е сутки.

При изучении количества эритроцитов, лейкоцитов, тромбоцитов и СОЭ у животных группы 3 установлено повышение этих показателей на 3-и сутки после трансплантации, а на 7-е сутки посттрансплантационного периода количество клеток крови и СОЭ возвращались к контрольным значениям. Животные группы 2 были использованы нами в эксперименте в качестве модели для изучения изменения показателей крови при патологии селезенки. У кроликов группы 2 среднее количество эритроцитов превышало контрольные значения в 1,4, лейкоцитов – в 1,4, тромбоцитов – в 1,9, ретикулоцитов – в 9,5, СОЭ – в 3,5 раза (таблица).

suspension, containing  $8-9 \times 10^6$  islets/kg and antibiotics under ketamine-xylazine narcosis. All experimental manipulations with animals were carried out according to the “General ethical principles of experiments in animals”, approved by the 1<sup>st</sup> National Congress on Bioethics (Kiev, 2001) and agreed with the statements of the “European Convention for the Protection of Vertebrate Animals Used for Experimental and Other Scientific Purposes” (Strasbourg, 1985).

Animals were divided into 3 groups: 1 – intact; 2 – with PIs xenotransplant. The observation period was 49 days. Glucose level in blood was weekly determined in rabbit blood using the “Gemoglan” indicator plates and Glucofort-II glucometer (“Norma”, Ukraine) and blood indices were controlled. Blood sedimentation rate (BSR) was determined with Panchenkov’s capillary and support; number of erythrocytes, platelets, leukocytes was calculated in Goryaev’s chamber with light microscopy; reticulocyte and siderocyte number in azure II-stained thin blood smears and with reaction to Berlin blue, correspondingly; blood clotting time with Moravic’s method. The data were statistically processed with Student’s t-criterion and single-factor analysis of variance.

### Results and discussion

PIs xenotransplantation into spleen resulted in a decrease in glucose level in rabbit blood of the group 3 down to normoglycemia to the 7<sup>th</sup> day of post-transplantation period. Glucose level did not statistically and significantly differ from that in the intact animals and to the 7<sup>th</sup> and 49<sup>th</sup> days was in average  $6.98 \pm 0.07$  and  $7.8 \pm 0.19$  mmol/l, correspondingly.

When studying the number of erythrocytes, leukocytes, platelets and BSR in animals of the 3 group there was established an increase in these indices to the 3<sup>rd</sup> day after transplantation but to the 7<sup>th</sup> day of post-transplantation period the number of blood cells and BSR were back to the control values.

The animals of the group 2 were used in experiment as the model of studying the changes in blood indices under spleen pathology. In rabbits of the group 2 an average number of erythrocytes exceeded the control values in 1.4 times, platelets in 1.9, reticulocytes in 9.5, BSR in 3.5 times (Table).

One of the important indices of spleen function damage is the pathologic erythrocyte form (siderocyte) presence in blood. When studying blood smears the siderocytes were revealed to the 35<sup>th</sup>-49<sup>th</sup> days only in the rabbits of the group 2.

Blood clotting time in animals of the 2 group was in 2.9 times lower than in the rest ones. In the 3 group this index reduced to the 3<sup>rd</sup> day that was probably associated to an operative treatment, but further it covered up to the normal values.

Показатели крови экспериментальных животных  
Blood indices of experimental animals

Показатели крови Blood indices	Группы экспериментальных животных после операции, сутки Groups of experimental animals after operation, days											
	1				2				3			
	0	3	7	49	0	3	7	49	0	3	7	49
Количество эритроцитов, $\times 10^{12}/\text{л}$ Erythrocyte number, $\times 10^{12}/\text{l}$	5,4 $\pm$ 0,3	5,6 $\pm$ 0,1	5,4 $\pm$ 0,1	5,6 $\pm$ 0,2	5,5 $\pm$ 0,1	8,3 $\pm$ 0,3*	7,0 $\pm$ 0,3*	7,3 $\pm$ 0,2*	5,3 $\pm$ 0,1	6,6 $\pm$ 0,1	5,3 $\pm$ 0,4	5,2 $\pm$ 0,2
Количество лейкоцитов, $\times 10^9/\text{л}$ Leukocyte number, $\times 10^9/\text{l}$	5,8 $\pm$ 0,2	5,5 $\pm$ 0,5	4,7 $\pm$ 0,2	4,8 $\pm$ 0,1	6,7 $\pm$ 0,3	8,3 $\pm$ 0,4*	8,8 $\pm$ 0,4*	7,8 $\pm$ 0,2*	5,8 $\pm$ 0,2	6,0 $\pm$ 0,2	5,5 $\pm$ 0,8	4,8 $\pm$ 0,5
Количество тромбоцитов, $\times 10^9/\text{л}$ Platelet number, $\times 10^9/\text{l}$	282 $\pm$ 15	266 $\pm$ 11	258 $\pm$ 15	233 $\pm$ 11	285 $\pm$ 5	535 $\pm$ 15*	515 $\pm$ 35*	430 $\pm$ 30*	300 $\pm$ 10	325 $\pm$ 15	266 $\pm$ 12	232 $\pm$ 11
Количество ретикулоцитов, % Reticulocyte number, %	2,0 $\pm$ 0,1	3,0 $\pm$ 0,1	1,0 $\pm$ 0,1	1,0 $\pm$ 0,1	2,0 $\pm$ 0,1	25 $\pm$ 2,2*	19 $\pm$ 2,1*	19 $\pm$ 3,2*	2,0 $\pm$ 0,1	4,0 $\pm$ 0,2*	4,0 $\pm$ 0,2*	2,0 $\pm$ 0,2
СОЭ, мм/ч BSR, mm/hr	1,3 $\pm$ 0,2	1,5 $\pm$ 0,1	1,7 $\pm$ 0,2	1,5 $\pm$ 0,1	2,0 $\pm$ 0,2	6,5 $\pm$ 0,5*	5,0 $\pm$ 0,2*	5,0 $\pm$ 0,1*	1,5 $\pm$ 0,2	3,3 $\pm$ 0,3*	2,0 $\pm$ 0,1	2,0 $\pm$ 0,1
Время свертывания крови, мин Blood clotting time, min	3,5 $\pm$ 0,5	3,8 $\pm$ 0,2	3,3 $\pm$ 0,3	3,5 $\pm$ 0,5	4,0 $\pm$ 0,1	1,1 $\pm$ 0,1*	1,0 $\pm$ 0,1*	1,5 $\pm$ 0,5*	3,4 $\pm$ 0,2	1,5 $\pm$ 0,5*	3,5 $\pm$ 0,5	4,0 $\pm$ 0,2

**Примечание.** \* – отличия достоверны между интактной группой и экспериментальными группами животных,  $p < 0,01$ .

**Notes.** \* – differences are statistically significant between the intact and experimental animal groups,  $p < 0.01$ .

Одним из важных показателей повреждения функции селезенки является наличие в крови патологических форм эритроцитов – сидероцитов. При исследовании мазков крови сидероциты были обнаружены на 35-49-е сутки только у кроликов группы 2.

Время свертывания крови у животных группы 2 было в 2,9 раза меньше, чем у остальных. В группе 3 этот показатель снижался на 3-и сутки, что, вероятно, связано с оперативным вмешательством, однако в дальнейшем он восстанавливался до нормальных значений.

### Выводы

Ксенотрансплантация ОПЖ в селезенку позволяет в течение 49 суток поддерживать нормогликемию в организме животных с аллоксан-индуцированным диабетом.

При изучении показателей крови у кроликов после интраспленальной ксенотрансплантации ОПЖ повреждения функции селезенки не установлены.

### Conclusions

PIs xenotransplantation into spleen enables within 49 hrs to maintain the normoglycemia in animal organism with alloxan-induced diabetes.

When studying the blood indices in rabbits after PIs intraspleen xenotransplantation no damages of spleen function were established.

### References

1. Kolot N.V., Bozhok G.A., Legach E.I., Bondarenko T.P. Effect of the site of pancreas islet transplantation on carbohydrate exchange compensation in rabbits with experimental Diabetes mellitus I type // Problemy Endokrinnoj Patologii.– 2007.– N4.– P. 71–77.
2. Turchin I.S., Zubkova G.A., Davidova G.I. et al. Xenotransplantation problems // Transplantologiya.– 2002.– Vol. 3, N2.– P. 137–145.
3. Kneteman N.M., Warnock G.L., Evans M.G. et al. Prolonged function of canine pancreatic fragments autotransplanted to the spleen by venous reflux // Transplantation.– 1990.– Vol. 49, N4.– P. 679–681.
4. Korbutt G.S., Elliot J.F., Ao Z. et al. Large-scale isolation, growth and function of neonatal islet cells // Clin. Invest.– 1996.– Vol. 97, N9.– P. 2119–2129.

## Литература

1. Колот Н.В., Божок Г.А., Легач Е.И., Бондаренко Т.П. Влияние места трансплантации островков поджелудочной железы на компенсацию углеводного обмена у кроликов с экспериментальным сахарным диабетом 1 типа // Проблемы эндокринной патологии.– 2007.– №4.– С. 71–77.
2. Турчин І.С., Зубкова Г.А., Давидова Г.І. та інші. Проблеми ксенотрансплантації // Трансплантологія.– 2002.– Т. 3, №2.– С. 137–145.
3. Kneteman N.M., Warnock G.L., Evans M.G. et al. Prolonged function of canine pancreatic fragments autotransplanted to the spleen by venous reflux // Transplantation.– 1990.– Vol. 49, N4.– P. 679–681.
4. Korbitt G.S., Elliot J.F., Ao Z. et al. Large-scale isolation, growth and function of neonatal islet cells // Clin. Invest.– 1996.– Vol. 97, N9.– P. 2119–2129.
5. Weitgasser R., Davalli A.M., Capotorto J.V. et al. Islet transplantation in diabetic Lewis rats – a comparison of the transplantation sites kidney and spleen capsule // Acta Med. Austriaca.– 1996.– Vol. 23, N5.– P. 156–159.

*Accepted in 13.05.2008*

*Поступила 13.05.2008*