

МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ  
ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ  
«НАЦИОНАЛЬНЫЙ МЕДИЦИНСКИЙ ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ЦЕНТР  
ТРАНСПЛАНТОЛОГИИ И ИСКУССТВЕННЫХ ОРГАНОВ  
ИМЕНИ АКАДЕМИКА В.И. ШУМАКОВА»

На правах рукописи

Скалецкая Галина Николаевна

**ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ МОДЕЛЬ ТКАНЕИНЖЕНЕРНОЙ  
КОНСТРУКЦИИ ПОДЖЕЛУДОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ**

14.01.24. Трансплантология и искусственные органы.

Диссертация  
на соискание ученой степени кандидата медицинских наук

Научный руководитель  
доктор биологических наук,  
профессор  
В. И. Севастьянов

Москва - 2017 г

<b>ВВЕДЕНИЕ</b> .....	4
<b>Глава 1. ТРАНСПЛАНТАЦИЯ ОСТРОВКОВ ПОДЖЕЛУДОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ ПРИ САХАРНОМ ДИАБЕТЕ 1 ТИПА И ПЕРСПЕКТИВЫ ПРИМЕНЕНИЯ ТКАНЕИНЖЕНЕРНОЙ КОНСТРУКЦИИ ПОДЖЕЛУДОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ (ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ)</b> .....	10
1.1. Применение трансплантации островков поджелудочной железы у больных сахарным диабетом 1 типа.....	11
1.1.1. Трансплантация аллогенных островков поджелудочной железы .....	11
1.1.2. Трансплантация ксеногенных островков поджелудочной железы.....	14
1.1.2.1. Источник свиных островков.....	15
1.1.2.2. Отбор и подготовка донорской поджелудочной железы свиньи.....	18
1.1.2.3. Выделение островков свиней.....	19
1.1.2.4. Очистка островков.....	20
1.1.3. Иммунное отторжение при ксенотрансплантации островков.....	21
1.1.3.1. Мгновенное опосредованное кровью воспаление.....	21
1.1.3.2. Сверхострое отторжение.....	21
1.1.3.3. Клеточное отторжение.....	22
1.1.4. Способы ослабления ксеногенного отторжения островков.....	23
1.1.4.1. Инкапсуляция островков.....	23
1.1.4.2. Блокировка костимуляции.....	24
1.1.4.3.Использование генетически модифицированных свиней при ксенотрансплантации островков.....	25
1.1.4.4. Выбор места ксенотрансплантации.....	26
1.1.4.5. Реваскуляризация островкового трансплантата.....	27
1.1.5. Клинические исследования по ксенотрансплантации островков.....	28
1.1.6. Безопасность ксенотрансплантации островков.....	29
1.2. Разработка тканеинженерной конструкции поджелудочной железы с целью лечения сахарного диабета 1 типа.....	30
1.2.1. Источники инсулинпродуцирующих клеток .....	31
1.2.1.1. Островки.....	32
1.2.1.2. Стволовые клетки.....	33
1.2.2. Примеры тканеинженерных конструкций поджелудочной железы .....	38
<b>Глава 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ</b> .....	48
2.1. Донорский источник поджелудочной железы .....	48

2.2. Принципы получения культур из поджелудочной железы .....	50
2.3. Матриксные компоненты тканеинженерной конструкции поджелудочной железы .....	53
2.3.1. Подготовка эксперимента по изучению влияния каркасного матрикса в виде пористых дисков на культуры островковых клеток поджелудочной железы.....	56
2.3.2. Подготовка эксперимента по влиянию микроструктурированного коллагенсодержащего гидрогелевого матрикса (БМКГ) на культуры островковых клеток поджелудочной железы.....	56
2.4. Моделирование экспериментального сахарного диабета .....	57
2.5. Статистическая обработка данных .....	59
<b>Глава 3. ПОЛУЧЕННЫЕ РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ .....</b>	<b>60</b>
3.1. Разработка методов получения культур из поджелудочной железы новорожденных кроликов.....	60
3.2. Изучение влияния биоматрикса на флоатирующие островковоподобные культуры при их совместной инкубации <i>in vitro</i> .....	71
3.2.1. Изучение влияния каркаса в виде пористых дисков на флоатирующие островковоподобные культуры поджелудочной железы .....	71
3.2.2. Исследования по определению взаимного влияния биополимерного микрогетерогенного коллагенсодержащего гидрогеля и флоатирующих островковоподобных культур .....	76
3.3. Результаты моделирования экспериментального сахарного диабета с помощью стрептозотоцина .....	82
3.4. Имплантация ТИК ПЖ в полость брюшины крысам с экспериментальным сахарным диабетом.....	88
3.4.1. Приготовление ТИК ПЖ.....	88
3.4.2. Подготовка животных с экспериментальным сахарным диабетом.....	88
3.4.3. Влияние внутрибрюшинной имплантации ТИК ПЖ на течение экспериментального сахарного диабета у лабораторных крыс.....	89
<b>ЗАКЛЮЧЕНИЕ.....</b>	<b>93</b>
<b>ВЫВОДЫ.....</b>	<b>99</b>
<b>ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ .....</b>	<b>100</b>
<b>СПИСОК ПРИНЯТЫХ СОКРАЩЕНИЙ .....</b>	<b>101</b>
<b>СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ .....</b>	<b>102</b>

## ВВЕДЕНИЕ

### Актуальность темы исследования

Трансплантация островков поджелудочной железы (ПЖ) считается наиболее действенным и передовым направлением в лечении сахарного диабета типа 1, с постепенным улучшением клинических результатов, как следует из данных Международного регистра трансплантации островков (Barton et al., 2012 [1]; Valamirugan et al., 2014 [2]). Однако клиническая трансплантация островков, выделенных из ПЖ посмертных доноров, не может удовлетворить даже малую долю имеющейся потребности в проведении этого этиопатогенетического метода антидиабетического лечения. Это обусловлено рядом причин, прежде всего непреодолимой нехваткой донорских органов, определенным хирургическим риском, непродолжительностью эффекта, а также неизбежностью применения чреватой осложнениями иммуносупрессии. В связи с этим актуальным является разработка более эффективных, безопасных и доступных методов заместительной клеточной терапии сахарного диабета.

Благодаря проведению в последние годы многочисленных исследований в клеточной биологии и прогрессу в разработке биосовместимых материалов (Севастьянов и др., 2010, 2011 [3, 4]; Amer et al., 2014 [5]) стало возможным создание тканеинженерных конструкций, которые состоят обычно из тканевого или клеточного компонента и биосовместимого матрикса.

Представляемая диссертационная работа посвящена разработке методов создания тканеинженерной конструкции ПЖ, применение которой должно помочь устранению недостатков, свойственных существующим трансплантационным методам лечения сахарного диабета 1 типа путем обеспечения условий для длительного выживания и функционирования донорских островков у реципиентов с сахарным диабетом.

При этом для получения достаточного для проведения работы количества панкреатической ткани в качестве наиболее доступного и хорошо нами изученного донорского источника были использованы лабораторные кролики.

## **Цель исследования**

Разработать модель тканеинженерной конструкции поджелудочной железы и провести ее экспериментальное исследование *in vitro* и *in vivo*.

## **Задачи исследования**

1. Разработать метод получения жизнеспособных островкоподобных культур поджелудочной железы с инсулинпродуцирующей активностью.
2. Исследовать *in vitro* влияние резорбируемых полимерных матриц на жизнеспособность островкоподобных культур поджелудочной железы.
3. Определить состав экспериментальной модели тканеинженерной конструкции поджелудочной железы и изучить ее функционирование *in vitro*.
4. Разработать экспериментальную модель стабильного сахарного диабета 1 типа.
5. Доказать функциональную эффективность тканеинженерной конструкции поджелудочной железы на экспериментальной модели сахарного диабета 1 типа.

## **Научная новизна работы**

Впервые получены островкоподобные культуры из поджелудочной железы новорожденных кроликов с инсулинпродуцирующей активностью.

Разработана экспериментальная модель стабильного сахарного диабета 1 типа, исключая его спонтанную реверсию.

Впервые разработана функционально активная экспериментальная модель тканеинженерной конструкция поджелудочной железы (ТИК ПЖ), состоящая из биополимерного гидрогелевого коллагенсодержащего матрикса и островкоподобных культур ПЖ.

Впервые установлено, что при имплантации ТИК ПЖ крысам с экспериментальным сахарным диабетом 1 типа, помимо прямого

гипогликемического действия, наблюдаются процессы регенерации в островках поджелудочной железы крыс-реципиентов, частично восстанавливающие пул  $\beta$ -клеток.

### **Теоретическая и практическая значимость**

Полученные результаты могут стать основой для проведения исследований по разработке методов получения культур островковых клеток и созданию моделей ТИК ПЖ. Соблюдение разработанных в настоящей работе принципов моделирования экспериментального сахарного диабета позволит обеспечить получение достоверных результатов при апробации различных способов антидиабетического лечения. Проведенные опыты показали принципиальную возможность осуществления эффективной имплантации ТИК ПЖ у животных с экспериментальным сахарным диабетом и перспективность проведения необходимых доклинических исследований на пути к подготовке клинических испытаний.

### **Методология и методы исследования**

Объектами для исследования явились островковоподобные культуры, полученные из ПЖ железы новорожденных кроликов, образцы матриц и лабораторные крысы с индуцированным (путем введения стрептозотоцина) сахарным диабетом. В качестве резорбируемого матрикса ТИК использовали твердотельный пористый каркас из сополимера полилактогликолида и биополимерный микрогетерогенный коллагенсодержащий гидрогель (БМКГ).

Наблюдения за формированием культур, получаемых из ПЖ, осуществляли с помощью инвертированного микроскопа и биостанции. Морфологический анализ культур, ТИК ПЖ и ПЖ железы животных-реципиентов проводили с использованием как гистологических, так и специфических иммуногистохимических методик.

Базальную и стимулированную секрецию инсулина *in vitro* культурами островковых клеток и ТИК ПЖ определяли путем измерения концентрации гормона в культуральной жидкости с помощью иммуноферментного метода.

### **Основные положения, выносимые на защиту**

1. Разработанный метод получения островковоподобных культур ПЖ новорожденных кроликов позволяет получать жизнеспособные клетки с инсулинпродуцирующей активностью.
2. Матрикс БМКГ положительно влияет на сохранность морфофункциональных свойств флотирующих островковоподобных культур *in vitro*.
3. Разработанная модель ТИК ПЖ, состоящая из БМКГ матрикса и флотирующих островковоподобных культур, обладает функциональной активностью *in vitro*.
4. Предложенный способ создания экспериментальной модели стабильного сахарного диабета 1 типа практически исключает спонтанную реверсию диабетического статуса у лабораторных крыс.
5. После имплантации разработанной модели ТИК ПЖ крысам с экспериментальным сахарным диабетом отмечается выраженное и продолжительное снижение уровня гипергликемии, а также регенерация  $\beta$ -клеток в собственной поджелудочной железе.

### **Степень достоверности и апробация результатов**

Работа выполнена на 100 крысах-самцах породы Вистар массой тела 200 – 240 г. Достоверность результатов определяется репрезентативным объемом проведенных экспериментов, использованием современных методов исследования и методов статистического анализа.

Исследования проводили в рамках государственного задания Минздрава России на осуществление научных исследований и разработок по теме: «Разработка и экспериментальное исследование тканеинженерных конструкций поджелудочной железы из культур островковых клеток поджелудочной железы и биodeградируемых носителей с целью стимуляции регенерации  $\beta$ -клеток у больных сахарным диабетом», № гос. регистрации 01201251423 (2012-2014 гг.); ФЦП «Исследование и разработка по приоритетным направлениям развития научно-технологического комплекса России на 2014-2020 годы» ПНИЭР «Разработка технологической платформы и методических рекомендаций по проведению доклинических исследований биомедицинских клеточных продуктов», № гос. регистрации 115012930004 (2014-2016 гг.) и гранта РФФИ № 13-04-12017-офи\_м «Инъекционные формы тканеинженерных конструкций хряща и поджелудочной железы» (2013-2015 гг.)

Апробация работы состоялась 14 июля 2017 г. на заседании объединенной научной конференции клинических, экспериментальных отделений и лабораторий федерального государственного бюджетного учреждения «Федеральный научный центр трансплантологии и искусственных органов имени академика В.И. Шумакова» Министерства Здравоохранения Российской Федерации (ФНЦТИО им. ак. В.И. Шумакова). Основные результаты диссертации доложены и обсуждены на IV, VI, VII и VIII Всероссийских съездах трансплантологов (Москва, 2006, 2012, 2014, 2016); 8<sup>th</sup> Int. Congress of the Transplant Society (Milano, Italy, 2006); II Национальном Конгрессе по регенеративной медицине (Москва, 2015).

### **Внедрение в практику**

1. Разработанный метод получения островковоподобных культур внедрен в практику научно-исследовательской работы отдела биомедицинских технологий и тканевой инженерии ФНЦТИО им. ак. В.И.Шумакова.



2. Экспериментальная модель стабильного стрептозотоцинового сахарного диабета используется в отделе биомедицинских технологий и тканевой инженерии ФНЦТИО им. ак. В.И.Шумакова при создании ТИК ПЖ человека и трансдермальной терапевтической системы инсулина

### **Личный вклад автора**

Автор принимал непосредственное участие в разработке метода получения островковоподобных культур, проводил наблюдение за процессом формирования культур и ТИК ПЖ с помощью инвертированного микроскопа и биостанции, готовил культуры, создавал ТИК ПЖ, осуществлял моделирование экспериментального сахарного диабета, выполнял имплантацию ТИК ПЖ крысам, определял гликемию и кетонурию у подопытных и контрольных животных, проводил забор образцов получаемых культур и тканей подопытных животных для последующего морфологического исследования, осуществлял обобщение и анализ полученных результатов и их статистическую обработку.

### **Публикации**

По теме диссертации опубликовано 11 научных работ, из них 5 статей в центральных рецензируемых журналах, рекомендованных ВАК, имеется 1 публикация в зарубежном издании.

### **Объем и структура диссертации**

Диссертационная работа изложена на 127 страницах машинописного текста, иллюстрирована 5 таблицами, 53 рисунками и состоит из введения, 3 глав, заключения, выводов, практических рекомендаций и списка литературы из 233 источников, включающего 10 источников на русском языке и 223 источника на английском языке.

# ГЛАВА 1. ТРАНСПЛАНТАЦИЯ ОСТРОВКОВ ПОДЖЕЛУДОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ ПРИ САХАРНОМ ДИАБЕТЕ 1 ТИПА И ПЕРСПЕКТИВЫ ПРИМЕНЕНИЯ ТКАНЕИНЖЕНЕРНОЙ КОНСТРУКЦИИ ПОДЖЕЛУДОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ (ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ)

По данным Международной федерации диабета 415 миллионов человек во всем мире страдают сахарным диабетом, и их число, по прогнозам, увеличится до 642 миллионов к 2040 году (<http://www.diabetesatlas.org>). Сахарный диабет 1 типа (СД1) - заболевание, характеризующееся избирательной и прогрессирующей потерей инсулин-продуцирующих  $\beta$ -клеток, вызванной аутоиммунной деструкцией, составляет примерно 10% этих случаев. Введение экзогенного инсулина, регулярный мониторинг уровня глюкозы в крови и диетические ограничения являются основными средствами лечения гипергликемии у всех пациентов с СД1. Несмотря на то что заместительная инсулинотерапия жизненно необходима, она не восстанавливает физиологическую регуляцию уровня глюкозы в крови [6] и не в состоянии предотвратить ни опасные гипогликемические состояния, ни поздние осложнения [7], и продолжительность жизни этих пациентов меньше по сравнению с населением в целом [8].

Хотя новые технологии, такие как медленно высвобождающийся инсулин или инсулиновые помпы, были разработаны в последние годы и существенно улучшили контроль гликемии и качество жизни пациентов с СД1 [9], физиологическая регуляция уровня глюкозы в крови по типу обратной связи остается недостижимой. Единственно возможное радикальное лечение этой болезни заключается в замещении разрушенной массы  $\beta$ -клеток, чувствительных к уровню сахара в крови и секретирующих соответствующее количество инсулина в зависимости от уровня глюкозы. Появляется все больше данных, указывающих на то, что пересадка  $\beta$ -клеток восстанавливает защиту от тяжелой гипогликемии, снижает уровень гликированного гемоглобина (HbA1c) и замедляет прогрессирование микрососудистых осложнений у пациентов с СД1 [10].

До сих пор единственными доступными клиническими подходами, способными восстановить пул  $\beta$ -клеток у пациентов с СД1 являются трансплантация поджелудочной железы (ПЖ) на сосудистых связях или пересадка панкреатических островков. Последняя заключается во введении эндокринных клеток в воротную вену реципиента и требует лишь минимальной инвазивной хирургической процедуры по сравнению с органной трансплантацией ПЖ [11-13].

Трансплантация островков (островковых клеток) ПЖ значительно развилась за последние три десятилетия благодаря усилиям научного сообщества во всем мире с постоянным усовершенствованием процесса получения островков и методов их трансплантации, в сочетании с более эффективной работой с пациентами и разработкой более эффективных протоколов начальной и поддерживающей иммуносупрессии [14]. Кроме того, трансплантация островков представляет собой отличную платформу для развития клеточной терапии, направленной на восстановление функции  $\beta$ -клеток с использованием альтернативных источников этих клеток, таких как ксеногенные островки или инсулин-продуцирующие клетки, полученные путем дифференцировки стволовых клеток.

## **1.1. Применение трансплантации островков поджелудочной железы у больных сахарным диабетом 1 типа**

### **1.1.1. Трансплантация аллогенных островков поджелудочной железы**

Трансплантация островков ПЖ в последнее время стала общепринятым методом лечения у пациентов с нестабильным СД1. Сама процедура может быть выполнена как в виде отдельной трансплантации островков пациентам с СД1 без уремии, так и путем совместной трансплантации островков и почки у пациентов с терминальной стадией почечной недостаточности или, если трансплантация почки уже выполнена, как пересадка островков после аллотрансплантации почки.

Первая попытка выделения островков ПЖ с последующей их трансплантацией крысам с химически индуцированным диабетом была осуществлена в 1972 году Ballinger и Lacy [15]. При этом островки были введены в печень, так как по данным Kemp et al. [16] этот орган является наиболее подходящим местом для имплантации островков. Пять лет спустя была впервые проведена аллотрансплантация островков человеку с использованием азатиоприна и кортикостероидов в качестве иммуносупрессивных препаратов [17]. С тех пор предпринимались многие усилия, и значительный прогресс был достигнут в этой области с точки зрения изоляции островков ПЖ человека [18], стратегии иммуносупрессии [19] и установлении оптимального количества пересаживаемых островков на килограмм массы тела реципиента [20].

Кульминацией всех этих достижений стала публикация в 2000 году так называемого Эдмонтонского протокола (Edmonton Protocol), достигшего 100% инсулиновой независимости у семи пациентов с СД1, получивших островки от нескольких доноров с применением бесстероидного протокола иммуносупрессии [21]. Эдмонтонский протокол представляет собой фундаментальное доказательство правильности концепции о возможности достижения инсулинонезависимости путем трансплантации островков ПЖ.

Несколько лет спустя та же группа исследователей сообщила об устойчивой функции островковых клеток, измеренная наличием С-пептида у 73% их пациентов с пересаженными островками и 15% инсулинонезависимости в течение 9 лет после трансплантации [22]. Все пациенты оставались свободными от тяжелых эпизодов гипогликемии и у них поддерживался уровень HbA1c <7,0%, показывающий общую длительную функцию трансплантата, хотя в то же время с отмечалось постепенное снижение концентрации С-пептида. Важно отметить, что длительное наблюдение показало долгосрочную безопасность процедуры с отсутствием тяжелой инфекции, малигнизации и склонности к гипогликемическим состояниям, а также сохранение стабильной функции почек [23].

С момента появления Эдмонтонского протокола программы трансплантации островков были расширены в Северной Америке, Европе и Австралии, где альтернативные протоколы для трансплантации островков ПЖ человека были проведены для того, чтобы преодолеть существующие ограничения процедуры, тем самым улучшая клинические результаты. В последнем докладе, опубликованном Объединенным Реестром Островковых Трансплантаций (CITR, [www.citregistry.org](http://www.citregistry.org)), проанализированы данные о 864 реципиентах островковых аллотрансплантатов (686 только островки и 178 - островки после пересадки почки), которым были выполнены 1679 инфузий за период с 1999 по 2012 гг. Подробный отчет собранных данных, доступных в период с 1999 по 2010 год, показал, что достигнутый уровень инсулинонезависимости в течение трех лет значительно улучшился: 27% за период 1999-2002 гг., 37% за период 2003-2006 гг. и 44% за период 2007-2010 гг.

Другие показатели функционирования островкового трансплантата, такие, как концентрация в крови С-пептида ( $> 0,3$  нг/мл), снижение HbA1c, устранение тяжелых эпизодов гипогликемии и стабилизация уровня глюкозы крови натощак, сохранялись вплоть до самого последнего времени [24].

Кроме того, успешные результаты были недавно сообщены рядом европейских групп. Так, участниками Программы Великобритании по трансплантации островков (The UK islet transplantation program) достигнуто функционирование трансплантата у 80% пациентов через 2 года после первой инфузии островков со значительным снижением частоты тяжелых гипогликемических эпизодов и поддержанием HbA1c  $< 7,0$  % у 70% реципиентов [25]; трансплантологи из Лилля и швейцарско-французской сети GRAGIL достигли 50- и 75%-ного уровней инсулиновой независимости в течение 5-летнего периода наблюдения, соответственно [26, 27].

Значительное уменьшение скорости потери островкового трансплантата свидетельствует о том, что новые препараты способны улучшить приживление и выживание островков, и лучше защитить островки от аллоиммунного отторжения.

В период 1999-2006 гг. доминировала иммуносупрессия по Эдмонтонскому протоколу - назначение антагониста рецептора IL-2 (даклизумаб) ингибитора mTOR (сиролимус) в комбинации с ингибитором кальциневрина (такролимус) для поддерживающей иммуносупрессии. В самом последнем периоде (2006-2010 гг.) иммуносупрессивная терапия проводится антителами, разрушающими Т-клетки с или без ингибитора TNF-альфа (этанерцепт), которые вводят во время трансплантации [28, 29] и ингибитором монофосфатдегидрогеназы (микофеноловая кислота) в комбинации с такролимусом для поддерживающей терапии [30, 31].

Несмотря на определенные успехи в аллотрансплантации островков, которую можно считать наиболее эффективным методом лечения СД1, о его широком применении пока не может быть и речи. Это подтверждает указанный выше факт, что за 13 лет (с 1999 по 2012 гг.) было выполнено пересадки лишь 864 пациентам, то есть реципиентами становились в среднем 66 человек в год, а нуждающихся в этой трансплантационном лечении – миллионы. Основная причина этого вопиющего дефицита – непреодолимая нехватка посмертных доноров, которые пока остаются единственным подходящим источником островков для клинического применения. Многие подходы, направленные на поиск альтернативных источников β-клеток в настоящее время интенсивно исследуются, в частности, возможности получения островков (β-клеток) от ксеногенных доноров, разработка методов дифференцировки стволовых клеток в инсулинпродуцирующие клетки.

### **1.1.2. Трансплантация ксеногенных островков поджелудочной железы**

Ксенотрансплантация островков ПЖ является перспективным направлением, способным ликвидировать разрыв между возможностями применения человеческих клеток и потребностями в трансплантационном лечении пациентов с сахарным диабетом 1 типа.

Использование для человека панкреатических островков, полученных от других видов, кажется очевидным способом обеспечения большого количества островков, необходимых для трансплантационной терапии. Большинство усилий в этой области было направлено на использование именно свиных островков по многим причинам: 1) свиной инсулин может эффективно заменить инсулин человека, так как они отличаются только одной аминокислотой; 2) свиные островки регулируют уровень глюкозы в том же физиологическом диапазоне, что и человеческие; 3) высокий выход островков может быть получен с помощью методов, установленных для выделения островков ПЖ человека и 4) свиньи могут быть генетически модифицированы для получения от них островков, более подходящих для трансплантации человеку [32].

Таким образом, среди потенциальных кандидатов для ксенотрансплантации островков свинья считается наиболее идеальным донором для будущих клинических применений (33-38). Хотя обнадеживающие результаты были получены при ксенотрансплантации островков свиней приматам (39-41), потенциальное их клиническое применение по-прежнему сталкивается с двумя серьезными проблемами: недостаточное обеспечение островками высокого качества и отторжение ксенотрансплантата.

#### *1.1.2.1. Источник свиных островков*

В качестве трансплантатов для ксенотрансплантации были выбраны островки, полученные от эмбрионов, плодов, новорожденных, молодых или взрослых свиней. Несмотря на несколько лет исследований, не было достигнуто точного консенсуса относительно выбора наиболее оптимальной породы свиней для доставки адекватных жизнеспособных изолированных островковых клеток для доклинической ксенотрансплантации (41, 42). В то же время показано, что применение ксенотрансплантатов островков, полученных у новорожденных (2-3-дневных) или взрослых (> 6 месяцев) свиней, приводит к коррекции сахарного диабета у нечеловеческих приматов (NHP) или людей (43-46).

Островковоподобные клеточные кластеры плодов свиней (ОКК) и островки новорожденных свиней (ОНС) представляют собой незрелые клетки, обладающие стойкостью к ишемическому и воспалительному повреждению во время изоляции, что делает удаление островков более эффективным. Тем не менее, в нескольких исследованиях было высказано предположение о том, что ОКК плохо реагировали инсулиновым ответом на глюкозу (47-51). Как правило, ОКК требуют 2-3 месяцев для созревания для достижения функциональности *in vivo* (52). Кроме того, у диабетических обезьян пересаженные свиные ОКК были почти полностью разрушены в течение 12 дней после трансплантации [53]. Все эти недостатки ограничивают потенциальное клиническое применение ОКК плодов свиньи.

Неонатальные свиные островки состоят из дифференцированных эндокринных клеток поджелудочной железы (около 35%) и преимущественно из эпителиальных клеток (около 57%), которые рассматриваются как клетки-предшественники островков [54, 55]. ОНС более чувствительны к высоким уровням глюкозы, чем ОКК, и, соответственно, обладают мощной функциональной способностью восстанавливать нормогликемию у диабетических животных, которые в основном связаны с экспансией  $\beta$ -клеток и активной дифференциацией эпителиальных клеток в  $\beta$ -клетки [56-59]. ОНС четко экспрессируют ксеноантигены, включая антигены сиаловой кислоты, Hanganutziu-Deicher (H-D) и Gal $\alpha$ 1-3Gal $\beta$ 1-4GlcNAc-R ( $\alpha$ -Gal) эпитопы [60]. Однако, благодаря развитию технологии генной инженерии, было показано, что стабильный трансфер генов ОНС может эффективно ослаблять ксеноантигенность [60-62].

При ксенотрансплантации островков свиньи в нескольких исследованиях предполагалось, что для достижения инсулинонезависимости у диабетических нечеловеческих приматов для трансплантации требуется в диапазоне 25 000 -100 000 эквивалентов островков (IEQ) на 1 кг массы тела реципиента [47, 50, 63-65]. Обычно после культивирования *in vitro* ткань из одной неонатальной поджелудочной железы дает около 50 000 агрегатов ОНС [58]; Таким образом, по



меньшей мере четыре донора новорожденных свиной должны быть использованы для лечения примата с сахарным диабетом массой тела 6-8 кг.

Взрослая свинья рассматривается как основной источник донорских ксенотрансплантатов островков, который может обеспечить достаточное количество жизнеспособных островковых клеток и начало их функционирования сразу же после трансплантации. Более 255 000 островков взрослой свиньи (ОВС) с высокой степенью чистоты (80-95%) могут быть выделены из ПЖ взрослой свиньи [66]. Кроме того, в опубликованном исследовании [67] также сообщили о получении чрезвычайно высокого «урожая» ОВС, до 800000 островковых эквивалентов на ПЖ после их очистки.

Эти достижения делают возможным проведение клинической ксеногенной трансплантации с использованием одного свиного донора. Кроме того, по сравнению с ПЖ молодых свиной (<6 месяцев) от взрослых свиных доноров [68-70] можно получить большое количество крупных (150-200 мкм) и хорошо структурированных островков. В крупных островках наличие централизованной структуры, которая непосредственно связана как с коллагеновыми волокнами, так и с капиллярами, может уменьшить повреждение островков, вызванное ферментативным перевариванием, и впоследствии облегчить реваскуляризацию островков после их пересадки [68, 71]. Следовательно, ОВС обладают лучшим потенциалом для клеточного приживления после ксенотрансплантации.

Порода и штамм донорских свиной оказывают жизненно важное влияние на результат изоляции островков. В предыдущих исследованиях было сделано предположение о том, что German Landrace и крупные белые свиной оказались более подходящими породами свиной-доноров островков, чем Duroc, Pietrain, Hampshire, Belgium Landrace, гибриды и свиной дикого типа [72, 73]. В ПЖ породы German Landrace выявлены наибольшее количество крупных островков (150 мкм) и самая высокая объемная плотность островков [73]. Напротив, Heiser et al. [74] сообщили о том, что из ПЖ свиной породы Pietrain можно получить больший урожай островков, чем из ПЖ чистокровных свиной German Landrace, мюнхенских минисвиной Troll и гибридных свиной.

Изменчивость результатов в разных лабораториях, возможно, была связана с различиями в способе изоляции островков и в процедуре подготовки препарата. В последнее время очень высокие урожаи островков (до  $9\ 589 \pm 2838$  IEQ / г ПЖ) с большими размерами и хорошей функциональностью были собраны у взрослых миниатюрных свиней из Chicago Medical School [75]. Эти животные могут разводиться при особых условиях, обеспечивающих отсутствие патогенов. Все это делает данную свиную породу потенциально лучшим кандидатом-донором для будущей клинической ксенотрансплантации островков.

#### *1.1.2.2. Отбор и подготовка донорской поджелудочной железы свиньи*

Морфологический скрининг перед процессом выделения необходим для получения островковых клеток с высоким качеством, уменьшения количественных потерь, сохранения жизнеспособности островков и снижения экономических издержек. Быстрая и недорогая стратегия оценки поджелудочной железы свиньи была установлена в 1994 году [76], в которой указывалось, что ПЖ, содержащая овальные островки с компактными границами, обеспечит успешную изоляцию островков. Между тем, размер островков *in situ* также рассматривался как еще один важный параметр для успешной изоляции. Донорская поджелудочная железа с преимущественно крупными островками ( $> 200$  мкм) обычно давала значительно большее количество клеточных трансплантатов [77, 78]. Кроме того, недавнее исследование показало, что только количество островковых эквивалентов на  $\text{мм}^2$  панкреатической ткани в селезеночной доле (хвостовая часть) ПЖ могло бы предсказать точный выход островков, тогда как такие переменные, как возраст свиньи-донора, пол, время ишемии и партия используемого фермента, не были достоверно коррелированы с выходом островков [79].

Тепловая ишемия во время доставки ПЖ должна быть максимально уменьшена, чтобы предотвратить аутолиз поджелудочной железы и апоптоз в островковых клетках, уменьшить экспрессию медиаторов воспаления и улучшить

выживаемость островков во время культивирования [80, 81]. Тем не менее, по-прежнему отсутствуют единые стандарты безопасного срока тепловой ишемии при подготовке свиных островков. Считается, что тепловая ишемия в пределах 10 минут является необходимой для успешной ксенотрансплантации островков свиньи приматам.

### *1.1.2.3. Выделение островков свиней*

Несмотря на то, что в области переваривания ПЖ свиней и изоляции островков было сделано несколько крупных улучшений или модификаций [82-84], все же существует потребность в совершенствовании методов изоляции. Как правило, сразу после забора интактной ПЖ свиньи в стерильных условиях панкреатический выводной проток канюлируют, а затем коллагеназу вводят с помощью шприца.

В последнее время для успешного переваривания ПЖ [85, 86] рекомендуется использовать современный эффективный фермент либеразу (Liberase MTF C/T), соответствующий критериям GMP (good manufacturing practices) и не содержащий фермент бычьей нервной ткани, и который имеет более низкое содержание эндотоксина (<10 ЕС / мг). После введения коллагеназы ПЖ помещается в циркулирующую камеру для переваривания / фильтрации (называемую камерой Оксфорда), которая похожа на стандартную камеру Рикорди. Оксфордская камера приводит к меньшему разрушению ткани, большему выходу островков, а также к повышению жизнеспособности клеток [87].

С помощью этого нового устройства можно получить до 5000 островков/г ПЖ, взятой у молодых свиней. По данным, полученным в другом исследовании, рекомендовано ограничить время переваривания до 35 мин, а температура в камере не должна превышать 35 ° С (88). Ограниченное время и более низкая температура предотвращают пагубное воздействие излишнего переваривания и окислительного стресса, вызывающих повреждение островков [75, 89]. Как только

островки освобождаются от растворенного коллагеназного матрикса, свежеизолированные островки немедленно удаляют из камеры переваривания / фильтрации и затем помещают в процессор клеток (COBE 2991) для очистки.

#### *1.1.2.4. Очистка островков*

Очистка является следующим необходимым процессом для полного отделения островков от ацинарных тканей, особенно при подготовке препарата островков от молодых или взрослых свиней. Классический метод очистки основан на центрифугировании в градиентах плотности, когда используется тот факт, что плотность островка ниже, чем плотность экзокринной ткани. Окончательная чистота полученных островков в основном зависит от характеристик градиентов плотности [90].

В настоящее время фиколл является наиболее часто используемым реагентом для очистки островков (82, 91), и обычно может быть достигнута чистота 70-90% (островки / цельная поджелудочная железа) (92). Однако этот реагент имеет недостатки: гипертоничность, высокую вязкость и возможное содержание эндотоксина, которые вредны для жизнеспособности и функции свиных островков [93].

Напротив, йодиксанол широко используется в клинических исследованиях в качестве изоосмотической контрастной среды (приблизительно 290 мОсм / кг), которая не содержит эндотоксина. По сравнению с раствором фиколла, йодиксанол может значительно повысить выход и жизнеспособность островков свиньи, уменьшить образование цитокинов / хемокинов и предотвратить потерю массы островков во время предтрансплантационного культивирования [93-95].

Так как свежеприготовленные островки взрослых свиней часто имеют гетерогенное строение, культивирование представляет собой ценный инструмент для улучшения качества и гомогенности ксенотрансплантата [96]. После проведения длительного (7-14 дней) культивирования ОВС при их пересадке был продемонстрирован более короткий срок реверсии гипергликемии и достижения нормогликемии у всех реципиентов.

### **1.1.3. Иммуное отторжение при ксенотрансплантации островков**

#### *1.1.3.1. Мгновенная опосредованная кровью воспалительная реакция*

Иммунологическое отторжение, которое оказывает негативное влияние на приживление островков, а также их функцию, по-прежнему является основным препятствием для успешного клинического применения ксенотрансплантации островков свиньи [97, 98]. Несколько исследований показали, что после интрапортальной инъекции вырабатывался тканевой фактор, экспрессировавшийся на пересаженных островках свиней, который сначала вызывал накопление тромбоцитов, коагуляцию и активацию комплемента, инфильтрацию нейтрофилами, а затем дисфункцию и разрушение трансплантата при контактом с кровью первичных реципиентов. Это явление было описано как мгновенная опосредованная кровью воспалительная реакция (МОКВР) [99-101]. Как правило, МОКВР способствует значительным ранним потерям ксенотрансплантата свиньи (составляет до 60-80%) у диабетических приматов [97, 102].

Таким образом, эффективные методы лечения, направленные на ответную МОКВР, могут обеспечить минимизацию критической дозы островков для восстановления нормогликемии и инсулинонезависимости. После появления МОКВР другие последующие иммунные реакции более конкретно проявляются в отношении ксенотрансплантатов островков свиньи.

#### *1.1.3.2 Сверхострое отторжение*

Приживление островков непосредственно связано с процессом реваскуляризации трансплантата, которая осуществляется, главным образом, с помощью эндотелиальных клеток реципиентов, так как очень мало донорских эндотелиальных клеток может выживать после культивирования перед трансплантацией [103].

При этом молекулы Gal экспрессируются на островках свињи в меньшей степени, чем в солидных органах, только 5% Gal экспрессируется на поверхности ОВС, а активность  $\alpha$ 1,3-галактозилтрансферазы также не обнаруживается (104, 105). Следовательно, ксенотрансплантаты островков свињи редко подвергаются сверхострому отторжению, наблюдаемому при трансплантации васкуляризованных органов. Кроме того, при изучении ксенотрансплантации островков свињи приматам не наблюдалось ни увеличение уровней Gal-специфических IgG, ни IgM-антител, ни Gal-специфического окрашивания (изолектин В4) на островках (20).

Все данные указывают на то, что естественные анти-Gal -антитела не играют важной роли в иммунном отторжении ОВС у диабетических приматов. Тем не менее, экспрессия Gal на островках свиней зависит от возраста доноров, и ОКК и ОНС четко экспрессируют относительно более высокий уровень Gal-антигенов (до 11-19% от общего количества островков) [104]. При этом экспрессия Gal остается положительной как у небольших (<100 мкм), так и у больших островках (> 100 мкм) после процедуры их выделения [105]. Поэтому молекулы Gal все еще являются значимыми мишенями для гуморального ксеногенного отторжения.

### *1.1.3.3. Клеточное отторжение*

Тем не менее, если островковые ксенотрансплантаты избегают острого повреждения из-за МОКВР и дополнительного гуморального ответа, они будут подвержены острому клеточному отторжению. К примеру, при ксенотрансплантации островков свиней грызунам клеточное отторжение, по-видимому, в основном связано с CD4 + Т-клеточным процессом [106-108]. У диабетических приматов острое клеточное отторжение происходит в течение от первых 24 ч до 20 дней после трансплантации и характеризуется массивной инфильтрацией макрофагов и Т-клеток (CD4 + и CD8 + Т-клеток) на периферии трансплантатов [109]. Lindeborg et al. [110] дополнительно продемонстрировали, что CD4 + Т-клетки являются основным фенотипом активированных клонов Т-

клеток, реагирующих на антигены свиней. Кроме того, опосредованный Т-клетками ответ, возможно, вызывает многочисленные реакции других клеток, таких как натуральные киллеры (NK-клетки), В-клетки, а также врожденные ответы. Все это указывает на то, что Т-клетки играют решающую и центральную роль в клеточном отторжении островков свиньи. Хотя клетки свиных островков, как полагают, не действуют как специальные антигенпрезентирующие и доставляющие клетки, они как прямым, так и непрямым путем презентуя антиген, участвуют, по-видимому, в ксеногенном Т-клеточном ответе [98]. Обычно Т-клеткам, чтобы полностью активироваться, требуются два сигнала, один из которых это сигнал Т-клеточного рецептора а другой - костимулирующий сигнал. Последний, обеспечиваемый взаимодействием между костимулирующими молекулами, экспрессируемыми на мембране антигенпрезентирующих клеток и Т-клетками, очень важен для индукции и усиления эффективного иммунного ответа [111].

Таким образом, терапия, нацеленная на различные пути, влияющие на активацию Т-клеток, как полагают, обеспечивает долгосрочную выживаемость свиных островков и гипореактивность реципиента.

#### **1.1.4. Способы ослабления ксеногенного отторжения островков**

##### *1.1.4.1. Инкапсуляция островков*

Иммуноизоляция, ограждающая островковые трансплантаты от иммунной системы реципиентов, стала эффективной стратегией защиты свиных островков от иммунного отторжения [112]. До настоящего времени существуют два типа устройств иммунной изоляции: микрокапсуляция и макрокапсуляция.

Микроинкапсуляция островков заключается в помещении одного или нескольких островков в микрокапсулу, в то время как макрокапсулы содержат несколько или более островков. Размеры трансплантатов инкапсулированных островков следует выбирать в соответствии с местом их введения, а также

жизнеспособностью и возможностью функционирования. Хотя микрокапсулы трудно имплантировать и удалять, их проницаемость лучше, чем у макрокапсул. Идеальные капсулы должны защищать помещенные в них трансплантаты свиней от атак, опосредуемых иммунными клетками хозяина, и обеспечивать свободный обмен питательными веществами, кислородом и метаболитами. Поэтому функция инкапсулированного островка тесно связана с биосовместимостью используемых для инкапсуляции материалов [113]. В последние годы для изготовления макрокапсул или микрокапсул использовали различные искусственные материалы, в том числе модифицированный полисульфон, протамин-гепариновый комплекс, целлюлозу, агарозу, этиленгликоль и альгинат. В результате их применения срок выживаемости островкового трансплантата был значительно увеличен [114-118]. Кроме того, после подкожной трансплантации инкапсулированных островков свиней (на основе альгината) наблюдалась 6-месячная коррекция гипергликемии у диабетических приматов без применения иммуносупрессии [18, 119].

Хотя было разработано много новых вариантов инкапсуляции островков свиней и показаны возможности достижения результатов в снижении ксеногенного отторжения и продлении срока функционирования трансплантата, перед крупномасштабными клиническими испытаниями все еще существуют некоторые проблемы, такие как инфекционные осложнения, низкая диффузионная способность и перикапсулярный фиброзный рост.

#### *1.1.4.2. Блокировка костимуляции*

Встреча Т-клеток с чужеродным антигеном без костимулирующего сигнала делает их невосприимчивыми к антигену (известно как анергия Т-клеток), тем самым подавляя ответ, индуцированный антигеном. Когда прямые и косвенные пути активации Т-клеток избирательно блокировались модифицированными незрелыми дендритными клетками свиней CTLA4Ig и белком CTLA4Ig мыши, время жизни ксенотрансплантатов свиных островков у диабетических мышей



было значительно удлинено (более 100 дней) [120]. Анти-CD154-антитела, которые, как известно, эффективны в блокировке непрямого пути распознавания аллотрансплантата [121, 122], также являются критическим компонентом эффективных иммуносупрессивных стратегий в предотвращении клеточного отторжения при ксенотрансплантации островков от свиней приматам [123, 124]. Однако клиническое применение антител против CD154 ограничено из-за высокого риска тромбоэмболических осложнений [125]. Примечательно, что эти костимулирующие блокировки не индуцировали иммунную толерантность, из-за достижения которой они были включены в долгосрочные иммуносупрессивные протоколы. Как и при использовании системной иммуносупрессии, инфекция и повышенная заболеваемость также выявляются у реципиентов, получавших блокировку костимуляции. Поэтому более специфическая костимуляционная блокировка должна быть разработана с целью повышения безопасности применяемых в настоящее время способов индукции толерантности.

#### *1.1.4.3. Использование генетически модифицированных свиней*

Генетически модифицированные свиньи обладают рядом потенциальных преимуществ, которые заключаются в минимизации риска тромбоза, снижении быстрой потери трансплантированных островков, уменьшении требуемого количества островков, уменьшении побочных эффектов традиционной / системной иммуносупрессии и улучшении активности и выживаемости островков [126-128].

Трансгенная экспрессия гем-оксигеназы-1 человека (НО-1) может эффективно защищать ксенотрансплантаты свиньи от повреждающего влияния ишемии / реперфузии и острого отторжения, опосредованного воспалительными цитокинами [129]. Гуморальное отторжение можно преодолеть при ксенотрансплантации островков свиньи приматам путем скрещивания свиней с выбитым (нокаутированным) геном  $\alpha$ 1,3-галактозилтрансферазы (GT-KO) с

трансгенными свиньями, экспрессирующими регуляторы комплемента человека, включая CD46, CD59 и фактор ускорения распада (hDAF, CD55) [130-132].

В последнее время разработка технологии интерференции РНК, нацеленной на эндогенные ретровирусы свиней, способна существенным образом решить возможную проблему заражения ретровирусами [133, 134]. С развитием и модификацией генной инженерии трансгенные свиньи в конечном итоге приведут к выполнению ксенотрансплантации островков в клинических условиях.

#### *1.1.4.4. Выбор места имплантации*

Успешная ксенотрансплантация свиных островков также тесно связана с соответствующим выбором места имплантации. Выбор идеального места для трансплантата должен учитывать следующие требования: 1) простота и безопасность хирургической процедуры; 2) возможность поддержания в окружающих тканях стабильного метаболизма глюкозы; 3) обеспечение возможных условий для иммунной защиты [135]. Помимо внутрипеченочной трансплантации, почечный субкапсулярный, подкожный, а также внутрисальниковый способы являются обычно используемыми местами введения как при экспериментальной, так и при доклинической ксенотрансплантации островков [136-138]. Почечная субкапсулярная зона и сальник представляют собой интересные альтернативы из-за преимуществ относительной доступности и инвазивности, достаточного кровоснабжения (сальник), портального венозного дренажа (сальник) и анатомической иммунной привилегированности.

#### *1.1.4.5. Реваскуляризация островкового трансплантата*

Возможность регенерации оптимального микрососудистого кровоснабжения является жизненно важным условием при трансплантации островков [139]. Однако изолированные свиные островки являются аваскулярными, и реваскуляризация возникает только через 14 дней после трансплантации [114], поэтому продвижение процесса реваскуляризации и защита вновь образованной микроциркуляции от опосредованного от повреждения будет в значительной степени способствовать улучшению функции островков и их выживанию.

Недавнее исследование показало, что когда островки были покрыты мезенхимальными стволовыми клетками (МСК) и эндотелиальными клетками (ЭК), пролиферация ЭК, прорастание, миграция ЭК в островки, а также последующая васкуляризация были значительно усилены благодаря влиянию МСК [140]. Аналогичные результаты были также продемонстрированы при трансплантации сингенных островков [141]. Учитывая мощные проангиогенные и иммуномодулирующие свойства МСК, для ксенотрансплантации свиных островков предварительная обработка ксенотрансплантатов с помощью МСК реципиентов будет полезна для ускорения реваскуляризации островков и улучшения их приживления.

Кроме того, ПЖ эмбрионов свиньи также может быть еще одним хорошим выбором. Эмбриональные панкреатические имплантаты индуцируют образование сосудистой сети «от реципиента», что поддерживает рост и выживание у диабетических грызунов или обезьян [142, 143], и позволяет тем самым избежать сверхострого или острого отторжения.

### 1.1.5. Клинические исследования по ксенотрансплантации островков

Систематическое клиническое применение островков свиней впервые было выполнено группой Groth (144). В период между 1990 и 1993 гг. 10 больным СД1 с аллотрансплантатом почки были пересажены ОКК свиней либо интрапортально, либо под капсулу пересаженной почки. После трансплантации С-пептид свиньи можно было обнаружить в моче в течение 200-400 дней у четырех пациентов. Данные свидетельствуют о том, что свиные островки могут выживать у людей, и это обеспечивает хорошую основу для клинического использования ксеногенных островков.

Elliott et al. [145] также сообщали о долгосрочной жизнеспособности и работоспособности свиных островков. Уровень глюкозы в крови пациента с СД1 был значительно снижен, после того как инкапсулированные альгинатом ОНС были имплантированы внутрибрюшинно. После 10 лет наблюдения биопсия показала, что в ткани брюшины реципиента все еще имеется большое количество функционирующих островков. Это отдельное исследование показывает, что свиные островки могут иметь положительный долгосрочный уровень сохранности, и терапевтический эффект при лечении человека с СД1. Эти данные указывают на необходимость проведения более масштабных клинических исследований.

Новозеландская компания Living Cell Technologies Co., Ltd. (LCT) разработала коммерческий инкапсулированный препарат свиных островков (Diabecell), который был протестирован в клиническом исследовании фазы I / IIa в Москве с 2007 года [145, 146]. В общей сложности семь пациентов с СД1 получили Diabecell внутрибрюшинно в дозе 5000-10000 IEQ / кг, и никаких серьезных побочных реакций не было обнаружено после пересадки. После 2-летнего наблюдения гликемия у пациентов снизилась до нормального диапазона (5,8-8,2 ммоль / л), два пациента были независимы от введения инсулина. В Новой Зеландии проводятся дополнительные испытания в фазе I / IIa.

### 1.1.6. Безопасность ксенотрансплантации островков

Межвидовая передача свиных эндогенных ретровирусов (СЭРВ) по-прежнему является потенциальным фактором риска в клинической ксенотрансплантации островков свиной. Когда клетки человека НК-293 были совместно культивированы с клетками свиней *in vitro*, СЭРВ могли инфицировать клетки человека [147]. Кроме того, возможность межвидовой передачи СЭРВ была также подтверждена при ксенотрансплантации островков свиней мышам SCID [148]. Напротив, никаких доказательств активации СЭРВ у пациентов с СД1 не наблюдалось после длительного наблюдения [149]. Однако СЭРВ остается потенциальной угрозой, требующей долгосрочного наблюдения в клинических испытаниях человека. Строгий скрининг СЭРВ должен проводиться при клинической трансплантации островков. С появлением свиней с выбитым геном СЭРВ эта опасность недостаточной биозащиты будет полностью устранена.

Помимо СЭРВ, другие источники патогенных инфекций, включая вирусы герпеса, цитомегаловирус свиней, лимфотропный герпесвирус, а также бактериальные патогены также создают проблемы безопасности при ксенотрансплантации островков свиной, подчеркивая важность выбора свиней, лишенных патогенных микроорганизмов, и необходимость проведения предварительного скрининга донорских свиней-доноров

Под впечатлением прогресса в экспериментальных и клинических исследованиях возникает ощущение, что трансплантация свиных островков имеет реальную возможность достижения реверсии сахарного диабета у приматов и человека. С разработкой подходящих донорских источников в виде генетически модифицированных свиней и модификацией технологии изоляции островков вместе с улучшением методов специфической иммуносупрессии, эта терапия принесет ощутимую пользу пациентам с сахарным диабетом в ближайшем будущем. Однако остаются нерешенные проблемы, поэтому необходимо детально рассмотреть возможность скорейшего их решения.

Важнейшим направлением исследований, которые способны устранить часть проблем, связанных с трансплантацией островков ПЖ, или найти адекватные ответы на возникающие вопросы, являются научные разработки, посвященные бурно развивающейся в последние годы регенеративной медицине. Такому прогрессу способствовало проведение многочисленных исследований в клеточной биологии, особенно в области стволовых клеток, и биосовместимых материалов, обеспечивших прогресс в развитии тканевой и клеточной инженерии [150-152].

## **1.2. Разработка тканеинженерной конструкции поджелудочной железы с целью лечения сахарного диабета**

Потенциальные возможности технологий тканевой инженерия и регенеративной медицины способны преодолеть многие из проблем, связанных с осуществлением как аллотрансплантации, так и ксенотрансплантации островков ПЖ. Благодаря использованию биосовместимых натуральных или искусственных матриц и использованию полученных естественным путем или синтезированных компонентов внеклеточного матрикса могут быть созданы условия, при которых значительно увеличится выживаемость и функциональная способность островков (островковых клеток), помещенных в организм пациентов с сахарным диабетом.

Основная идея применения тканевой инженерии при клеточной терапии диабета 1 типа состоит в имплантации островков, а точнее  $\beta$ -клеток, на биосовместимом матриксе-носителе, который с введенными в его состав необходимыми для жизнедеятельности имплантата биомолекулами обеспечивает возможность создания трехмерной структуры и подходящую внеклеточную среду (микроокружение) для обеспечения длительного выживания и функционирования клеток *in vitro* и *in vivo* [153].

Данные последних лет указывают на трехмерные (3D) культуральные системы как на методологическую основу для создания тканеинженерных конструкций (ТИК) ПЖ и улучшения клинических результатов трансплантации островков. Кроме того, в этих условиях можно обеспечить направленную дифференцировку стволовых клеток в  $\beta$ -клетки, что создаст неограниченный потенциал инсулинпродуцирующих клеток (ИПК), пригодных для трансплантации. Таким образом, тканеинженерный подход в сочетании с принципами регенеративной медицины может решить проблему долгосрочной адекватной терапии сахарного диабета 1 типа. Судя по результатам недавних исследований, описанных в литературе, три основных компонента являются ключевыми для ТИК ПЖ: 1) жизнеспособные ИПК, которые могут формировать клеточные островкоподобные агрегаты и выделять инсулин в ответ на глюкозный стимул; 2) каркас (скаффолд) из биосовместимого биостабильного или биорезорбируемого материала, обеспечивающего механическую поддержку клеточного компонента ТИК; 3) биомолекулы внеклеточного матрикса для создания среды, обеспечивающей длительное выживание и функционирование ИПК, а также усиление дифференцировки клеток-предшественников.

### **1.2.1 Источники инсулинпродуцирующих клеток**

Благодаря достижениям современной биологии, из различных типов клеток, прежде всего стволовых, могут быть получены клетки, способные секретировать инсулин, и, возможно, использоваться для лечения сахарного диабета 1 типа, поскольку они отвечают клиническим требованиям, состоящим в выделении инсулина в ответ на повышение уровня глюкозы без каких-либо побочных эффектов. Однако самыми естественными, и поэтому самыми совершенными продуцентами инсулина остаются  $\beta$ -клетки, находящиеся в островках поджелудочной железы.

### 1.2.1.1 Островки

Островки представляют собой скопления эндокринных клеток в ПЖ, с размерами у человека в диапазоне от 50 до 300 мкм в [154]. Островки состоят из  $\alpha$ -,  $\beta$ -,  $\gamma$ -,  $\delta$ - и  $\epsilon$ -клеток, из которых  $\alpha$ -клетки и  $\beta$ -клетки имеют непосредственное отношение к метаболизму глюкозы. В-клетки являются инсулинпродуцирующими клетками островков, и потеря их функции приводит к развитию сахарного диабета 1 типа. Существуют межвидовые различия процентного содержания и локализации  $\beta$ -клеток в островках [155].

В человеческих островках  $\beta$ -клетки являются преобладающим типом клеток (диапазон 32-77%, в среднем 59%), расположенных преимущественно на периферии внутриостровковых кровеносных сосудов. В-клетки функционируют, выделяя инсулин в ответ на повышение уровня глюкозы в крови, и затем этот уникальный гормон взаимодействует со специальными клеткам многих тканей (например, жир, мышцы, печень), чтобы инициировать в них метаболизм глюкозы для получения энергии.

Островки, изолированные из трупной ПЖ, являются первейшим источником клеток, допущенных для клинического использования, но их количество ограничено из-за дефицита доноров. Островки животных в определенной степени исследованы в качестве альтернативы. Свиные островки являются наиболее распространенным ксеногенным источником, так как человеческий и свиной инсулины отличаются одной аминокислотой [156]. В той же степени близок инсулину человека кроличий инсулин [157]. Количество доклинических испытаний со свиными островками на людях крайне ограничено, хотя свиные островки сохранялись и функционировали в течение до 6 месяцев у нечеловеческих приматов с применением иммуносупрессии [158].

Несколько доклинических испытаний с использованием макро- или микроинкапсуляции свиных островков продемонстрировали, что их имплантация давала позитивный эффект в течение нескольких лет без использования иммуносупрессии [159]. Тем не менее, сохраняется мнение о том, что



трансплантация островков свиньи остается несовершенным методом лечения в связи с ограниченной долгосрочной жизнеспособностью *in vivo* и постоянной потребностью в применении иммуносупрессивных препаратов [160].

Функция островка опосредуется в результате взаимодействия с окружающими тканями и сосудистой сетью *in vivo*, и эти исследования позволяют предположить, что совместное культивирование с клетками эндотелия дает преимущества и в условиях *in vitro*.

Учитывая весьма ограниченную возможность использования островков от доступных доноров ПЖ, которыми оказываются чаще всего люди, погибшие в результате черепно-мозговой травмы, все более активной областью исследований становится изучение перспектив получения инсулинпродуцирующих клеток из стволовых клеток или клеток-предшественников [161].

#### 1.2.1.2 Стволовые клетки

Стволовые клетки (СК) определяются по их способности к самообновлению и дифференцировке в различные типы клеток и попадают в одну из двух категорий: плюрипотентные (могут дифференцироваться во все типы клеток организма) или мультипотентные (имеют ограниченную способность к дифференцировке). Эмбриональные стволовые клетки являются наиболее широко исследованным источником для панкреатической дифференцировки в силу их плюрипотентности.

##### *Эмбриональные стволовые клетки*

СК, полученные из эмбрионов, являются потенциальным источником суррогатных  $\beta$ -клеток и, вполне возможно, могут использоваться для замещения дефицита островков, получаемых из ПЖ трупов человека. Первая документальная попытка получения инсулинпозитивных клеток из эмбриональных стволовых клеток (ЭСК) человека была осуществлена в 2001 г. [162]. Исследователи следовали протоколу, установленному для дифференцировки нейронов в инсулинпозитивные кластеры, так как пути развития центральной нервной

системы и поджелудочной железы сходны. В дальнейшем попытались создавать клетки, которые более похожи на панкреатические  $\beta$ -клетки, а не инсулинпозитивные нейроподобные клетки.

Если рассматривать возможности получения значительных количеств  $\beta$ -клеток из СК, то следует констатировать, что уже были осуществлены многочисленные попытки воспроизвести их в процессе культивирования СК различного происхождения, в том числе ЭСК, индуцируя онтогенетический путь дифференцировки клеток поджелудочной железы в  $\beta$ -клетки [163]. Для этого использовали различные сочетания дифференцирующих факторов, которые смогли обеспечить формирование из энтодермы прогениторных клеток ПЖ и их дифференцировку в ИПК с конечным образованием аналогов  $\beta$ -клеток с некоторыми, но не со всеми их фенотипическими и функциональными характеристиками [164-165].

Основной концепцией успеха, в настоящее время используемой для получения ИПК из ЭСК, является попытка имитировать среду, окружающую островки в процессе развития, обеспечивая поступление факторов роста через определенные промежутки времени. При наиболее успешных подходах используют множество факторов роста и фармакологические средства, действие которых направлено на суммирование сигнальных каскадов, имеющих отношение к панкреатической дифференцировке *in vitro* [166]. В целом наблюдается успех в получении ИПК из ЭСК *in vitro*, содержащих до 25% от конечной популяции, но адекватная реакция на нагрузку глюкозой *in vitro* остается нерешенной проблемой [167].

Несмотря на потенциальную возможность получения из ЭСК неограниченного количества панкреатических  $\beta$ -клеток, имеющиеся в настоящее время протоколы дифференцировки, вероятно, потребуют достижения *in vitro* необходимой реакции ИПК на нагрузку глюкозой и окончательной дифференцировки, прежде чем они могут быть применены в клинических условиях, так как использование частично дифференцированных ЭСК остается ограниченным из-за их способности образовывать цисты и тератомы после трансплантации в эксперименте лабораторным животным [167].

*Мезенхимальные стволовые клетки*

Мезенхимальные стволовые клетки (МСК), получаемые, как правило, из костного мозга, представляют собой фибробластоподобные клетки, которые обладают способностью дифференцироваться в ряд клеточных клонов [168]. МСК присутствуют также в жировой и ряде других тканей с хорошим кровоснабжением. Существует ряд доказательств того, что естественная тканевая ниша МСК расположена периваскулярно — вокруг кровеносных сосудов. Кроме того, МСК были обнаружены в пульпе молочных зубов, амниотической (околоплодной) жидкости, пуповинной крови и вартоновом студне. В недавних работах исследовали возможность дифференцировки МСК в эндокринные клетки ПЖ, включая  $\beta$ -клетки, но с ограниченным успехом [169-171]. Были проведены опыты по изучению антидиабетического эффекта пересадок ИПК, полученных из МСК, лабораторным животным с экспериментальным сахарным диабетом. Так, культуры ИПК, полученные в результате дифференцировки МСК, выделенных из жировой ткани, были с успехом трансплантированы диабетическим мышам, обеспечив нормализацию у них уровня гликемии [172]. Несмотря на невозможность получения истинных (полноценных)  $\beta$ -клеток или островков, человеческие ЭСК или другие СК удавалось дифференцировать в панкреатическом направлении, что подтверждалось их способностью отвечать на глюкозную нагрузку секрецией инсулина в условиях *in vivo* — после того, когда их трансплантировали лабораторным мышам с сахарным диабетом. Этот факт позволяет предположить, что «окружение», в которое попадают пересаженные клетки, обеспечивает их необходимыми сигналами, индуцирующими окончательную дифференцировку [173].

Использование таких транскрибирующих факторов, как Pdx1 и MaFA, индуцирующих репрограммирование, повышает эффективность образования панкреатоподобных клеток из МСК [174]. Применение способов репрограммирования могло бы сократить количество шагов, которые необходимо сделать на пути окончательной дифференцировки клеток. Так, было обнаружено, что экспрессия MaFA облегчает дифференцировку СК, выделенных

из плаценты, в ИПК, так как они становятся способными отвечать на высокую концентрацию глюкозы *in vitro* (в среде культивирования) и обеспечивать нормогликемию после трансплантации у мышей-реципиентов с сахарным диабетом.

По мнению некоторых авторов [175], наиболее подходящими для получения ИПК представляются эндометриальные МСК, потенциально способные дифференцироваться в мезодермальные и энтодермальные ткани. После успешного выделения СК из эндометрия человека был использован трехступенчатый протокол, обеспечивающий их дифференцировку в  $\beta$ -клетки ПЖ. В качестве 3D-основы был использован фибрин. Через 2 недели клетки образовали островковоподобные кластеры, способные секретировать инсулин, проинсулин и С-пептид, выявленные методом иммунофлуоресценции как специальные маркеры  $\beta$ -клеток. В нескольких исследованиях МСК вводили диабетическим мышам и продемонстрировали снижение уровня глюкозы в крови, хотя это, по-видимому, произошло из-за регенерации пула  $\beta$ -клеток реципиента, а не в результате дифференцировки МСК в  $\beta$ -клетки [35, 36].

Регенерация  $\beta$ -клеток, как полагают, происходит вследствие иммуномодулирующего и ангиогенного эффектов МСК, хотя точный механизм неизвестен [176]. Наиболее широкое распространение получило использование МСК в совместной культуре с имплантированными островками, которое показало, что происходит улучшение клинического результата путем реваскуляризации трансплантата и защиты островковых клеток от иммунной атаки. Использование МСК, как представляется, оказывает, в первую очередь, иммуномодулирующее действие, хотя способность этих клеток дифференцироваться в ИПК продолжает исследоваться [177].

Известен способ подготовки жизнеспособных и функционально активных островков для последующей их успешной трансплантации путем совместного культивирования первично изолированных островков с МСК, полученными из жировой ткани (ЖТ) в вогнутых микролунках [178]. Проведенные наблюдения показали, что МСК ЖТ, вначале отделенные от островков, в конечном счете участвовали в образовании трехмерных сфероидов, состоящих из островковой

ткани. Впоследствии при исследовании полученных сфероидов была выявлена ультраструктурная морфологические данные, существенно отличающаяся от таковой в первично изолированных островках. При этом культивированные с МСК ЖТ островковые клетки продемонстрировали более высокую жизнеспособность и усиленную инсулинсекретирующую способность по сравнению с монокультурами островков. Это позволяет предположить, что МСК ЖТ имеют значительный потенциал для защиты островковых клеток от повреждений в процессе культивирования и могут быть использованы для улучшения выживаемости островков и их функции перед трансплантацией.

В экспериментах *in vivo*, включавших ксенотрансплантацию микроинкапсулированных сфероидов мышам с экспериментальной моделью диабета, было показано, что по сравнению с первично изолированными островками, использование сфероидов, полученных в результате сокультивирования, обеспечивало более длительную реверсию диабета и меньшее количество необходимого трансплантационного материала.

#### *Неэндокринные клетки поджелудочной железы и гепатоциты*

Были сделаны попытки получать ИПК из клеток, которые онтогенетически близки к  $\beta$ -клеткам. В качестве популяций клеток, которые могут дифференцироваться в  $\beta$ -клетки, были предложены клетки ацинусов и протоков поджелудочной железы [179-181]. В других исследованиях изучали целесообразность трансдифференцировки гепатоцитов или других типов эндокринных клеток в  $\beta$ -клетки, так как они имеют общего предшественника [182-184]. Основная концепция включает в себя дедифференцировку популяции клеток обратно в их прогениторное состояние, а затем стимулирование повторной дифференцировки в  $\beta$ -клетки. На сегодняшний день использование этих клеточных популяций клеток и примененные методические подходы оказались безуспешными при получении функциональных  $\beta$ -клеток и достижении реверсии гипергликемии *in vivo* [185]. Тем не менее, эта область исследований остается активной, и в случае успеха будет предлагать надежный источник клеток для тканевой инженерии. Панкреатические клетки-предшественники, которые могут

быть легко выделены у пренатальных мышей, экспрессируют ряд генов, свидетельствующих об их принадлежности к панкреатическому фенотипу, но не к инсулину.

Таким образом, они могут быть полезным источником клеток для выявления условий, способствующих дифференцировке *in vitro* клеток-предшественников в функционирующие  $\beta$ -клетки. Показано, что неэндокринные клетки, остающиеся после изоляции островков из донорской ПЖ, после введения в них гена нейрогенной дифференцировки могут дифференцироваться в  $\beta$ -клетки после культивирования *in vitro* [186]. Перспективность использования прогениторных клеток ПЖ подтверждена исследованиями, в которых показано, что отсутствие предшественников островковых клеток в трансплантате приводит к снижению массы  $\beta$ -клеток, в то время как трансплантация островковой ткани, богатой прогениторными клетками, существенно повышает антидиабетический эффект [187].

### 1.2.2. Примеры тканеинженерных конструкций поджелудочной железы

В одном из последних обзоров [153] приведены основные типы ТИК ПЖ, исследования функциональных свойств которых *in vitro* и *in vivo* дало наиболее значимые результаты (Таблица 1.).

Так, путем поддержания клеток в физиологически более подходящих структурах и сохранения клеточно-клеточных и клеточно-матриксных контактов может быть имитирована окружающая среда, близкая к естественным условиям. Это соображение особенно актуально, когда островки представляют собой клеточную популяцию в культуре, которая должна иметь многочисленные клеточно-клеточные контакты между эндокринными клетками и клеточно-матричные контакты между эндокринными клетками и окружающей базальной мембраной [201].

Таблица 1 - Краткое описание основных типов ТИК ПЖ.

Особенности культуры	Модификации	Типы клеток	Основные характеристики
2D-культуры			
Суспензия или монослой		Островки плодов мышей [188, 189]	Способность приводить к реверсии экспериментального сахарного диабета после трансплантации [189]
3D-системы			
Засев в пористые каркасы из жесткоцепных полимерных материалов	Добавление молекул внеклеточного матрикса (ВКМ)	Островки, выделенные из ПЖ человека и животных [190]	Островки, культивированные в пористых каркасах, имеют более высокую жизнеспособность и инсулинпродуцирующую активность по сравнению с 2D-культурами [190, 191]. Включение в каркас молекул ВКМ усиливает секрецию инсулина [192]. Островки, имплантированные <i>in vivo</i> в скаффолды, васкуляризируются и снижают уровень гликемии [193].
Инкубация с гидрогелем	Добавление молекул ВКМ	Островки человека и крыс [194, 195]. Прогениторные клетки ПЖ крысы [195] Островки, культивированные с МСК [198].	Островки, культивированные в гидрогеле, имеют более высокую жизнеспособность по сравнению с 2D-культурами и вызывают реверсию гипергликемии в опытах <i>in vivo</i> [194, 196, 197]. Включение молекул ВКМ в гидрогель повышает секрецию инсулина [199]. При культивировании прогениторных клеток в гидрогеле происходит их дифференцировка в $\beta$ -клетки [200]. Сокультивирование островков с МСК усиливает секрецию инсулина [199].

При подготовке трансплантации островков процесс их изоляции часто разрушает внеклеточную среду, приводя к потере функции островков после пересадки. Восстановление контактов с внеклеточной матрицей и механическая поддержка изолированных островков может увеличить долгосрочный успех трансплантации островков.

Таким образом, обеспечение трехмерности, вероятно, играют важную роль в культивировании *in vitro* островков и их выживании и функционировании *in vivo*. Совместное культивирование островков взрослых крыс Wistar и трехмерного тонковолокнистого гидрогелевого скаффолда показало, что выживаемость и инсулинсекретирующая активность островков, непосредственно контактировавших со скаффолдом, были выше, чем при его отсутствии [202].

По-видимому, основной причиной низкого выживания островков после их трансплантации является процедура их выделения из ткани ПЖ. Недостаточную эффективность трансплантации островков связывают также с тем, что в процессе их получения они лишаются привычного микроокружения, нарушается их внутренняя васкуляризация и иннервация [203]. При этом основательно изменяются сигнальные взаимоотношения между островковыми клетками и внеклеточным матриксом (ВКМ), что нарушает регуляцию морфофизиологических процессов, включающих выживание, пролиферацию, секреторную активность, и, в конце концов, ухудшает результаты трансплантации островков. В связи с этим, чрезвычайно важным является создание матриц, обладающих свойствами, характерными для микроокружения островков, имеющегося в нативной ПЖ. Возможно, как использование существующих, так и создание новых биоматериалов, включающих основные компоненты панкреатического окружения, в том числе формирование в скаффолдах трехмерных ниш, обеспечивающих сохранение морфофункциональных свойств находящихся в них островков [204].

В последние годы для создания биорезорбируемых 3D-матриц привлекается целый ряд технологий - от простого «выщелачивания» до технологий прототипирования [205, 206], все чаще стали использовать биополимеры (коллаген, хитозан, полилактогликолиды, бактериальные полимеры



и др.). Трехмерные биорезорбируемые пористые матрицы являются каркасными элементами ТИК, обеспечивающими жизнедеятельность клеток в процессе формирования определенных типов тканей. 3D-матрицы способствуют локализации клеток в области имплантации, одновременно являясь их носителем, временно выполняющими функции естественного внеклеточного матрикса.

Панкреатические островки представляют собой обильно насыщенными сосудами эндокринные клеточные кластеры, которые находятся в непосредственном контакте с базальной мембраной эндотелиальных клеток и экзокринных клеток в ПЖ. Существуют два неиммунных фактора [196], способствующих гибели островков, изолированных из донорской ПЖ, в процессе их культивирования: формирование амилоидоза и потеря компонентов ВКМ. Использование в качестве матрицы для культивируемых человеческих островков трехмерных коллагенсодержащих скаффолдов, по сравнению с культивированием в 2D-условиях, приводило к существенному уменьшению образования амилоида и снижению уровня апоптоза  $\beta$ -клеток на 75 %.

С точки зрения тканевой инженерии, знание внеклеточных сигналов, присутствующих в панкреатических островках, может быть использовано для разработки биологически приближенных к ВКМ скаффолдов, способных поддерживать функции островков. ВКМ имеет несколько функций, такие как обеспечение структурной поддержки, выступление в качестве резервуара для факторов роста, передатчика сигналов к клеткам через интегрин-опосредованные взаимодействия [207].

Основные компоненты ВКМ в значительной степени сохраняются у многих видов животных и включают бифункциональные белки, такие как коллаген, фибронектин и ламинин, гликозаминогликаны и, в меньшей степени, факторы роста и цитокины [208]. Этот принцип лежит в основе биологической совместимости матриц и допускает использование биологических каркасов, полученных из ксеногенных источников, в клинической практике. Точное распределение и трехмерное расположение указанных молекул является

тканеспецифичным и, по меньшей мере, частично ответственно за различные механические, функциональные и структурные свойства различных тканей.

Ламинин, являясь одним из основных компонентов базальных мембран, представлен в ПЖ в ацинарных клетках, распределен внутри и вокруг островков, в переходных экзокринно-эндокринных клетках и присутствует во внутриостровковых кровеносных сосудах [209, 210]. Так как он является неотъемлемой частью внеклеточного окружения островков *in vivo*, во многих работах исследовали функции островков на 2D-культурах с различными изоформами ламинина. Например, было показано, что ламинин-111, ассоциированный с панкреатическим протоковым эпителием, усиливает дифференцировку и рост островков плода мыши (211), избирательно увеличивает количество ИПК и поддерживает жизнеспособность островков взрослых крыс на протяжении нескольких дней [212]. Человеческие  $\beta$ -клетки прикреплялись, распределялись и сохранялись на подложке из мембран лизированных клеток человека (линия 56), но не лизированных клетках крысы (линия 804G), обе из которых богаты ламинином [213]. Островки крысы, однако, росли и секретировали инсулин, когда их культивировали на подложке из мембран лизированных клеток линии 804G. Эти исследования показывают, что клеточно-матричные взаимодействия могут иметь видовую специфичность. Кроме того, ламинин, по-видимому, усиливает дифференцировку ЭСК в ИПК [214].

Когда человеческие ЭСК культивировали на микропринтированных покрытых ламинином покровных стеклах диаметром 100 мкм, с соблюдением протокола направленной дифференцировки, клеточные кластеры демонстрировали профили экспрессии генов, определенно напоминающих энтодерму, из которой развиваются предшественники панкреатических клеток. Когда происходило открепление и дальнейшая дифференцировка суспензионной культуры, небольшая часть (<5%) клеток экспрессировала факторы транскрипции ПЖ Pdx1 и NKX6. В целом, по-видимому, ламинин играет важную роль в поддержании функции островков и выделении инсулина *in vitro* и в поддержании дифференцировки человеческих ЭСК в предшественники  $\beta$ -клеток.

Коллаген также является основным компонентом базальной мембраны, и коллагены типа I, IV, V и VI присутствуют на границе экзокринно-эндокринных клеточных взаимодействий и в непосредственной близости к внутриостровковым эндотелиальным клеткам [215]. Коллагены I, V, VI типов являются наиболее распространенными изоформами в пределах островково-экзокринного интерфейса ПЖ человека с лишь слабой экспрессией коллагена IV типа, хотя его присутствие сильно выражено в эпителиальной основе плодной ПЖ [216]. Коллаген IV типа присутствует в развивающейся ПЖ человека и участвует в развитии структуры островков, о чем свидетельствует его близость к инокуляции кластеров инсулин- и глюкагон-позитивных клеток [217]. При получении 2D-культур островки крысы культивировали на коллагене I и IV типов при сохранении жизнеспособности, соответственно, у 60% и 89% островков, в то время как более 90% тех островков, которые культивировали в суспензии, подверглись апоптической гибели через 48 часов. За 24 часа инкубации островков в чашках, покрытых коллагеном типа I и IV, инсулина выделялось соответственно в 4 и 6 раз больше, чем при использовании чашек, покрытых БСА, или стандартных полилизинных чашек [218]. Интересно отметить, что островки, которые образовывали монослой на поверхности коллагена типа I, с последующим наложением второго слоя коллагена поверх клеток, были способны образовывать островкоподобные агрегаты и поддерживать базальный уровень выделения инсулина в течение 8 недель, вовлекая при этом 3D-контакты матрицы как имеющие важное значение для сохранения структуры островков *in vitro*. Несмотря на способность островков прикрепляться и размножаться на поверхностях, покрытых коллагеном I и IV типов, наблюдавшаяся эпителиально-мезенхимальная трансдифференцировка ограничивает полезность этих субстратов для получения 2D-культур *in vitro*. Так как коллаген IV типа определяется преимущественно в развивающейся ПЖ и, как полагают, способствует формированию островков, он может быть более подходящим субстратом для направленной дифференцировки стволовых клеток. Был проведен сравнительный анализ жизнеспособности и инсулинпродуцирующей активности островков *in*

*in vitro* в коллагенсодержащем матриксе, заселенном фибробластами, и *in vivo* на сингенной модели трансплантации островков мышам [219]. Использование 3D-матрикса значительно улучшало выживание трансплантата и позволяло снижать эффективную дозу пересаживаемых островков вдвое. Фибробласты, помещенные в скаффолд, продуцировали фибронектин и ростовые факторы, индуцировали пролиферацию островковых клеток.

Как известно, фибрин, образующийся из фибриногена во время повреждения тканей, обеспечивает формирование кровяного сгустка и таким образом участвует в репарации раны. Фибрин широко используется как гидрогель и уплотнитель в клинике. Связываясь с рецепторами клеточной мембраны, такими как интегрины, фибрин способствует дифференцировке клеток, их пролиферации, функционированию и выживанию [220]. Фибрин также способен сохранять архитектуру островковых клеток, стимулировать секрецию ими инсулина, ангиогенез островков, оказывать протективный эффект в отношении гибели клеток. После трансплантации островков в фибриновом гидрогеле происходит активная неоваскуляризация трансплантата, налаживается его гормонпродуцирующая функция. Таким образом, фибрин как биосовместимый и биodeградируемый скаффолд может рассматриваться в качестве подходящего компонента ТИК ПЖ. Кроме того, фибрин оказывал защитное действие по отношению к внедренным в него островкам, выделенных из ПЖ молодых поросят и подвергшихся воздействию перекиси водорода [221]. При этом островки, окруженные фибрином, сохраняли инсулинпродуцирующую активность в ответ на глюкозный стимул, в то время как у островков, помещенных в культуральные полистироловые чашки, эта способность под воздействием перекиси водорода значительно снижалась. Высокая степень биосовместимости и специфических свойств фибрин гидрогеля делает его похожим на нормальную ПЖ и представляется авторами идеальной «подложкой». Кроме того, фибрин был использован в качестве 3D-основы для обеспечения дифференцировки мезенхимальных клеток, выделенных из эндометрия, в панкреатические  $\beta$ -клетки.

Сравнительно недавно было разработано новое поколение инъекционных форм многокомпонентных биополимерных микрогетерогенных коллагенсодержащих гелей (БМКГ) с высокими регенераторными свойствами [222]. В состав БМКГ, относящегося к классу биоактивных биомиметических гидрогелей [223] и запатентованного как композиция гетерогенного имплантируемого геля [4], входят основные компоненты ВКМ мягких тканей животного происхождения (пептиды частично гидролизованного коллагена, гликопротеины и уроновые кислоты) и другие биологически активные вещества ВКМ, в том числе факторы роста, необходимые для жизнедеятельности окружающих клеток и синтеза экзогенных уроновых кислот, протеогликанов и коллагена. Наличие микрогетерогенной структуры гидрогеля позволило увеличить время его биорезорбции до нескольких месяцев [224], по сравнению с однокомпонентными биоимплантатами из коллагена, гиалуроновой кислоты, фибрина и др., рассасывающимися в течение 3-4 недель, что недостаточно для формирования ТИК ПЖ.

Посев клеток на сборные пористые каркасы исследованы как средство повышения жизнеспособности и функции изолированных островков *in vitro* и для улучшения результатов их трансплантации. Например, островки крысы, культивированные в пористом полигликолевом каркасе, были почти в 2 раза более жизнеспособными и давали в 4 раза бóльшую секрецию инсулина по сравнению с островками, которые культивировали на необработанном 2D-каркасе в течение 15 дней [225]. В отдельном исследовании человеческие островки были помещены в коллагеновый гель, содержащий фибронектин и коллаген IV типа в порах полилактогликолидного каркаса [226]. Интересно, что островки внутри такого каркаса поддерживали высокий уровень секреции инсулина при стимуляции глюкозой, аналогично свежим островкам, и он был выше, чем у островков, которые культивировали в геле с коллагеном типа 1, но в отсутствие каркаса, или у островков, культивированных в суспензии. Эти результаты демонстрируют важность как клеточно-матриксных контактов, так и структурной поддержки, оказываемой каркасом в поддержании функции островковых клеток *in vitro* и в усилении функции островков после трансплантации.

В работе [227] был использован 3D-биоблоттинг для изготовления пористого 3D-скаффолда на основе альгината для внепеченочной доставки островков. В таких скаффолдах отношение поверхности к объему, и, таким образом, транспорт кислорода и питательных веществ увеличивается по сравнению с гидрогелями, нанесенными обычным способом. Еще одним преимуществом использования каркасных материалов является возможность совместного культивирования множества типов клеток и создания условий, напоминающих аспекты природных тканевых структур с взаимодействием с ВКМ и близостью к сосудистой системе. Это было продемонстрировано в исследовании, в котором мышинные островки, эндотелиальные клетки пупочной вены человека и МСК, полученные из крайней плоти человека, совместно культивировали на пористых полилактогликолидных каркасах [228]. Такая трехкультуральная система улучшила жизнеспособность островков (75%-я жизнеспособность после 4-х недель инкубации *in vitro*) по сравнению с 2D-контролем (через 2 недели культивирования жизнеспособные клетки отсутствовали). При этом островки в 3D-скаффолде выделяли примерно на 50% больше инсулина, чем в 2D-системе.

Таким образом, есть достаточно оснований полагать, что разработка тканеинженерной конструкции поджелудочной будет способствовать решению ряда проблем, которые возникли в области клеточной терапии сахарного диабета 1 типа.

Эти проблемы заключаются при аллогенной пересадке островков ПЖ, прежде всего, в непреодолимости острейшего дефицита единственного источника островков (посмертные доноры), в неизбежности применения чреватой осложнениями иммуносупрессивной терапии, а также в непродолжительности получаемого эффекта. Выполнение повторных аллотрансплантаций островков по окончании лечебного посттрансплантационного действия вряд ли целесообразно и практически маловероятно из-за указанных выше проблем. Основной причиной реальной невозможности проведения клинической ксенотрансплантации островков, которая могла бы, прежде всего, решить проблему обеспечения донорским материалом, является гипотетическая опасность передачи

реципиентам зоонозной инфекции, хотя клинический опыт ксеногенных пересадок это не подтверждает.

Целесообразность и перспективность создания моделей тканеинженерной конструкции обусловлена прежде всего тем, что с ее помощью можно будет создать необходимые условия для существенного увеличения длительности выживания и адекватного функционирования как аллогенных, так и ксеногенных островков поджелудочной железы без применения иммуносупрессии или при ее практически безопасным для реципиентов режиме.

## Глава 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

### *2.1. Донорский источник поджелудочной железы*

Нами были применены определенные принципиальные подходы к получению культур островковых клеток из поджелудочной железы, которые обусловили выбор донорского источника.

Во-первых, в качестве источника островковой ткани было решено отдать предпочтение использованию ПЖ животных, так как только таким образом может быть реально преодолен острый дефицит донорского материала (ПЖ посмертных доноров), делающий практически невозможным как проведение экспериментальных исследований в надлежащем объеме, так и последующие доклинические и клинические испытания.

Во-вторых, донорами должны были служить плоды или новорожденные животные, потому что, как известно, фетальная и неонатальная панкреатическая ткань обладает существенно меньшей иммуногенностью, нежели ПЖ взрослых особей [229]. Это позволяет надеяться на избавление от необходимости применять иммуносупрессию при пересадке островков чужеродным реципиентам или хотя бы на существенное уменьшение ее интенсивности.

В-третьих, преимущество фетальной и неонатальной ткани ПЖ состоит в том, что доля эндокринной (островковой) ткани в ней составляет около 10 % , что в несколько раз больше, чем в ПЖ взрослых особей (лишь 2-3 %). Этот анатомический факт, как можно было предположить, должен способствовать значительному увеличению «урожая» выделенной островковой ткани.

В качестве животных-доноров было решено использовать кроликов, так как инсулин этих животных чрезвычайно близок по своей структуре и физиологическому действию инсулину человека [154]. Проведенный нами гистологический анализ ПЖ плодов позднего срока гестации и ПЖ 1-2-дневных новорожденных кроликов показал их практически полную морфологическую идентичность, поэтому было решено в дальнейших исследованиях использовать



именно неонатальную, а не фетальную ПЖ, чтобы не прибегать в эвтаназии беременных крольчих. Высокая плодовитость, а также несложность и небольшая затратность разведения и содержания этих животных может обеспечить практически неисчерпаемый источник разнообразной донорской ткани для трансплантации.

Выполненные нами исследования [230] подтвердили, что доля островковой ткани в ПЖ новорожденного кролика в несколько раз превышает таковую в ПЖ взрослой особи (рис. 1). Следует при этом отметить, что компактные островки ПЖ взрослого кролика имеют овоидную форму и четкие границы, обозначенные коллагеновыми волокнами, отделяющими их от окружающей экзокринной ткани. Островки в неонатальной ПЖ гораздо мельче, неправильной, «рваной» формы и не имеют выраженных соединительно-тканых прослоек на границе с экзокринными клетками (Рисунок 1Б).

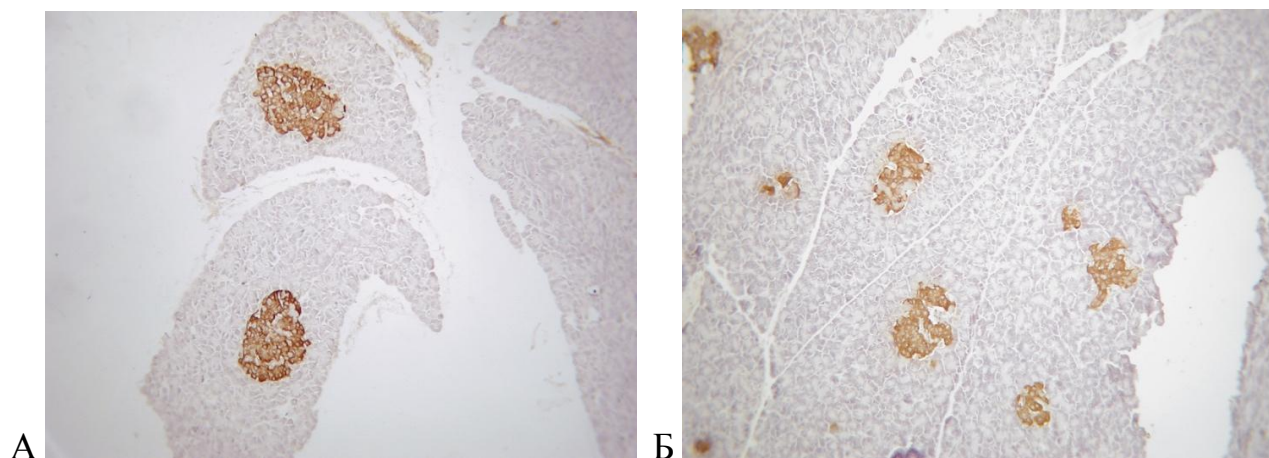


Рисунок 1 - Поджелудочная железа взрослого кролика (А) и новорожденного кролика (Б). Иммуногистохимическое окрашивание  $\beta$ -клеток островков антителами к инсулину. Увеличение  $\times 200$ .

Донорами поджелудочной железы служили 1-2-дневные новорожденные кролики ( $n = 560$ ), доставлявшиеся из специализированного питомника федерального государственного бюджетного учреждения науки «Научный центр биомедицинских технологий Федерального медико-биологического агентства».

Каждая партия животных сопровождалась представлением ветеринарного свидетельства, подтверждавшего отсутствие в кролиководческом хозяйстве инфекционных заболеваний.

В день доставки животных подвергали эвтаназии путем дислокации спинного мозга, сразу после которой в стерильных условиях вскрывали брюшную полость и иссекали поджелудочную железу, которую немедленно помещали в чашку Петри с холодным (+4°C) раствором Хенкса без фенолового красного. Дальнейшие манипуляции по получению культур проводились в условиях ламинарного бокса, обеспечивающего поток стерильного воздуха.

## ***2.2. Принципы получения культур из поджелудочной железы.***

При разработке метода получения культур островковых клеток из поджелудочной железы мы столкнулись с тем, что традиционные технологии выделения островков из ПЖ человека и взрослых животных не подходят при обработке ПЖ плодов и новорожденных животных. Так как в ПЖ взрослых особей островки четко отграничены от окружающей экзокринной ткани прослойками соединительной ткани, методы их изоляции основаны, прежде всего, на протеолитическом воздействии на эти прослойки ферментами типа коллагеназы. На этом основаны почти все методики выделения островков из ПЖ.

Однако у новорожденных млекопитающих животных из-за естественного отсутствия пищеварительной активности экзокринный отдел ПЖ развит слабо, и островковая ткань недостаточно четко отделена от экзокринной ткани волокнами соединительной ткани. Приведенные в предыдущем разделе (2.1.) данные морфологических исследований подтвердили нецелесообразность обработки панкреатической ткани новорожденных кроликов препаратами коллагеназного ряда из-за практического отсутствия целенаправленной точки приложения действия таких ферментов. Поэтому потребовалась разработка новых подходов к созданию метода выделения островковых клеток из ПЖ плодов и новорожденных кроликов.

С этой целью было решено не использовать не только ферментное переваривание ткани ПЖ, но и другие общепринятые способы ее обработки, такие как продавливание через фильтры, воздействие шейкера, центрифугирование в градиентах плотности и др. Применили лишь механическую микродиссекцию панкреатической ткани, очищенной от капсулы органа, видимых соединительно-тканых и сосудистых структур.

После последовательного извлечения и помещения в чашку Петри с холодным раствором 10 поджелудочных желез новорожденных кроликов быстро, но тщательно очищали от капсулы и видимых кровеносных сосудов и выводных панкреатических протоков с помощью глазных пинцетов. Затем каждый очищенный таким образом орган разрезали на фрагменты размерами 2-3 мм. Полученные панкреатические микрофрагменты переносили на вогнутую поверхность круглого стекла (типа часового стекла) и три раза промывали холодным бесцветным раствором Хенкса, после чего с помощью острых глазных ножниц в течение 10-12 минут тщательно измельчали ткань поджелудочных желез до микрофрагментов размером не более 1 мм. Образовавшуюся тканевую массу промывали холодным раствором Хенкса. После удаления последнего измельченную ткань ресуспендировали в 5 мл среды 199 и переносили в культуральный флакон площадью 75 кв. см., равномерно распределяя полученную суспензию по его дну. Затем во флакон вносили 20 мл среды 199 и 2 мл эмбриональной телячьей сыворотки. В процессе подготовки культуры в качестве сбалансированного солевого раствора использовали раствор Хенкса и среду 199, изготовленные в Институте полиомиелита и вирусных энцефалитов им. М.П.Чумакова РАМН, в качестве добавки – эмбриональную телячью сыворотку фирмы NuClone (Бельгия).

В опытах по получению культур из поджелудочной железы использовали одноразовую пластиковую лабораторную посуду (культуральные флаконы, пипетки, чашки Петри, скребки и др.) фирмы Corning (США).

Выращивание культур проводили в инкубаторе Sanyo при 37°C в увлажненной атмосфере, содержащей 5 % CO<sup>2</sup>.

Наблюдение за формированием культур и их последующей инкубацией с биополимерными матриксами проводили через инвертированный микроскоп Nikon Eclipse TS 100 путем ежедневного мониторинга, и значимые изменения фиксировали с помощью цифровой фотокамеры. В части исследований для выявления деталей морфологических изменений, происходящих при различных вариантах культивирования, инкубацию и микроскопическое наблюдение осуществляли в условиях биостанции Nikon IMq, позволяющей проводить мониторинг изменений в любой части культуры путем ежечасного (или с другим временным интервалом) фотографирования объекта на протяжении многих суток. Эта биостанция включает в себя моторизованный инвертированный микроскоп, обеспечивающий высококачественные фазово-контрастные изображения, инкубатор и охлаждаемую CCD камеру. Клеточные культуры в биостанции всегда находятся в условиях заданной температуры, влажности и уровня CO<sup>2</sup>.

Для гистологического исследования на определенных сроках формирования культур производили забор их образцов. Полученный материал фиксировали в формалине или смеси Буэна. После рутинной процедуры обезвоживания образцы заливали в парафин. Среды толщиной 4 мкм окрашивали гематоксилином и эозином, а также подвергали иммуногистохимическому окрашиванию по стандартной методике с пероксидазой хрена для выявления основных типов островковых клеток с использованием соответствующих моноклональных антител: antiinsulin и antiglucagon (фирма Sigma, США). Для выявления протокового эпителия и прогениторных клеток окрашивание препаратов соответственно на цитокератин 18 и цитокератин 19 осуществляли с использованием Novocastra Concentrated Peroxidase Detection System (RE 7130-K, Leica Microsystems), следуя инструкции производителя. Предварительно перед окрашиванием депарафинированные срезы подвергали ретривизации инкубацией в 0,1 %-ном растворе трипсина при 37°C в течение 30 минут.

Содержание инсулина в культуральной жидкости определяли с помощью набора для иммуноферментного анализа фирмы DRG (Германия). При этом определяли не только базальную концентрацию гормона, но и ее изменение под

влиянием традиционных стимуляторов секреции инсулина: повышенного до 25 ммоль/л содержания глюкозы в культуральной среде (имитация высокого уровня гипергликемии) и теофиллина (10 ммоль/л). Ниже описывается более подробно процедура этих исследований.

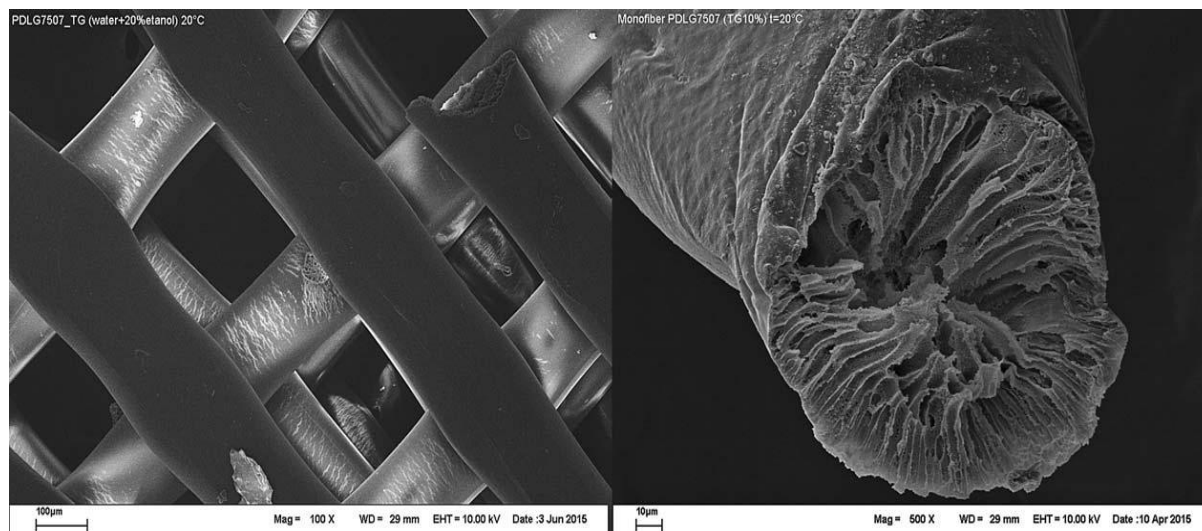
Из флакона с культурами островковых клеток, полученными из поджелудочных желез новорожденных кроликов, на 10-12-дневном сроке инкубации удаляется ростовая среда и заменяется свежей питательной средой с низким содержанием глюкозы (2,8 ммоль/л). После 24-часовой инкубации в обычных условиях (37°C, 5% CO<sup>2</sup>) берется проба (в 3 экземплярах) ростовой среды и замораживается (-20°C). Сразу же из флакона с культурами удаляется ростовая среда и заменяется свежей с высокой концентрацией глюкозы (25 ммоль/л) и добавлением теофиллина (10 ммоль/л). Теофиллин используется в этом тесте для повышения инсулинпродуцирующей реакции на высокую концентрацию глюкозы через его действие по повышению внутриклеточного уровня цАМФ путем ингибирования фосфоэстеразы. Через 60 минут инкубации в указанных условиях берется проба (в 3 экземплярах) ростовой среды и замораживается (-20°C).

### ***2.3. Матриксные компоненты тканеинженерной конструкции поджелудочной железы***

В роли биоматриксного компонента тканеинженерной конструкции были испытаны пористый каркас и коллагенсодержащий гидрогель.

В качестве каркасного матрикса использовали пористые диски из резорбируемого сополимера полилактогликолида PDLG7507 (Puras, Нидерланды), изготовленные методом 3D-принтинга в Институте фотонных технологий Федерального исследовательского центра «Кристаллографии и фотоники» РАН методом 3D-принтинга (Рисунок 2).

**Состав образца: 1)** Полилактогликолид PDLG7507 (Puras, Нидерланды);  
**2)** Вода дистиллированная, деионизованная; **3)** Тетраэтиленгликоль (менее 1%); **4)**  
 Спирт этиловый (менее 1%).



А

Б

Рисунок 2 - Общий вид каркасного матрикса (А) и микроструктура волокон (Б). Диск диаметром 10 мм, высотой 5 мм, толщиной волокон, образующих пористую структуру ~ 100 мкм.

Для гидрогелевого матрикса была выбрана инъекционная форма биополимерного микрогетерогенного коллагенсодержащего гидрогеля (БМКГ) из линейного ряда материалов «Композиция имплантируемого гетерогенного геля» (торговый знак *Сфера*®ГЕЛЬ (АО «БИОМИР сервис», Россия», г. Краснознаменск, М.О., № ФСР 2012/13033 от 01.02.2012 г.), разработанного для клеточных технологий. Матрикс представляет собой находящийся в шприце стерильный прозрачный, слегка опалесцирующий гидрогель с зернистой структурой (Рисунок 3). Средний размер микрочастиц –  $150 \pm 20$  мкм, вязкость –  $62.9 \pm 7.9$  Па и  $pH = 6,8 \pm 0,1$  (Рисунок 4).



Рисунок 3 - Общий вид инъекционной формы БМКГ.

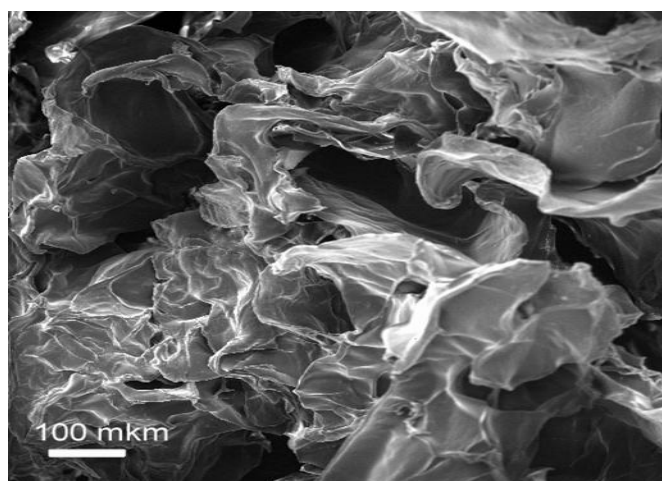


Рисунок 4 - Микроструктура БМКГ (*Сферо®*ГЕЛЬ).

Коллагенсодержащую композицию гетерогенного имплантируемого геля получают из гидролизата эмбриональных или постнатальных коллагенсодержащих тканей животного происхождения, исключая человека, причем он состоит из двух составляющих: твердой - микрочастиц из сшитого гидролизата и жидкой - из исходного гидролизата, взятые в определенном соотношении [Патент РФ на изобретение № 2433828].

Формирование гетерогенной структуры гидрогеля позволило существенно увеличить время его биорезорбции по сравнению с биоимплантатами из коллагена, рассасывающимися в течение 3-4 недель.

### ***2.3.1. Подготовка эксперимента по изучению влиянию каркасного матрикса в виде пористых дисков на культуры островковых клеток поджелудочной железы***

В процессе подготовки эксперимента, с целью отмывания пористых дисков от возможных технологических примесей, каждый из 4 использованных образцов аккуратно опускали на дно соответствующей лунки пластикового культурального планшета, заливали средой 199 и помещали в инкубатор с температурой 37°C на 4 суток, ежедневно проводя замену среды.

Эксперимент проводили следующим образом: в 4 лунки с дисками помещали культуры островковых клеток в среде 199, и в 2 лунки без дисков помещали только культуры островковых клеток в среде 199. Инкубацию проводили при 37°C и 5%-ном содержании CO<sub>2</sub>. Замену ростовой среды на свежую проводили каждые 2-3 дня.

### ***2.3.2. Подготовка эксперимента по влиянию микроструктурированного коллагенсодержащего гидрогелевого матрикса (БМКГ) на культуры островковых клеток поджелудочной железы***

Два миллилитра БМКГ выдавливали из стерильного шприца через силиконизированный пластиковый катетер и равномерно распределяли по дну специальной наклонной культуральной пробирки с горизонтальным плоским дном площадью 10 кв. см (фирма ТТР, Швейцария). Затем флотирующие островковоподобные культуры (ФОК), сформировавшуюся к 10-12 суткам инкубации 10 измельченных ПЖ новорожденных кроликов, с помощью пипетки забирали из культурального флакона и осторожно равномерно наслаивали на биоматрикс, покрывая всю его поверхность. После добавления 7-8 мл ростовой среды 199 (без сыворотки) пробирку помещали в инкубатор, в котором обеспечивалось культивирование при 37°C в увлажненной атмосфере, содержащей 5 % CO<sub>2</sub>. Смену закисленной культуральной среды на свежую проводили каждые 2-3 дня.



#### ***2.4. Моделирование экспериментального сахарного диабета 1 типа***

В качестве подопытных и контрольных животных были выбраны крысы, так как известна их жизнестойкость и способность длительно переносить тяжелые метаболические расстройства благодаря большим способностям к регенеративным процессам, которые обеспечивают в большинстве случаев их выживание, несмотря на серьезные повреждения, вызываемые моделированием тканевой или органной дисфункции.

Существует довольно распространенное мнение о том, что применение стрептозотоцина, благодаря его избирательному поражению  $\beta$ -клеток поджелудочной железы лабораторных животных, в данном случае крыс, приводит у них к необратимому возникновению экспериментального сахарного диабета даже при однократном его внутривенном или внутривентральном введении в дозе 40-90 мг на 1 кг массы тела.

Однако наш предыдущий опыт работы с этим диабетогенным антибиотиком показал, что недостаточное количество инъецированного стрептозотоцина не обеспечивает достижения достаточной высокой и стойкой гипергликемии, а его избыток вызывает токсический эффект и чрезмерный подъем концентрации глюкозы в крови, что приводит к тяжелому клиническому состоянию и неоправданному падежу животных. Поэтому было решено провести специальное исследование, которое помогло бы определиться с выбором надежной методики индукции стрептозотоцинового сахарного диабета, имеющего стойкий и необратимый характер.

Дизайн эксперимента:

Вид, пол животных: крысы-самцы.

Порода/линия: Вистар.

Масса тела: 200-240 г.

Источник получения: питомник лабораторных животных федерального государственного унитарного предприятия "Опытно-производственное хозяйство Манихино».

Карантин: 21 день. Во время этого периода все животные оставались здоровыми.

Содержание: крыс содержали в специальных клетках по 5 особей.

Кормление: комбинированный корм для лабораторных грызунов. Микробиологический статус кормов соответствует «Ветеринарно-санитарным нормам и требованиям к качеству кормов для непродуктивных животных» и не оказывает негативного влияния на результаты проводимого теста. Животные получали корм и доступ к воде без ограничения.

Идентификация: маркировка животных – индивидуальная, с помощью стойкого пигмента.

Всего в опытах на крысах с экспериментальным сахарным диабетом было использовано 100 животных. Все манипуляции с животными проводили согласно правилам, принятым Европейской конвенцией по защите позвоночных животных, используемых для исследований и других научных целей (European Convention for the Protection of Vertebrate Animals Used for Experimental and other Scientific Purposes (ETS 123) Strasbourg, 1986).

Для индукции сахарного диабета нами было отдано предпочтение введению антибиотика стрептозотоцина, обладающего избирательным токсическим действием по отношению к инсулинпродуцирующим  $\beta$ -клеткам островков поджелудочной железы. Так как для достоверной оценки любого метода лечения экспериментального сахарного диабета должна быть исключена спонтанная (не связанная с лечебным воздействием) реверсия диабетического статуса, было решено определить тот способ введения стрептозотоцина лабораторным крысам, который может обеспечить длительное стабильное течение индуцированного таким образом сахарного диабета. С этой целью изучены результаты использования двух основных режимов введения стрептозотоцина (фирма Sigma, США): 30 крысам препарат вводили однократно внутрибрюшинно в дозе 70 мг на 1 кг массы тела и 30 крысам также внутрибрюшинно вводили по 12 мг/кг/сут. в течение 5 дней подряд (суммарная доза такая же – 70 мг/кг).

Гликемию в капиллярной крови животных определяли с помощью глюкометра One Touch Ultra, кетоновые тела в моче - с помощью визуальных полосок Урикет-1.

## **2.5. Статистическая обработка данных**

Статистическую обработку полученных результатов осуществляли с помощью компьютерного статистического пакета Biostat; достоверность различий оценивали по критерию t-Стьюдента. Достоверными считали различия при  $p < 0,05$  (Статистический пакет, рекомендованный ВОЗ, EpiInfo 5.0).

### Глава 3. ПОЛУЧЕННЫЕ РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

#### 3.1. Разработка методов получения культур из поджелудочной железы новорожденных кроликов

Для того чтобы определить наиболее рациональные подходы к получению культур островковых клеток, было решено провести наблюдение за морфологическим состоянием механически измельченной ткани ПЖ новорожденных кроликов с целью выявления изменений, происходящих как бы спонтанно при ее культивировании *in vitro*. Поэтому железу подвергали только очистке от соединительно-тканной капсулы, видимых сосудов и выводных протоков и микродиссекции, не применяя обработки каким-либо ферментным препаратом. При этом мы все-таки рассчитывали на то, что при измельчении панкреатической ткани последняя будет неизбежно подвергнута деликатному воздействию тех протеолитических ферментов, которые будут высвобождаться при механическом разрушении экзокринных (ацинарных) клеток. Данные, полученные при изучении образцов измельчаемой ткани под инвертированным микроскопом, и их выборочный гистологический анализ показали, что оптимальная длительность процесса измельчения, обеспечивающая умеренную диссоциацию ткани ПЖ без ее выраженной деструкции, составляет 12 минут при комнатной температуре (21-24°C).

При наблюдении с помощью инвертированного микроскопа Nikon Eclipse TS 100 и анализе серийного фотографирования, выполненного в условиях биостанции Nikon IMq, были выявлены следующие структурные изменения в инкубируемых микрофрагментах ПЖ.

Уже через 2-3 суток культивирования панкреатических микрофрагментов в них отмечалась выраженная, прогрессирующая и необратимая деграция экзокринных клеток. В последующие несколько дней происходила их гибель и элиминация. Образовавшиеся при этом детритные массы удаляли при очередной

смене ростовой среды. В результате происходило как бы самоочищение островковой ткани от окружающей ее экзокринной ткани. К 4-5 суткам образовавшиеся структуры в определенной степени напоминали плавающие ананасы (Рисунок 5), в которых быстро уменьшающийся в объеме «пучок листьев» представлял собой погибающую экзокринную ткань, а остающийся «плод» – уплотняющуюся островковую ткань.

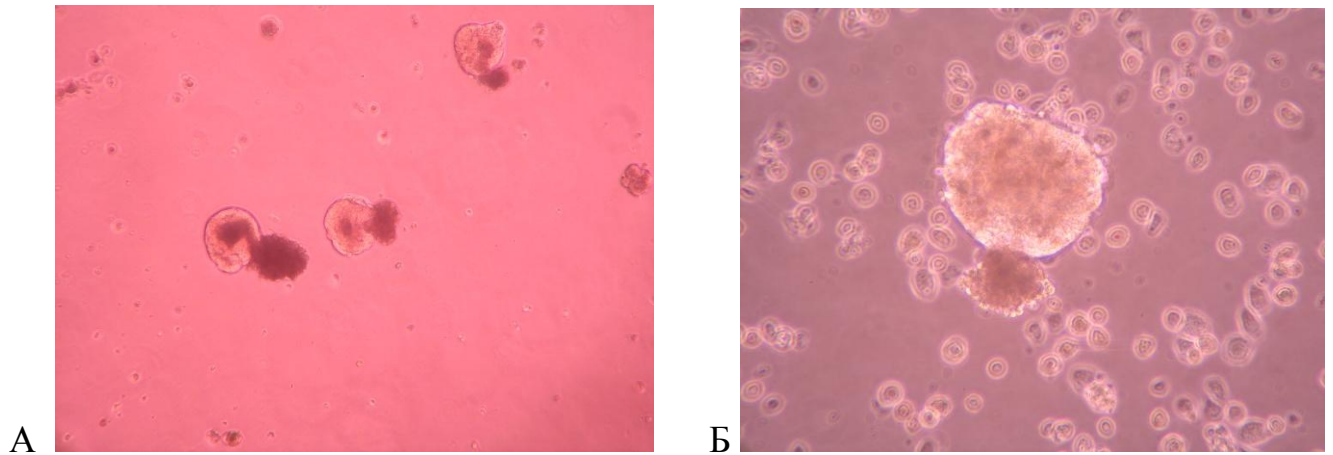


Рисунок 5 - Состояние культуры после 4-суточной инкубации микрофрагментов ПЖ: самоочищение островковой ткани от экзокринной ткани. Инвертированный микроскоп. Увеличение x40 (А), x100 (Б).

В то же время на поверхности многих флотирующих (свободно плавающих) панкреатических микрофрагментов, постепенно приобретающих шарообразную или овоидную форму, появлялись единичные клетки эпителиального характера, и вскоре такое их «выползание» приобретало довольно интенсивный характер (Рисунок 6А). При этом вышедшие клетки начинали группироваться и образовывать вокруг флотирующих микрофрагментов нечто похожее на корону, состоящую из эпителиальных клеток. Затем эти клетки, по одной или группами, начинали покидать поверхность формирующихся флотирующих структур и оседать на дно культурального флакона (Рисунок 6 Б). В результате такой своеобразной миграции отделившиеся клетки начинали более или менее равномерно покрывать его поверхность. В дальнейшем «клетки-мигранты», продолжающие активно оседать, с помощью псевдоподий начинали

перемещаться по дну культурального флакона и, кооперируясь друг с другом, образовывать диплеты, триплеты, различной величины скопления (кластеры) [Рисунок 7].

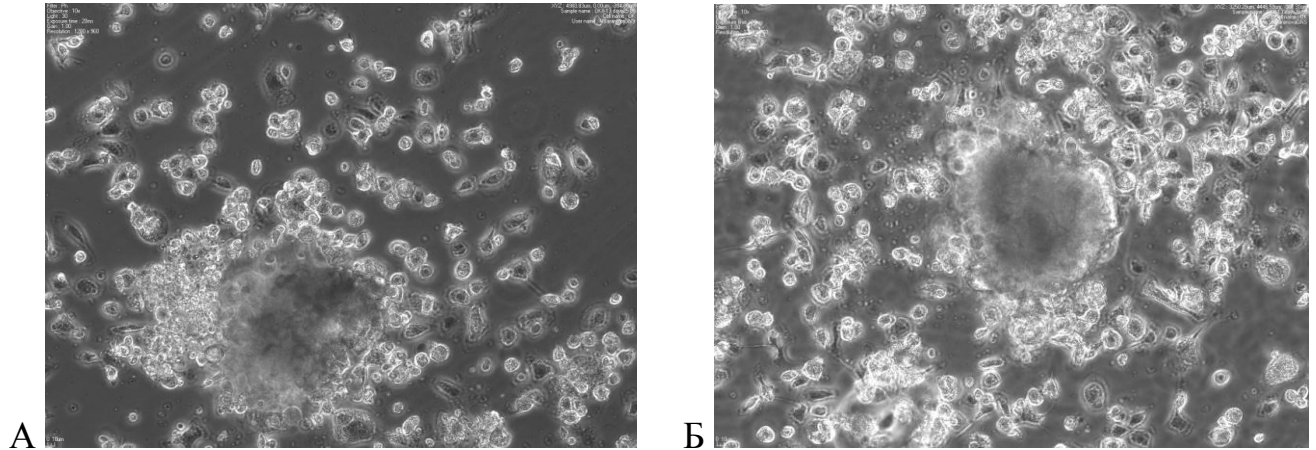


Рисунок 6 - Островковые клетки выходят на поверхность панкреатического микрофрагмента (А) и, частично сгруппировавшись, покидают его (А, Б). Наблюдение с помощью инвертированного микроскопа биостанции. Фазовый контраст. Увеличение x 100.

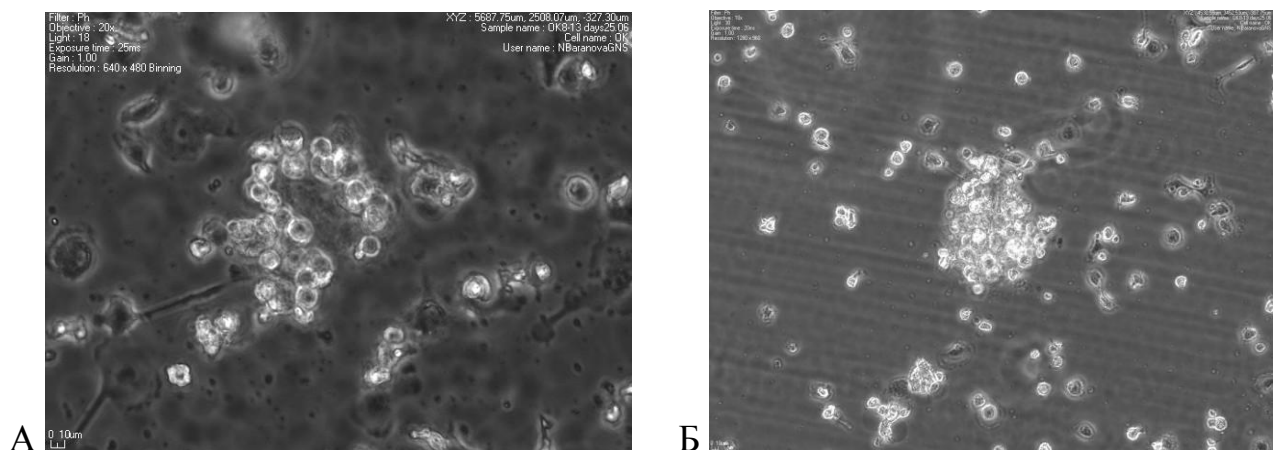


Рисунок 7 - Формирование кластера из мигрировавших островковых клеток. Наблюдение с помощью инвертированного микроскопа биостанции Nikon IMq. Фазовый контраст. А. Увеличение x 100. Б. Увеличение x 40.

К 6-7 суткам инкубации активная миграция приводила к тому, что многочисленные островковые клетки, как отдельные, так и в виде кластеров, покрывали значительную часть культурального флакона (Рисунок 8).

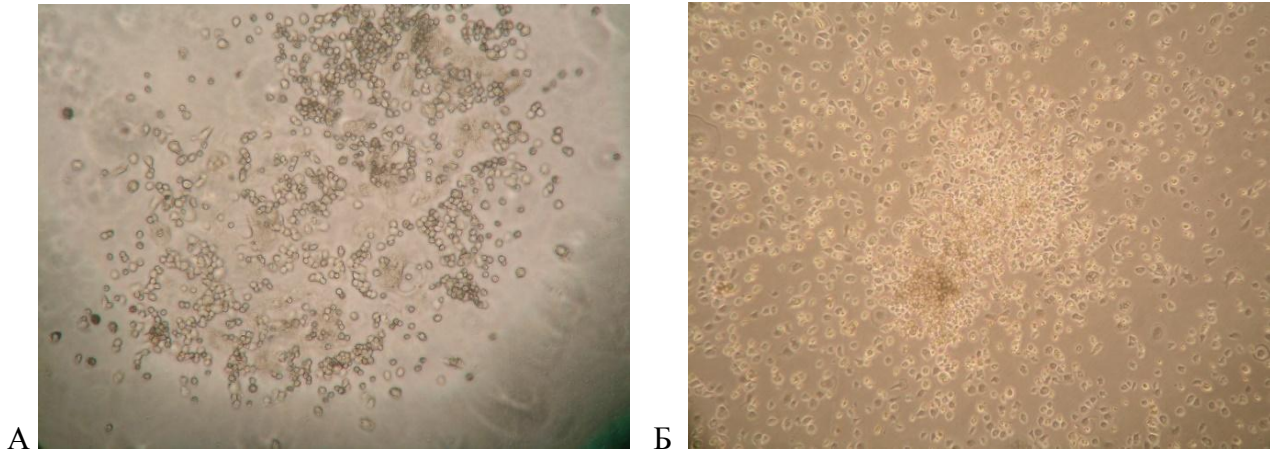


Рисунок 8 – А. Образование скоплений клеток-мигрантов. Увеличение x 200. Б. Островковые клетки покрывают значительную поверхность дна культурального флакона. Инвертированный микроскоп. Увеличение x 40.

На 7-8 сутки миграционный процесс, как правило, завершился (Рисунок 9А). В это же время последние остатки экзокринной ткани покидали практически уже сформировавшиеся флотирующие культуры (Рисунок 9Б).

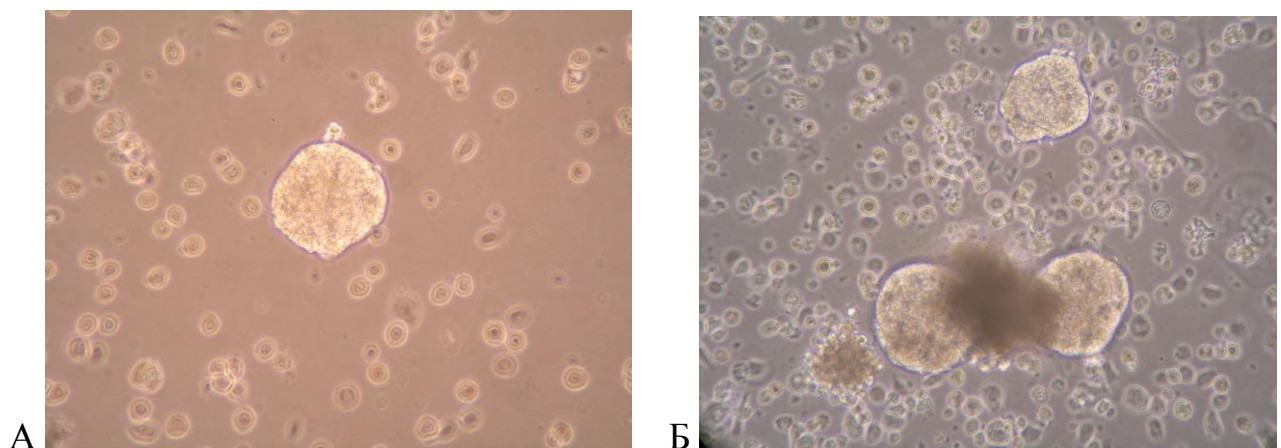


Рисунок 9 - А. Завершение процесса клеточной миграции. Б. Окончательное избавление сформировавшихся островковоподобных структур от остатков экзокринной ткани. Инвертированный микроскоп. Увеличение x 100.



При этом в мигрировавших и осевших островковых клетках стали появляться признаки их деградации, которые проявлялись, прежде всего, в вакуолизации цитоплазмы (Рисунок 10А). В дальнейшем дегенеративные процессы охватывали все большее количество клеток-мигрантов, и к исходу 2 недель жизнеспособные клетки сохранялись лишь в свободно плавающих островковоподобных структурах и в небольшом числе более или менее крупных кластеров островковых клеток (Рисунок 10Б). Погибшие клетки (как остатки экзокринной ткани, так и апоптировавшие островковые) превращались в детрит, который удалялся из культуры при очередной смене ростовой среды.

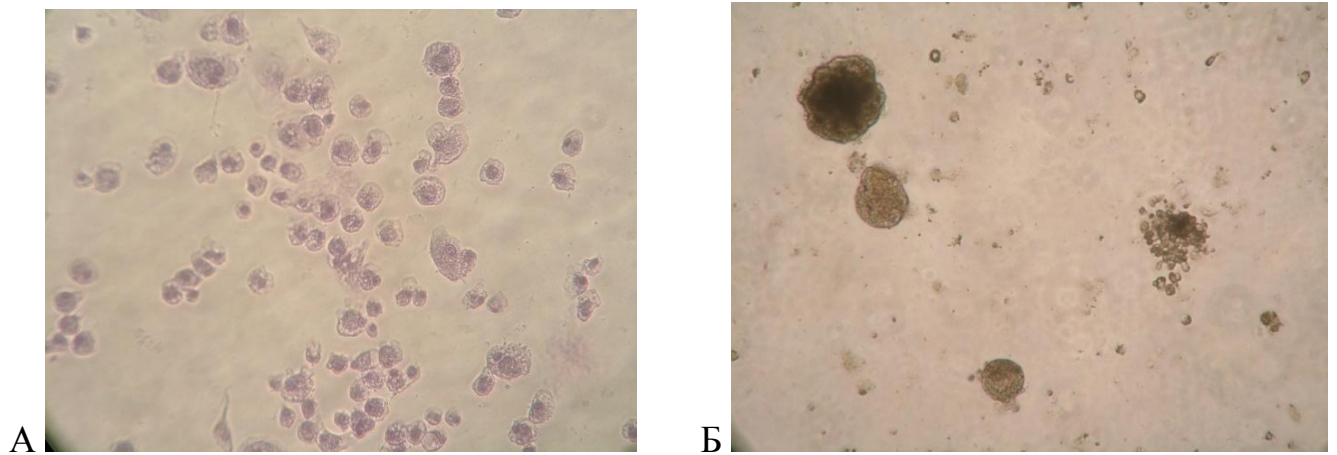


Рисунок 10 - А. Массовая вакуолизация цитоплазмы мигрировавших островковых клеток. Б. Флотирующие островковоподобные образования и кластер островковых клеток на фоне остатков клеточного детрита. Инвертированный микроскоп. Увеличение x 100 (А). Увеличение x 40 (Б).

В результате, после гибели и элиминации экзокринной ткани и мигрировавших островковых клеток, в культуре сохраняются только свободно плавающие, с четкими очертаниями плотные структурные образования шарообразной или овоидной формы (Рисунок 11А).

Гистологический анализ флотирующих культур, имеющих, как было указано, шарообразную или овоидную форму, показал, что часть из них может иметь небольшие полости, которые образовались, по-видимому, на месте участков погибшей и элиминированной экзокринной панкреатической ткани



(Рисунок 11Б). Специфическое иммуногистохимическое окрашивание таких культур выявило наличие значительного количества главных островковых клеток: инсулинсодержащих  $\beta$ -клеток и глюкагонсодержащих  $\alpha$ -клеток (Рисунок 12), что дало основание называть такие флотирующие культуры островковоподобными.

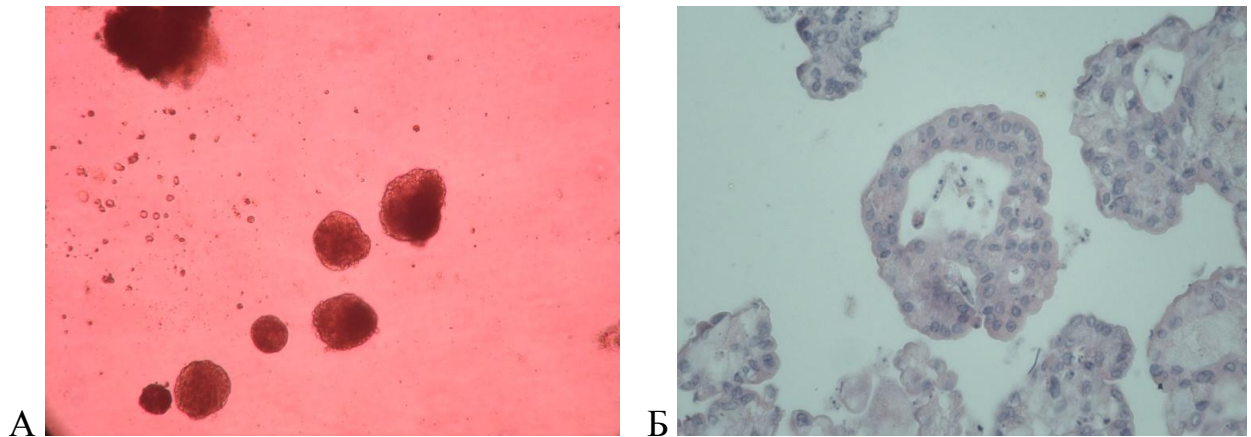


Рисунок 11 - Флотирующие культуры, полученные из ПЖ новорожденных кроликов. А. Инвертированный микроскоп. Увеличение  $\times 40$ . Б. Окрашивание гематоксилином и эозином. Увеличение  $\times 200$ .

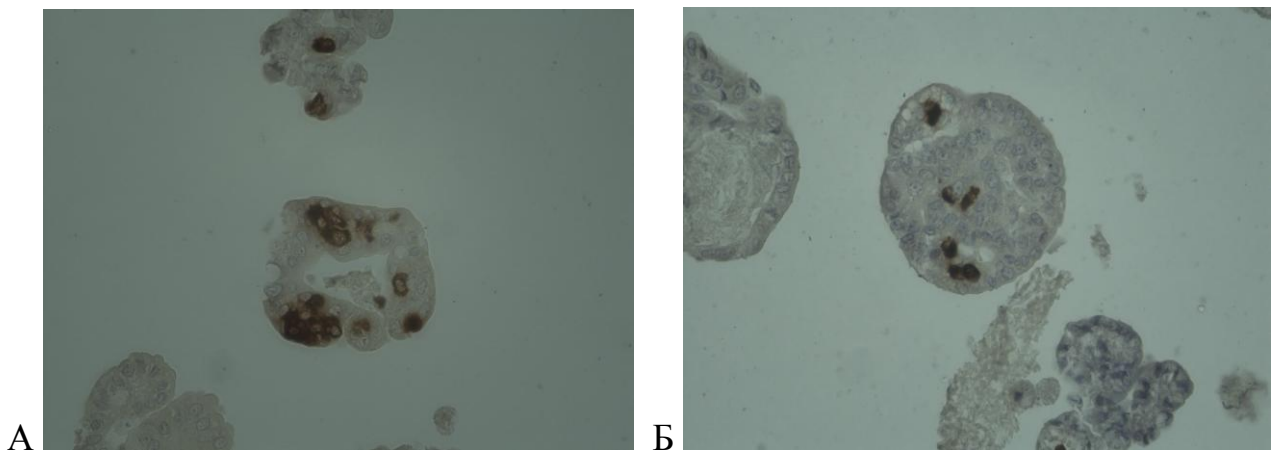


Рисунок 12 - Флотирующие культуры, полученные из поджелудочной железы новорожденных кроликов. Иммунопозитивное окрашивание  $\beta$ -клеток антителами к инсулину (А) и  $\alpha$ -клеток антителами к глюкагону (Б). Увеличение  $\times 200$ .

В то же время часть культивируемых микрофрагментов ПЖ не оставались «на плаву», а, осев на дно культурального флакона, прикреплялись к нему. Так же, как у флотирующих микрофрагментов, было отмечена их "самоочистка" от экзокринной ткани, происходившая в течение нескольких дней, и уплотнение оставшейся ткани. При этом на 5-7 сутки инкубации стало отмечаться появление монослоя вокруг очага прикрепления панкреатической ткани (Рисунок 13).

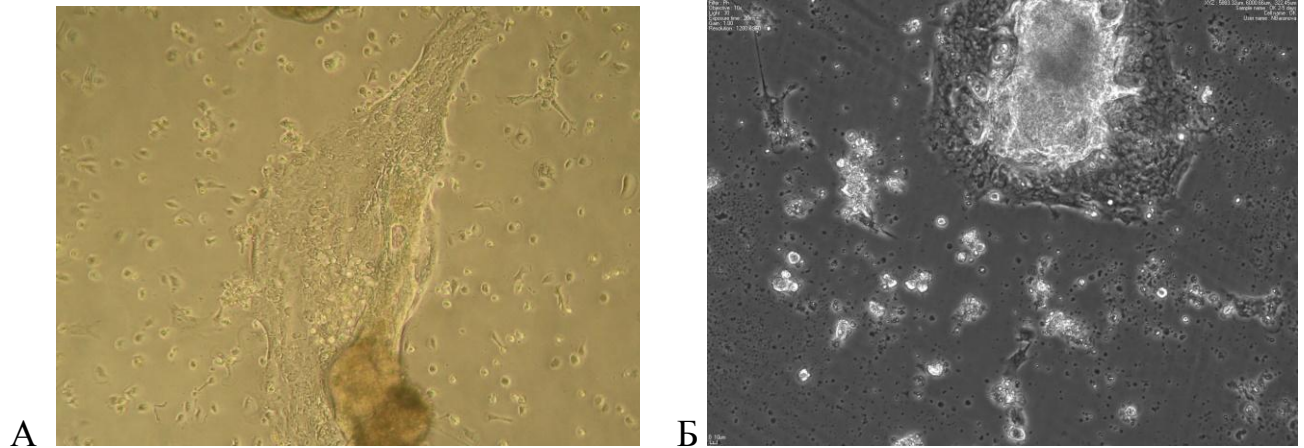


Рисунок 13 - Образование монослоя эпителиальных клеток вокруг очага прикрепления микрофрагмента ПЖ новорожденного кролика. А. Инвертированный микроскоп. Увеличение  $\times 100$ . Б. Фазовый контраст. Увеличение  $\times 200$ .

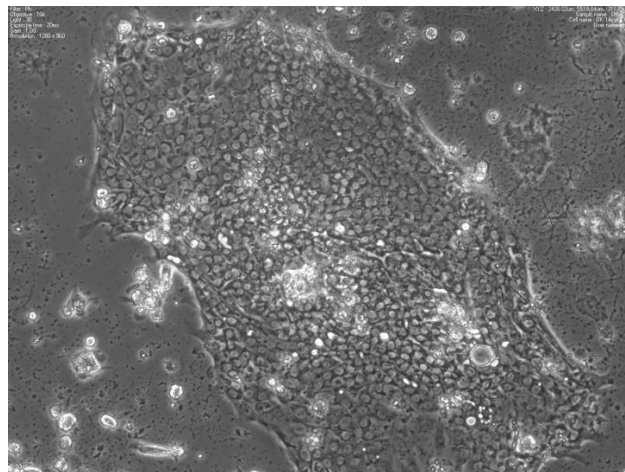


Рисунок 14 - Формирование однослойного пласта эпителиальных клеток. Инвертированный микроскоп биостанции. Фазовый контраст. Увеличение  $\times 200$ .

Через 12-14 суток инкубации прикрепленных микрофрагментов ПЖ, вокруг которых был отмечено формирование эпителиального монослоя, происходило значительное увеличение площади последнего. По мере периферического однослойного роста наблюдалось постепенное «истощение», а затем и исчезновение очага изначальной адгезии панкреатической ткани. В результате образовывался однородный клеточный пласт (Рисунок 14).

Иммуногистохимический анализ показал, что свыше 90% клеток, формирующих однослойную культуру, интенсивно окрашивались антителами к цитокератину 18, что характерно для эпителия энтодермального происхождения (Рисунок 15А). Кроме того, эти клетки активно экспрессировали специфический маркер протокового эпителия – цитокератин 19 (Рисунок 15Б).

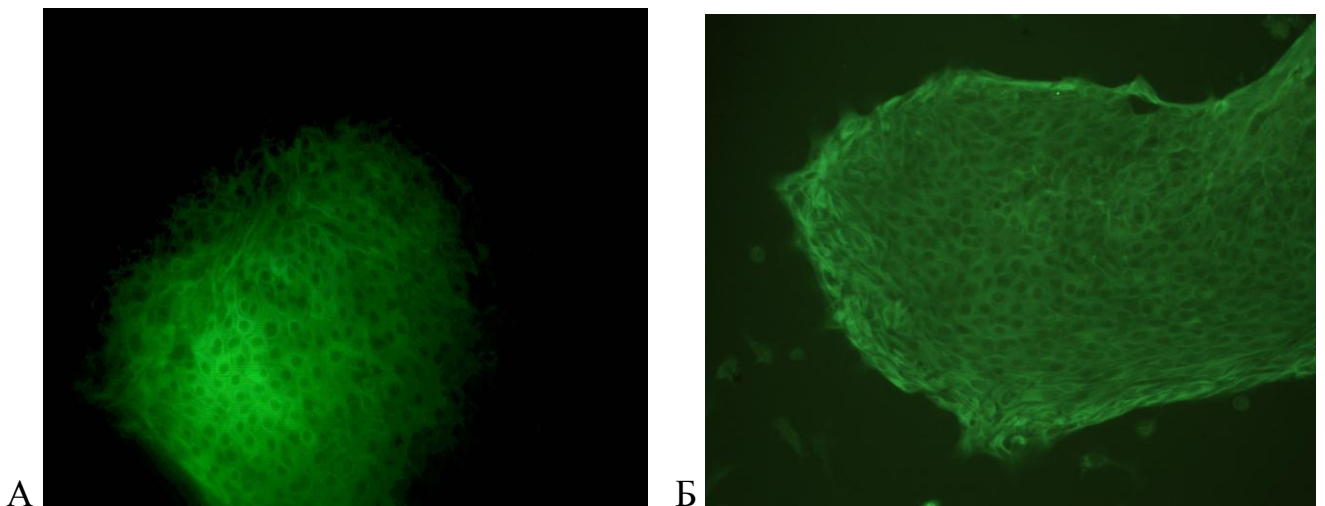


Рисунок 15. Иммуногистохимическое окрашивание эпителиального монослоя на цитокератин 18 (А) и цитокератин 19 (Б). Иммунофлуоресцентный микроскоп. Увеличение x 200.

Полученные данные позволяют определить, что основным клеточным типом, формирующим монослой, является панкреатический протоковый эпителий, который служит источником прогениторных клеток ПЖ. При этом негативная реакция на окрашивание монослоя антителами к инсулину и глюкагону свидетельствовала об отсутствии достаточной дифференцировки прогениторных клеток в островковые клетки на данном сроке культивирования.

В дальнейшем происходило изменение конфигурации монослоя с существенным утолщением его края, что свидетельствовало о формировании многослойности с образованием определенной трехмерности части культуры (Рисунок 16).

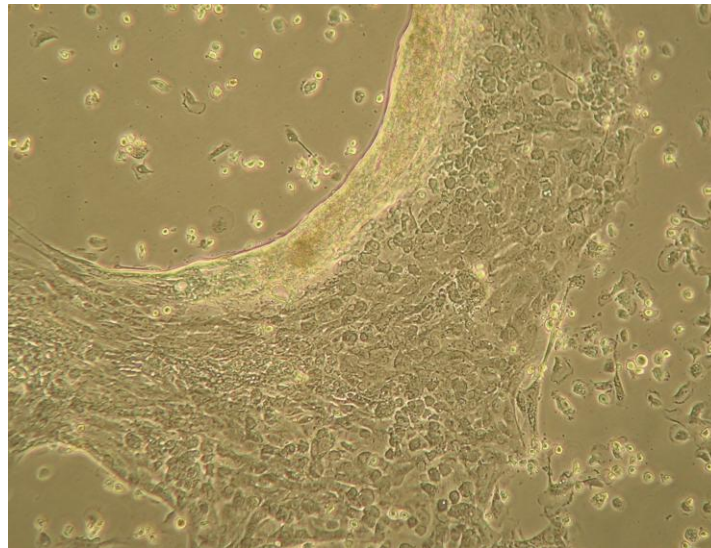


Рисунок 16 - Изменение конфигурации монослоя с образованием трехмерной структуры. Инвертированный микроскоп. Увеличение  $\times 100$ .

Таким образом, нами были получены три основных типа культур островковых клеток: флотирующие островковоподобные, имеющие органотипический характер, суспензионные цитотипические, полученные в результате миграции островковых клеток и прогениторные клетки, происходящие из эпителия выводных протоков.

В дальнейшем перед нами встал вопрос: какой вид полученных нами культур может стать клеточным (тканевым) компонентом разрабатываемой нами ТИК ПЖ?

Так как в состав ТИК ПЖ должен входить тканевой компонент, содержащий островковые клетки, способные к адекватной инсулин-продуцирующей активности, было решено не использовать с этой целью культуры, состоящие из прогениторных клеток. Последние не содержат существенного количества зрелых  $\beta$ -клеток и поэтому не могут секретировать

значимое количество инсулина. Возможно, в дальнейших исследованиях будут созданы условия для активной дифференцировки прогениторных клеток в  $\beta$ -клетки, что обусловит их включение в клеточно-тканевую компонент ТИК ПЖ.

Цитотипические культуры, представляющие собой суспензию островковых клеток, были исключены из «претендентов» на роль компонента ТИК ПЖ по другой причине. Несмотря на содержание значительного количества инсулинпродуцирующих зрелых  $\beta$ -клеток, суспензионные культуры, как оказалось, не обладают достаточной жизнеспособностью: уже к 5-7 суткам инкубации *in vitro* у части культивируемых клеток отмечалась вакуолизация цитоплазмы, которая в дальнейшем приобретала массовый характер, и к исходу 10-12 суток инкубации доля жизнеспособных клеток была уже очень мала. Кроме того, следует отметить, что довольно высокая концентрация инсулина, которая была зарегистрирована на 7 сутки инкубации на ее базальном уровне (возможно, частично за счет освобождения инсулина из разрушающихся  $\beta$ -клеток), после стимуляции повышалась незначительно, что свидетельствовало о неспособности содержащихся в культуре  $\beta$ -клеток осуществлять выброс инсулина по принципу обратной связи, что необходимо для их функционирования *in vivo*.

В то же время суспензионные культуры цитотипического характера, состоящие из островковых клеток, очищенных от экзокринных элементов, имеют определенную ценность как клеточный препарат, который может использоваться в непродолжительных экспериментах по испытания сахароснижающих и других фармакологических веществ, воздействующих на островковый аппарат ПЖ. Очень важным является то, что такие культуры могут быть получены как бы естественным путем, в результате спонтанной клеточной миграции при инкубации микрофрагментов ПЖ. Этот подход к получению препарата островковых клеток в корне отличается от способов выделения очищенной фракции  $\beta$ -клеток, применяющихся не одно десятилетие и состоящих из целого ряда методических приемов. Они включают, прежде всего, процедуру изоляции островков, требующую, как минимум, применение ферментного переваривания и центрифугирование в градиентах плотности. Затем проводится диссоциация



островков с целью получения суспензии островковых клеток. При этом применение таких, далеко не деликатных, даже насильственных манипуляций приводит не только к существенной потере ценного клеточного материала, но и к снижению функциональных возможностей выделенных клеток.

В отличие от описанных двух типов культур (прогениторные и суспензионные цитотипические), флотирующие культуры по мере инкубации приобретали островковоподобные черты и длительно сохраняли жизнеспособность и гормональную активность. При этом они продуцировали инсулин *in vitro* по принципу обратной связи, что было подтверждено тем, что базальный уровень концентрации инсулина увеличивался более чем в 1,5 раза стимуляции высокой концентрацией глюкозы и теofilлином (Рисунок 17).

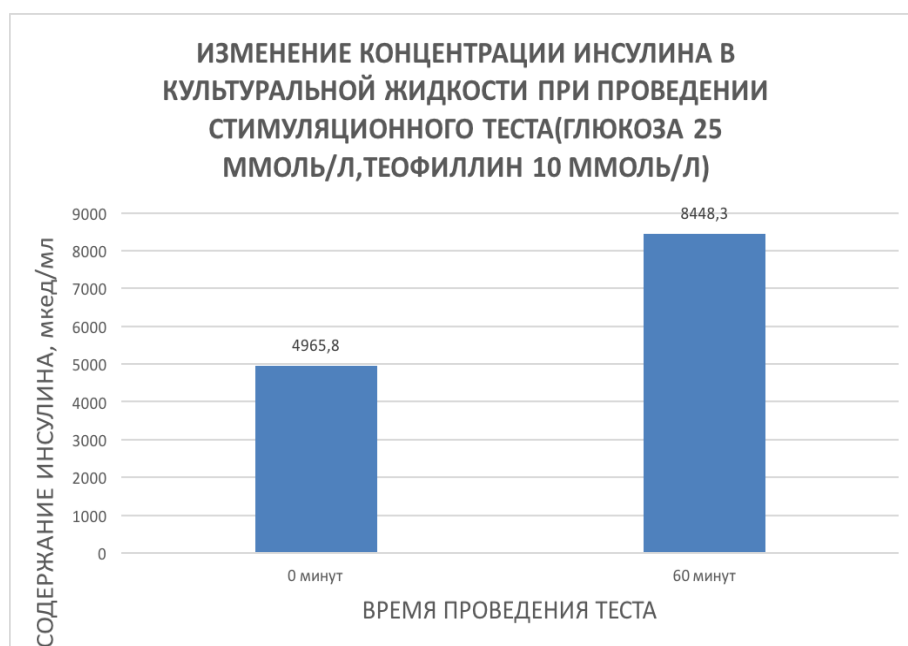


Рисунок 17 - Результаты стимуляционного теста на 10 сутки инкубации флотирующих островковоподобных культур.

Поэтому такие органотипические культуры, которые были названы нами флотирующими островковоподобными культурами (ФОК), стали использоваться в настоящем исследовании в качестве основного компонента ТИК ПЖ.

## **3.2. Изучение влияния биоматриксков на флотирующие островковоподобные культуры при их совместной инкубации *in vitro***

### ***3.2.1. Изучение влияния каркаса в виде пористых дисков на флотирующие островковоподобные культуры поджелудочной железы***

При совместной инкубации флотирующих островковоподобных культур (ФОК) и четырех пористых дисков (ПД), помещенных по одной в лунки культурального планшета, как показали 7-дневные наблюдения с помощью инвертированного микроскопа, не было отмечено признаков прикрепления или другого взаимодействия островковых клеток и матрикса из PLGA7507.

С целью облегчения контакта культур с волокнистыми структурами этого каркасного матрикса другие 8 полилактогликолидных дисков подвергли произвольному механическому «разволокнутию» путем их растягивания с помощью хирургических пинцетов, вплоть до получения в значительной степени отдельных филаментов. Кроме того, с целью создания более комфортных условий для совместной инкубации ПД и ФОК в этом опыте по два диска (теперь уже разволокненные) с культурами помещали не в лунки планшета, а в 4 оригинальные культуральные пробирки конической формы с горизонтальным дном площадью 10 см<sup>2</sup> (фирма ТРР, Швейцария).

Лишь в этих измененных условиях в первые несколько дней наблюдения у краев ПД происходило некоторое скапливание ФОК (Рисунок 18А). Однако отчетливого прикрепления культур к матриксу отмечено не было. В то же время группы островковых клеток, мигрировавших из ФОК в процессе их инкубации с ПД, проявили определенное сродство к полилактогликолидным филаментам (Рисунок 18Б) и начинали прикрепляться к поверхности волокон, как одиночных, так и их сплетений в пределах разволокненных ПД (Рисунок 19).

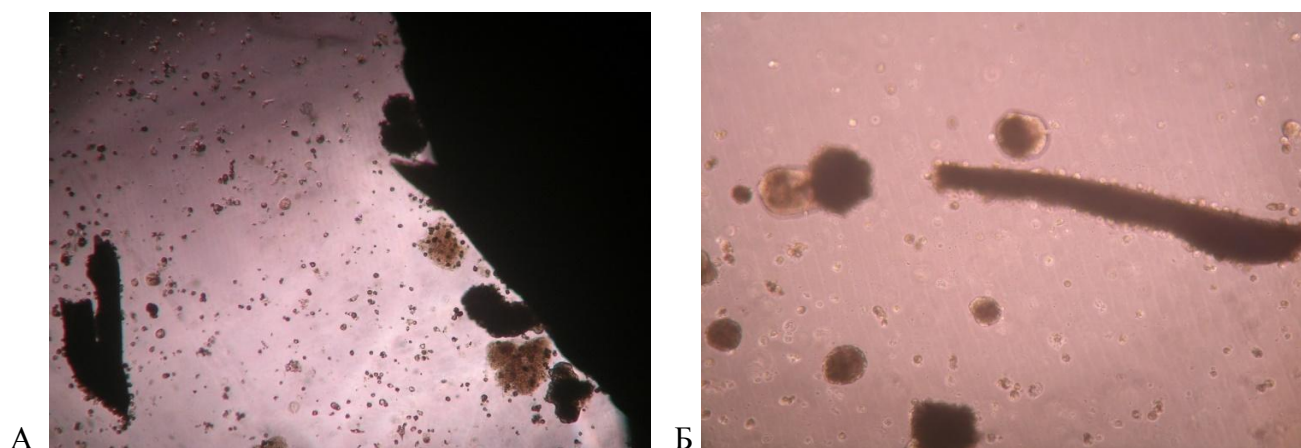


Рисунок 18 - Пятые сутки совместной инкубации ФОК и ПД. А. Скопление ФОК у поверхности ПД. Б. Прикрепление островковых клеток, мигрировавших из ФОК, к обрывкам волокон. Инвертированный микроскоп. Увеличение  $\times 100$ .

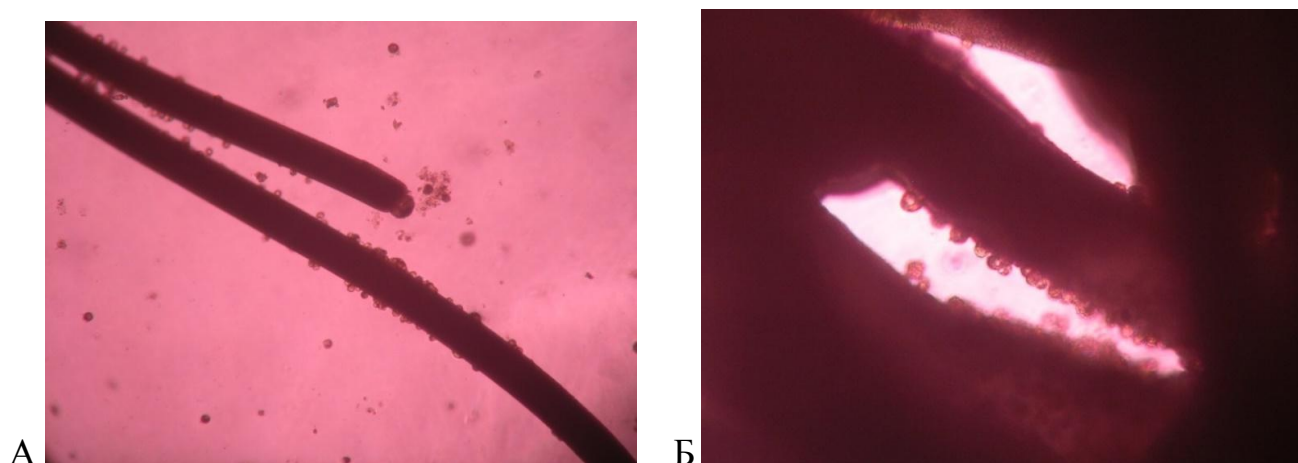


Рисунок 19 - Пятые сутки совместной инкубации ФОК и ПД. Активное прикрепление мигрировавших островковых клеток к поверхности, как отдельных волокон, так и их сплетений внутри ПД. Увеличение 40 (А), 200 (Б).

Однако к исходу 10-дневной совместной инкубации ФОК и ПД было отмечено открепление клеток от волокон и их последующая деградация (Рисунок 20).





Рисунок 20 - Десятые сутки совместной инкубации ФОК и ПД. Открепление островковых клеток от волокнистого фрагмента ПД. Массовая деградация одиночных, в том числе открепившихся клеток. Увеличение x 100.

Следует отметить, что в процессе гистологической обработки не удалось сохранить целостность ПД, так как при проведении через хлороформ происходило их растворение, а при альтернативном проведении через толуол – грубая деструкция. Однако главной целью морфологического исследования было определение структурной целостности клеточного материала и лишь во вторую очередь – матрикса. Как видно из представленных препаратов, сохранились лишь слабо окрашенные эозинофильные волокнистые структуры, более похожие на нити или волоски (рис. 21А), которые практически не содержали на своей поверхности клеточные элементы. Свободно плававшие в культуральной среде кластеры островковых клеток и островковоподобные культуры превратились при этом в детрит (Рисунок 21Б).

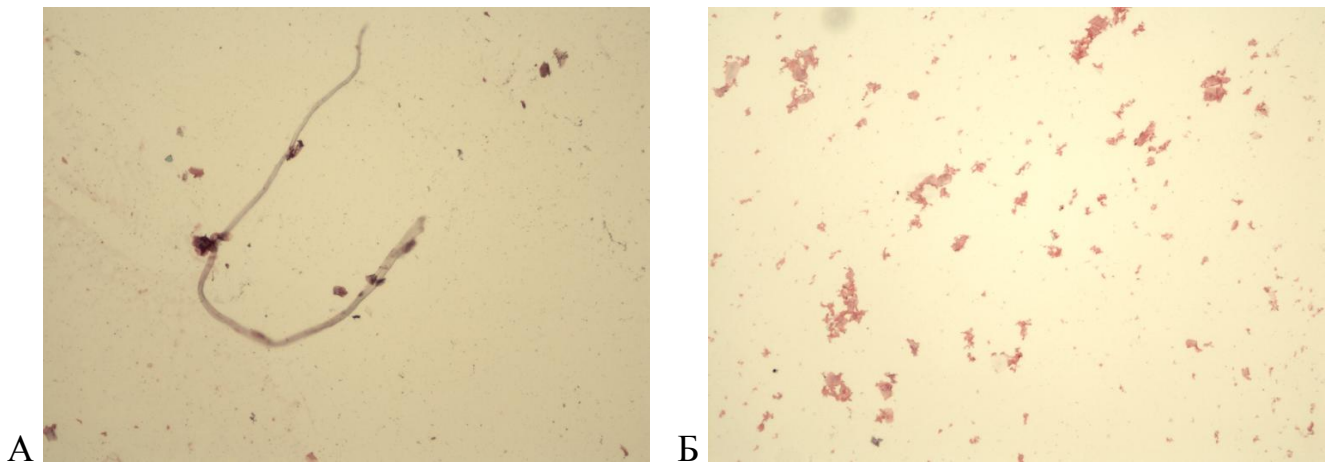


Рисунок 21 - А. Десятые сутки совместной инкубации ФОК и ПД.. Окрашивание гематоксилином и эозином. Увеличение x 100.

В то же время при контрольной инкубации (без ПД) ФОК, полученные из поджелудочной железы новорожденных кроликов, сохранили полную структурную целостность (Рисунок 22), несмотря на длительный (24 дня) срок их культивирования.

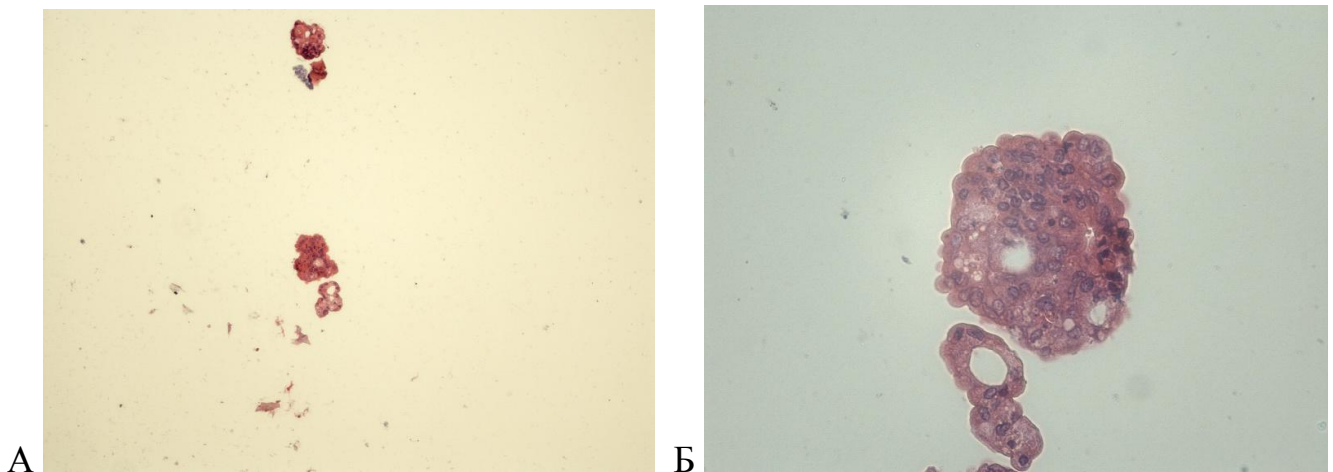


Рисунок 22 - Флотирующие островковоподобные культуры поджелудочной железы новорожденных кроликов с сохраненной структурой (контроль) на 24 сутки инкубации. Окрашивание гематоксилином и эозином. Увеличение x 100 (А); x 400 (Б).

Таким образом, проведенные эксперименты показали, что в течение 5-7 суток совместного культивирования ФОК и матрикса из PLGA7507 сохранялась высокая степень адгезии мигрировавших островковых клеток к филаментам матрикса. Это в определенной степени свидетельствовало о сродстве клеток к материалу матрикса, а их нахождение внутри пористых дисков о достаточной комфортности локального микроокружения. Однако в дальнейшем, как это происходило с описанными выше суспензионными культурами, состоявшими из мигрировавших островковых клеток, происходила их дегенерация и апоптоз. Это еще раз показало, что без природного микроокружения, имеющегося в островках, отдельные островковые клетки и даже их скопления не способны длительно выживать в условиях *in vitro*.

Если клетки-мигранты продемонстрировали хоть непродолжительную, но очевидную тенденцию к прикреплению к филаментам пористых дисков, то ФОК такого сродства не показали. Мало того, у них была отмечена весьма непродолжительная жизнеспособность (менее 10 суток) при совместной инкубации с ПД. Это было показано с помощью соответствующих, описанных выше, морфологических исследований (Рисунки 21, 22).

Косвенным признаком отрицательного влияния ПД можно считать миграцию островковых клеток из ФОК, которую можно расценить как вынужденное бегство клеток от неблагоприятных для них условий. Попытка клеток-мигрантов найти более благоприятные условия для своего выживания путем прикрепления к волокнистым структурам ПД, не дала продолжительного эффекта: через несколько суток произошло открепление клеток с последующей их деструкцией. Если низкую жизнеспособность отдельных клеток можно объяснить их разрозненностью и отсутствием достаточной кооперации, требуемой для формирования островковоподобной структуры, необходимой для «коллективного выживания», то деградация ФОК при благополучном выживании аналогичных культур в контроле (без присутствия ПД) заставляет сделать вывод о неблагоприятном долговременном влиянии испытанного матрикса на культуры и, следовательно, о его непригодности как компонента ТИК.

### ***3.2.2. Исследования по определению взаимного влияния биополимерного микрогетерогенного коллагенсодержащего гидрогеля и флолирующих островковоподобных культур***

С целью определения наилучших условий совместимости ФОК с биополимерным микрогетерогенным коллагенсодержащим гидрогелем (БМКГ) использовали культуры с различным сроком их формирования – от 7 до 14 суток. Оказалось, что наиболее подходящими для взаимодействия с испытуемым биоматриксом являются культуры со сроком инкубации не менее 12 суток. Оказалось, что при использовании 7-10-дневных культур уже на 4-6 сутки совместной инкубации происходило растворение основной массы БМКГ, что не позволяло надеяться на создание полноценной и стабильной ТИК ПЖ.

По-видимому, причиной этой преждевременной резорбции биоматрикса явилось переваривающее действие протеолитических ферментов, освобождавшихся при разрушении в процессе гибели экзокринных клеток, которые еще сохранились к 7-10-дневному сроку инкубации в культивируемых панкреатических микрофрагментах.

При использовании в опытах по сокультивированию 12-14-дневных ФОК с БМКГ резорбция последнего происходила медленно, что позволяло в течение достаточно продолжительного времени определить преимущества, которые, предположительно, должен был дать культурам непосредственный и длительный контакт с биоматриксом, по сравнению с ФОК, инкубируемыми без воздействия БМКГ.

Вскоре после начале совместного культивирования ФОК оседали на дно культурального флакона, равномерно покрытого БМКГ (Рисунок 23А). При этом, если в начале инкубации культуры собирались группами, как бы стремясь к определенной кооперации, то в последующие дни они более или менее равномерно распределялись по поверхности биоматрикса и, найдя, по-видимому, благоприятные для выживания и функционирования условия, прикреплялись к этому биосовместимому субстрату (Рисунок 23Б).

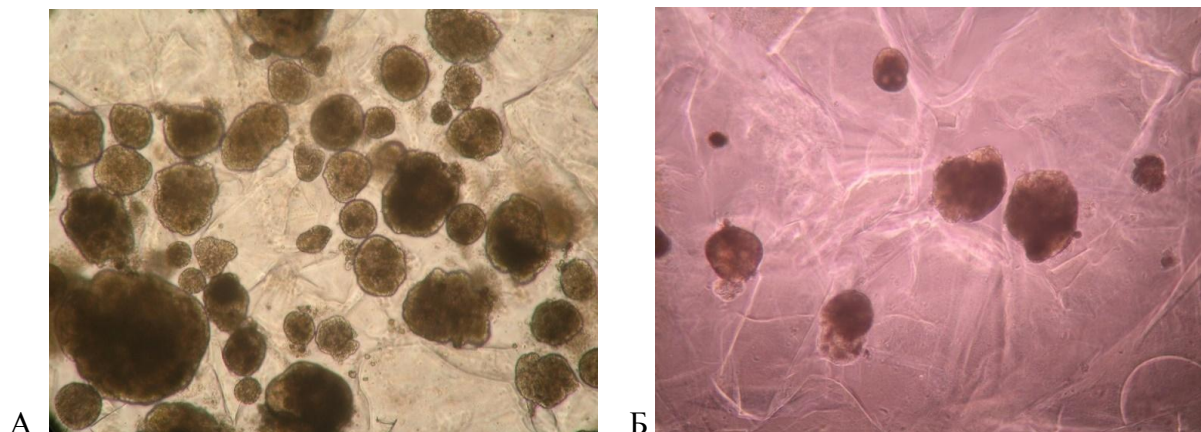


Рисунок 23 - Оседание (А) и прикрепление (Б) ФОК поджелудочной железы новорожденным кроликам к поверхности биоматрикса. Инвертированный микроскоп. Увеличение x 40.

При совместной инкубации ФОК и БМКГ, в процессе формирования ТИК ПЖ, отмечалась ожидаемая медленная резорбция основных масс гидрогелевого биоматрикса с сохранением к 2-недельному сроку определенного количества его остатков, на которых плотно и надежно закрепились жизнеспособные культуры (Рисунок 24).

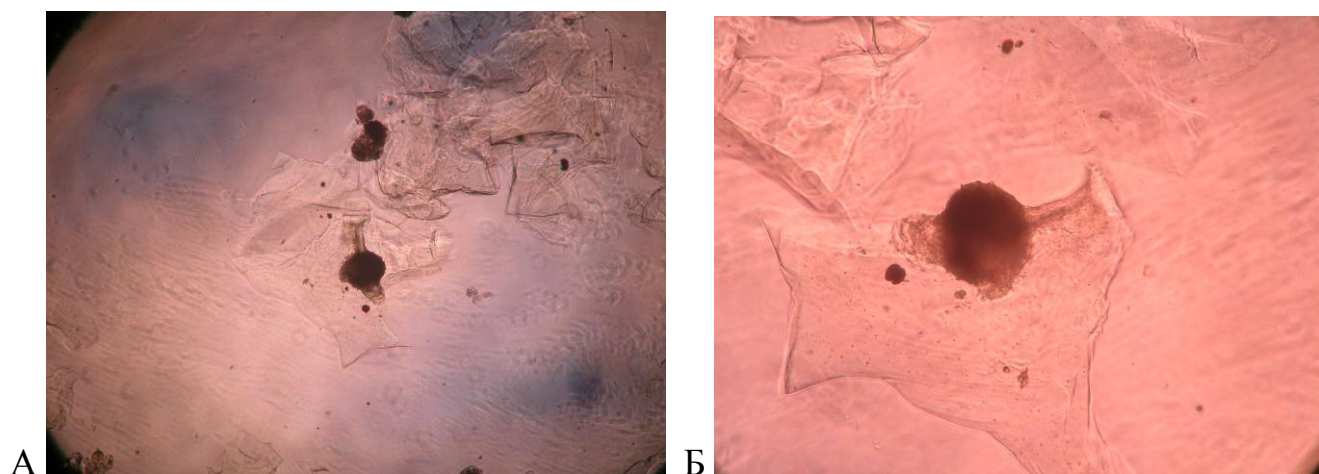


Рисунок 24 - Сохранение плотного контакта ФОК и БМКГ на фоне резорбции основных масс биоматрикса. Инвертированный микроскоп. Увеличение x 40 (А); x 100 (Б).

В процессе формирования ТИК после прикрепления части ФОК к поверхности биоматрикса происходило их "распластывание", которое, вероятно, обеспечивало наилучшие условия для выживания и сохранения функции островковых клеток (Рисунок 25).

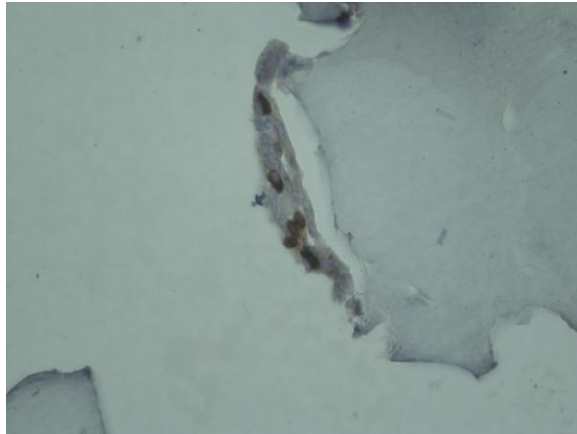


Рисунок 25 - Прикрепление ФОК к биоматриксу. Иммунопозитивное окрашивание  $\beta$ -клеток антителами к инсулину. Увеличение  $\times 100$ .

Создавалось впечатление, что осевшие культуры расположились на матриксе как на подложке, которая обеспечивает им не только механическую поддержку, но и оказывает по отношению к ФОК определенную трофическую функцию. Это можно объяснить, в частности, наличием в составе биоматрикса *Сферо®ГЕЛЬ* природного коллагена, который, как известно, в норме присутствует в развивающейся поджелудочной железе и участвует в развитии структуры островков, о чем свидетельствует его близость к инокуляции кластеров инсулин- и глюкагонпозитивных клеток [217]. Возможно, отсутствием такого взаимодействия можно объяснить результаты параллельной инкубации ФОК в обычных условиях – без добавления к биоматриксу. Как показали наблюдения с использованием инвертированного микроскопа, в конце 4-недельного срока (в том числе – 2 недель параллельно опыту сокультивирования ФОК и БМКГ) культуры без БМКГ сохраняли внешнюю компактность и целостность, однако морфологические исследования выявили признаки центрального некроза и сниженную жизнеспособность сохранившихся островковых клеток.



Таким образом, морфофункциональный альянс ФОК и БМКГ создал подходящие условия для формирования ТИК ПЖ. При этом, как показали гистологические и иммуногистохимические исследования, на протяжении достаточно длительной (2 недели) инкубации в ТИК ПЖ сохранялись не только  $\beta$ -клетки (рис. 26), но и панкреатические прогениторные клетки (Рис. 27).

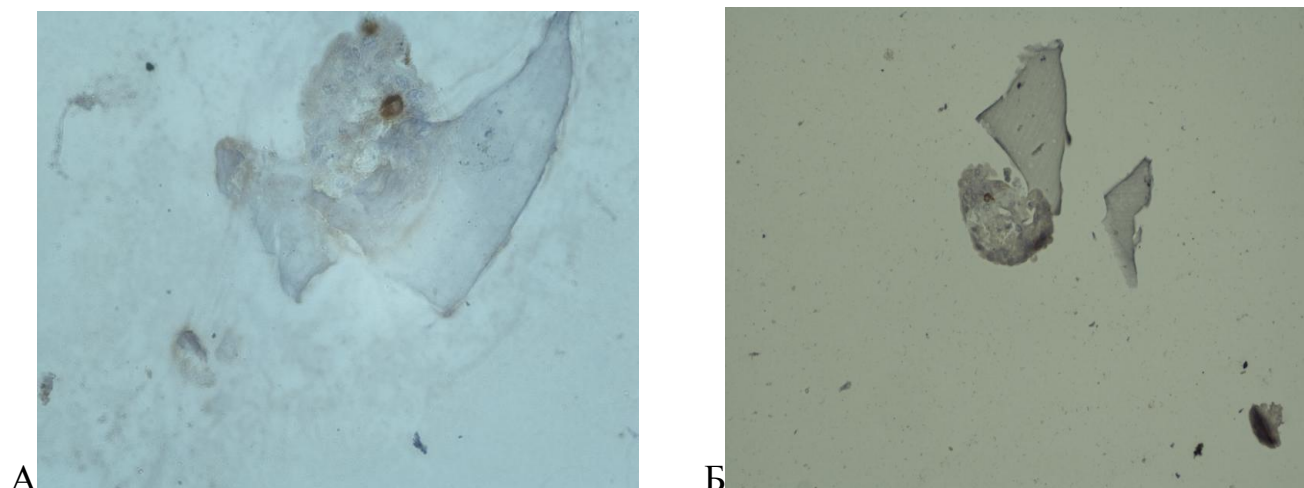


Рисунок 26 - ТИК ПЖ. Иммунопозитивное окрашивание на инсулин. Увеличение x 200 (А); x 100 (Б).

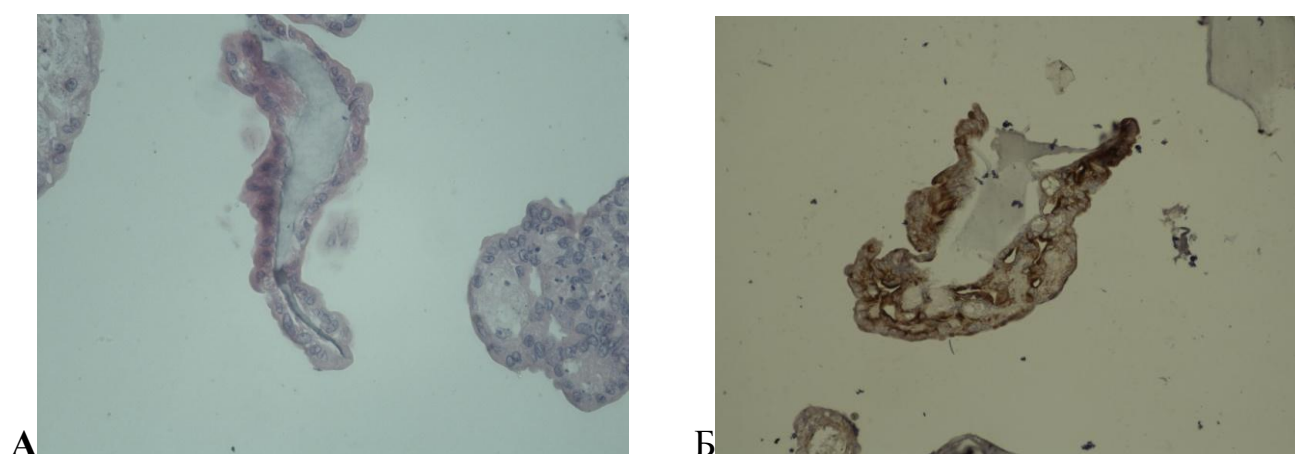


Рисунок 27. ТИК ПЖ. А. Окрашивание гематоксилином и эозином. Увеличение x 200. Б. Иммунопозитивное окрашивание на цитокератин 19. Увеличение x 200.

Подтверждением наличия значительного количества гормонально-активных  $\beta$ -клеток в тканевом компоненте ТИК ПЖ явились результаты анализа проб культуральной жидкости, взятых при инкубации ТИК ПЖ (Рисунок 28). На 7 сутки культивирования базальная концентрация инсулина, которая составила 2380 мкед./мл, после стимуляции «гипергликемическим» уровнем глюкозы (25 ммоль/л) и теofilлином (10 ммоль/л) увеличилась до 3190 мкед./мл.



Рисунок 28. Результаты стимуляционного теста, выполненного на 7 сутки инкубации тканеинженерной конструкции поджелудочной железы.

Одновременно, в процессе получения ТИК ПЖ, при совместной инкубации культур, полученных из ПЖ новорожденных кроликов, с биоматриksom, вокруг части прикрепившихся культур формировались эпителиоподобные однослойные зоны роста (Рисунок 28).



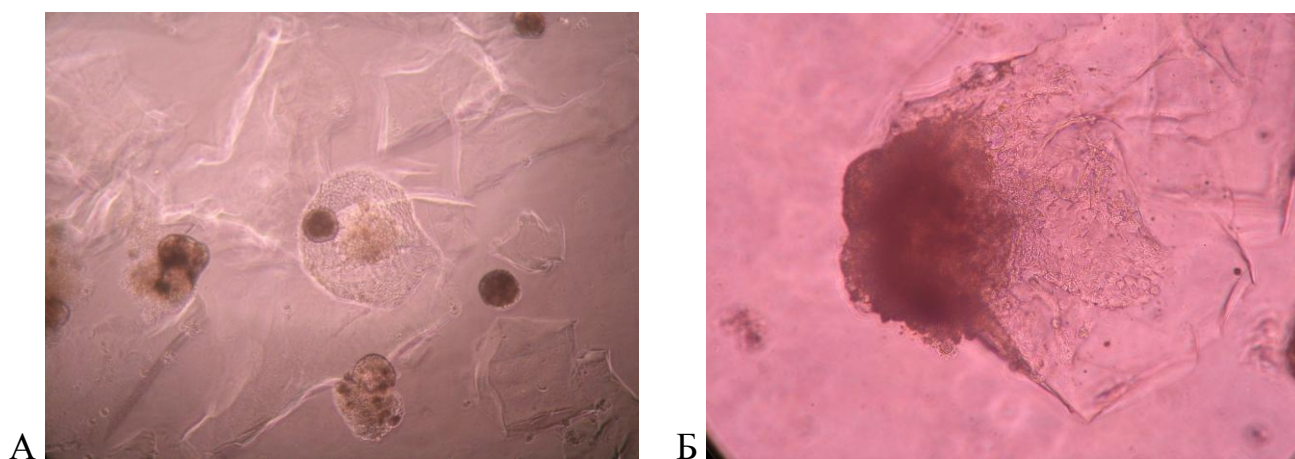


Рисунок 29 - Формирование зоны роста вокруг ФОК, прикрепившихся к биоматриксу. Инвертированный микроскоп. Увеличение x 40 (А); x 100 (Б).

На основании ранее проведенных исследований [231, 232] можно с большой долей вероятности предположить, что клетки, входящие в образовавшийся монослой, происходят из протокового эпителия и являются прогениторными клетками ПЖ, то есть предшественниками островковых клеток.

То, что именно БМКГ оказывает стимулирующее действие на образование этих клеток, доказывает отсутствие формирования однослойных культур при инкубации флотирующих культур в бессывороточной среде без добавления БМКГ. Так как для получения культур прогениторных клеток протокового происхождения обычно используют эмбриональную фетальную сыворотку, можно сделать вывод о том, что *Сферо*®ГЕЛЬ сам по себе способен быть отличным стимулятором роста прогениторных клеток ПЖ и в определенной степени заменить трофическое действие сыворотки.

Проведенные исследования показали, что присутствие БМКГ не только не оказывает токсического воздействия, но благоприятно сказывается на выживании ФОК, полученных из ПЖ новорожденных кроликов. При этом сохраняются структурные особенности и гормональная способность, характерные для нативных панкреатических островков. Такое взаимное позитивное влияние ФОК и гидрогелевого биоматрикса создало необходимые условия для формирования тканеинженерной конструкции поджелудочной железы. В процессе довольно

длительной инкубации, несмотря на постепенную прогрессирующую резорбцию основных масс БМКГ, его остатки, которые контактировали непосредственно с ФОК, не растворялись “до последнего“, что позволило полагать, что позитивное влияние этих двух составляющих формирующейся ТИК было взаимным. Именно эта комбинация тканевого и матричного компонентов была нами определена как модель ТИК ПЖ.

Кроме того, совместная инкубация ФОК с биоматриком в бессывороточной ростовой среде приводит к формированию однослойных культур, которые, по всей видимости, состоят из прогениторных клеток ПЖ, являющихся, как известно, предшественниками островковых клеток.

Не только в теоретическом, но и в практическом плане важен тот факт, что использованный нами биоматрикс не только способствует длительному сохранению морфо-функциональных свойств ФОК, являющихся тканевым компонентом разработанной нами ТИК ПЖ, но и способствует росту прогениторных панкреатических клеток. Это позволяет надеяться на то, что с помощью БМКГ матрикса можно будет существенно увеличить количество островковых клеток, пригодных для последующей их трансплантации. Это должно произойти не только благодаря повышению выживаемости островковых клеток, но и в результате дифференцировки прогениторных клеток, входящих в состав ФОК, и представляющих как бы "второй эшелон" островковых клеток, которые могут поддержать или даже усилить антидиабетическое действие имплантированной ТИК ПЖ.

### **3.3. Результаты моделирования экспериментального сахарного диабета 1 типа с помощью стрептозотоцина**

В первой группе крыс (n=30), которым стрептозотин ввели внутрибрюшинно однократно в дозе 70 мг на 1 кг массы тела, двое животных погибли на 5-7 сутки при отсутствии характерных признаков диабетического статуса, но при этом измерение гликемии показало очень низкий ее уровень –

менее 2,9 ммоль/л, что свидетельствовало о том, что смерть животных наступила, скорее всего от гипогликемической комы, которая могла развиваться у них вследствие массового разрушения  $\beta$ -клеток после введения стрептозотоцина и выбросом в кровотоки больших количеств содержащегося в этих клетках инсулина.

Кроме этих крыс погибли еще четверо, но летальный исход наступил у них на 9-14 сутки на фоне тяжелой гипергликемии (более 33,3 ммоль/л). Объективное состояние у этих 4 крыс при этом соответствовало тяжелому диабетическому статусу: значительная потеря массы тела, резко выраженная общая слабость, гиподинамия, огромное количество выпиваемой воды и, соответственно, массивная полиурия, диарея, выпадение, истончение волос и пожелтение шерсти, трудность взятия капиллярной крови для анализа из-за сгущения крови вследствие сильнейшего обезвоживания, склонность к образованию гнойников.

В связи с гибелью 6 животных (20 % от общего числа), наступившей, скорее всего, в результате гипогликемической комы у 2 крыс и гипергликемической комы у 4 крыс, они были исключены из анализа результатов опыта (Таблица 2).

К концу 8-недельного наблюдения (срок опыта) выраженные признаки диабетического статуса сохранялись у 17 животных (№ 1, 2, 3, 4, 6, 8, 11, 12, 13, 16, 17, 19, 20, 23, 25, 28, 30), что составило 56,6 % крыс этой группы, и гликемия у них составила в среднем 24,6 ммоль/л.

У оставшихся 7 крыс клинические признаки диабета были выражены весьма умеренно, и в последние 2-3 недели наблюдения у них была отмечена тенденция к снижению концентрации глюкозы в крови вплоть до субнормальных цифр (в среднем 12,3 ммоль/л). Примечательно, что у всех этих 7 крыс (№ 5, 7, 10, 21, 24, 26 и 27), которые составили 23,3 % от общего количества животных этой группы, гипергликемия не превышала 20 ммоль/л (Рисунок 30).

Таблица 2 - Изменения гликемии (ммоль/л) у крыс (n=24) после однократного введения стрептозотоцина

№ крысы	Недели после введения стрептозотоцина, гликемия (ммоль/л)								
	0	1	2	3	4	5	6	7	8
1	5,7	12,9	<b>23,6</b>	26,7	24,4	27,4	25,5	25,4	<b>24,0</b>
2	4,9	25,8	<b>28,7</b>	29,2	30,3	31,9	31,7	28,1	<b>30,2</b>
3	6,0	21,6	<b>22,0</b>	26,5	31,8	30,7	31,5	29,8	<b>30,9</b>
4	5,5	22,8	<b>25,1</b>	24,9	22,2	23,0	20,6	26,9	<b>23,8</b>
5	6,7	13,1	<b>16,0</b>	14,7	15,2	14,1	12,7	13,3	<b>11,6</b>
6	5,0	13,6	<b>21,1</b>	19,6	24,7	21,9	23,4	21,8	<b>21,9</b>
7	5,8	14,9	<b>18,2</b>	16,1	14,6	12,7	14,0	12,8	<b>12,7</b>
8	4,7	12,2	<b>21,9</b>	18,2	23,1	22,6	24,0	22,5	<b>23,4</b>
10	5,4	13,4	<b>19,2</b>	17,8	17,6	16,9	14,2	13,3	<b>12,4</b>
11	7,3	16,7	<b>30,6</b>	29,1	29,8	29,3	30,1	30,5	<b>29,9</b>
12	7,7	15,5	<b>26,9</b>	27,1	27,4	25,0	27,6	27,0	<b>27,3</b>
13	6,4	23,1	<b>25,1</b>	26,4	26,0	25,9	26,1	25,7	<b>26,1</b>
16	6,8	18,8	<b>25,9</b>	26,6	27,0	26,1	26,5	26,9	<b>26,3</b>
17	5,8	23,3	<b>28,4</b>	29,0	29,2	28,8	28,5	29,1	<b>28,9</b>
19	6,2	18,6	<b>28,3</b>	27,1	28,4	28,7	27,9	28,1	<b>28,8</b>
20	4,6	14,9	<b>27,0</b>	25,5	25,0	24,1	27,1	28,4	<b>27,7</b>
21	5,7	12,2	<b>14,5</b>	16,0	16,7	12,2	13,1	11,4	<b>12,5</b>
23	5,7	22,0	<b>31,1</b>	32,6	33,3	33,3	32,8	32,9	<b>32,4</b>
24	4,3	16,1	<b>14,4</b>	12,6	13,4	12,8	12,8	11,5	<b>10,7</b>
25	7,1	22,0	<b>26,5</b>	26,1	25,8	23,0	25,3	24,9	<b>24,1</b>
26	5,9	13,1	<b>17,1</b>	18,6	14,5	12,9	13,0	11,1	<b>10,4</b>
27	5,6	12,9	<b>16,7</b>	15,3	13,3	13,6	11,9	10,8	<b>9,7</b>
28	6,8	16,6	<b>27,4</b>	27,0	25,8	26,1	26,2	26,9	<b>26,2</b>
30	5,9	16,1	<b>22,4</b>	21,1	21,4	20,7	21,9	20,9	<b>21,3</b>
М	5,9	17,2	<b>23,3</b>	<b>23,1</b>	<b>23,4</b>	<b>22,7</b>	<b>22,9</b>	<b>22,5</b>	<b>22,2</b>
σ	0,9	4,2	<b>5,1</b>	<b>5,6</b>	<b>6,2</b>	<b>6,7</b>	<b>7</b>	<b>7,4</b>	<b>7,6</b>

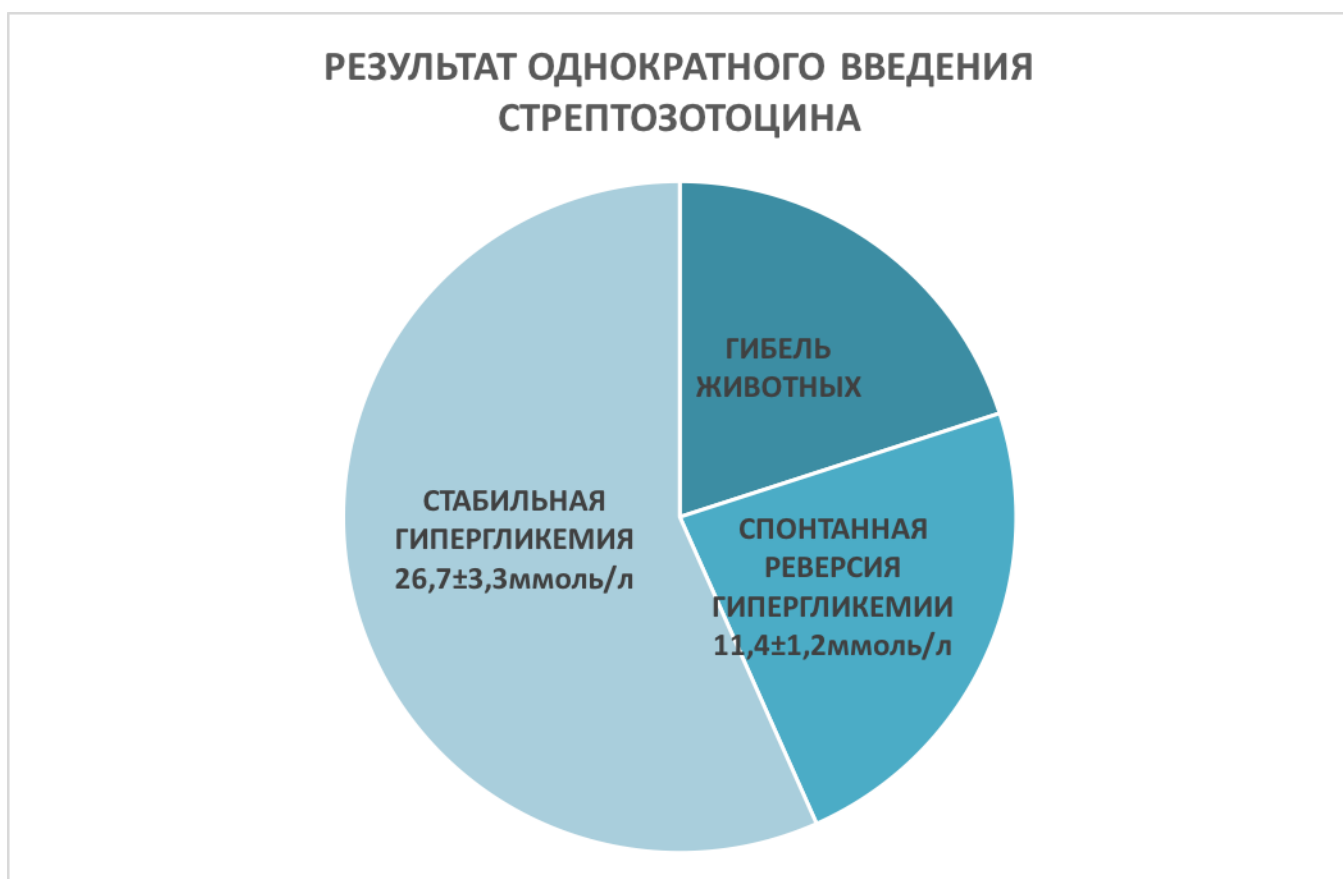


Рисунок 30 - Распределение животных по результатам действия однократного внутрибрюшинного введения стрептозотоцина в дозе 70 мг/кг.

Таким образом, можно сделать вывод о том, что однократное внутрибрюшинное стрептозотоцина в рекомендованной дозе (70 мг/кг) может привести к гибели в результате развития как гипогликемической, так и гипергликемической (гиперосмолярной) комы у 20 % крыс животных. Стойкая, но не смертельная гипергликемия установилась немногим более, чем у половины оставшихся в живых крыс, и их можно было использовать в качестве реципентов или контроля.

Еще у почти четверти крыс этой группы наступала частичная реверсия диабетического статуса; при этом у всех у них через 2 недели после введения стрептозотоцина уровень гипергликемии не превышал 20 ммоль/л. Поэтому таких животных не следует использовать в опытах по изучению эффективности какого-либо антидиабетического лечения, так как возможна неправильная трактовка результатов из-за спонтанного выраженного снижения гипергликемии.

Таблица 3 - Изменения гликемии после дробного введения стрептозотоцина

№ крысы	Недели после введения стрептозотоцина, гликемия (ммоль/л)								
	0	1	2	3	4	5	6	7	8
1	5,1	12,9	<b>23,6</b>	26,7	28,4	27,4	25,5	25,4	<b>24,0</b>
2	4,7	15,8	<b>25,7</b>	27,2	25,3	23,9	23,9	24,1	<b>23,2</b>
3	4,3	11,6	<b>22,0</b>	23,5	21,8	20,7	21,5	19,8	<b>20,9</b>
4	5,5	12,8	<b>25,1</b>	24,9	25,2	23,0	25,6	26,9	<b>23,8</b>
5	6,1	13,1	<b>26,0</b>	24,4	23,0	24,1	26,7	28,3	<b>27,6</b>
6	4,8	13,6	<b>21,1</b>	19,6	24,7	21,9	23,4	21,8	<b>20,1</b>
7	5,9	14,9	<b>18,2*</b>	16,8	17,6	12,7	14,0	12,8	<b>12,7</b>
8	6,7	20,2	<b>21,9</b>	21,2	23,1	22,6	24,0	22,5	<b>23,4</b>
9	5,3	20,1	<b>24,4</b>	23,8	26,1	25,7	23,3	22,5	<b>22,7</b>
10	5,1	13,4	<b>17,2*</b>	14,8	17,6	16,9	14,2	13,3	<b>12,4</b>
11	5,9	20,7	<b>27,8</b>	26,1	25,1	27,2	26,0	28,7	<b>27,4</b>
12	4,8	13,7	<b>21,7</b>	19,8	22,2	23,7	24,5	24,5	<b>25,1</b>
13	4,4	17,3	<b>26,6</b>	27,4	28,5	26,8	27,0	28,4	<b>28,2</b>
14	5,2	15,9	<b>22,7</b>	25,0	24,6	26,6	25,3	24,7	<b>25,5</b>
15	4,1	19,1	<b>25,5</b>	23,9	24,4	24,6	25,1	24,9	<b>25,0</b>
16	5,9	19,8	<b>26,6</b>	25,9	26,7	26,9	27,3	27,9	<b>28,3</b>
17	4,9	12,9	<b>24,8</b>	23,0	24,9	24,4	25,7	26,0	<b>26,3</b>
18	6,1	19,3	<b>28,3</b>	29,1	30,0	29,9	29,6	29,8	<b>30,1</b>
19	5,8	13,3	<b>21,5</b>	23,3	23,0	22,7	22,2	22,0	<b>21,7</b>
20	5,5	13,3	<b>22,1</b>	19,4	23,3	23,5	24,1	23,9	<b>24,6</b>
21	4,0	14,8	<b>23,4</b>	19,9	22,1	22,8	23,4	23,8	<b>23,7</b>
22	5,1	13,7	<b>25,3</b>	25,5	19,9	24,9	24,0	23,9	<b>23,8</b>
23	5,4	13,9	<b>22,5</b>	22,5	24,8	25,6	26,4	25,8	<b>26,1</b>
24	<b>4,7</b>	17,3	<b>24,6</b>	25,6	24,1	24,9	25,0	24,7	<b>24,5</b>
25	<b>3,9</b>	14,6	<b>22,2</b>	20,6	21,8	18,8	21,0	21,6	<b>23,7</b>
26	<b>5,1</b>	16,8	<b>23,3</b>	26,1	24,4	23,1	23,8	24,9	<b>25,3</b>
27	<b>5,4</b>	13,1	<b>21,8</b>	23,1	23,4	20,9	19,9	20,3	<b>19,7</b>
28	<b>5,9</b>	21,2	<b>27,7</b>	28,4	28,4	26,7	26,3	26,9	<b>26,0</b>
29	<b>4,4</b>	13,4	<b>23,1</b>	24,5	23,0	23,7	24,6	22,9	<b>22,6</b>
30	<b>4,8</b>	16,1	<b>22,4</b>	23,3	21,2	19,8	20,4	20,8	<b>20,2</b>
M	<b>5,1</b>	<b>15,6</b>	<b>23,6</b>	<b>23,5</b>	<b>24,0</b>	<b>23,6</b>	<b>23,8</b>	<b>23,8</b>	<b>23,6</b>
σ		<b>2,8</b>	<b>2,6</b>	<b>3,3</b>	<b>2,8</b>	<b>3,4</b>	<b>3,3</b>	<b>3,8</b>	<b>3,9</b>

Гораздо более обнадеживающие результаты в отношении достижения стабильного течения сахарного диабета при минимальной потере животных дали наблюдения за крысами из 2-й группы (n=30), которым было осуществлено дробное введение стрептозотоцина в той же (суммарно) дозе – 70 мг/кг. Такой способ индукции экспериментального сахарного диабета с помощью стрептозотоцина, как оказалось, имеет ряд преимуществ.

Во-первых, ни у одного из животных не было отмечено развитие гипогликемического состояния, что можно объяснить отсутствием вероятности массовой гибели  $\beta$ -клеток и высвобождением из них больших количеств инсулина, так общая доза стрептозотоцина распределяется на 5 введений.

Во-вторых, также ни у одной из крыс не было зарегистрировано сверхвысоких уровней гликемии, которые сами по себе могли привести к гибели животных.

Наконец, лишь у 2 из 30 крыс (то есть в 6,6 % случаев) была отмечена тенденция к снижению развившейся после индукции сахарного диабета гипергликемии, причем у обоих животных (№ 7 и 10) через 2 недели после последнего введения стрептозотоцина была менее 20 ммоль/л (Таблица 3).

Таким образом, как при однократном, так и при дробном внутрибрюшинном введении стрептозотоцина определенной гарантией наступления необратимого стабильного диабетического статуса может служить регистрация у подопытных крыс гипергликемии, превышающей 20 ммоль/л через 2 недели после введения стрептозотоцина.

Однако дробное введение стрептозотоцина позволяет обеспечить стойкий диабетический статус у существенно большего процента животных (93,4%), подвергшихся индукции диабета, благодаря практическому исключению гибели животных как от гипогликемии, так и очень высокой гипергликемии и очень малой вероятности спонтанной реверсии диабета (Рисунок 31).

Поэтому именно методика с дробным введением стрептозотоцина была нами применена при формировании экспериментальной модели сахарного диабета 1 типа.

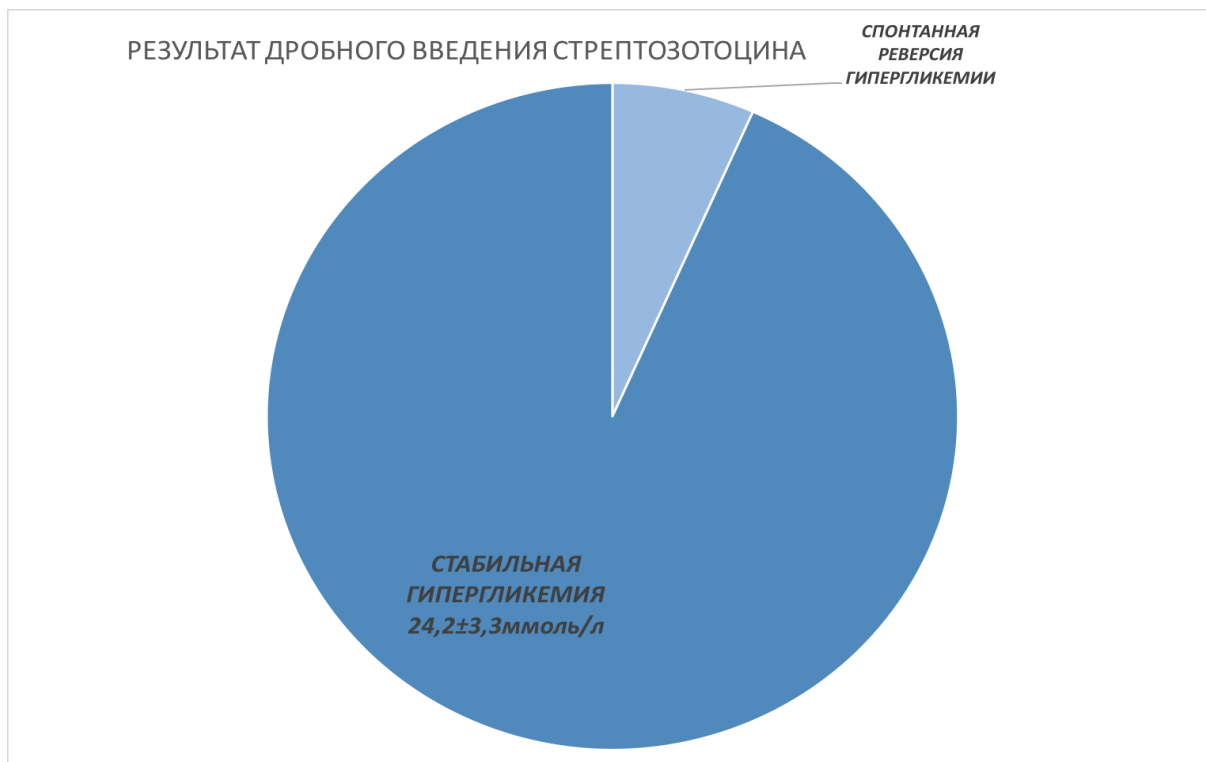


Рисунок 31 - Распределение животных по результатам действия дробного внутрибрюшинного введения стрептозотоцина: по 12 мг/кг/сут. в течение 5 дней.

### 3.4. Имплантация ТИК ПЖ в полость брюшины крысам с экспериментальным сахарным диабетом 1 типа

#### 3.4.1. Приготовление ТИК ПЖ

ТИК ПЖ приготавливали в соответствии с технологией, описанной в разделе «Материалы и методы» (2.3.2.).

#### 3.4.2. Подготовка животных с экспериментальным сахарным диабетом

Из 40 крыс линии Вистар, у которых путем дробного введения стрептозотоцина (см. подробное описание методики в разделе 2.4) в опыте использовали 32 крысы с гликемией выше 20 ммоль/л через 2 недели после последней инъекции стрептозотоцина. Этих животных разделили на 2 равных



по количеству и равноценных (по среднему содержанию глюкозы в крови) группы. В группу № 1 включили 16 крыс, которым однократно в полость брюшины ввели ТИК ПЖ в среде 199, в группу № 2 – 16 крыс, которым не проводилось никакого лечения (контроль).

### ***3.4.3. Влияние внутрибрюшинной имплантации ТИК ПЖ на течение экспериментального сахарного диабета у лабораторных крыс***

Наблюдение за всеми животными и измерение у них гликемии (как подопытных, так и контрольных) продолжалось 8 недель со времени выполнения имплантации ТИК ПЖ. Кроме определения постпрандиальной концентрации глюкозы в капиллярной крови и традиционного взвешивания, у крыс с наиболее выраженным диабетическим статусом проводили ориентировочное качественное определение ацетона в моче.

У 14 из 16 крыс подопытной группы после внутрибрюшинного введения ТИК ПЖ уже через 2 недели практически исчезли характерные клинические признаки сахарного диабета, такие как полидипсия, полиурия, диарея, истончение, пожелтение и выпадение шерсти, гиподинамия. Восстановилась прибавка в массе тела, которая по интенсивности даже стала превышать таковую у здоровых интактных животных.

При этом у указанных 14 крыс-реципиентов было отмечено ожидаемое существенное снижение уровня гипергликемии, и к исходу 4-5 недель содержание глюкозы в крови снизилось у большинства реципиентов примерно на 10-11 ммоль/л. В дальнейшем гликемия стабилизировалась на уровне, в среднем меньшим почти в 2 раза по сравнению с ее уровнем до имплантации, и к исходу запланированной 8-й неделе постимплантационного наблюдения составила в среднем по всей подопытной группе 13,7 ммоль/л (Таблица 4), что оказалось намного ниже исходного (перед введением ТИК ПЖ) среднего уровня (25,2 ммоль/л). Высокая степень значимости такого снижения гликемии ( $p < 0,05$ ) было подтверждено с помощью проведенного статистического анализа.

Таким образом, в результате проведения длительного (8 недель) наблюдения за крысами со стабильным экспериментальным сахарным диабетом, которым в полость брюшины имплантировали тканеинженерную конструкцию, состоящую из флотирующих островкоподобных культур, полученных из поджелудочной железы новорожденных кроликов, и биополимерного микрогетерогенного коллагенсодержащего гидрогеля, был получен отчетливый терапевтический эффект. Выраженное антидиабетическое действие выполненной имплантации оказалось стойким и продолжительным у 14 из 16 крыс-реципиентов, то есть почти в 90 % случаев.

Таблица 4. Изменения гликемии (ммоль/л) у крыс со стрептозотоциновым сахарным диабетом (n=16) после имплантации ТИК ПЖ в полость брюшины

№ крысы	Недели до(-) и после(+) имплантации ТИК ПЖ										
	(-)2	(-)1	0	(+)1	(+)2	(+)3	(+)4	(+)5	(+)6	(+)7	(+)8
3	21,2	23,9	<b>24,3</b>	21,8	19,9	18,1	16,4	12,3	10,7	10,1	<b>9</b>
4	16,6	25,8	<b>25,7</b>	23,5	19,2	16,1	15,3	14,2	13,9	13,8	<b>14,1</b>
6	25,2	22,9	<b>23,6</b>	16,7	18,4	17,4	15,5	15,4	14	14,9	<b>14,5</b>
7	24,6	25,8	<b>25,7</b>	19,2	15,3	13,9	11,7	14,1	13,2	11,6	<b>9,6</b>
8	24,3	21,6	<b>22</b>	16,5	11,8	10,7	11,5	9,8	10,9	9,9	<b>8,8</b>
10	26,6	22,8	<b>25,1</b>	24,9	22,2	23	20,6	16,9	13,8	11,4	<b>11,9</b>
11	20,3	21,6	<b>22</b>	21,1	19,9	15,8	14,8	14,2	13,9	13,8	<b>12,5</b>
12	27,7	23,1	<b>26</b>	21,4	21	24,1	12,7	13,3	11,6	10,2	<b>10,9</b>
13	16,9	23,2	<b>26,5</b>	25,3	24,9	22,8	22,4	19	18,4	18,1	<b>16,9</b>
15	24,4	23,6	<b>21,1</b>	19,6	14,7	11,9	13,4	11,8	10,1	13,7	<b>10</b>
18	25	24,9	<b>23,2</b>	22,1	24,6	20,7	14	12,8	12,7	14,8	<b>13,3</b>
19	17,7	23,1	<b>26</b>	24,8	21,4	20,7	20,1	16,6	14,3	14,9	<b>15</b>
20	24,4	28,6	<b>31,1</b>	30,3	26,6	20,4	14,7	14,9	15,8	16,1	<b>16,4</b>
21	18,3	24,7	<b>27,2</b>	23,8	22,1	23,4	24,6	22,7	22,1	22,5	<b>22,6</b>
28	23,1	30,2	<b>31,1</b>	30,4	28,2	25	21,1	21,6	21,4	20,9	<b>21</b>
39	23,1	22,2	<b>21,9</b>	18,2	13,1	12,6	14	12,5	13,4	9,8	<b>12,5</b>
M	<b>22,5</b>	<b>24,3</b>	<b>25,2</b>	<b>22,5</b>	<b>20,2</b>	<b>18,5</b>	<b>16,4</b>	<b>15,1</b>	<b>14,4</b>	<b>14,2</b>	<b>13,7</b>
σ	3,5	2,4	3	4,1	4,7	4,7	4	3,5	3,5	3,8	4

В контрольной группе у всех 16 животных на протяжении срока наблюдения отмечались выраженные клинические признаки сахарного диабета (Таблица 5). При этом высота гипергликемии через 2 недели и 8 недель после

введения стрептозотоцина практически не изменилась, составив соответственно  $24,8 \pm 2,7$  и  $24 \pm 2$  ммоль/л (различие статистически не значимое,  $p > 0,05$ ). В то же время, несмотря на высокий и длительный срок сохранения стойкого диабетического статуса, ни одна из крыс не погибла. Это можно объяснить тем фактом, что у этих животных, несмотря на повторные измерения вплоть до окончания эксперимента, не была зарегистрирована кетонурия. По-видимому, тяжесть состояния животных была связана не с развитием кетоацидоза, а с гиперосмолярностью крови, обусловленной высокой гипергликемией.

Таблица 5. Изменения гликемии (ммоль/л) у крыс со стрептозотоциновым сахарным диабетом (n=16) без лечения (контроль)

№ крысы	Недели до (-) и после (+) имплантации ТИК ПЖ										
	-2	-1	0	1	2	3	4	5	6	7	8
9	22,2	25,9	<b>26,1</b>	25,8	24	24,5	25,1	25,4	25	24,9	<b>22,2</b>
14	27,7	26	<b>26,9</b>	27,7	25,1	25,5	26,4	25,6	24,1	25,7	<b>25,4</b>
17	22,2	20,8	<b>19,8</b>	21	23,4	24	21,3	23,8	23,2	22	<b>21,3</b>
22	25,6	27,4	<b>28,9</b>	28,6	26,9	27,6	29,2	25,8	27	28,3	<b>26,7</b>
23	23,1	22,9	<b>22,9</b>	21,6	20,7	22,2	21,8	24,2	22,2	24,1	<b>22,5</b>
24	21,4	20,1	<b>22,1</b>	21,7	23,3	24	23,7	26,4	25,7	28,5	<b>25,4</b>
25	28,1	28,5	<b>29</b>	27,2	27,9	27,5	27,9	25,2	25,4	25,9	<b>25,9</b>
26	26,2	28	<b>28,2</b>	28	27,7	25,4	25,8	28,2	26	26,7	<b>25,4</b>
29	25,1	23,3	<b>24</b>	24,5	23,9	22,5	25,4	26,7	25,5	24,4	<b>22,2</b>
32	24,1	24,4	<b>23,6</b>	25,1	24,8	25	25,4	25	24,9	21,2	<b>25,7</b>
34	21,5	23,7	<b>24,1</b>	23,2	23,4	22,8	23,6	24,1	23,7	24,4	<b>23</b>
35	26,9	27,4	<b>26</b>	28,5	27,9	27,5	26,4	25,7	28,5	25,4	<b>26,2</b>
36	20,1	19,6	<b>21,1</b>	22,2	23,4	23,3	23,5	22,9	22,4	19,5	<b>20</b>
37	26,7	24,4	<b>23,9</b>	24,5	27,7	25,6	27	28,2	25,7	26	<b>24,8</b>
38	22,3	23,2	<b>24,4</b>	23,8	21,6	23,8	21,7	23	22,2	24,1	<b>24,1</b>
40	25,1	25,2	<b>26,2</b>	25,3	25	24,5	25,2	25,4	25,9	23,9	<b>24,3</b>
М	24,3	24,4	<b>24,8</b>	24,9	24,8	24,7	25	25,3	24,8	24,7	<b>24</b>
σ	2,5	2,8	<b>2,7</b>	2,6	2,3	1,7	2,3	1,6	1,8	2,4	<b>2</b>

Морфологические исследования ПЖ крыс из 2-й группы (экспериментальный сахарный диабет без лечения, контроль), выявил лишь единичные  $\beta$ -клетки в островках (Рисунок 32А), что подтвердило избирательное повреждение  $\beta$ -клеток стрептозотоцином при отсутствии признаков их видимой регенерации. Аналогичный анализ ПЖ подопытных животных с экспериментальным сахарным диабетом из 1-й группы (имплантация ТИК ПЖ), проведенный по окончании 8-недельного опыта, выявил отчетливые морфологические признаки регенерации  $\beta$ -клеток собственной ПЖ железы крыс-реципиентов (Рисунок 32Б).

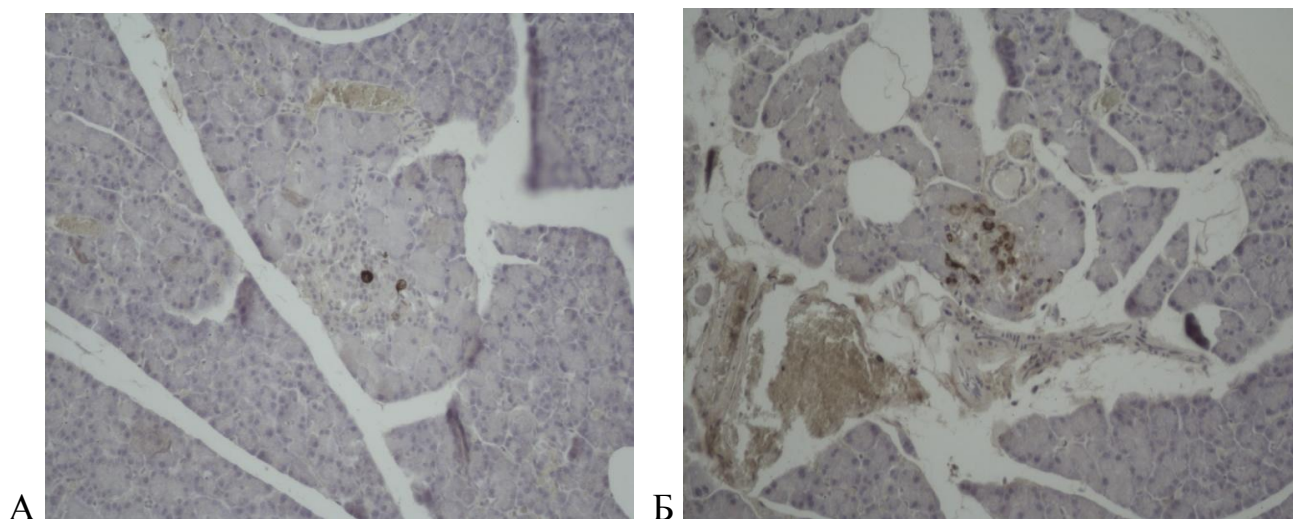


Рисунок 32. А. Единичные сохранившиеся  $\beta$ -клетки (в центре) в ПЖ крысы с сахарным диабетом (контроль). Б. Регенерация  $\beta$ -клеток в ПЖ крысы с сахарным диабетом через 8 недель после имплантации ТИК ПЖ. Иммуногистохимическое окрашивание антителами к инсулину. Увеличение  $\times 200$ .

Полученные данные позволили предположить получение комбинированного антидиабетического эффекта внутрибрюшинного введения ТИК ПЖ, обусловленного как непосредственным функционированием имплантата, так и его стимулирующим влиянием на регенерацию  $\beta$ -клеток в собственных островках крыс-реципиентов.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Основным, определяющим и, пожалуй, наиболее сложным по созданию компонентом любой тканеинженерной конструкции (ТИК) является ее тканевая (клеточная) составляющая. Если изначально она не обладает достаточной жизнеспособностью и функциональной способностью, то никакой матрикс, являющийся другим компонентом ТИК, не может в достаточной мере обеспечить ее успешное испытание *in vitro* и тем более *in vivo*. В связи с этим первоочередной задачей настоящего исследования, посвященного созданию модели ТИК поджелудочной железы (ПЖ), явилась разработка культуры островков (островковых клеток), обладающей способностью длительно сохранять необходимые морфофункциональные свойства. Для выполнения этой задачи было решено использовать в качестве донорского источника ПЖ кроликов, так как инсулин этих животных чрезвычайно близок по своей структуре и физиологическому действию инсулину человека [154]. Использование в качестве доноров именно новорожденных животных объясняется тем, что неонатальная ПЖ содержит в несколько раз больше эндокринной (островковой) ткани, чем ПЖ взрослых кроликов [230].

Для того чтобы определить наиболее рациональные подходы к получению культур островковых клеток, было решено провести наблюдение за морфологическим состоянием механически измельченной ткани ПЖ новорожденных кроликов с целью выявления изменений, происходящих как бы спонтанно при ее культивировании *in vitro*. Поэтому железу подвергали только очистке от соединительно-тканной капсулы, видимых сосудов и выводных протоков и микродиссекции, не применяя обработке каким-либо ферментным препаратом. При этом мы все-таки рассчитывали на то, что при измельчении панкреатической ткани последняя будет неизбежно подвергнута деликатному воздействию тех протеолитических ферментов, которые будут высвобождаться при механическом разрушении экзокринных клеток.

Данные, полученные при изучении характерных изменений, происходящих при длительной инкубации панкреатических микрофрагментов, позволили получить три основных типа культур островковых клеток: флотирующие (свободно плавающие), имеющие органотипический характер, суспензионные цитотипические, полученные в результате миграции островковых клеток, и прогениторные клетки, происходящие из эпителия выводных протоков ПЖ.

В качестве тканевого компонента ТИК ПЖ было решено использовать флотирующие культуры, так как в процессе инкубации они приобретали островковоподобные черты и в течение длительного времени сохраняли жизнеспособность и гормональную активность. При этом такие органотипические культуры способны продуцировать инсулин *in vitro* по принципу обратной связи, что было подтверждено исследованием проб культуральной жидкости, которое показало, что базальный уровень концентрации инсулина увеличивался более чем в 1,5 раза после стимуляции повышенным содержанием глюкозы и теофиллином.

В то же время остальные два вида культур также могут найти определенное применение. Так, суспензионные цитотипические культуры, несмотря на их недостаточную выживаемость, имеют как академический, так и вполне практический интерес, так как представляют собой «чистую» культуру островковых клеток (в основном  $\beta$ -клеток) и могут быть использованы, в частности, как модель для тестирования сахароснижающих препаратов.

В свою очередь, культуры, состоящие из панкреатических прогениторных клеток, могут использоваться в дальнейших исследованиях по разработке ТИК ПЖ при создании условий, обеспечивающих их дифференцировку в зрелые островковые клетки.

Следующим этапом работы явились исследования по совместной инкубации флотирующих островковоподобных культур (ФОК) с матриксами, которые должны были определить, какой из них может служить другим необходимым компонентом ТИК ПЖ.

Сокультивирование ФОК с одним из каркасных матриксов, который представлял собой пористые диски из резорбируемого сополимера

полилактогликолида, не оправдало ожиданий. Несмотря на наличие некоторых положительных свойств, его неспособность благоприятно влиять на культуры в течение необходимо длительного времени не позволило рассматривать этот матрикс как перспективный компонент ТИК ПЖ.

В противоположность этим результатам, явно позитивно проявил себя гидрогелевый матрикс, в качестве которого была выбрана инъекционная форма биополимерного микрогетерогенного коллагенсодержащего гидрогеля (БМКГ).

Проведенные исследования показали, что присутствие БМКГ не только не оказывает токсического воздействия, но благоприятно сказывается на выживании ФОК, полученных из ПЖ новорожденных кроликов. При этом сохраняются структурные особенности и гормональная способность, характерные для нативных панкреатических островков. Такая продуктивная совместимость ФОК и гидрогелевого биоматрикса создала необходимые условия для формирования ТИК ПЖ.

В процессе довольно длительной инкубации, несмотря на постепенную прогрессирующую резорбцию основных масс БМКГ, его остатки, которые контактировали непосредственно с ФОК, не растворялись полностью, что позволило полагать, что позитивное влияние этих двух составляющих формирующейся ТИК было взаимным. Именно эта комбинация тканевого и матриксного компонентов была нами определена как модель ТИК ПЖ. Функциональная способность разработанной модели была подтверждена определением ее адекватной инсулинпродуцирующей активности при проведении стимуляционного теста в процессе инкубации.

Помимо этого, совместная инкубация ФОК с биоматриksom в бессывороточной ростовой среде приводила к формированию однослойных культур, которые, по всей вероятности, состоят из прогениторных клеток ПЖ, являющихся, как известно, предшественниками островковых клеток и при создании необходимых условий инкубации смогут дифференцироваться в островковые клетки, что непременно усилит антидиабетическую мощь ТИК ПЖ.

Для того чтобы исключить использование в опытах крыс, у которых после введения диабетогенного препарата стрептозотоцина может произойти спонтанная реверсия гипергликемии, было проведено специальное исследование по определению критериев стабильного, необратимого течения индуцированного таким образом сахарного диабета 1 типа. Оказалось, что оптимальным является дробное внутрибрюшинное введение стрептозотоцина в суммарной дозе 70 мг на 1 кг массы тела, и критериями стабильного сахарного диабета, исключающего его самостоятельную реверсию, является уровень гликемии более 20 ммоль/л, зафиксированный не ранее, чем через 2 недели после последней инъекции стрептозотоцина. При отборе диабетических крыс в соответствии с этими критериями реверсия гипергликемии возможна лишь примерно у 6 % животных, что не может значимо повлиять на результаты тестирования какого-либо антидиабетического лечения. Отсутствие реальной возможности спонтанной реверсии диабетического статуса у крыс со стабильной гипергликемией подтвердили морфологические исследования, показавшие отсутствие признаков регенерации  $\beta$ -клеток в собственной ПЖ таких животных.

Именно крысы с заведомо стабильным сахарным диабетом были использованы в опытах по имплантации ТИК ПЖ, осуществленных с целью изучения функциональных возможностей разработанной модели в условиях *in vivo* – при внутрибрюшинной имплантации.

В результате проведения достаточно длительного (8 недель) наблюдения за крысами со стабильным экспериментальным сахарным диабетом 1 типа, которым в полость брюшины имплантировали ТИК, состоящую из ФОК, полученных из ПЖ новорожденных кроликов, и БМКГ, был достигнут отчетливый терапевтический эффект. Выраженное антидиабетическое действие выполненной имплантации оказалось стойким и продолжительным у 14 из 16 крыс-реципиентов, то есть почти в 90 % случаев. При этом в аналогичной по тяжести экспериментального сахарного диабета контрольной группе крыс ни у одного из 16 животных не наступило ремиссии диабетического статуса.



Морфологические исследования ПЖ крыс из 2-й (контрольной) группы, выявили лишь единичные  $\beta$ -клетки в островках ПЖ, что подтвердило избирательное и практически необратимое повреждение  $\beta$ -клеток дробно введенным стрептозотоцином при отсутствии признаков их видимой регенерации.

Аналогичный анализ ПЖ подопытных животных с экспериментальным диабетом из 1-й группы (имплантация ТИК ПЖ), проведенный по окончании 8-недельного эксперимента, выявил отчетливые морфологические признаки регенерации  $\beta$ -клеток. Полученные данные позволили предположить получение комбинированного антидиабетического эффекта после внутрибрюшинного введения ТИК ПЖ, обусловленного как непосредственным функционированием имплантата, так и его стимулирующим влиянием, приведшим к частичному восстановлению пула  $\beta$ -клеток в собственных островках крыс-реципиентов.

Для получения стандартизированной ТИК ПЖ, имеющей стабильный клеточный состав и заданную функциональную активность, использование донорского органа человека чрезвычайно затруднительно не только вследствие их хронического дефицита, но также из-за неоднородности донорского материала. Индивидуальные различия доноров (возраст, пол, предшествующие заболевания и др.), а также различная степень жизнеспособности и функциональных возможностей островковых клеток изъятых органов, зависящих, прежде всего, от срока ишемии и анамнестических особенностей донора, не позволяют получить заведомо подходящий препарат островков для ТИК ПЖ.

Значительно более реальным представляется создание стабильного прототипа ТИК ПЖ с использованием островков животных. Для получения стандартного образца ТИК можно использовать здоровых животных одной линии или породы, одного возраста, пола, содержащихся в одинаковых условиях. Также одинаково минимален будет срок ишемии изъятых органов и обеспечена стандартность всех процедур, применяемых при получении ТИК ПЖ.

Кроме того, в перспективе, если будет обеспечена безопасность применения ксеногенных клеточных препаратов (такие исследования интенсивно проводятся,

в частности, в области создании стерильных линий животных), ТИК ПЖ, содержащие клетки животных, могут найти широкое применение в клинике.

ПЖ свиньи (чаще – новорожденных поросят) является наиболее распространенным источником островков, рассматриваемым в качестве альтернативы трупной донорской поджелудочной железы человека. Этот выбор обусловлен в значительной мере чрезвычайным структурным сходством инсулина свиньи и человеческого инсулина, которые отличаются друг от друга лишь одной, концевой, аминокислотой. Практически одинакова и функциональная активность этого вида инсулина, подтвержденная более чем полувековым опытом применением свиного инсулина в клинической диабетологии. В той же степени близок инсулину человека кроличий инсулин. Однако если в отношении применения свиных клеток в качестве ксенотрансплантатов допускается теоретическая и экспериментальная возможность передачи человеку чужеродных вирусов и микробов (при клинических испытаниях таких случаев не зарегистрировано), то данные о передаче вирусной инфекции человеку от кроликов ни в каком виде и варианте в мировой литературе не приводятся.

В связи с этим нами в качестве альтернативного и наиболее перспективного источника островковой ткани определена кроличья поджелудочная железа, а именно ПЖ новорожденных (1-2-дневных) кроликов. Этот выбор обусловлен не только гарантией одновременного получения однородного и стабильного во всех отношениях донорского материала, но реальной возможностью исключить применение иммуносупрессии при имплантации такой ТИК ПЖ как в эксперименте, так и в клинике. Чрезвычайно низкая иммуногенность культур, получаемых из ПЖ новорожденных кроликов, была показана иммунологами в опытах по совместной инкубации разнообразного набора сывороток людей с прекультивированными островковыми клетками [233]. При этом не было отмечено адсорбции иммуноглобулинов, содержавшихся в этих сыворотках, на островковых клетках ПЖ новорожденных кроликов даже в присутствии комплемента человека.

## ВЫВОДЫ

1. Предложен и обоснован состав экспериментальной модели тканеинженерной конструкции поджелудочной железы (ТИК ПЖ), матриксом которой выбран биополимерный микрогетерогенный коллагенсодержащий гидрогель (БМКГ), а клеточной составляющей - флотирующие островковоподобные культуры поджелудочной железы (ФОК ПЖ) новорожденных кроликов.
2. Разработан метод получения ФОК ПЖ, проявляющих инсулинпродуцирующую активность.
3. В процессе формирования органотипических островковоподобных культур возможно получение цитотипических культур, состоящих из островковых клеток, и однослойных культур, состоящих из прогениторных клеток поджелудочной железы.
3. Показано, что при культивировании ФОК ПЖ в присутствии БМКГ происходит прикрепление культур к матриксу и формирование ТИК ПЖ, проявляющей инсулинпродуцирующую функцию на протяжении всего срока эксперимента (2 недели).
4. Для доказательства *in vivo* функциональной эффективности модели ТИК ПЖ разработаны критерии стабильности экспериментального сахарного диабета 1 типа (крысы линии Вистар), исключаяющие его спонтанную реверсию.
5. При внутрибрюшинной имплантации модели ТИК ПЖ крысам с экспериментальным сахарным диабетом происходит выраженное и продолжительное снижение уровня гипергликемии. Помимо прямого сахароснижающего действия, наблюдаются процессы регенерации в островках поджелудочной железы крыс-реципиентов, частично восстанавливающие пул  $\beta$ -клеток.

## ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

1. Разработанный метод культивирования микрофрагментов поджелудочной железы позволяет получить три типа культур: флотирующие островковоподобные, имеющие органотипический характер, суспензионные цитотипические, состоящие из островковых клеток, и однослойные, состоящие из прогениторных клеток ПЖ.
2. Биополимерный микрогетерогенный коллагенсодержащий гидрогель может служить матриksom для ТИК различных органов и тканей.
3. Для правильной интерпретации опытов по проведению антидиабетического лечения у лабораторных крыс рекомендуется использовать животных со стрептозотоциновым сахарным диабетом, соответствующим критериям стабильности (гликемия более 20 ммоль/л через 2 недели после введения стрептозотоцина), исключающих спонтанную реверсию гипергликемии.
4. Следует учитывать, что имплантация ТИК ПЖ способна оказывать не только прямое гипогликемизирующее действие, но и стимулировать частичное восстановление инсулинпродуцирующей активности собственных  $\beta$ -клеток реципиента вследствие их регенерации.

**СПИСОК ПРИНЯТЫХ СОКРАЩЕНИЙ**

БМКГ - биополимерный микрогетерогенный коллагенсодержащий гидрогель

ИПК - инсулинпродуцирующие клетки

МОКВР – мгновенная опосредованная кровью воспалительная реакция

МСК – мезенхимальные стволовые клетки

ОВС – островки взрослых свиней

ОКК – островковоподобные клеточные кластеры

ОНС – островки новорожденных свиней

ПД – пористые диски

ПЖ – поджелудочная железа

СД1 – сахарный диабет 1 типа

СК – стволовые клетки

СЭРВ – свиные эндогенные ретровирусы

ТИК – тканеинженерная конструкция

ФОК – флоатирующие островковоподобные культуры

ЭСК – эмбриональные стволовые клетки

НbA1c – гликозилированный (гликированный) гемоглобин

**СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ**

1. Barton FB, Rickels MR, Alejandro R, Hering BJ, Wease S, Naziruddin B et al. Improvement in outcomes of clinical islet transplantation: 1999-2010. *Diabetes Care*. 2012 Jul; 35(7): 1436-1445. doi: 10.2337/dc12-0063.
2. Balamurugan AN, Naziruddin B, Lockridge A, Tiwari M, Loganathan G, Takita M et al. Islet product characteristics and factors related to successful human islet transplantation from the Collaborative Islet Transplant Registry (CITR) 1999-2010. *Am J Transplant*. 2014 Nov; 14 (11): 2595-2606. doi: 10.1111/ajt.12872.
3. Севастьянов ВИ, Перова НВ. Инъекционный гетерогенный биополимерный гидрогель для заместительной и регенеративной хирургии и способ его получения. Патент РФ № 2433828 (2010).
4. Биосовместимые материалы (учебное пособие). Под ред. Севастьянова В.И. и Кирпичникова М.П. М.: МИА (2011).
5. Amer LD, Mahoney MJ, Bryant SJ. Tissue Engineering Approaches to Cell-Based Type 1 Diabetes. *Therapy Tissue Engineering Part B: Reviews*. October 2014, 20(5): 455-467. doi:10.1089/ten.teb.2013.0462.
6. Mannucci E, Monami M, Dicembrini I et al Achieving HbA1c targets in clinical trials and in the real world: a systematic review and meta-analysis. *J Endocrinol Invest* 37. 2014:477–495. doi:10.1007/s40618-014-0069-6 CrossRefPubMed
7. Van Belle TL, Coppieters KT, von Herrath MG Type 1 diabetes: etiology, immunology, and therapeutic strategies. *Physiol Rev* 2011. 91:79–118. doi:10.1152/physrev.00003.2010 CrossRefPubMed
8. Lind M, Svensson A-M, Kosiborod M et al Glycemic control and excess mortality in type 1 diabetes. *N Engl J Med* 2014. 371:1972–1982. doi:10.1056/NEJMoa1408214 CrossRefPubMed
9. Saudek CD, Duckworth WC, Giobbie-Hurder A et al Implantable insulin pump vs multiple-dose insulin for non-insulin-dependent diabetes mellitus: a randomized clinical trial. Department of Veterans Affairs Implantable Insulin Pump Study Group. *JAMA* 1996. 276:1322–1327CrossRefPubMed

10. Maffi P, Secchi A Clinical results of islet transplantation. *Pharmacol Res* 2015. 98:86–91. doi:10.1016/j.phrs.2015.04.010 CrossRefPubMed
11. Venturini M, Angeli E, Maffi P et al Technique, complications, and therapeutic efficacy of percutaneous transplantation of human pancreatic islet cells in type 1 diabetes: the role of US. *Radiology* 2005. 234:617–624. doi:10.1148/radiol.2342031356 CrossRefPubMed
12. Warnock GL, Kneteman NM, Ryan EA et al Continued function of pancreatic islets after transplantation in type I diabetes. *Lancet* 1989. 334:570–572. doi:10.1016/S0140-6736(89)90701-0 CrossRef
13. Scharp DW, Lacy PE, Santiago JV et al (Insulin independence after islet transplantation into type I diabetic patient. *Diabetes* 1990. 39:515–518CrossRefPubMed
14. Piemonti L, Pileggi A 25 Years of the Ricordi automated method for islet isolation. *Cellr4* .2013. 11): e128. <http://www.cellr4.org/article/128>. Accessed 29 Dec 2015
15. Ballinger WF, Lacy PE Transplantation of intact pancreatic islets in rats. *Surgery* 1972. 72:175–186PubMed
16. Kemp CB, Knight MJ, Scharp DW et al Effect of transplantation site on the results of pancreatic islet isografts in diabetic rats. *Diabetologia* 1973. 9:486–491CrossRefPubMed
17. Najarian JS, Sutherland DE, Matas AJ et al Human islet transplantation: a preliminary report. *Transplant Proc* 1977. 9:233–236PubMed
18. Ricordi C, Lacy PE, Finke EH et al Automated method for isolation of human pancreatic islets. *Diabetes* 1988. 37:413–420CrossRefPubMed
19. Oberholzer J, Triponez F, Mage R et al Human islet transplantation: lessons from 13 autologous and 13 allogeneic transplantations. *Transplantation* 2000. 69:1115–1123CrossRefPubMed
20. Secchi A, Socci C, Maffi P et al Islet transplantation in IDDM patients. *Diabetologia* 1997 40:225–231CrossRefPubMed
21. Shapiro AM, Lakey JR, Ryan EA et al Islet transplantation in seven patients with type 1 diabetes mellitus using a glucocorticoid-free immunosuppressive regimen. *N*

- Engl J Med 2000. 343:230–238. doi:10.1056/NEJM200007273430401  
CrossRefPubMed
22. Shapiro AMJ, Ricordi C, Hering BJ et al International trial of the Edmonton protocol for islet transplantation. N Engl J Med 2006. 355:1318–1330. doi:10.1056/NEJMoa061267 CrossRefPubMed
23. Brennan DC, Kopetskie HA, Sayre PH et al Long-term follow-up of the edmonton protocol of islet transplantation in the United States. Am J Transplant. 2015. doi:10.1111/ajt.13458 PubMed
24. Barton FB, Rickels MR, Alejandro R et al Improvement in outcomes of clinical islet transplantation: 1999–2010. Diabetes Care 2012. 35:1436–1445. doi:10.2337/dc12-0063 CrossRefPubMedPubMedCentral
25. Brooks AM, Walker N, Aldibbiat A et al Attainment of metabolic goals in the integrated UK islet transplant program with locally isolated and transported preparations. Am J Transplant. 2013. 13:3236–3243. doi:10.1111/ajt.12469 CrossRefPubMed
26. Vantyghem MC, Kerr-Conte J, Arnalsteen L et al Primary graft function, metabolic control, and graft survival after islet transplantation. Diabetes Care 2009. 32:1473–1478. doi:10.2337/dc08-1685 CrossRefPubMedPubMedCentral
27. Lablanche S, Borot S, Wojtuszczyzn A et al Five-year metabolic, functional, and safety results of patients with type 1 diabetes transplanted with allogenic islets within the Swiss-French GRAGIL network. Diabetes Care 2015. 38:1714–1722. doi:10.2337/dc15-0094 CrossRefPubMed
28. Qi M, Kinzer K, Danielson KK et al Five-year follow-up of patients with type 1 diabetes transplanted with allogeneic islets: the UIC experience. Acta Diabetol 2014.51:833–843.doi:10.1007/s00592-014-0627-6 CrossRefPubMedPubMedCentral
29. Bellin MD, Barton FB, Heitman A et al Potent induction immunotherapy promotes long-term insulin independence after islet transplantation in type 1 diabetes. Am J Transplant 2012. 12:1576–1583. doi:10.1111/j.1600-6143.2011.03977.x CrossRefPubMedPubMedCentral



30. Shapiro AMJ State of the art of clinical islet transplantation and novel protocols of immunosuppression. *Curr Diabetes Rep* 2011. 11:345–354. doi:10.1007/s11892-011-0217-8 CrossRef
31. Posselt AM, Szot GL, Frassetto LA et al Islet transplantation in type 1 diabetic patients using calcineurin inhibitor-free immunosuppressive protocols based on T-cell adhesion or costimulation blockade. *Transplantation* (2010) 90 (12):1595–1601 CrossRefPubMedPubMedCentral
32. Kandaswamy R, Skeans MA, Gustafson SK et al (2015) OPTN/SRTR 2013 annual data report: pancreas. *Am J Transplant* 15:1–20. doi:10.1111/ajt.13196 CrossRefPubMed32.
33. Cooper DK, Gollackner B, Sachs DH.. Will the pig solve the transplantation backlog? *Annu Rev Med* (2002) 53:133.10.1146/annurev.med.53.082901.103900 [PubMed] [Cross Ref]
34. Koulmanda M, Qipo A, Smith RN, Auchincloss H., Jr. Pig islet xenografts are resistant to autoimmune destruction by non-obese diabetic recipients after anti-CD4 treatment. *Xenotransplantation* (2003) 10(2):178.10.1034/j.1399-3089.2003.02040.x [PubMed] [Cross Ref]
35. Potter KJ, Abedini A, Marek P, Klimek AM, Butterworth S, Driscoll M, et al. Islet amyloid deposition limits the viability of human islet grafts but not porcine islet grafts. *Proc Natl Acad Sci U S A* (2010) 107(9):4305.10.1073/pnas.0909024107 [PMC free article] [PubMed] [Cross Ref]
36. Tai HC, Ezzelarab M, Hara H, Ayares D, Cooper DK.. Progress in xenotransplantation following the introduction of gene-knockout technology. *Transpl Int* (2007) 20(2):107.10.1111/j.1432-2277.2006.00398.x [PubMed] [Cross Ref]
37. Casu A, Echeverri GJ, Bottino R, van derWindt DJ, He J, Ekser B, et al. Insulin secretion and glucose metabolism in alpha 1,3-galactosyltransferase knock-out pigs compared to wild-type pigs. *Xenotransplantation* (2010) 17(2):131.10.1111/j.1399-3089.2010.00572.x [PubMed] [Cross Ref]
38. Garkavenko O, Dieckhoff B, Wynyard S, Denner J, Elliott RB, Tan PL, et al. Absence of transmission of potentially xenotic viruses in a prospective pig to primate

islet xenotransplantation study. *J Med Virol* (2008) 80(11):2046.10.1002/jmv.21272 [PubMed] [Cross Ref]

39. Cozzi E, Bosio E.. Islet xenotransplantation: current status of preclinical studies in the pig-to-nonhuman primate model. *Curr Opin Organ Transplant* (2008) 13(2):155.10.1097/MOT.0b013e3282f97842 [PubMed] [Cross Ref]

40. Rood PP, Buhler LH, Bottino R, Trucco M, Cooper DK.. Pig-to-nonhuman primate islet xenotransplantation: a review of current problems. *Cell Transplant* (2006) 15(2):89.10.3727/000000006783982052 [PubMed] [Cross Ref]

41. Dufrane D, Gianello P.. Pig islet xenotransplantation into non-human primate model. *Transplantation* (2008) 86(6):753.10.1097/TP.0b013e3181840f55 [PubMed] [Cross Ref]

42. Prabhakaran S, Hering BJ. What strain of pig should be used? *Xenotransplantation* (2008) 15(2):83.10.1111/j.1399-3089.2008.00456.x [PubMed] [Cross Ref]

43. Thompson P, Badell IR, Lowe M, Turner A, Cano J, Avila J, et al. Alternative immunomodulatory strategies for xenotransplantation: CD40/154 pathway-sparing regimens promote xenograft survival. *Am J Transplant* (2012) 12(7):1765.10.1111/j.1600-6143.2012.04031.x [PMC free article] [PubMed] [Cross Ref]

44. Dufrane D, Goebbels RM, Gianello P.. Alginate macroencapsulation of pig islets allows correction of streptozotocin-induced diabetes in primates up to 6 months without immunosuppression. *Transplantation*(2010) 90(10):1054.10.1097/TP.0b013e3181f6e267 [PubMed] [Cross Ref]

45. Elliott RB, Escobar L, Tan PL, Muzina M, Zwain S, Buchanan C.. Live encapsulated porcine islets from a type 1 diabetic patient 9.5 yr after xenotransplantation. *Xenotransplantation* (2007) 14(2):157.10.1111/j.1399-3089.2007.00384.x [PubMed] [Cross Ref]

46. Hering BJ, Wijkstrom M, Graham ML, Hårdstedt M, Aasheim TC, Jie T, et al. Prolonged diabetes reversal after intraportal xenotransplantation of wild-type porcine

- islets in immunosuppressed nonhuman primates. *Nat Med* (2006) 12(3):301.10.1038/nm1369 [PubMed] [Cross Ref]
47. Otonkoski T, Ustinov J, Rasilainen S, Kallio E, Korsgren O, Hayry P.. Differentiation and maturation of porcine fetal islet cells in vitro and after transplantation. *Transplantation* (1999) 68(11):1674.10.1097/00007890-199912150-00010 [PubMed] [Cross Ref]
48. Tan C, Tuch BE, Tu J, Brown SA.. Role of NADH shuttles in glucose-induced insulin secretion from fetal beta-cells. *Diabetes* (2002) 51(10):2989.10.2337/diabetes.51.10.2989 [PubMed] [Cross Ref]
49. Korsgren O, Jansson L, Eizirik D, Andersson A.. Functional and morphological differentiation of fetal porcine islet-like cell clusters after transplantation into nude mice. *Diabetologia* (1991) 34(6):379.10.1007/BF00403174 [PubMed] [Cross Ref]
50. Bogdani M, Suenens K, Bock T, Pipeleers-Marichal M, In't Veld P, Pipeleers D.. Growth and functional maturation of beta-cells in implants of endocrine cells purified from prenatal porcine pancreas. *Diabetes* (2005) 54(12):3387.10.2337/diabetes.54.12.3387 [PubMed] [Cross Ref]
51. Sandler S, Andersson A, Eizirik DL, Hellerström C, Espevik T, Kulseng B, et al. Assessment of insulin secretion in vitro from microencapsulated fetal porcine islet-like cell clusters and rat, mouse, and human pancreatic islets. *Transplantation* (1997) 63(12):1712.10.1097/00007890-199706270-00002 [PubMed] [Cross Ref]
52. Hardikar AA, Wang XY, Williams LJ, Kwok J, Wong R, Yao M, et al. Functional maturation of fetal porcine beta-cells by glucagon-like peptide 1 and cholecystokinin. *Endocrinology* (2002) 143(9):3505.10.1210/en.2001-211344 [PubMed] [Cross Ref]
53. Söderlund J, Wennberg L, Castaños-Velez E, Biberfeld P, Zhu S, Tibell A, et al. Fetal porcine islet-like cell clusters transplanted to cynomolgus monkeys: an immunohistochemical study. *Transplantation* (1999) 67(6):784.10.1097/00007890-199903270-00002 [PubMed] [Cross Ref]

54. Korbitt GS, Elliott JF, Ao Z, Smith DK, Warnock GL, Rajotte RV.. Large scale isolation, growth, and function of porcine neonatal islet cells. *J Clin Invest* (1996) 97(9):2119.10.1172/JCI118649 [PMC free article] [PubMed] [Cross Ref]
55. Dufrane D, Gianello P.. Pig islets for clinical islet xenotransplantation. *Curr Opin Nephrol Hypertens* (2009) 18(6):495.10.1097/MNH.0b013e328331a8e3 [PubMed] [Cross Ref]
56. Trivedi N, Hollister-Lock J, Lopez-Avalos MD, O'Neil JJ, Keegan M, Bonner-Weir S, et al. Increase in beta-cell mass in transplanted porcine neonatal pancreatic cell clusters is due to proliferation of beta-cells and differentiation of duct cells. *Endocrinology* (2001) 142(5):2115.10.1210/en.142.5.2115 [PubMed] [Cross Ref]
57. Yoon KH, Quickel RR, Tatarkiewicz K, Ulrich TR, Hollister-Lock J, Trivedi N, et al. Differentiation and expansion of beta cell mass in porcine neonatal pancreatic cell clusters transplanted into nude mice. *Cell Transplant* (1999) 8(6):673. [PubMed]
58. Weir GC, Quickel RR, Yoon KH, Tatarkiewicz K, Ulrich TR, Hollister-Lock J, et al. Porcine neonatal pancreatic cell clusters (NPCCs): a potential source of tissue for islet transplantation. *Ann Transplant* (1997) 2(3):63. [PubMed]
59. Nielsen TB, Yderstraede KB, Schroder HD, Holst JJ, Brusgaard K, Beck-Nielsen H.. Functional and immunohistochemical evaluation of porcine neonatal islet-like cell clusters. *Cell Transplant* (2003) 12(1):13.10.3727/000000003783985142 [PubMed] [Cross Ref]
60. Omori T, Nishida T, Komoda H, Fumimoto Y, Ito T, Sawa Y, et al. A study of the xenoantigenicity of neonatal porcine islet-like cell clusters (NPCC) and the efficiency of adenovirus-mediated DAF (CD55) expression. *Xenotransplantation* (2006) 13(5):455.10.1111/j.1399-3089.2006.00335.x [PubMed] [Cross Ref]
61. Vizzardelli C, Molano RD, Pileggi A, Berney T, Cattani P, Fenjves ES, et al. Neonatal porcine pancreatic cell clusters as a potential source for transplantation in humans: characterization of proliferation, apoptosis, xenoantigen expression and gene delivery with recombinant AAV. *Xenotransplantation* (2002) 9(1):14.10.1034/j.1399-3089.2002.0o128.x [PubMed] [Cross Ref]

62. Cooper DK, Hara H, Ezzelarab M, Bottino R, Trucco M, Phelps C, et al. The potential of genetically-engineered pigs in providing an alternative source of organs and cells for transplantation. *J Biomed Res* (2013) 27(4):249.10.7555/JBR.27.20130063 [PMC free article] [PubMed] [Cross Ref]
63. Casu A, Bottino R, Balamurugan AN, Hara H, van derWindt DJ, Campanile N, et al. Metabolic aspects of pig-to-monkey (*Macaca fascicularis*) islet transplantation: implications for translation into clinical practice. *Diabetologia* (2008) 51(1):120.10.1007/s00125-007-0844-4 [PubMed] [Cross Ref]
64. Thompson P, Cardona K, Russell M, Badell IR, Shaffer V, Korbitt G, et al. CD40-specific costimulation blockade enhances neonatal porcine islet survival in nonhuman primates. *Am J Transplant* (2011) 11(5):947.10.1111/j.1600-6143.2011.03509.x [PMC free article] [PubMed] [Cross Ref]
65. van derWindt DJ, Bottino R, Casu A, Campanile N, Smetanka C, He J, et al. Long-term controlled normoglycemia in diabetic non-human primates after transplantation with hCD46 transgenic porcine islets. *Am J Transplant* (2009) 9(12):2716.10.1111/j.1600-6143.2009.02850.x [PubMed] [Cross Ref]
66. Ricordi C, Socci C, Davalli AM, Staudacher C, Baro P, Vertova A, et al. Isolation of the elusive pig islet. *Surgery* (1990) 107(6):688. [PubMed]
67. Yonekawa Y, Matsumoto S, Okitsu T, Arata T, Iwanaga Y, Noguchi H, et al. Effective islet isolation method with extremely high islet yields from adult pigs. *Cell Transplant* (2005) 14(10):757.10.3727/000000005783982512 [PubMed] [Cross Ref]
68. Dufrane D, Goebbels RM, Fdilal I, Guiot Y, Gianello P.. Impact of porcine islet size on cellular structure and engraftment after transplantation: adult versus young pigs. *Pancreas* (2005) 30(2):138.10.1097/01.mpa.0000147083.62501.4e [PubMed] [Cross Ref]
69. White SA, Hughes DP, Contractor HH, London NJ.. A comparison of cross sectional surface area densities between adult and juvenile porcine islets of Langerhans. *Horm Metab Res* (1999) 31(9):519.10.1055/s-2007-978787 [PubMed] [Cross Ref]

70. Jay TR, Heald KA, Carless NJ, Topham DE, Downing R.. The distribution of porcine pancreatic beta-cells at ages 5, 12 and 24 weeks. *Xenotransplantation* (1999) 6(2):131.10.1034/j.1399-3089.1999.00009.x [PubMed] [Cross Ref]
71. Dufrane D, Goebbels RM, Guiot Y, Gianello P.. Is the expression of Gal-alpha1,3Gal on porcine pancreatic islets modified by isolation procedure? *Transplant Proc* (2005) 37(1):455.10.1016/j.transproceed.2004.12.161 [PubMed] [Cross Ref]
72. Kirchhof N, Hering BJ, Geiss V, Federlin K, Bretzel RG. Evidence for breed-dependent differences in porcine islets of Langerhans. *Transplant Proc* (1994) 26(2):616. [PubMed]
73. Ulrichs K, Boss M, Heiser A, Eckstein V, Wacker H-H, Thiede A. Histomorphological characteristics of the porcine pancreas as a basis for the isolation of islets of Langerhans. *Xenotransplantation* (1995) 2(3):176.10.1111/j.1399-3089.1995.tb00091.x [Cross Ref]
74. Heiser A, Ulrichs K, Muller-Ruchholtz W. Influence of porcine strain, age, and pH of the isolation medium on porcine pancreatic islet isolation success. *Transplant Proc* (1994) 26(2):618. [PubMed]
75. Kim JH, Kim HI, Lee KW, Yu JE, Kim SH, Park HS, et al. Influence of strain and age differences on the yields of porcine islet isolation: extremely high islet yields from SPF CMS miniature pigs. *Xenotransplantation* (2007) 14(1):60.10.1111/j.1399-3089.2006.00364.x [PubMed] [Cross Ref]
76. Mundwiler KE, Lamberti FV, Hill RS. Rapid and inexpensive method for the quantitative assessment of donor pancreata for islet isolation. *Transplant Proc* (1994) 26(6):3427. [PubMed]
77. Krickhahn M, Buhler C, Meyer T, Thiede A, Ulrichs K.. The morphology of islets within the porcine donor pancreas determines the isolation result: successful isolation of pancreatic islets can now be achieved from young market pigs. *Cell Transplant* (2002) 11(8):827. [PubMed]
78. Gazda LS, Adkins H, Bailie JA, Byrd W, Circle L, Conn B, et al. The use of pancreas biopsy scoring provides reliable porcine islet yields while encapsulation

- permits the determination of microbiological safety. *Cell Transplant* (2005) 14(7):427.10.3727/000000005783982846 [PubMed] [Cross Ref]
79. Anazawa T, Balamurugan AN, Matsumoto S, Lafreniere SA, O'Brien TD, Sutherland DE, et al. Rapid quantitative assessment of the pig pancreas biopsy predicts islet yield. *Transplant Proc* (2010) 42(6):2036.10.1016/j.transproceed.2010.05.113 [PMC free article] [PubMed] [Cross Ref]
80. Stadlbauer V, Schaffellner S, Iberer F, Lackner C, Liegl B, Zink B, et al. Occurrence of apoptosis during ischemia in porcine pancreas islet cells. *Int J Artif Organs* (2003) 26(3):205. [PubMed]
81. Goto M, Imura T, Inagaki A, Ogawa N, Yamaya H, Fujimori K, et al. The impact of ischemic stress on the quality of isolated pancreatic islets. *Transplant Proc* (2010) 42(6):2040.10.1016/j.transproceed.2010.05.101 [PubMed] [Cross Ref]
82. Brandhorst D, Brandhorst H, Hering BJ, Federlin K, Bretzel RG.. Islet isolation from the pancreas of large mammals and humans: 10 years of experience. *Exp Clin Endocrinol Diabetes* (1995) 103(Suppl 2):3.10.1055/s-0029-1211386 [PubMed] [Cross Ref]
83. Ricordi C, Finke EH, Lacy PE.. A method for the mass isolation of islets from the adult pig pancreas. *Diabetes* (1986) 35(6):649.10.2337/diab.35.6.649 [PubMed] [Cross Ref]
84. Nielsen TB, Yderstraede KB, Beck-Nielsen H.. Isolation, transplantation, and functional studies of adult porcine islets of Langerhans. *Comp Med* (2002) 52(2):127. [PubMed]
85. O'Gorman D, Kin T, Imes S, Pawlick R, Senior P, Shapiro AM.. Comparison of human islet isolation outcomes using a new mammalian tissue-free enzyme versus collagenase NB-1. *Transplantation* (2010) 90(3):255.10.1097/TP.0b013e3181e117ce [PubMed] [Cross Ref]
86. Jin SM, Shin JS, Kim KS, Gong CH, Park SK, Kim JS, et al. Islet isolation from adult designated pathogen-free pigs: use of the newer bovine nervous tissue-free enzymes and a revised donor selection strategy would improve the islet graft function.

Xenotransplantation (2011) 18(6):369.10.1111/j.1399-3089.2011.00677.x [PubMed]  
[Cross Ref]

87. Gray DW, Sudhakaran N, Titus TT, McShane P, Johnson P.. Development of a novel digestion chamber for human and porcine islet isolation. *Transplant Proc* (2004) 36(4):1135.10.1016/j.transproceed.2004.04.050 [PubMed] [Cross Ref]

88. 62. Stiegler P, Stadlbauer V, Hackl F, Schaffellner S, Iberer F, Greilberger J, et al. Prevention of oxidative stress in porcine islet isolation. *J Artif Organs* (2010) 13(1):38.10.1007/s10047-010-0488-x [PubMed] [Cross Ref]

89. Li S, Sakai T, Suzuki Y, Goto T, Tanaka T, Yoshikawa T, et al. Improved quantity and in vivo function of islets isolated by reduced pressure-controlled injection of collagenase in a rat model. *Cell Transplant* (2007) 16(5):539. [PubMed]

90. Carter JD, Dula SB, Corbin KL, Wu R, Nunemaker CS.. A practical guide to rodent islet isolation and assessment. *Biol Proced Online* (2009) 11:3.10.1007/s12575-009-9021-0 [PMC free article] [PubMed] [Cross Ref]

91. Marchetti P, Finke EH, Gerasimidi-Vazeou A, Falqui L, Scharp DW, Lacy PE.. Automated large-scale isolation, in vitro function and xenotransplantation of porcine islets of Langerhans. *Transplantation* (1991) 52(2):209.10.1097/00007890-199108000-00005 [PubMed] [Cross Ref]

92. Toso C, Brandhorst D, Oberholzer J, Triponez F, Buhler L, Morel P.. Isolation of adult porcine islets of Langerhans. *Cell Transplant* (2000) 9(3):297. [PubMed]

93. Min T, Yi L, Chao Z, Haitao Z, Wei W, Liang Y, et al. Superiority of visipaque (iodixanol)-controlled density gradient over Ficoll-400 in adult porcine islet purification. *Transplant Proc* (2010) 42(5):1825.10.1016/j.transproceed.2010.01.068 [PubMed] [Cross Ref]

94. van der Burg MP, Graham JM.. Iodixanol density gradient preparation in University of Wisconsin solution for porcine islet purification. *ScientificWorldJournal* (2003) 3:1154.10.1100/tsw.2003.107 [PubMed] [Cross Ref]

95. Mita A, Ricordi C, Miki A, Barker S, Khan A, Alvarez A, et al. Purification method using iodixanol (OptiPrep)-based density gradient significantly reduces cytokine chemokine production from human islet preparations, leading to prolonged



- beta-cell survival during pretransplantation culture. *Transplant Proc* (2009) 41(1):314.10.1016/j.transproceed.2008.10.059 [PMC free article] [PubMed] [Cross Ref]
96. Rijkkelijkhuizen JK, van der Burg MP, Tons A, Terpstra OT, Bouwman E.. Pretransplant culture selects for high-quality porcine islets. *Pancreas* (2006) 32(4):403.10.1097/01.mpa.0000220866.87658.b2 [PubMed] [Cross Ref]
97. Ekser B, Cooper DK.. Overcoming the barriers to xenotransplantation: prospects for the future. *Expert Rev Clin Immunol* (2010) 6(2):219.10.1586/eci.09.81 [PMC free article] [PubMed] [Cross Ref]
98. Scalea J, Hanecamp I, Robson SC, Yamada K.. T-cell-mediated immunological barriers to xenotransplantation. *Xenotransplantation* (2012) 19(1):23.10.1111/j.1399-3089.2011.00687.x [PMC free article] [PubMed] [Cross Ref]
99. Nilsson B. The instant blood-mediated inflammatory reaction in xenogeneic islet transplantation. *Xenotransplantation* (2008) 15(2):96.10.1111/j.1399-3089.2008.00460.x [PubMed] [Cross Ref]
100. Johansson H, Lukinius A, Moberg L, Lundgren T, Berne C, Foss A, et al. Tissue factor produced by the endocrine cells of the islets of Langerhans is associated with a negative outcome of clinical islet transplantation. *Diabetes* (2005) 54(6):1755.10.2337/diabetes.54.6.1755 [PubMed] [Cross Ref]
101. Goto M, Tjernberg J, Dufrane D, Elgue G, Brandhorst D, Ekdahl KN, et al. Dissecting the instant blood-mediated inflammatory reaction in islet xenotransplantation. *Xenotransplantation* (2008) 15(4):225.10.1111/j.1399-3089.2008.00482.x [PMC free article] [PubMed] [Cross Ref]
102. Marigliano M, Bertera S, Grupillo M, Trucco M, Bottino R.. Pig-to-nonhuman primates pancreatic islet xenotransplantation: an overview. *Curr Diab Rep* (2011) 11(5):402.10.1007/s11892-011-0213-z [PMC free article] [PubMed] [Cross Ref]
103. Nyqvist D, Kohler M, Wahlstedt H, Berggren PO.. Donor islet endothelial cells participate in formation of functional vessels within pancreatic islet grafts. *Diabetes* (2005) 54(8):2287.10.2337/diabetes.54.8.2287 [PubMed] [Cross Ref]

104. Rayat GR, Rajotte RV, Hering BJ, Binette TM, Korbitt GS.. In vitro and in vivo expression of Galalpha-(1,3)Gal on porcine islet cells is age dependent. *J Endocrinol* (2003) 177(1):127.10.1677/joe.0.1770127 [PubMed] [Cross Ref]
105. Komoda H, Miyagawa S, Kubo T, Kitano E, Kitamura H, Omori T, et al. A study of the xenoantigenicity of adult pig islets cells. *Xenotransplantation* (2004) 11(3):237.10.1111/j.1399-3089.2004.00121.x [PubMed] [Cross Ref]
106. Gill RG, Wolf L, Daniel D, Coulombe M. CD4+ T cells are both necessary and sufficient for islet xenograft rejection. *Transplant Proc* (1994) 26(3):1203. [PubMed]
107. Olack BJ, Jaramillo A, Benshoff ND, Kaleem Z, Swanson CJ, Lowell JA, et al. Rejection of porcine islet xenografts mediated by CD4+ T cells activated through the indirect antigen recognition pathway. *Xenotransplantation* (2002) 9(6):393.10.1034/j.1399-3089.2002.01070.x [PubMed] [Cross Ref]
108. Koulmanda M, Laufer TM, Auchincloss H, Jr, Smith RN. Prolonged survival of fetal pig islet xenografts in mice lacking the capacity for an indirect response. *Xenotransplantation* (2004) 11(6):525.10.1111/j.1399-3089.2004.00174.x [PubMed] [Cross Ref]
109. Kirchoff N, Shibata S, Wijkstrom M, Kulick DM, Salerno CT, Clemmings SM, et al. Reversal of diabetes in non-immunosuppressed rhesus macaques by intraportal porcine islet xenografts precedes acute cellular rejection. *Xenotransplantation* (2004) 11(5):396.10.1111/j.1399-3089.2004.00157.x [PubMed] [Cross Ref]
110. Lindeborg E, Kumagai-Braesch M, Moller E.. Phenotypic and functional characterization of human T cell clones indirectly activated against adult pig islet cells. *Xenotransplantation* (2006) 13(1):41.10.1111/j.1399-3089.2005.00257.x [PubMed] [Cross Ref]
111. Trikudanathan S, Sayegh MH.. The evolution of the immunobiology of co-stimulatory pathways: clinical implications. *Clin Exp Rheumatol* (2007) 25(5 Suppl 46):S12. [PubMed]
112. Sakata N, Sumi S, Yoshimatsu G, Goto M, Egawa S, Unno M.. Encapsulated islets transplantation: past, present and future. *World J Gastrointest Pathophysiol* (2012) 3(1):19.10.4291/wjgp.v3.i1.19 [PMC free article] [PubMed] [Cross Ref]

113. de Vos P, Hamel AF, Tatarkiewicz K.. Considerations for successful transplantation of encapsulated pancreatic islets. *Diabetologia* (2002) 45(2):159.10.1007/s00125-001-0729-x [PubMed] [Cross Ref]
114. Orłowski T, Sitarek E, Tatarkiewicz K, Sabat M, Antosiak M.. Comparison of two methods of pancreas islets immunoisolation. *Int J Artif Organs* (1997) 20(12):701. [PubMed]
115. Kin T, Iwata H, Aomatsu Y, Ohyama T, Kanehiro H, Hisanaga M, et al. Xenotransplantation of pig islets in diabetic dogs with use of a microcapsule composed of agarose and polystyrene sulfonic acid mixed gel. *Pancreas* (2002) 25(1):94.10.1097/00006676-200207000-00020 [PubMed] [Cross Ref]
116. Schaffellner S, Stadlbauer V, Stiegler P, Hauser O, Halwachs G, Lackner C, et al. Porcine islet cells microencapsulated in sodium cellulose sulfate. *Transplant Proc* (2005) 37(1):248.10.1016/j.transproceed.2005.01.042 [PubMed] [Cross Ref]
117. Antosiak-Iwanska M, Sitarek E, Sabat M, Godlewska E, Kinasiewicz J, Werynski A.. Isolation, banking, encapsulation and transplantation of different types of Langerhans islets. *Pol Arch Med Wewn* (2009) 119(5):311. [PubMed]
118. Lember N, Wesche J, Petersen P, Doser M, Zschocke P, Becker HD, et al. Encapsulation of islets in rough surface, hydroxymethylated polysulfone capillaries stimulates VEGF release and promotes vascularization after transplantation. *Cell Transplant* (2005) 14(2–3):97.10.3727/000000005783983232 [PubMed] [Cross Ref]
119. Dufrane D, Goebbels RM, Saliez A, Guiot Y, Gianello P.. Six-month survival of microencapsulated pig islets and alginate biocompatibility in primates: proof of concept. *Transplantation* (2006) 81(9):1345.10.1097/01.tp.0000208610.75997.20 [PubMed] [Cross Ref]
120. Zhai C, Yu L, Zhu H, Tian M, Xiaogang Z, Bo W.. Porcine CTLA4-Ig prolong islet xenografts in rats by downregulating the direct pathway of T-cell activation. *Xenotransplantation* (2011) 18(1):40.10.1111/j.1399-3089.2011.00627.x [PubMed] [Cross Ref]
121. Tian M, Lv Y, Zhai C, Zhu H, Yu L, Wang B.. Alternative immunomodulatory strategies for xenotransplantation: CD80/CD86-CTLA4 pathway-modified immature

- dendritic cells promote xenograft survival. *PLoS One* (2013) 8(7):e69640.10.1371/journal.pone.0069640 [PMC free article] [PubMed] [Cross Ref]
122. Forster E, Krenger W, Joergensen J, Hof R, Geha RS, Hollander GA.. Contribution of CD40-CD154-mediated costimulation to an alloresponse in vivo. *Transplantation* (1999) 67(9):1284.10.1097/00007890-199905150-00016 [PubMed] [Cross Ref]
123. Yamada A, Salama AD, Sayegh MH. The role of novel T cell costimulatory pathways in autoimmunity and transplantation. *J Am Soc Nephrol* (2002) 13(2):559. [PubMed]
124. Cardona K, Korbitt GS, Milas Z, Lyon J, Cano J, Jiang W, et al. Long-term survival of neonatal porcine islets in nonhuman primates by targeting costimulation pathways. *Nat Med* (2006) 12(3):304.10.1038/nm1375 [PubMed] [Cross Ref]
125. Schuler W, Bigaud M, Brinkmann V, Di Padova F, Geisse S, Gram H, et al. Efficacy and safety of ABI793, a novel human anti-human CD154 monoclonal antibody, in cynomolgus monkey renal allotransplantation. *Transplantation* (2004) 77(5):717.10.1097/01.TP.0000116563.72763.83 [PubMed] [Cross Ref]
126. d'Apice AJ, Cowan PJ. Gene-modified pigs. *Xenotransplantation* (2008) 15(2):87.10.1111/j.1399-3089.2008.00457.x [PubMed] [Cross Ref]
127. Nagaraju S, Bottino R, Wijkstrom M, Hara H, Trucco M, Cooper DK.. Islet xenotransplantation from genetically engineered pigs. *Curr Opin Organ Transplant* (2013) 18(6):695.10.1097/MOT.0000000000000020 [PubMed] [Cross Ref]
128. Yeom HJ, Koo OJ, Yang J, Cho B, Hwang JI, Park SJ, et al. Generation and characterization of human heme oxygenase-1 transgenic pigs. *PLoS One* (2012) 7(10):e46646.10.1371/journal.pone.0046646 [PMC free article] [PubMed] [Cross Ref]
129. Diamond LE, Quinn CM, Martin MJ, Lawson J, Platt JL, Logan JS.. A human CD46 transgenic pig model system for the study of discordant xenotransplantation. *Transplantation* (2001) 71(1):132.10.1097/00007890-200101150-00021 [PubMed] [Cross Ref]
130. Liu D, Kobayashi T, Onishi A, Furusawa T, Iwamoto M, Suzuki S, et al. Relation between human decay-accelerating factor (hDAF) expression in pig cells and inhibition

- of human serum anti-pig cytotoxicity: value of highly expressed hDAF for xenotransplantation. *Xenotransplantation* (2007) 14(1):67.10.1111/j.1399-3089.2006.00365.x [PubMed] [Cross Ref]
131. Le Bas-Bernardet S, Tillou X, Poirier N, Dilek N, Chatelais M, Devallière J, et al. Xenotransplantation of galactosyl-transferase knockout, CD55, CD59, CD39, and fucosyl-transferase transgenic pig kidneys into baboons. *Transplant Proc* (2011) 43(9):3426.10.1016/j.transproceed.2011.09.024 [PubMed] [Cross Ref]
132. Klymiuk N, van Buerck L, Bähr A, Offers M, Kessler B, Wuensch A, et al. Xenografted islet cell clusters from INSLEA29Y transgenic pigs rescue diabetes and prevent immune rejection in humanized mice. *Diabetes* (2012) 61(6):1527.10.2337/db11-1325 [PMC free article] [PubMed] [Cross Ref]
133. Ramsoondar J, Vaught T, Ball S, Mendicino M, Monahan J, Jobst P, et al. Production of transgenic pigs that express porcine endogenous retrovirus small interfering RNAs. *Xenotransplantation* (2009) 16(3):164.10.1111/j.1399-3089.2009.00525.x [PubMed] [Cross Ref]
134. Semaan M, Kaulitz D, Petersen B, Niemann H, Denner J.. Long-term effects of PERV-specific RNA interference in transgenic pigs. *Xenotransplantation* (2012) 19(2):112.10.1111/j.1399-3089.2012.00683.x [PubMed] [Cross Ref]
135. Merani S, Toso C, Emamaullee J, Shapiro AM.. Optimal implantation site for pancreatic islet transplantation. *Br J Surg* (2008) 95(12):1449.10.1002/bjs.6391 [PubMed] [Cross Ref]
136. van der Windt DJ, Echeverri GJ, Ijzermans JN, Cooper DK.. The choice of anatomical site for islet transplantation. *Cell Transplant* (2008) 17(9):1005.10.3727/096368908786991515 [PubMed] [Cross Ref]
137. Dufrane D, Steenberghe M, Goebbels RM, Saliez A, Guiot Y, Gianello P.. The influence of implantation site on the biocompatibility and survival of alginate encapsulated pig islets in rats. *Biomaterials* (2006) 27(17):3201.10.1016/j.biomaterials.2006.01.028 [PubMed] [Cross Ref]
138. Eventov-Friedman S, Tchorsh D, Katchman H, Shezen E, Aronovich A, Hecht G, et al. Embryonic pig pancreatic tissue transplantation for the treatment of diabetes.

PLoS Med (2006) 3(7):e215.10.1371/journal.pmed.0030215 [PMC free article] [PubMed] [Cross Ref]

139. Menger MD, Yamauchi J, Vollmar B.. Revascularization and microcirculation of freely grafted islets of Langerhans. *World J Surg* (2001) 25(4):509.10.1007/s002680020345 [PubMed] [Cross Ref]

140. Jansson L, Carlsson PO.. Graft vascular function after transplantation of pancreatic islets. *Diabetologia* (2002) 45(6):749.10.1007/s00125-002-0827-4 [PubMed] [Cross Ref]

141. Johansson U, Rasmusson I, Niclou SP, Forslund N, Gustavsson L, Nilsson B, et al. Formation of composite endothelial cell-mesenchymal stem cell islets: a novel approach to promote islet revascularization. *Diabetes* (2008) 57(9):2393.10.2337/db07-0981 [PMC free article] [PubMed] [Cross Ref]

142. Sakata N, Chan NK, Chrisler J, Obenaus A, Hathout E.. Bone marrow cell cotransplantation with islets improves their vascularization and function. *Transplantation* (2010) 89(6):686.10.1097/TP.0b013e3181cb3e8d [PMC free article] [PubMed] [Cross Ref]

143. Tchorsh-Yutsis D, Hecht G, Aronovich A, Shezen E, Kliensky Y, Rosen C, et al. Pig embryonic pancreatic tissue as a source for transplantation in diabetes: transient treatment with anti-LFA1, anti-CD48, and FTY720 enables long-term graft maintenance in mice with only mild ongoing immunosuppression. *Diabetes* (2009) 58(7):1585.10.2337/db09-0112 [PMC free article] [PubMed] [Cross Ref]

144. Groth CG, Korsgren O, Tibell A, Tollemar J, Möller E, Bolinder J, et al. Transplantation of porcine fetal pancreas to diabetic patients. *Lancet* (1994) 344(8934):1402.10.1016/S0140-6736(94)90570-3 [PubMed] [Cross Ref]

145. Elliott RB.. Towards xenotransplantation of pig islets in the clinic. *Curr Opin Organ Transplant* (2011) 16(2):195.10.1097/MOT.0b013e3283449dec [PubMed] [Cross Ref]

146. Tan PL. Company profile: tissue regeneration for diabetes and neurological diseases at Living Cell Technologies. *Regen Med* (2010) 5(2):181.10.2217/rme.10.4 [PubMed] [Cross Ref]

147. Yu P, Zhang L, Li SF, Li YP, Cheng JQ, Lu YR, et al. Long-term effects on HEK-293 cell line after co-culture with porcine endogenous retrovirus. *Transplant Proc* (2005) 37(1):496.10.1016/j.transproceed.2004.12.296 [PubMed] [Cross Ref]
148. van der Laan LJ, Lockey C, Griffeth BC, Frasier FS, Wilson CA, Onions DE, et al. Infection by porcine endogenous retrovirus after islet xenotransplantation in SCID mice. *Nature* (2000) 407(6800):90.10.1038/35024089 [PubMed] [Cross Ref]
149. Valdes-Gonzalez R, Dorantes LM, Bracho-Blanchet E, Rodriguez-Ventura A, White DJ.. No evidence of porcine endogenous retrovirus in patients with type 1 diabetes after long-term porcine islet xenotransplantation. *J Med Virol* (2010) 82(2):331.10.1002/jmv.21655 [PubMed] [Cross Ref]
150. Amer LD, Mahoney MJ, Bryant SJ. Tissue Engineering Approaches to Cell-Based Type 1 Diabetes. *Therapy Tissue Engineering Part B: Reviews*. October 2014, 20(5): 455-467. doi:10.1089/ten.teb.2013.0462.
151. Bosco D, Armanet M, Morel P, Niclauss N. Unique arrangement of  $\beta$ -and  $\nu$ -cells in human islets of Langerhans. *Diabetes*, 2010; 59.
152. Cabrera O. The unique cytoarchitecture of human pancreatic islets has implications for islet cell function. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 2006; 103: 2334–2339.
153. Dufrane D, Gianello P. Pig islet for xenotransplantation in human: structural and physiological compatibility for human clinical application. *Transplant.Rev. (Orlando)*, 2012; 26: 183–188.
154. Шрейбер В. Патофизиология желез внутренней секреции. Медицинское издательство, Прага, 1987: с. 414.
155. Marigliano M, Bertera S, Grupillo M, Trucco M, Bottino R. Pig-to-nonhuman primates pancreatic islet xenotransplantation: an overview. *Curr.Diab. Rep.*, 2011; 11:402–412.
156. Dufrane D, Gianello P. Macro- or microencapsulation of pig islets to cure type 1 diabetes. *World J. Gastroenterol.*, 2012; 18: 6885–6893.
157. Van der Windt DJ. Clinical Islet Xenotransplantation: How Close Are We? *Diabetes*, 2012; 61: 3046–3055.

158. Sumi S, Gu Y, Hiura A, Inoue K. Regenerative medicine for insulin deficiency; creation of pancreatic islets and bioartificial pancreas. *J. Hepatobiliary Pancreat. Sci.*, 2011; 18 (1): 6-12.
159. Lumelsky N, Blondel O, Laeng P, Velasco I, Ravin R, McKay R. Differentiation of embryonic stem cells to insulin-secreting structures similar to pancreatic islets. *Science*, 2001; 292: 1389–1394.
160. Aguayo-Mazzucato C, Bonner-Weir S. Stem cell therapy for type 1 diabetes mellitus. *Nat. Rev.*, 2010; 6: 139-149.
161. D'Amour K, Bang AG, Eliazer S. Production of pancreatic hormone-expressing endocrine cells from human embryonic stem cells. *Nat Biotechnol*, 2006; 24:1392-1311.
162. Shi Y. Generation of functional insulin-producing cells from human embryonic stem cells in vitro. *Methods Mol. Biol.*, 2010; 636: 79-85.
163. Chandra V, Phadnis S, Nair P.D, Bhonde RR. Generation of pancreatic hormone-expressing islet-like cell aggregates from murine adipose tissue-derived stem cells. *Stem Cells* 2009; 27: 1941-1945.
164. Basford CL. The functional and molecular characterisation of human embryonic stem cell-derived insulin-positive cells compared with adult pancreatic beta cells. *Diabetologia*, 2012; 55: 358–371.
165. Uccelli A, Moretta L, Pistoia V. Mesenchymal stem cells in health and disease, *Nat Rev Immunol*. 2008 Sep; 8(9): 726-736. doi: 10.1038/nri2395.
166. Milanesi A. B-Cell regeneration mediated by human bone marrow mesenchymal stem cells. *PLoS One*, 2012; 7: e42177.
167. Tang DQ, Cao LZ, Burkhardt BR, Xia CQ, Litherland SA, Atkinson MA, Yang LJ. In vivo and in vitro characterization of insulin-producing cells obtained from murine bone marrow. *Diabetes*, 2004; 53: 1721–1732.
168. Chen L-B, Jiang X-B, Yang L. Differentiation of rat marrow mesenchymal stem cells into pancreatic islet beta-cells. *World J. Gastroenterol.* 2004; 10:3016–3020.
169. Kroon E, Martinson LA, Kadoya K. Pancreatic endoderm derived from human embryonic stem cells generates glucose-responsive insulin-secreting cells in vivo. *Nat. Biotechnol.*, 2008; 26: 443-451.



170. Gabr MM, Sobh MM, Zakaria MM, Refaie AF, Ghoneim MA. Transplantation of insulin-producing clusters derived from adult bone marrow stem cells to treat diabetes in rats. *Exp. Clin. Transplant.*, 2008; 6: 236-241.
171. Chiou SH, Chen SJ, Chang YL. A promotes the reprogramming of placenta-derived multipotent stem cells into pancreatic islets-like and insulin-positive cells. *J. Cell Mol. Med.*, 2010; Feb: 16-22.
172. Bernardo AS, Cho CH, Mason Sjo Biphasic induction of Pdx1 in mouse and human embryonic stem cells can mimic development of pancreatic beta-cells. *Stem Cells*, 2009; 27: 341-349.
173. Niknamasl A, Ostad SN, Soleimani M, Azami M, Salmani MK, Lotfibakhshaiesh N et al. A new approach for pancreatic tissue engineering: human endometrial stem cells encapsulated in fibrin gel can differentiate to pancreatic islet beta-cell. *Cell Biol Int.* 2014 Oct;38(10):1174-1182. doi: 10.1002/cbin.10314. Epub 2014 Jul 3.
174. Lee RH, Seo MJ, Reger RL, Spees JL, Pulin AA, Olson SD, D.J. Multipotent stromal cells from human marrow home to and promote repair of pancreatic islets and renal glomeruli in diabetic NOD/scid mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 2006; 103:17438–17443.
175. Chang C. Mesenchymal stem cells adopt beta-cell fate upon diabetic pancreatic microenvironment. *Pancreas*, 2009; 38:275–281.
176. Franquesa M, Hoogduijn MJ, Bestard O, Grinyo JM. Immunomodulatory effect of mesenchymal stem cells on B cells. *Front. Immunol.*, 2012; 3:212.
177. Hematti P, Kim J, Stein AP, Kaufman D. Potential role of mesenchymal stromal cells in pancreatic islet transplantation. *Transplant. Rev. (Orlando)*, 2013; 27:21–29.
178. Jun Y, Kang AR, Lee JS, Park S-J, Lee DY, Moon S-H. Microchip-based engineering of super-pancreatic islets supported by adipose-derived stem cells. *Biomaterials*. 2014; 35: 4815-4826.
179. 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; 48:49–57.

180. Song K-H. In vitro transdifferentiation of adult pancreatic acinar cells into insulin-expressing cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2004; 316:1094–1100.
181. Minami K, Seino S. Pancreatic acinar-to-beta cell transdifferentiation in vitro. *Front. Biosci.* 2008;1:5824–5837.
182. Yamada S, Yamamoto Y, Nagasawa M. In vitro transdifferentiation of mature hepatocytes into insulin-producing cells. *Endocr. J.* 2006; 53: 789–795.
183. Aviv V. Exendin-4 promotes liver cell proliferation and enhances the PDX-1-induced liver to pancreas transdifferentiation process. *J. Biol. Chem.* 2009; 284:33509–33520.
184. Lu Y, Li Y. Transdifferentiation of hepatic oval cells into pancreatic islet beta-cells. *Front. Biosci.* 2012; 17:2391–2395.
185. Shimoda M., Chen S., Noduchi H., Matsumoto S., Grayburn P.A. Neurogenic differentiation directs differentiation of cytokeratin 19-positive human pancreatic nonendocrine cells into insulin-producing cells. *Transpl. Proc.*, Vol. 42, N 6, 2010: 2071-2074.
186. Lee S-H, Hao E, Savinov AY, Geron I, Strong AJ, Itkin-Ansari P. Human B-cell precursors mature into functional insulin-producing cells in an immunoisolation device: implications for diabetes cell therapies. *Transplantation*, 2009, V.87, N 7: 983-991.
187. Smith RN, Kent SC, Nagle J, Selig M, Lafrate AJ, Najafian N et al. Pathology of an islet transplant 2 years after transplantation: evidence for an immunological loss. *Transplantation*, V.86, N7, 2008: 54-62.
188. Page H, Flood P, Reynaud EG. Three-dimensional tissue cultures: current trends and beyond. *Cell Tissue Res*, 2013;352:123–131.
189. Saito H, Takeuchi M, Chida K, Miyajima A. Generation of glucose-responsive functional islets with a three-dimensional structure from mouse fetal pancreatic cells and iPS cells in vitro. *PLoS One*, 2011; 6: e28209
190. Daoud J, Asami K, Rosenberg L, Tabrizian M. Long-term in vitro human pancreatic islet culture using three dimensional microfabricated scaffolds. *Biomaterials*, 2011; 32, 1536–1542.

191. Zhao V, Song C, Zhang W. The three-dimensional nanofiber scaffold culture condition improves viability and function of islets. *J. Biomat. Res. A.*, 2010; 94 (3): 667-672.
192. Kaufman-Francis K, Koffler J, Weinberg N., Dor, Y. & Levenberg, S. Engineered vascular beds provide key signals to pancreatic hormone-producing cells. *PLoS One*, 2012; 7: e40741..
193. Hall KK, Gattas-Asfura KM, Stabler CL. Microencapsulation of islets within alginate/poly (ethylene glycol) gels cross-linked via Staudinger ligation. *Acta Biomat*, 2011;**7**: 614–624.
194. Mason MN, Mahoney MJ. Inhibition of Gamma-Secretase Activity Promotes Differentiation of Embryonic Pancreatic Precursor Cells into Functional Islet-like Clusters in Poly(Ethylene Glycol) Hydrogel Culture. *Tissue Eng. Part A*, 2010; 16: 2593–2603.
195. Zhang Y, Jalili RB, Warnock GL., Ao Z, Marzban L, Ghahary A. Three-dimensional scaffolds reduce islet amyloid formation and enhance function of cultured human islets. *Am. J. Pathol.*, 2012, Oct., 181 (4): 1296-305.
196. Weber LM, He J, Bradley B., Haskins K, Anseth KS. PEG-based hydrogels as an in vitro encapsulation platform for testing controlled beta-cell microenvironments. *Acta Biomater*, 2006; 2: 1–8.
197. Cruise G, Hubbel J. In vitro and in vivo performance of porcine islets encapsulated in interfacially polymerized poly(ethylene glycol) diacrylate membranes. *Cell Transplant*. 1999; 8: 293–306.
198. Weber LM, Hayda KN, Haskins K, Anseth, KS. The effects of cell-matrix interactions on encapsulated beta-cell function within hydrogels functionalized with matrix-derived adhesive peptides. *Biomaterials*, 2007; 28: 3004–3011.
200. Mason MN, MahoneyMJ. Selective beta-Cell Differentiation of Dissociated Embryonic Pancreatic Precursor Cells Cultured in Synthetic Polyethylene Glycol Hydrogels. *Tissue Eng. Part A*, 2009; 15: 1343–1352.

201. Sabra G, Vermette P. A 3D cell culture system: separation distance between INS-1 cell and endothelial cell monolayers co-cultured in fibrin influences INS-1 cells insulin secretion. *Biotechnol. Bioeng*, 2013; 110: 619–627.
202. Cheng JY, Raghunath M, Whitelock J, Poole-Warren L. Matrix components and scaffolds for sustained islet function. *Tissue Eng. Part B Rev.*, 2011. 17: 235-247.
203. Stendahl J., Kaufman D., Stupp S. Extracellular matrix in pancreatic islets: Relevance to scaffold design and transplantation. *Cell Transplant.*, 2009; 18: 1-12.
204. Coronel M., Stabler C. Engineering a local microenvironment for pancreatic islet replacement. *Curr.Opin.Biotechnol.*, 2013; 24: 900-908.
205. Василец ВН. Методы изготовления матриц. В книге: Биосовместимые материалы (учебное пособие). Под ред. Севастьянова ВИ и Кирпичникова МП. М.: МИА (2011): 229-236.
206. Попов ВК. Имплантаты в заместительной и регенеративной медицине костных тканей. Там же: 253-294. Попов ВК.
207. Hynes RO. The extracellular matrix: not just pretty fibrils. *Science*, 2009; 326, 1216–1219.
208. Londono R, Badylak SF. Biologic Scaffolds for Regenerative Medicine: Mechanisms of In vivo Remodeling. *Annals of Biomedical Engineering*, March 2015, Volume 43, Issue 3: 577-592.
209. Deijnen JHM., Hulstaert CE, Wolters GHJ, Schilfgaarde R. Significance of the peri-insular extracellular matrix for islet isolation from the pancreas of rat, dog, pig, and man. *Cell Tissue Res*, 1992;267:139–146.
210. Jiang F-X, Harrison LC. Extracellular signals and pancreatic beta-cell development: a brief review. *Mol. Med*, 2002; 8: 763–70.
211. Jiang F-X., Georges-Labouesse E, Harrison LC. Regulation of laminin 1-induced pancreatic beta-cell differentiation by alpha6 integrin and alpha-dystroglycan. *Mol. Med*, 2001; 7: 107–114.
212. Pinkse GGM, Bouwman WP, Jiawan-Lalai R, Terpstra OT, Bruijn JA, Heer de E. Integrin signaling via RGD peptides and anti-1 antibodies confers resistance to apoptosis in islets of Langerhans. *Diabetes*, 2006; 55:1–6.

213. Ris F, Hammar E, Bosco D, Pilloud C, Maedler K, Donath MY et al. Impact of integrin-matrix matching and inhibition of apoptosis on the survival of purified human beta-cells in vitro. *Diabetologia*, 2002; 45: 841–850.
214. Hammar G, Parnaud D, Bosco E. Extracellular Matrix Protects Pancreatic beta-Cells Against Apoptosis. *Diabetes*, 2004; 53: 2034-2041.
215. Deijnen JH, Snylichem Van M, Wolters Van PTR, Schilfgaarde Van GHR. Cell& Tissue Distribution of collagens type I, type III and type V in the pancreas of rat, dog, pig and man. *Cell Tissue Res*, 1994; 277: 115–121.
216. Hughes SJ, Clark A, McShane P, Contractor HH, Gray DW, Johnson PR. Characterisation of collagen VI within the islet-exocrine interface of the human pancreas: implications for clinical islet isolation? *Transplantation*, 2006; 8:1,423–426.
217. Cirulli V, Beattie GM, Klier G. Expression and function of alpha(v)beta(3) and alpha(v)beta(5) integrins in the developing pancreas: roles in the adhesion and migration of putative endocrine progenitor cells. *J. Cell Biol.*, 2000; 150: 1445–1460.
218. Kaido T, Yebra M, CirulliV, MontgomeryAM. Regulation of human beta-cell adhesion, motility, and insulin secretion by collagen IV and its receptor alpha1beta1. *J Bio Chem*, 2004; 279: 53762–53769.
219. Yalili RB, Moeen-Rezakhanlou A, Hosseni-Tabatabaei A, Ao Z, Warnock GL. Fibroblast populated collagen matrix promotes islet survival and reduces the number of islet required for diabetes reversal. *J. Cell Physiol.*, 2011; 226 (7): 1813-1819.
220. Riopel M, Trinder M, Wang R. Fibrin, a scaffold material for islet transplantation and pancreatic endocrine tissue engineering. *Tissue Eng. Part B Rev*, 2014, Jul. 24 (Epub ahead of print).
221. Kuehn C, Lakey JR, Lamb MW, Vermette P. Young porcine endocrine pancreatic islets cultured in fibrin show improved resistance toward hydrogen peroxide. *Islets*. 2013 Sep-Dec; 5(5):207-215. doi: 10.4161/isl.26989. Epub 2013 Nov.
222. Севастьянов ВИ, Перова НВ, Немец Е.А. и др. Примеры экспериментально-клинического применения биосовместимых материалов в регенеративной медицине. В книге: Биосовместимые материалы (учебное пособие). Под ред. Севастьянова ВИ и Кирпичникова МП. М.: МИА (2011): 237-252.

223. Fisher SA, Tam RY, Shoichet MS. Tissue mimetics: engineered hydrogel matrices provide biomimetic environments for cell growth. *Tissue Engineering*, 2014; Part A. 20: 895-898.
224. Севастьянов В.И. Технологии тканевой инженерии и регенеративной медицины. *Вестник трансплантологии и искусственных органов*. 2014; 16(3): 93-108.
225. Перова НВ, Севастьянов ВИ. Биополимерный гетерогенный гидрогель Сферо®ГЕЛЬ - инъекционный биодеградируемый имплантат. *Практическая медицина*. 2014; 8 (84): 111-116.
226. Chun S, Huang Y, Xie WJ, Hou Y, Huang RP, Song Y. Adhesive growth of pancreatic islet cells on a polyglycolic acid fibrous scaffold. *Transplant. Proc.*, 2008;40: 1658–1663.
227. Daoud J, Asami K, Rosenberg L, Tabrizian M. Long-term in vitro human pancreatic islet culture using three dimensional microfabricated scaffolds. *Biomaterials*, 2011; 32, 1536–1542.
228. Marchioli G, van Gurp L, van Krieken PP. Fabrication of three-dimensional bioplotting hydrogel scaffolds for islets of Langerhans transplantation. *Biofabrication*. 2015 May 28; 7(2):025009. doi: 10.1088/1758-5090/7/2/025009
229. Kaufman-Francis K, Koffler J, Weinberg N, Dor Y, Levenberg S. Engineered vascular beds provide key signals to pancreatic hormone-producing cells. *PLoS One*, 2012; 7:740-741.
230. Скалецкий Н.Н., Кирсанова Л.А., Бубенцова Г.Н., Баранова Н.В., Скалецкая Г.Н., Севастьянов В.И. Выявление островкового потенциала донорской поджелудочной железы с использованием иммуноморфологического анализа. *Вестник трансплантологии и искусственных органов*, 2016, № 1, С. 31-37.
231. Кирсанова Л.А., Баранова Н.В., Скалецкий Н.Н., Зайденов В.А., Бубенцова Г.Н., Пушкова И.А. Поджелудочная железа новорожденных кроликов как источник прогениторных клеток. *Вестник трансплантологии и искусственных органов*. 2011, № 1. С. 61-64.

232. Кирсанова Л.А., Бубенцова Г.Н., Баранова Н.В., Скалецкий Н.Н., Зайденов В.А., Пушкова И.А. Особенности формирования островкоподобных кластеров при культивировании монослоя протокового эпителия. Вестник трансплантологии и искусственных органов. 2012, № 4. С. 74-79.

233. Богданова Н.Б., Абрамов В.Ю., Скалецкий Н.Н., Петрова И.А., Пушкова И.А., Баранова Н.В., Бубенцова Г.Н.. Исследование фиксации сывороточных иммуноглобулинов человека на культивированных островковых клетках поджелудочной железы кролика. 4 Всероссийский съезд трансплантологов. 2007. С. 227-228.