

DOI: 10.15825/1995-1191-2019-4-45-53

СРАВНИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ СЕКРЕТОРНОЙ СПОСОБНОСТИ ОСТРОВКОВ ЛАНГЕРГАНСА, КУЛЬТИВИРОВАННЫХ С БИОПОЛИМЕРНЫМ КОЛЛАГЕНСОДЕРЖАЩИМ ГИДРОГЕЛЕМ И ТКАНЕСПЕЦИФИЧЕСКИМ МАТРИКСОМ

Н.В. Баранова, Л.А. Кирсанова, А.С. Пономарева, Е.А. Немец, Ю.Б. Басок, Г.Н. Бубенцова, В.А. Сургученко, В.И. Севастьянов

ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр трансплантологии и искусственных органов имени академика В.И. Шумакова» Минздрава России, Москва, Российская Федерация

Введение. Созданию биомедицинского клеточного продукта – биоинженерной конструкции поджелудочной железы (ПЖ) – препятствуют проблемы, связанные с поддержанием жизнеспособности функционально активных изолированных островков Лангерганса (ОЛ). Сохранению структуры и функции изолированных ОЛ в условиях *in vitro* и *in vivo* могут способствовать как биополимерные, так и тканеспецифические матриксы. Наиболее предпочтительные для клеток тканеспецифические матриксы могут быть получены в результате децеллюляризации поджелудочной железы (ДПЖ-матрикс). **Цель.** Провести сравнительный анализ секреторной функции изолированных ОЛ крысы, культивированных в присутствии биополимерного коллагенсодержащего гидрогеля (БМКГ) и тканеспецифического ДПЖ-матрикса соответственно. **Материалы и методы.** ОЛ из ПЖ крысы выделяли, используя классическую коллагеназную технику с некоторыми модификациями. ОЛ культивировали в присутствии БМКГ- и тканеспецифического матрикса в стандартных условиях. Тканеспецифический ДПЖ-матрикс получали в результате децеллюляризации ПЖ крысы. ДПЖ-матрикс был исследован на цитотоксичность, присутствие ДНК и подвергнут морфологическому изучению. Секреторную функцию ОЛ исследовали методом иммуноферментного анализа (ИФА). **Результаты.** Было показано, что секреторная функция островков, культивированных в присутствии БМКГ- и ДПЖ-матрикса, значительно выше, чем в монокультуре островков. Выявлено преимущество применения тканеспецифического ДПЖ-матрикса при создании биоинженерной конструкции ПЖ по сравнению с БМКГ-матриksom. **Заключение.** БМКГ и тканеспецифический ДПЖ-матриксы способствуют не только сохранению жизнеспособности изолированных ОЛ, но и пролонгированию их секреторной способности в течение 10 дней, по сравнению с монокультурой ОЛ.

Ключевые слова: островки Лангерганса, биополимерный гидрогель, децеллюляризованная поджелудочная железа, матрикс, культивирование, секреция инсулина.

COMPARATIVE ANALYSIS OF SECRETORY CAPACITY OF LANGERHANS ISLETS CULTURED WITH BIOPOLYMER COLLAGEN-CONTAINING HYDROGEL AND TISSUE-SPECIFIC MATRIX

N.V. Baranova, L.A. Kirsanova, A.S. Ponomareva, E.A. Nemets, Y.B. Basok, G.N. Bubentsova, V.A. Surguchenko, V.I. Sevastianov

V.I. Shumakov National Medical Research Center of Transplantology and Artificial Organs of the Ministry of Healthcare of the Russian Federation, Moscow, Russian Federation

Introduction. The creation of a biomedical cell product – a bioengineered construct of the pancreas – is hampered by problems associated with maintaining the viability of isolated islets of Langerhans (OL). Both biopolymer

Для корреспонденции: Баранова Наталья Владимировна. Адрес: 123182, Москва, ул. Щукинская, д. 1. Тел.: (499) 190-42-66, (917) 568-98-22. E-mail: barnats@yandex.ru

For correspondence: Baranova Natalya Vladimirovna. Address: 1, Shchukinskaya str., Moscow, 123182, Russian Federation. Tel.: (499) 190-42-66, (917) 568-98-22. E-mail: barnats@yandex.ru

and tissue-specific matrices can contribute to the preservation of the structure and function of isolated OL *in vitro* and *in vivo*. The most preferred tissue-specific matrices for cells can be obtained as a result of pancreatic decellularization (DP matrix). **Aim:** comparative analysis of the secretory function of rat isolated OL cultured with biopolymer collagen-containing hydrogel (BMCH) and tissue-specific DP matrix, respectively. **Materials and methods.** OL was isolated using classical collagenase technique with some modifications. OL was cultured in the presence of BMCH- and tissue-specific matrix under standard conditions. Tissue-specific DP matrix was obtained by decellularization of rat pancreas. The DP matrix was examined for cytotoxicity, DNA presence and subjected to morphological study. The secretory function of OL was studied by enzyme immunoassay (ELISA). **Results.** It has been shown that the secretory function of islets cultured in the presence of BMCH- and DP matrix is significantly higher than in the islets monoculture. Identified the advantage of tissue-specific DP matrix when creating bioengineered constructs of the pancreas compared to BMCH matrix. **Conclusion.** BMCH and tissue-specific DP matrices contribute not only to the preservation of the viability of isolated OL, but also to the prolongation of their secretory ability for 10 days, compared to the monoculture OL.

Key words: islets of Langerhans, biopolymer hydrogel, decellularized pancreas, matrix, cultivation, insulin secretion.

ВВЕДЕНИЕ

Созданию биомедицинского клеточного продукта – биоинженерной конструкции поджелудочной железы (ПЖ) препятствуют проблемы, связанные с поддержанием жизнеспособности функционально активных изолированных островков Лангерганса (ОЛ) [1, 2]. Известно, что в процессе изоляции ОЛ утрачивают васкуляризацию, иннервацию, а также лишаются связей с внеклеточным матриксом (ВКМ), играющим значимую роль в регуляции множества аспектов физиологии островков, включая выживаемость, пролиферацию и секрецию инсулина [3, 4]. Сохранению структуры и функции изолированных ОЛ в условиях *in vitro* и *in vivo* могут способствовать матриксы-биомиметики ВКМ, обладающие свойствами, характерными для нативного микроокружения поджелудочной железы [5–7]. К биомиметикам, моделирующим состав ВКМ, относится и биополимерный микрогетерогенный коллагенсодержащий гидрогель (БМКГ-матрикс) – многокомпонентный продукт из природных соединений, в состав которого входят пептиды частично гидролизованного коллагена, гликопротеины, уроновые кислоты, а также биологически активные вещества ВКМ, включая факторы роста, необходимые для жизнедеятельности клеток [8].

Известно, что при инкубации с коллагенсодержащими матриксами изолированные ОЛ длительное время сохраняют целостность, жизнеспособность и секреторную функцию по сравнению с монокультурами ОЛ [9, 10]. Ранее нами было показано, что культивирование изолированных ОЛ крысы с БМКГ-матриksom способствует сохранению жизнеспособности и характерной структуры ОЛ *in vitro* в течение 14 суток [11].

При всех своих достоинствах резорбируемые матриксы из биополимерных материалов не обладают тканевой специфичностью. В последние годы интенсивно начались разработки биоинженерных

конструкций на основе тканеспецифических матриксов, изготовленных из децеллюляризованных тканей с сохранением структурных, биохимических и биомеханических свойств нативного ВКМ с последующей рецеллюляризацией клеточными компонентами [12, 13]. При разработке протоколов децеллюляризации ПЖ важно учитывать сохранение ее архитектоники и микроциркуляторного русла при максимально полном удалении клеточного материала, в том числе ДНК, для минимизации иммунного ответа при имплантации биоинженерной конструкции ПЖ и с минимальным повреждением компонентов ВКМ [14, 15]. Присутствие в децеллюляризованном матриксе ПЖ (ДПЖ-матрикс) нативных компонентов ВКМ, таких как структурные белки (различные типы коллагена, эластин, фибронектин и ламинин), гликопротеины и факторы клеточной адгезии, позволяет создать условия для пролонгированной жизнедеятельности островковых клеток и практически полностью имитировать ВКМ [16]. Трехмерная структура ВКМ определяет топографическое расположение эндокринных клеток ПЖ, что также влияет на выживаемость и секреторную активность ОЛ [17]. Показано, что островки, культивированные в присутствии ДПЖ-матрикса, увеличивали секрецию инсулина по сравнению с изолированными ОЛ в монокультуре [18].

Цель нашей работы заключалась в проведении сравнительного анализа секреторной активности изолированных ОЛ крысы, культивированных с биополимерным микрогетерогенным коллагенсодержащим гидрогелем и тканеспецифическим матриксом.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Экспериментальные животные

Исследования проводили на половозрелых крысах-самцах породы Wistar (180–220 г), полученных из питомника лабораторных животных ФГУП ОПХ «Манихино». Акклиматизацию и содержание лабо-

раторных животных осуществляли в соответствии с межгосударственным стандартом ГОСТ ISO 10993-2-2009 «Изделия медицинские. Оценка биологического действия медицинских изделий». Часть 2. «Требования к обращению с животными».

Все манипуляции с животными проводили в соответствии с «Правилами проведения работ с использованием экспериментальных животных» от 1973 г. и 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).

Гидрогелевый миметик ВКМ

В качестве гидрогелевого миметика ВКМ была выбрана инъекционная форма БМКГ-матрикса из линейного ряда композиции *Сфера*[®]ГЕЛЬ (АО «БИОМИР сервис», Россия), предназначенная для применения в клеточных технологиях со следующими характеристиками: средний размер микрочастиц – $145,79 \pm 0,09$ мкм; модуль упругости – 1170 ± 12 Па; модуль вязкости – $62,9 \pm 7,9$ Па; набухаемость – не ниже $86,6 \pm 3,0$ масс. %; время резорбции – до 9 месяцев. Ранее проведенные исследования продемонстрировали, что данный БМКГ-матрикс является оптимальным для создания клеточно- и тканеинженерных конструкций [19].

Тканеспецифический ВКМ

В качестве тканеспецифического ВКМ был выбран матрикс, полученный из децеллюляризованной ткани ПЖ крысы (ДПЖ-матрикс).

Для децеллюляризации использовали субтотально удаленную ПЖ крысы, измельченную вручную с помощью глазных ножниц до размера фрагментов не более $1 \times 1 \times 2$ мм. Фрагменты ПЖ обрабатывали при комнатной температуре в условиях непрерывного перемешивания (ротационная система MultiBio RS-24, скорость 5 оборотов/мин) последовательно в 0,1% растворе додецилсульфата натрия (SDS) на дистиллированной воде в течение 3 часов, в 0,1% растворе SDS на 1N NaCl в течение 3 часов и в 0,1% растворе SDS на фосфатно-солевом буфере (PBS, pH = 7,35) в течение 18 часов. На конечной стадии получения ДПЖ-матрикса децеллюляризованные фрагменты панкреатической ткани отмывали от остатков поверхностно-активных агентов в течение 72 часов в трех сменах PBS, содержащего антибиотик/антимикотик. Смену раствора осуществляли один раз в сутки. Образцы ДПЖ-матрикса (фрагменты ДПЖ в PBS) вносили в криопробирки, замораживали и подвергали γ -стерилизации (1,5 Мрад). Стерильный ДПЖ-матрикс хранили при температуре 4–6 °С и не-

посредственно перед экспериментом дополнительно измельчали до среднего размера микрофрагментов 500 ± 45 мкм для уменьшения степени микрогетерогенности.

Морфологическое исследование ДПЖ-матрикса

Для морфологического исследования образцы ДПЖ-матрикса фиксировали в 10% забуференном формалине, обезжизивали в спиртах восходящей концентрации, выдерживали в смеси хлороформа и этанола, хлороформе и заливали в парафин. Срезы толщиной 4–5 мкм, полученные на микротоме RM2245 (Leica, Германия), депарафинировали, регидратировали и окрашивали гематоксилином и эозином, на общий коллаген (метод Массона), на эластические волокна (метод Унны–Тенцера), а также проводили флюоресцентное окрашивание DAPI для качественного определения ядерного материала в ДПЖ-матриксе.

Количественное определение ДНК в ДПЖ-матриксе

Для определения степени иммуногенности децеллюляризованного материала по остаточному количеству ядерного материала в ДПЖ-матриксе проводили выделение и флюоресцентное окрашивание ДНК [20].

Выделение ДНК из образцов ДПЖ-матрикса проводили с помощью набора DNeasyBlood&TissueKit (QIAGEN, Германия) согласно инструкции производителя. Для количественного определения ДНК согласно протоколу использовали флюоресцентный краситель[™] PicogreenQuant-iT (Invitrogen, США), действие которого активировалось излучением с длиной волны 480 нм. Полученная термоэлектронная эмиссия анализировалась на ридере для микропланшетов Spark 10M (TecanTrading AG, Швейцария) при длине волны 520 нм. Для определения абсолютного количества ДНК использовали калибровочную кривую ДНК бактериофага λ (Invitrogen, США) в диапазоне 0,0–1000 нг/мл.

Исследование ДПЖ-матрикса на цитотоксичность

Цитотоксичность образцов ДПЖ-матрикса *in vitro* оценивали методом прямого контакта в соответствии с межгосударственным стандартом ГОСТ ISO 10993-5-2011 «Изделия медицинские. Оценка биологического действия медицинских изделий. Часть 5. Исследование на цитотоксичность: методы *in vitro*» на культуре фибробластов мыши линии L929. Отрицательным контрольным образцом служила культуральная среда с 10% эмбриональной телячьей сывороткой (HyClone, США). В качестве

положительного контрольного образца использовали стандарт цинка одноэлементный водный 10 000 мкг/мл (Sigma-Aldrich, США). Все процедуры проводили в асептических условиях. Визуально культуру оценивали с помощью инвертированного микроскопа Eclipse TS100 (Nikon, Япония).

Метаболическую активность фибробластов после контакта с образцами матрикса оценивали через 24 ч с помощью витального красителя prestoBlue™ CellViabilityReagent (Invitrogen™, США) согласно протоколу производителя. Изменение оптической плотности регистрировали с использованием ридера для микропланшетов Spark 10M (TecanTrading AG, Швейцария) с программным обеспечением SparkControl™ Magellan V1.2.20 на длинах волн 570 и 600 нм.

Статистическую обработку полученных данных проводили с помощью приложения Microsoft Excel 2007. Все результаты представлены в виде «среднее значение ± среднее квадратичное отклонение». Различия считали достоверными при $p < 0,05$.

Изоляция и идентификация островков Лангерганса

Процедуру выделения ОЛ из ПЖ половозрелой крысы ($n = 6$) проводили на основе классических протоколов с использованием коллагеназы [21, 22] с некоторыми модификациями [11].

Идентификацию островков осуществляли, проводя окрашивание дитизином. Краситель избирательно окрашивал ОЛ, при этом ацинарные клетки оставались неокрашенными [22]. Ресуспендированные изолированные ОЛ в дальнейшем использовали в эксперименте.

Культивирование ОЛ в присутствии БМКГ- и ДПЖ-матрикса

Свежевыделенные ОЛ ресуспендировали в среде DMEM/F12 (1:1) с 10% содержанием ЭТС, 2 мМ L-глутамин, 1 М Нерес и 50 мг/мл гентамицина и приблизительно равное количество островков ($n = 300 \pm 25$) вносили в три культуральных флакона 25 см². Островки, культивированные без добавления матрикса (культуральный флакон 1), служили контролем. В культуральные флаконы 2 и 3 вносили 0,2–0,3 мл тщательно ресуспендированного БМКГ-матрикса (опытная группа I) и 0,2–0,3 мл суспензии ДПЖ-матрикса со средним размером микрофрагментов 500 ± 45 мкм (опытная группа II) соответственно.

Инкубацию всех культуральных систем проводили в стандартных условиях при 37 °С в CO₂-инкубаторе в увлажненной атмосфере, содержащей 5% CO₂. Мониторинг и фотосъемку культивируемых островков проводили с помощью инвертированного микроскопа Nikon Eclipse TS100 (Nikon, Япония),

оснащенного цифровой фотокамерой. Смену культуральной среды осуществляли на сроках 1, 2, 3, 6, 8 и 10 суток с целью отбора проб для последующего исследования на содержание инсулина.

Метод иммуноферментного анализа для определения содержания инсулина в культуральной среде

Перед определением содержания в пробах инсулина из культуральных флаконов на указанных сроках инкубации удалялась ростовая среда и заменялась свежей питательной средой. Через 1 час инкубации в прежних условиях (37 °С, 5% CO₂) отбирали пробы ростовой среды и замораживали (–23 °С) для последующего исследования [23].

Для определения базальной концентрации инсулина в культуральной среде использовали набор для иммуноферментного анализа (ИФА) Rat Insulin ELISA Kit (Thermo scientific, США), действующего по принципу твердофазного сэндвич-метода, согласно инструкции производителя. В данном варианте ИФА используется пара антител, специфичных к пространственно удаленным эпитопам исследуемого антигена, что позволяет добиться высокой чувствительности и специфичности при определении антигена (инсулина).

Оптическую плотность измеряли, используя микропланшетный ридер Spark 10M (TecanTrading AG, Швейцария) с программным обеспечением SparkControl™ Magellan V1.2.20 на длинах волн 450 и 550 нм для учета оптических дефектов микропланшета.

Статистическую обработку полученных данных проводили с помощью приложения Microsoft Excel 2007. Результаты количественного метода ИФА рассчитывали по линейной калибровочной кривой. Все результаты представлены в виде «среднее значение ± среднее квадратичное отклонение». Различия считали достоверными при $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Морфологическое исследование ДПЖ-матрикса

Предварительное морфологическое исследование подтвердило классическую картину строения ПЖ крысы без признаков ишемического повреждения (рис. 1). Образцы децеллюляризованной ПЖ, использованные в эксперименте, демонстрировали в целом сохранность архитектоники стромы и были представлены ажурной волокнистой структурой, напоминающей ячеистую сеть. Сохранившиеся клетки и отдельные клеточные ядра в образцах не обнаруживались. Специфическое окрашивание с DAPI подтверждало отсутствие клеточных ядер и фрагментов ядерного материала в матриксе, тем

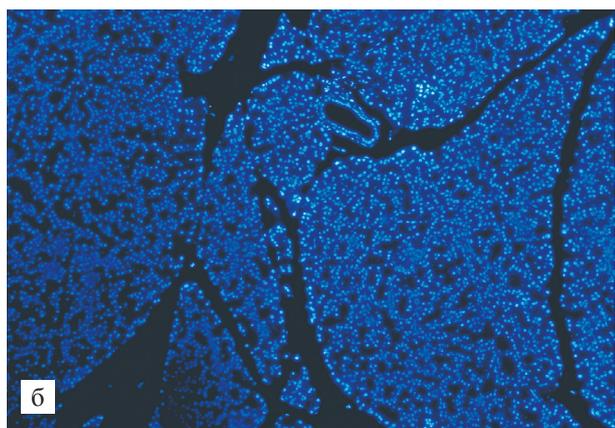
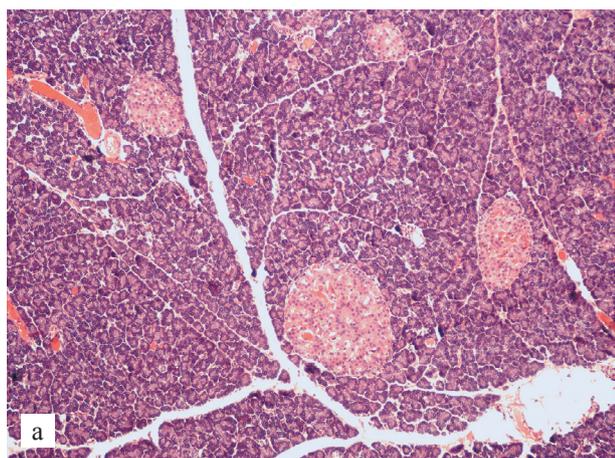


Рис. 1. Гистологическая картина поджелудочной железы крысы: а – гематоксилин и эозин; б – флюоресцентное окрашивание клеточных ядер с DAPI. $\times 100$

Fig. 1. Histological structure of rat pancreas: a – H&E staining; б – nuclear DAPI staining. $\times 100$

самым свидетельствуя об эффективности проведенной процедуры децеллюляризации панкреатической ткани (рис. 2, а). Окрашивание образцов по методу Массона позволяло визуализировать коллагеновые волокна в составе полученного матрикса (рис. 2, б), а окрашивание орсеином выявляло также наличие и эластических волокон, что свидетельствовало о сохранности основных фибриллярных белков матрикса (рис. 2, в).

Количественное определение ДНК в ДПЖ-матриксе

Количественный анализ нативной и децеллюляризованной ткани ПЖ крысы показал, что матрикс децеллюляризованной ПЖ по сравнению с исходной тканью был в значительной степени ($p < 0,05$) очищен от ДНК (табл. 1).

Таким образом, в результате децеллюляризации в ткани сохранилось не более 0,1 % ДНК, что свидетельствовало о высокой эффективности децеллюляризации, и соответственно, низкой иммуногенности полученного матрикса (рис. 3).

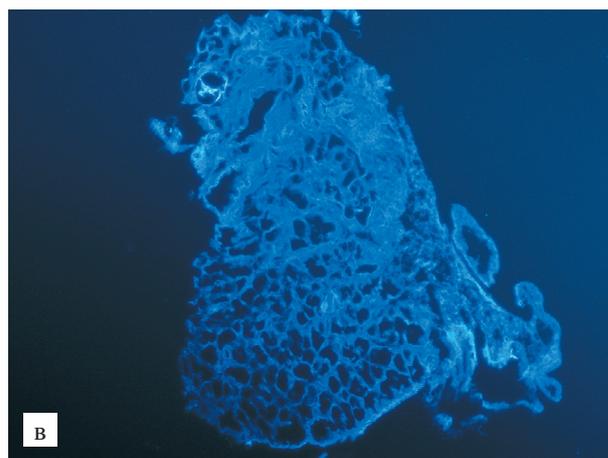
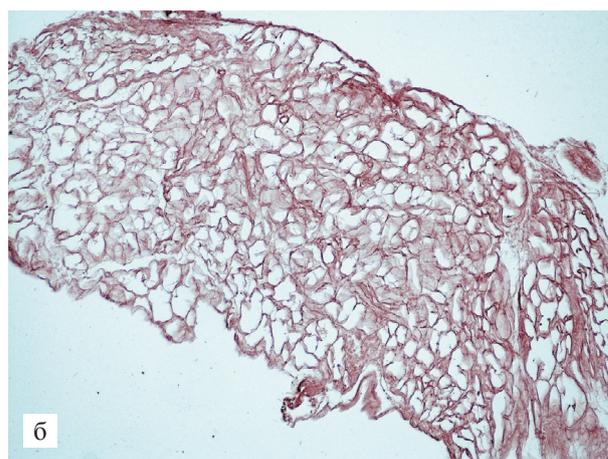
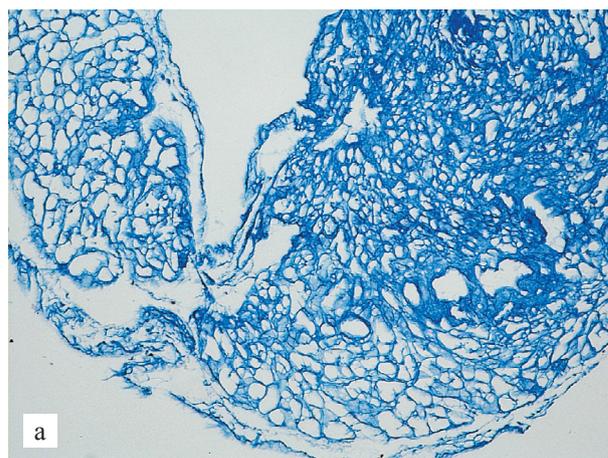


Рис. 2. Гистологическая картина децеллюляризованной поджелудочной железы крысы (ДПЖ-матрикс): а – окрашивание на общий коллаген по методу Массона демонстрирует полное отсутствие клеток и сохранность коллагеновых волокон матрикса; б – окрашивание по методу Унны–Тенцера выявляет наличие эластических волокон в матриксе; в – флюоресцентное окрашивание матрикса с DAPI подтверждает отсутствие клеточных ядер в ДПЖ-матриксе. $\times 200$

Fig. 2. Histological structure of decellularized rat pancreas (DP matrix): а – Masson's trichrome staining demonstrated complete absence of cells and preservation of collagen fibres; б – Unna-Tentser's staining revealed preservation of elastic fibres; в – nuclear DAPI staining confirmed absence of nuclear material in DP matrix. $\times 200$

Таблица 1

Количественное содержание ДНК в нативной и децеллюляризованной ткани ПЖ крысы
Quantitative content DNA in native and decellularized rat pancreatic tissue

Образец ткани ПЖ крысы	ДНК, нг Среднее значение ± стандартная ошибка
Нативная ПЖ крысы	1354,8 ± 168,7
Децеллюляризованная ПЖ крысы	1,3 ± 0,3

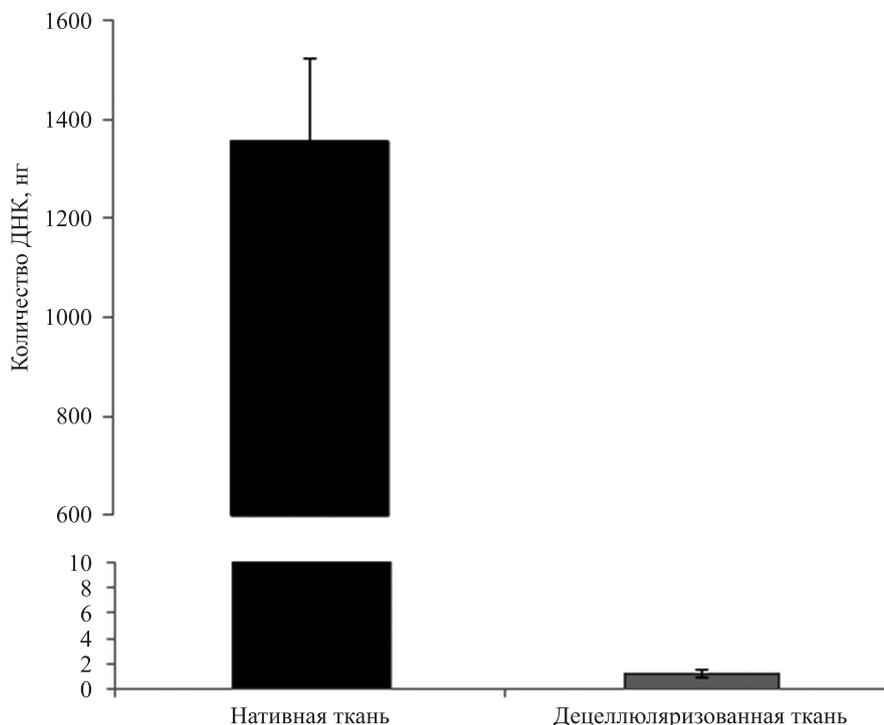


Рис. 3. Сравнительный анализ количественного содержания ДНК в нативной и децеллюляризованной ткани ПЖ крысы

Fig. 3. Quantification DNA in native and decellularized rat pancreatic tissue

Цитотоксичность ДПЖ-матрикса

Анализ результатов проводился согласно оценочной шкале степени ответной реакции клеток после инкубации с образцами (n = 3) ДПЖ матрикса.

В табл. 2 представлены значения, характеризующие пролиферативную активность фибробластов L929 относительно отрицательного контроля (степень реакции 0). После контакта с образцами ДПЖ-матрикса пролиферативная активность фибробластов относительно отрицательного контроля осталась выше 90% (степень реакции 0), что показало отсут-

ствие цитотоксического действия образцов данного матрикса. Положительный контроль в данном эксперименте продемонстрировал резкую цитотоксичность (степень реакции 4).

Морфофункциональные свойства ОЛ при инкубации с БМКГ- и ДПЖ-матриксами

Полученные ОЛ имели округлую или овальную форму и сохраняли целостность, что свидетельство-

Таблица 2

Результаты исследования на цитотоксичность ДПЖ-матрикса
Results of DP matrix cytotoxicity study

№ образца	Наименование образца	% пролиферирующих клеток относительно отрицательного контроля	Степень ответной реакции клеток
1	ДПЖ-матрикс	96,25 ± 1,69	0
2	Положительный контроль	7,84 ± 2,34	4

вало о том, что в процессе выделения макроструктура ОЛ не пострадала (рис. 4).

Через сутки культивирования значимых морфологических изменений в монокультуре ОЛ (контрольная группа) не выявлялось. Однако после трех суток обнаруживались первые признаки деструкции: в некоторых островках появлялись полости, а поверхность их становилась бугристой. На рубеже шести суток культивирования большая часть контрольных островков претерпевала фрагментацию.

В опытной группе I значительная часть островков через сутки культивирования проявляла адгезивные свойства и прикреплялась к поверхности БМКГ-матрикса, в то время как остальные островки продолжали флотировать (рис. 5). Такая картина практически не менялась на протяжении всего срока наблюдения (10 суток). При этом ОЛ были визуально сохранены.

В отличие от первой опытной группы островки, культивированные с ДПЖ-матриksom (опытная группа II), не проявляли адгезивных качеств, и находясь в непосредственной близости с матриksom, оставались интактными вплоть до 5 суток инкубации. В дальнейшем не менее половины культивированных ОЛ осаждались на поверхность ДПЖ-матрикса (рис. 6). В течение всего срока наблюдения, так же как и в первой опытной группе, выраженных признаков деструкции островков не обнаруживалось.

Секреторная функция ОЛ при инкубации с БМКГ- и ДПЖ-матриксами

Через 24 часа культивирования отмечалось, что концентрация инсулина в I и II опытных группах была выше на 26,2% ($258,4 \pm 9,7 \mu\text{IU/mL}$) и на 48,7% ($304,9 \pm 12,2 \mu\text{IU/mL}$) по сравнению с контрольной группой ($205,1 \pm 11,5 \mu\text{IU/mL}$), на третьи сутки инкубации – на 62,1% ($149,0 \pm 12,3 \mu\text{IU/mL}$) и 102,9% ($186,5 \pm 10,9 \mu\text{IU/mL}$) соответственно по сравнению с контрольной группой ($91,9 \pm 7,8 \mu\text{IU/mL}$) (табл. 3).

Таблица 3

Сравнительный анализ содержания инсулина в опытных группах относительно контрольной группы (монокультура ОЛ), %

Comparative analysis of insulin in experimental groups relative to the control group (OL monoculture), %

Сутки	ОЛ + БМКГ (I опытная группа)	ОЛ + ДПЖ (II опытная группа)
1	$26,2 \pm 3,8$	$48,7 \pm 4,0$
2	$31,6 \pm 6,2$	$71,6 \pm 5,7$
3	$62,1 \pm 8,3$	$102,9 \pm 5,8$
6	$249,6 \pm 10,4$	$373,6 \pm 6,9$

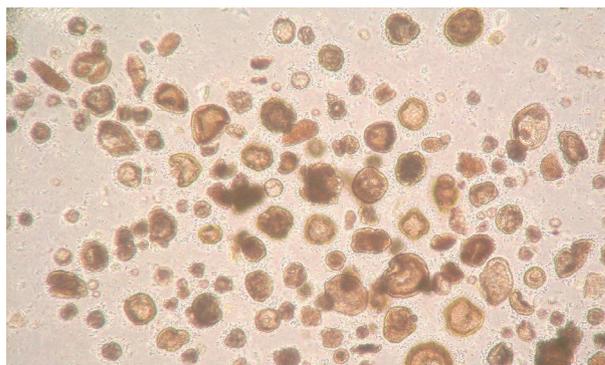


Рис. 4. Изолированные островки Лангерганса, инвертированный микроскоп. $\times 200$

Fig. 4. Isolated Langerhans islets, inverted microscope. $\times 200$

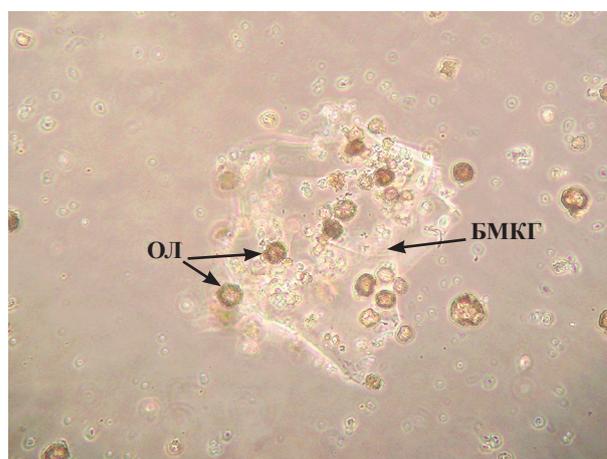


Рис. 5. Островки Лангерганса, культивируемые с БМКГ, 7 суток инкубации, инвертированный микроскоп. $\times 100$

Fig. 5. Langerhans islets cultivated with BMCH, 7 days, inverted microscope. $\times 100$

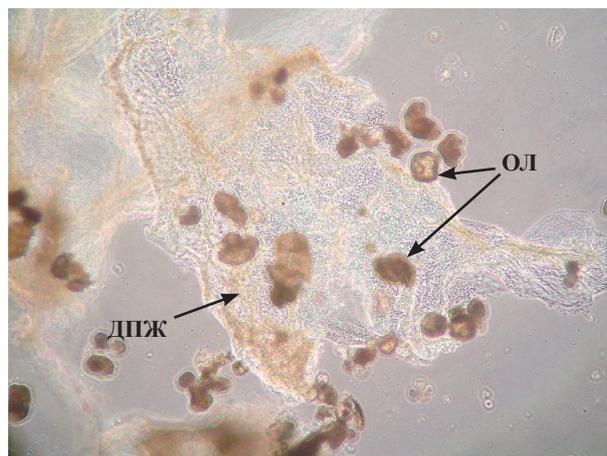


Рис. 6. Островки Лангерганса, культивируемые с ДПЖ-матриksom, 7 суток инкубации, инвертированный микроскоп. $\times 100$

Fig. 6. Langerhans islets cultivated with decellular rat pancreas (DP matrix), 7 days, inverted microscope. $\times 100$

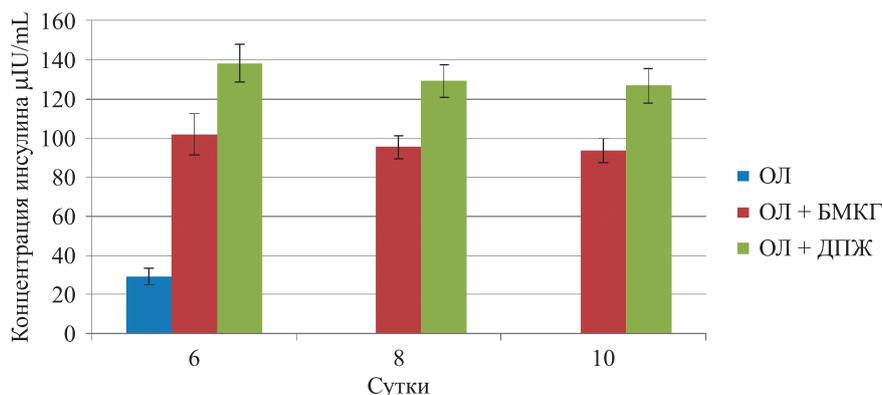


Рис. 7. Сравнительный анализ концентрации инсулина в контрольной (монокультура ОЛ) и опытных (ОЛ, культивируемые с БМКГ- и с ДПЖ-матриксами соответственно) группах

Fig. 7. Quantification insulin in the control (monoculture OL) and experimental (OL, cultured with BMCH and DP matrix respectively) groups

Выявленное различие в концентрации гормона в контрольной и опытных группах на этих сроках можно объяснить позитивным влиянием матрикса на функциональную способность ОЛ. На шестые сутки культивирования наблюдали еще более значимую разницу между концентрациями инсулина в I и II опытных группах ($102,1 \pm 10,6$ и $138,3 \pm 9,6$ $\mu\text{IU}/\text{mL}$ соответственно) и контролем ($29,2 \pm 4,1$ $\mu\text{IU}/\text{mL}$). Это коррелирует с морфологическими данными о деструктивных изменениях, происходящих в островках после трех суток суспензионного культивирования. На 8–10-е сутки инкубации в контрольной группе сохранившиеся островки не обнаруживались, по этой причине исследовать культуральную среду представлялось неактуальным. В то же время в указанные сроки в опытных группах концентрация инсулина практически оставалась неизменной: I группа – $93,7 \pm 6,2$ $\mu\text{IU}/\text{mL}$, II группа – $126,9 \pm 8,9$ $\mu\text{IU}/\text{mL}$, при этом уровень секреции инсулина во II группе (ОЛ в присутствии тканеспецифического ДПЖ-матрикса) был на 35,5% выше, чем в I группе (ОЛ в присутствии БМКГ-матрикса) (рис. 7). Несмотря на то что концентрация инсулина, выраженная в абсолютных значениях, с увеличением срока культивирования снижалась, положительная тенденция влияния матрикса (БМКГ и ДПЖ) на секреторную функцию островков в процентном отношении сохранялась на протяжении всего срока наблюдения.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

БМКГ- и тканеспецифический ДПЖ-матрикса способствуют не только сохранению жизнеспособности изолированных ОЛ, но и пролонгированию их секреторной способности в течение 10 дней по сравнению с монокультурой ОЛ. В условиях проведенных экспериментов показано преимущество применения тканеспецифического ДПЖ-матрикса

для создания биоинженерной конструкции ПЖ по сравнению с БМКГ-матриксами.

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

The authors declare no conflict of interest.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ / REFERENCES

1. Kumar N, Joisher H, Ganguly A. Polymeric scaffolds for pancreatic tissue engineering: a review. *Rev Diabet Stud.* 2018 Winter; 14 (4): 334–353. doi: 10.1900/RDS.2017.14.334.
2. Lemos NE, de Almeida Brondani L, Dieter C, Rheinheimer J, Boucas AP, BauermannLeitao C et al. Use of additives, scaffolds and extracellular matrix components for improvement of human pancreatic islet outcomes *in vitro*: a systematic review. *Islets.* 2017 Sep 3; 9 (5): 73–86. doi: 10.1080/19382014.2017.1335842.
3. Llacua LA, Faas MM, de Vos P. Extracellular matrix molecules and their potential contribution to the function of transplanted pancreatic islets. *Diabetologia.* 2018 Jun; 61 (6): 1261–1272. doi: 10.1007/s00125-017-4524-8.
4. Stendahl JC, Kaufman DB, Stupp SI. Extracellular matrix in pancreatic islets: relevance to scaffold design and transplantation. *Cell Transplantation.* 2009; 18 (1): 1–12. doi: 10.3727/096368909788237195.
5. Fisher SA, Tam RY, Shoichet MS. Tissue mimetics: engineered hydrogel matrices provide biomimetic environments for cell growth. *Tissue Engineering.* 2014; Part A, 20 (5, 6): 895–898. doi: 10.1089/ten.tea.2013.0765.
6. Coronel M, Stabler C. Engineering a local microenvironment for pancreatic islet replacement. *Curr Opin Biotechnol.* 2013; 24: 900–908. doi: 10.1016/j.copbio.2013.05.004.
7. Jiang K, Chaimov D, Patel SN, Liang JP, Wiggins SC, Samojlik MM et al. 3-D physiometric extracellular matrix hydrogels provide a supportive microenvironment for rodent and human islet culture. *Biomaterial.* 2019 Apr; 198: 37–48. doi: 10.1016/j.biomaterials.2018.08.057.

8. Перова НВ, Севастьянов ВИ. Биополимерный гетерогенный гидрогель Сферо®ГЕЛЬ – инъекционный биодеградируемый имплант. *Практическая медицина*. 2014; 8 (84): 111–116. Perova NV, Sevastianov VI. Sfero®GEL – inyectionsniy biodegradiruyemiy implant. *Prakticheskaya meditsina*. 2014; 8 (84): 111–116.
9. Abualhassan N, Sapozhnikov L, Pawlick RL, Kahana M, Pepper AR, Bruni A et al. Lung-derived microscaffolds facilitate diabetes reversal after mouse and human intraperitoneal islet transplantation. *PLoS One*. 2016 May 26; 11 (5): e0156053. doi: 10.1371/journal.pone.0156053.
10. Szebeni GJ, Tancos Z, Feher LZ, Alfoldi R, Kobolak J, Dinnyes A, Puskas LG. Real architecture for 3D Tissue (RAFT) culture system improves viability and maintains insulin and glucagon production of mouse pancreatic islet cells. *Cytotechnology*. 2017; 69 (2): 359–369. doi: 10.1007/s10616-017-0067-6.
11. Баранова НВ, Кирсанова ЛА, Бубенцова ГН, Севастьянов ВИ. Микрогетерогенный коллагенсодержащий гидрогель как матрикс для изолированных островков Лангерганса поджелудочной железы крысы. *Гены и клетки. Материалы III Национального конгресса по регенеративной медицине*. 2017; XII (3): 38–39. Baranova NV, Kirsanova LA, Bubentsova GN, Sevastianov VI. Microstructured collagen-containing hydrogel as matrix for isolated islets of rat pancreas. *Genes and Cells. Materials of the 3rd National congress on regenerative medicine*. 2017, XII (3): 38–39.
12. Rana D, Zreigat H, Benkirane-Jessel N, Ramakrishna S, Ramalingam M. Development of decellularized scaffolds for stem cell-driven tissue engineering. *J Tissue Eng Regen Med*. 2017 Apr; 11 (4): 942–965. doi: 10.1002/term.2061.
13. Napierala H, Hillebrandt K-H, Haep N, Tang P, Tintemann M, Gassner J et al. Engineering an endocrine neopancreas by repopulation of a decellularized rat pancreas with islets of Langerhans. *Sci Rep*. 2017 Feb 2; 7: 41777. doi: 10.1038/srep41777.
14. Wu D, Wan J, Huang Y, Guo Y, Xu T, Zhu M et al. 3 D culture of MIN-6 cells on decellularized pancreatic scaffold: *in vitro* and *in vivo* study. *Biomed Res Int*. 2015; 2015: 432645. doi: 10.1155/2015/432645.
15. Keane TJ, Londono R, Turner NJ, Badylak SF. Consequences of ineffective decellularization of biologic scaffolds on the host response. *Biomaterials*. 2012 Feb; 33 (6): 1771–1781. doi: 10.1016/j.biomaterials.2011/10/054.
16. Smink AM, de Vos P. Therapeutic strategies for modulating the extracellular matrix to improve pancreatic islet function and survival after transplantation. *Curr Diab Rep*. 2018 May 19; 18 (7): 39. doi: 10.1007/s11892-018-1014-4.
17. Salvatori M, Katari R, Patel T, Peloso A, Mugweru J, Owusu K, Orlando G. Extracellular matrix scaffold technology for bioartificial pancreas engineering: state of the art and future challenges. *J Diab Sci Technol*. 2014; 8 (1): 159–169. doi: 10.1177/1932296813519558.
18. Mirmalek-Sani S-H, Orlando G, McQuilling J, Pareta R, Mack D, Salvatori M et al. Porcine pancreas extracellular matrix as a platform endocrine pancreas bioengineering. *Biomaterials*. 2013 July; 34 (22): 5488–5495. doi: 10.1016/j.biomaterials.2013.03.054.
19. Севастьянов ВИ, Шагидулин МЮ, Скалецкий НН, Перова НВ, Довжик ИА, Готье СВ. Доклинические исследования безопасности и эффективности биомедицинских клеточных продуктов для регенерации суставного хряща, печени и поджелудочной железы. Методические рекомендации по проведению доклинических исследований биомедицинских клеточных продуктов. Под ред. ак. В.А. Ткачука. М., 2017: 187–255. Sevastianov VI, Shagidulin MYu, Skaletskiy NN, Dovzhik IA, Gautier SV. Preclinical studies of safety and efficacy of biomedical cell products for regeneration of articular cartilage, liver and pancreas. Guidelines for preclinical studies of biomedical cell products. Edited by ac. V.A. Tkachuk. M., 2017: 187–255.
20. Crapo PM, Gilbert TW, Badylak SF. An overview of tissue and whole organ decellularization processes. *Biomaterials*. 2011 Apr; 32 (12): 3233–3243. doi: 10.1016/j.biomaterials.2011.01.057.
21. London NJ, Swift SM, Clayton HA. Isolation, culture and functional evaluation of islets of Langerhans. *Diabetes Metab*. 1998 Jun; 24 (3): 200–207. PMID: 9690051.
22. Pang X, Xue W, Feng X, Tian X, Teng Y, Ding X et al. Experimental studies on islets isolation, purification and function in rats. *Int J Clin Exp Med*. 2015 Nov 15; 8 (11): 20932–20938. PMID: 26885021.
23. Sigmundsson K, Ojala JRM, Ohman MK, Osterholm AM, Moreno-Moral A, Domogatskaya A et al. Culturing functional pancreatic islets on 65-laminins and curative transplantation to diabetic mice. *Matrix Biol*. 2018 Sep; 70: 5–19. doi: 10.1016/j.matbio.2018.03.018.

Статья поступила в редакцию 21.10.2019 г.

The article was submitted to the journal on 21.10.2019