

DOI: 10.15825/1995-1191-2019-2-104-111

## ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ИМПЛАНТАЦИЯ ТКАНЕИНЖЕНЕРНОЙ КОНСТРУКЦИИ ПОДЖЕЛУДОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ

Г.Н. Скалецкая, Н.Н. Скалецкий, Л.А. Кирсанова, Г.Н. Бубенцова, Е.А. Волкова, В.И. Севастьянов

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

**Цель.** Изучение влияния имплантации тканеинженерной конструкции поджелудочной железы (ТИК ПЖ) на течение экспериментального сахарного диабета. **Материалы и методы.** Образцы ТИК получали в результате совместной инкубации *in vitro* флотирующих островковоподобных культур (ФОК), полученных из ПЖ новорожденных кроликов, и биополимерного микрогетерогенного коллагенсодержащего гидрогеля (БМКГ). Стабильный сахарный диабет вызывали у крыс линии Вистар с помощью методики дробного введения стрептозотоцина. **Результаты.** Формирование ТИК ПЖ происходило на 7–10-й день инкубации ФОК с БМКГ. При этом в ТИК ПЖ было выявлено наличие  $\beta$ -клеток, обладающих инсулин-продуцирующей активностью. После внутрибрюшинной имплантации образцов ТИК ПЖ у крыс со стрептозотоциновым сахарным диабетом происходило значительное и стойкое снижение гликемии до окончания 8-недельного срока опыта. При морфологическом исследовании ПЖ крыс-реципиентов были выявлены признаки регенерации собственных  $\beta$ -клеток. **Заключение.** 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 со стрептозотоциновым сахарным диабетом.

*Ключевые слова:* поджелудочная железа новорожденных кроликов, флотирующие островковоподобные культуры, биополимерный микрогетерогенный коллагенсодержащий гидрогель, тканеинженерная конструкция, крысы, стрептозотоциновый сахарный диабет, гликемия, регенерация  $\beta$ -клеток.

## EXPERIMENTAL IMPLANTATION OF TISSUE-ENGINEERING PANCREATIC CONSTRUCT

G.N. Skaletskaya, N.N. Skaletskiy, L.A. Kirsanova, G.N. Bubentsova, E.A. Volkova, V.I. Sevastyanov

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

**Aim:** to study the effect of implantation of tissue-engineering pancreatic construct (TEPC) on the course of experimental diabetes mellitus. **Materials and methods.** The TEPC samples received as a result of joint incubation *in vitro* floating islet-like cultures (FILC), obtained from the pancreas of newborn rabbits, and the biopolymer microheterogeneous collagen hydrogel (BMCH). Stable diabetes mellitus was caused in Wistar rats by the method of fractional streptozotocin administration. **Results.** The formation of TEPC occurred at 7–10 days of incubation FILC with BMCH. At the same time, the presence of  $\beta$ -cells with insulin-producing activity was revealed in the TEPC. After intraperitoneal implantation of TEPC samples in rats with streptozotocin diabetes mellitus, there was a significant and persistent decrease in glycemia until the end of the 8-week period of the experiment. Morphological study of pancreas of recipient rats revealed signs of regeneration of own  $\beta$ -cells. **Conclusion.** The data obtained suggest the combined antidiabetic effect of intraperitoneal injection of TEPC, due to both the

**Для корреспонденции:** Скалецкая Галина Николаевна. Адрес: 123182, Москва, ул. Щукинская, д. 1. Тел.: (499) 190-42-66, (903) 771-18-13. E-mail: Skalink@mail.ru

**For correspondence:** Skaletskaya Galina Nikolaevna. Address: 1, Shchukinskaya str., Moscow, 123182, Russian Federation. Tel.: (499) 190-42-66, (903) 771-18-13. E-mail: Skalink@mail.ru

direct functioning of the implant and its stimulating effect on the regeneration of  $\beta$ -cells in their own islets of rats with streptozotocin diabetes mellitus.

*Key words: pancreas of newborn rabbits, floating islet-like cultures, biopolymer microheterogeneous collagen hydrogel, tissue-engineering pancreatic construct, rats, streptozotocin diabetes mellitus, glycemia, regeneration of  $\beta$ -cells*

## ВВЕДЕНИЕ

Создание моделей тканеинженерных конструкций (ТИК) является одним из основных исследовательских направлений в регенеративной медицине. Очень актуальным и перспективным представляется применение ТИК, содержащих инсулинпродуцирующие островковые клетки поджелудочной железы (ПЖ), при лечении сахарного диабета 1-го типа, одного из наиболее распространенных и социально значимых хронических заболеваний. Традиционная его терапия (ежедневное введение синтезированных препаратов инсулина) не способна надежно предотвратить или приостановить развитие тяжелых специфических осложнений (нефропатия, ретинопатия и др.), приводящих к потере работоспособности и сокращению продолжительности жизни у большинства пациентов. В то же время показано, что пересадка реципиентам с осложненным сахарным диабетом 1-го типа гормонально-активных островков (островковых клеток) ПЖ приводит не только к торможению, но и к частичному обратному развитию диабетических ангиопатий [1]. Однако проведение значимого количества аллотрансплантаций островков из-за естественного дефицита их источника (посмертные доноры) невозможно, а неизбежность сопутствующего проведения чреватой осложнениями иммуносупрессии существенно ограничивает показания к проведению такого трансплантационного лечения [2]. Эта ситуация стимулирует поиски других источников инсулинпродуцирующих клеток, пригодных для трансплантационного лечения сахарного диабета, а также проведение исследований по созданию условий, препятствующих отторжению пересаженных клеток и позволяющих не применять иммуносупрессивные препараты. В определенной степени эти задачи могут быть решены в процессе создания ТИК ПЖ. Использование в ее составе стволовых клеток различного происхождения пока не может в полной мере заменить островки (островковые клетки), полученные из естественного источника – поджелудочной железы человека и млекопитающих животных [3].

В связи с этим нами была разработана экспериментальная модель ТИК, в качестве тканевого компонента которой были использованы флотирующие островковоподобные культуры, полученные из ПЖ новорожденных кроликов, и в качестве матричного компонента – коллагенсодержащий гидрогель. Опыты *in vitro* показали сохранность инсулинсекретиру-

ющих  $\beta$ -клеток в образцах ТИК ПЖ на протяжении, по меньшей мере, 14-дневной их инкубации в ростовой среде [4]. Следующим этапом исследования функциональных возможностей полученной ТИК ПЖ явилась ее имплантация лабораторным животным с экспериментальным сахарным диабетом, результаты которой приводятся в настоящей работе.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

### Получение тканеинженерной конструкции поджелудочной железы

Донорами панкреатической ткани служили 1–3-дневные новорожденные кролики породы шиншилла ( $n = 160$ ), которых доставляли из специализированного питомника Федерального государственного бюджетного учреждения науки «Научный центр биомедицинских технологий Федерального медико-биологического агентства». Каждая партия животных сопровождалась ветеринарным свидетельством об отсутствии в кролиководческом хозяйстве инфекционных заболеваний.

В качестве тканевого компонента при изготовлении каждого образца ТИК ПЖ использовали флотирующие островковоподобные культуры (ФОК), полученные из 10 ПЖ новорожденных кроликов с помощью описанной нами ранее методики [5]. Формирование ТИК происходило в результате совместной 7–10-суточной инкубации ФОК с ее матричным компонентом – биополимерным микрогетерогенным коллагенсодержащим гидрогелем (БМКГ), в качестве которого применяли отечественный *Сферо*@ГЕЛЬ [6]. С этой целью 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 см<sup>2</sup> (фирма ТТР, Швейцария). Затем взвесь культур с помощью пипетки забирали из культурального флакона и осторожно равномерно наслаивали на биоматрикс, покрывая всю его поверхность. После добавления 5–6 мл ростовой среды 199 пробирку помещали в инкубатор, в котором обеспечивалось культивирование при 37 °С в увлажненной атмосфере, содержащей 5% CO<sub>2</sub>. Замену закисленной культуральной среды на свежую проводили каждые 2–3 дня.

Наблюдение за формированием ТИК проводили с помощью инвертированного микроскопа Nikon

Eclipse TS 100 путем почти ежедневного мониторинга, и значимые изменения фиксировали с помощью цифровой фотокамеры.

Содержание инсулина в культуральной жидкости определяли с помощью набора для иммуоферментного 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).

### Подготовка животных с экспериментальным сахарным диабетом

Стабильный сахарный диабет вызывали у крыс линии Вистар с помощью разработанной нами методики дробного введения стрептозотоцина [7]. Всего использовали 40 самцов массой тела 200–240 г, доставленных из питомника лабораторных животных Федерального государственного унитарного предприятия «Опытно-производственное хозяйство «Манихино». 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).

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

Из 40 животных, подвергшихся индукции сахарного диабета, в опыте использовали 32 крысы с гликемией не менее 20 ммоль/л, зарегистрированной через 2 недели после последней инъекции стрептозотоцина. Соблюдение этих критериев обеспечивает, по нашим данным, отсутствие в дальнейшем спонтанной реверсии диабетического статуса у подопытных и контрольных животных. Отобранных крыс разделили на две равные по количеству и равноценные по среднему содержанию глюкозы в крови группы. В подопытную группу включили 16 крыс, каждой из которых однократно в полость брюшины ввели образец ТИК ПЖ, и контрольную группу составили 16 крыс, которым не проводилось никакого лечения.

Сбор полученного образца ТИК ПЖ проводился *ex tempore* с деликатным применением клеточного скребка, и забранную с помощью силиконизированного катетера суспензию вводили подопытной крысе внутрибрюшинно шприцем через иглу 18G.

Для выявления инсулинсодержащих  $\beta$ -клеток в образцах ТИК ПЖ и в поджелудочной железе крыс-реципиентов применяли иммуногистохимическое окрашивание с использованием моноклональных антител antiinsulin (Sigma).

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

### Формирование ТИК ПЖ

Вскоре после начала совместного культивирования ФОК осаждались на дно культурального флакона, равномерно покрытого БМКГ (рис. 1, а). 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

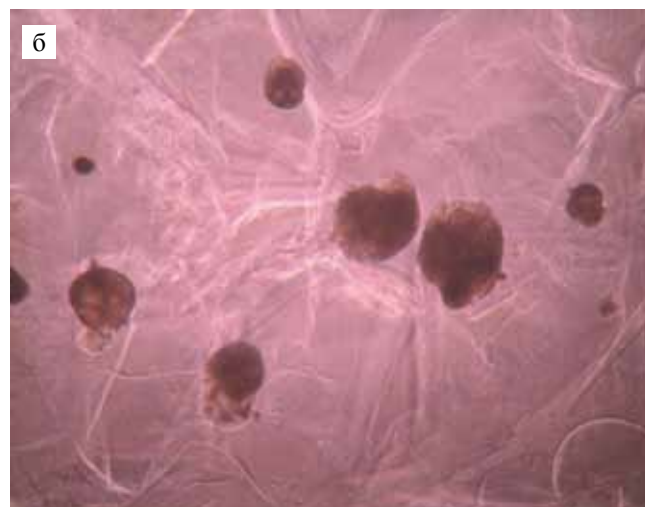
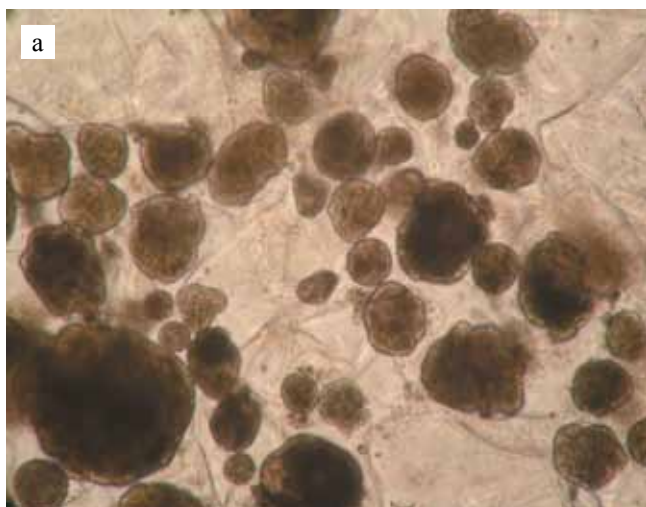


Рис. 1. Осаждение (а) и прикрепление (б) флотирующих островкоподобных культур к поверхности матрикса. Инвертированный микроскоп.  $\times 40$

Fig. 1. Sedimentation (a) and attachment (б) of floating islet-like cultures to the matrix surface. Inverted microscope.  $\times 40$

и, найдя, по-видимому, благоприятные для выживания и функционирования условия, прикреплялись к этому биосовместимому субстрату (рис. 1, б).

При совместной инкубации ФОК и БМКГ, в процессе формирования ТИК ПЖ, отмечалась ожидаемая медленная резорбция основных масс гидрогелевого матрикса с сохранением к 7–10-дневному сроку определенного количества его остатков, на которых плотно и надежно закрепились жизнеспособные культуры (рис. 2).

Создавалось впечатление, что осевшие ФОК расположились на матриксе, как на подложке, которая не только обеспечивает им механическую поддержку,

но и оказывает по отношению к ним определенную трофическую функцию. Это можно объяснить, в частности, наличием в составе биоматрикса *Сфера*®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 инсулинопозитивных клеток [8].

Таким образом, морфофункциональный альянс ФОК и БМКГ создал подходящие условия для формирования ТИК ПЖ. При этом, как показали иммуногистохимические исследования, в ТИК ПЖ сохранились инсулиносекретирующие  $\beta$ -клетки (рис. 3).

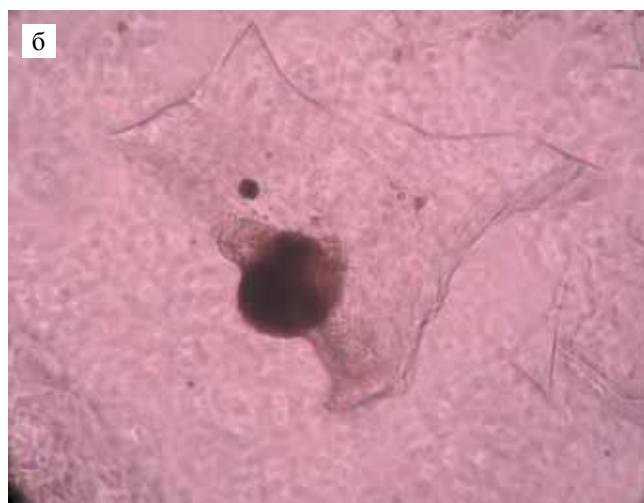
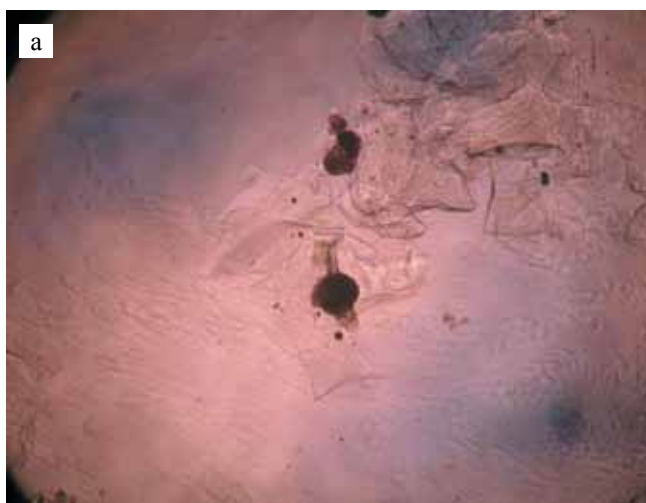


Рис. 2. Формирование тканеинженерной конструкции вследствие стойкого прикрепления островковоподобных культур к матриксу. Инвертированный микроскоп.  $\times 40$  (а);  $\times 100$  (б)

Fig. 2. The formation of tissue-engineered constructs due to persistent attachment the islet cell cultures to matrix. Inverted microscope.  $\times 40$  (a);  $\times 100$  (б)

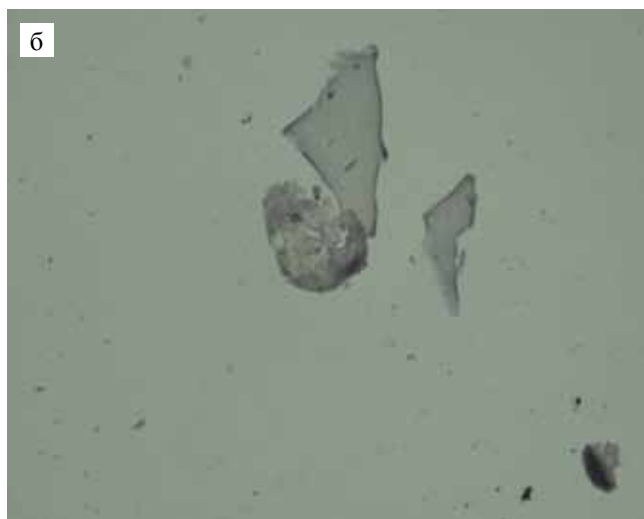


Рис. 3. Тканеинженерная конструкция поджелудочной железы. Иммуногистохимическое окрашивание антителами к инсулину.  $\times 200$  (а);  $\times 100$  (б)

Fig. 3. Tissue engineering pancreatic construct. Immunohistochemical staining with antibodies to insulin.  $\times 200$  (a);  $\times 100$  (б)

Подтверждением наличия значительного количества гормонально-активных  $\beta$ -клеток в тканевом компоненте ТИК ПЖ явились результаты анализа проб культуральной жидкости, взятых при инкубации ТИК ПЖ (рис. 4). На 7-е сутки культивирования базальная концентрация инсулина, которая составила 2380 мкд./мл, после стимуляции «гипергликемическим» уровнем глюкозы (25 ммоль/л) и теофиллином (10 ммоль/л) увеличилась до 3190 мкд./мл.

### 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 качественное определение кетоновых тел 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 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 меньшем почти в 2 раза по сравнению с ее уровнем до имплантации, и к исходу запланированной 8-й недели постимплантационного наблюдения составила в среднем по всей подопытной группе 13,7 ммоль/л (табл. 1), что оказалось намного ниже исходного (перед введением ТИК ПЖ) среднего уровня (25,2 ммоль/л). Высокая степень значимости такого снижения гликемии ( $p < 0,05$ ) была подтверждена 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 флотизирующих островкоподобных культур, полученных из поджелудочной железы новорожденных кроликов, и биополимерного микрогетерогенного коллагенсодержащего гидрогеля, был получен отчетливый терапевтический эффект. Выраженное антидиабетическое действие выполненной имплантации оказалось



Рис. 4. Результаты стимуляционного теста, выполненного на 7-е сутки инкубации тканеинженерной конструкции поджелудочной железы

Fig. 4. The results of the stimulation test performed on the 7th day of incubation of tissue-engineering pancreatic construct

стойким и продолжительным у 14 из 16 крыс-реципиентов, то есть почти в 90% случаев.

В контрольной группе у всех 16 животных на протяжении срока наблюдения отмечались выраженные клинические признаки сахарного диабета (табл. 2). 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 на протяжении всего эксперимента, вплоть до его окончания, не была зарегистрирована кетонурия. По-видимому, тяжесть состояния животных была связана не с развитием кетоацидоза, а с гиперосмолярностью крови, обусловленной высокой гипергликемией.

Морфологические исследования ПЖ крыс из контрольной группы (экспериментальный сахарный диабет без лечения) выявили лишь единичные  $\beta$ -клетки в островках, что подтвердило избирательное повреждение  $\beta$ -клеток стрептозотоцином при отсутствии признаков их видимой регенерации. Аналогичный анализ ПЖ подопытных животных с экспериментальным сахарным диабетом из подопытной группы (имплантация ТИК ПЖ), проведенный по окончании 8-недельного опыта, выявил отчетливые морфологические признаки регенерации  $\beta$ -клеток собственной ПЖ железы крыс-реципиентов (рис. 5).

Полученные данные позволили предположить получение комбинированного антидиабетического эффекта внутрибрюшинного введения ТИК ПЖ, обус-

Таблица 1

**Изменение гликемии (ммоль/л) у крыс со стрептозотоциновым диабетом (n = 16) после имплантации тканеинженерной конструкции ПЖ в полость брюшины**  
**Changes in glycemia (mmol/l) in rats with streptozotocin diabetes (n = 16) after implantation of tissue-engineered pancreatic construct into the peritoneal cavity**

№ 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

Таблица 2

**Изменение гликемии (ммоль/л) у крыс со стрептозотоциновым сахарным диабетом (n = 16) без лечения (контрольная группа)**

**Changes in glycemia (mmol/l) in rats with streptozotocin diabetes mellitus (n = 16) without treatment (control group)**

№ 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>
M	<b>24,3</b>	<b>24,4</b>	<b>24,8</b>	<b>24,9</b>	<b>24,8</b>	<b>24,7</b>	<b>25</b>	<b>25,3</b>	<b>24,8</b>	<b>24,7</b>	<b>24</b>
σ	2,5	2,8	2,7	2,6	2,3	1,7	2,3	1,6	1,8	2,4	2

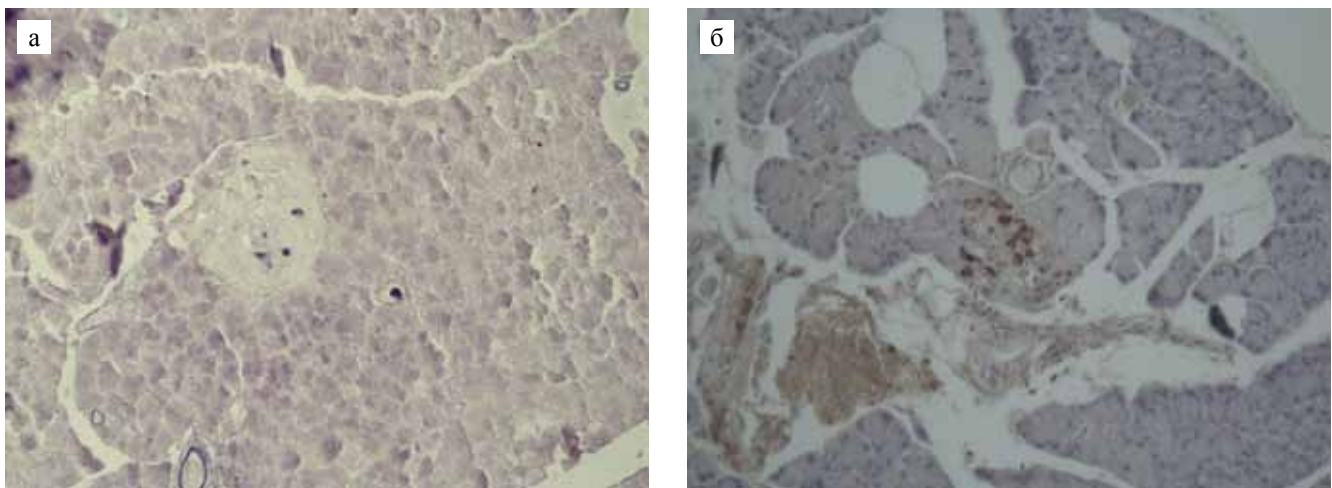


Рис. 5: а – единичные  $\beta$ -клетки (в центре) в ПЖ крысы с сахарным диабетом (контроль),  $\times 200$ ; б – регенерация  $\beta$ -клеток в ПЖ крысы с сахарным диабетом через 8 недель после имплантации тканеинженерной конструкции ПЖ. Иммуногистохимическое окрашивание антителами к инсулину.  $\times 100$

Fig. 5: a – single  $\beta$ -cells (in the center) in pancreas of diabetic rat (control),  $\times 200$ ; б – regeneration of  $\beta$ -cells in pancreas of diabetic rat 8 weeks after implantation of tissue-engineered pancreatic construct. Immunohistochemical staining with antibodies to insulin.  $\times 100$

ловленного как непосредственным функционированием имплантата, так и его стимулирующим влиянием на регенерацию  $\beta$ -клеток в собственных островках крыс-реципиентов. Однако в первые посттрансплантационные недели сахароснижающий эффект обусловлен, скорее всего, только активностью  $\beta$ -клеток, находящихся в составе ТИК ПЖ. Их длительное выживание в организме ксеногенного реципиента объясняется предварительным культивированием *in vitro*, при котором, по-видимому, происходит существенное снижение иммуногенности. Это предположение было подтверждено иммунологами в опытах по совместной инкубации разнообразного набора сывороток людей с прекультивированными островковыми клетками ПЖ новорожденных кроликов [9]. При этом не было отмечено адсорбции иммуноглобулинов, содержащихся в этих сыворотках, на островковых клетках даже в присутствии комплемента человека.

Оценивая значимость полученных нами результатов, следует отметить, что для получения стандартизированной ТИК ПЖ, имеющей стабильный клеточный состав и заданную функциональную активность, использование посмертных донорских органов 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 препарат островков, заведомо подходящий 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, когда будет показана безопасность применения определенных ксеногенных клеточных препаратов, ТИК ПЖ, содержащие клетки животных, могут найти широкое применение в клинике.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

После внутрибрюшинной имплантации модели тканеинженерной конструкции поджелудочной железы, сформировавшейся из флотирующих островковоподобных культур поджелудочной железы новорожденных кроликов и биополимерного микрогетерогенного коллагенсодержащего гидрогеля, крысам с экспериментальным сахарным диабетом у них происходило выраженное и стойкое снижение уровня гипергликемии. Помимо прямого сахароснижающего действия выявлены признаки регенерации в островках поджелудочной железы крыс-реципиентов, которая приводит к частичному восстановлению пула собственных  $\beta$ -клеток и усилению антидиабетического эффекта.

*Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.*

*The authors declare no conflict of interest.*

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ / REFERENCES

1. Maffi P, Secchi A. Clinical results of islet transplantation. *Pharmacol Res.* 2015; 98: 86–91. doi: 10.1016/j.phrs.2015.04.010 CrossRefPubMed.
2. 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.
3. 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.
4. Скалецкий НН, Кирсанова ЛА, Севастьянов ВИ. 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. *Трансплантология: итоги и перспективы.* Том V. 2013 год. Под ред. С.В. Готье. М.–Тверь: Триада. 2014: 140–152. Skaletskiy NN, Kirsanova LA, Sevastyanov VI. Razrabotka i eksperimentalnoe issledovanie tkaneinzhenernykh konstruksiy podzheludochnoy zhelezy iz kultur ostrovkovykh kletok i biodegradiruemyykh nositeley s tselyu stimulatsii regeneratsii  $\beta$ -kletok u bolnykh sakharnym diabetom. *Transplantologia: itogi i perspektivy.* Tom V. 2013 god. Pod red. S.V. Gautier. M.–Tver': Triada, 2014: 140–152.
5. Скалецкая ГН, Севастьянов ВИ. Экспериментальная модель тканеинженерной конструкции поджелудочной железы. *Трансплантология: итоги и перспективы.* Том IX. 2017 год. Под ред. С.В. Готье. М.–Тверь: Триада, 2018: 283–299. Skaletskaya GN, Sevastyanov VI. Eksperimentalnaya model tkaneinzhenernoy konstruksii podzheludochnoy zhelezy. *Transplantologia: itogi i perspektivy.* Tom IX. 2017 god. Pod red. S.V. Gautier. M.–Tver': Triada, 2018: 283–299.
6. Севастьянов ВИ, Перова НВ. Инъекционный гетерогенный биополимерный гидрогель для заместительной и регенеративной хирургии и способ его получения. Патент РФ № 2433828 (2010). Sevastyanov VI, Perova NV. Inyeksionniy geterogeniyy biopolimerniy gidrogel dlya zamestitelnoy regenerativnoy khirurgii i sposoby ego polucheniya. Patent RF 2433828 (2010).
7. Севастьянов ВИ., Шагидулин МЮ, Скалецкий НН, Перова НВ, Довжик ИА, Готье СВ. Доклинические исследования безопасности и эффективности БМКП для регенерации суставного хряща, печени и поджелудочной железы. *Методические рекомендации по проведению доклинических исследований биомедицинских клеточных продуктов.* Под редакцией акад. В.А. Ткачука. М.: МГУ, 2017. Sevastyanov VI, Shagidulin MYu, Skaletskiy NN, Perova NV, Dovzhik IA, Gautier SV. Doklinicheskiye issledovaniya bezopasnosti i effektivnosti BMKP dlya regeneratsii sustavnogo khryashcha, pecheni i podzheludochnoy zhelezy. *Metodicheskiye rekomendatsii po provedeniyu doklinicheskikh issledovaniy biomeditsinskykh kletochnykh produktov.* Pod red. akad. V.A. Tkachuka. M.: MGU, 2017: 187–255.
8. 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.
9. Богданова НБ, Абрамов ВЮ, Скалецкий НН, Петрова ИА, Пушкова ИА, Баранова НВ, Бубенцова ГН. Исследование фиксации сывороточных иммуноглобулинов человека на культивированных островковых клетках поджелудочной железы кролика. *IV Всероссийский съезд трансплантологов.* М., 2008: 227–228. Bogdanova NB, Abramov VYu, Skaletskiy NN, Petrova IA, Pushkova IA, Baranova NV, Bubentsova GN. Issledovanie fiksatsii syvorotochnykh immunoglobulinov cheloveka na kultivirovannykh ostrovkovykh kletkakh podzheludochnoy zhelezy. *IV Vserossiyskiy s'yezd transplantologov.* M., 2008: 227–228.

*Статья поступила в редакцию 17.04.2019 г.  
The article was submitted to the journal on 17.04.2019*