

DOI: 10.15825/1995-1191-2022-1-48-55

РАЗРАБОТКА ПОДХОДОВ К БЕСФЕРМЕНТНОМУ ПОЛУЧЕНИЮ ОСТРОВКОВОЙ ТКАНИ ИЗ ПОДЖЕЛУДОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ

Г.Н. Скалецкая, Н.Н. Скалецкий, Г.Н. Бубенцова, В.И. Севастьянов

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

Успешность аллотрансплантации островков поджелудочной железы при лечении пациентов с трудно-управляемым течением сахарного диабета 1-го типа зависит главным образом от количества и качества островков, изолируемых из поджелудочной железы посмертных доноров с помощью ферментных препаратов, прежде всего коллагеназы. Многочисленные исследования по совершенствованию и стандартизации методов выделения островков достигли в последнее десятилетие предела своих возможностей, что сделало невозможным дальнейшее увеличение количества и качества клинических трансплантаций. Учитывая негативное влияние применения коллагеназной техники на морфофункциональные свойства изолируемых островков, в настоящей работе изучена возможность бесферментного получения островковой ткани, очищенной от экзокринного балласта. Эксперименты, проведенные с использованием поджелудочной железы новорожденных и молодых кроликов, показали реальность разработки методических подходов к получению островковоподобных культур без применения экзогенных ферментов.

Ключевые слова: поджелудочная железа, экзокринная ткань, островки, изоляция, коллагеназа, кролики, флотирующие островковоподобные культуры.

DEVELOPMENT OF APPROACHES TO ENZYME-FREE ISOLATION OF PANCREATIC ISLETS

G.N. Skaletskaya, N.N. Skaletskiy, G.N. Bubentsova, V.I. Sevastianov

Shumakov National Medical Research Center of Transplantology and Artificial Organs, Moscow, Russian Federation

The success of pancreatic islet allotransplantation in the treatment of patients with a difficult-to-manage type 1 diabetes depends mainly on the quantity and quality of islets isolated from the pancreas of deceased donors using enzyme preparations, primarily collagenase. Numerous studies on improvement and standardization of islet isolation techniques have reached their limits in the last decade. This has made it impossible to further boost the number and quality of clinical transplants. Taking into account the negative impact of collagenase technique on the morphofunctional properties of isolated islets, this work has studied the possibility of enzyme-free isolation of islet tissue purified of exocrine ballast. Experiments using the pancreas of newborn and young rabbits showed that developing methodological approaches to obtaining islet-like cultures without the use of exogenous enzymes is feasible.

Keywords: pancreas, exocrine tissue, islets, isolation, collagenase, rabbits, floating islet-like cultures.

ВВЕДЕНИЕ

Прорыв в эффективной аллотрансплантации островков поджелудочной железы (ПЖ) больным сахарным диабетом 1-го типа ознаменовался в самом начале XXI века разработкой Эдмонтонского протокола [1]. С тех пор произошло определенное улучшение результатов и повышение безопасности

трансплантации островков [2]. При этом некоторые трансплантационные центры неизменно были более успешными, чем другие [3], и это различие обусловлено в значительной, если не в определяющей, степени качеством изолированных островков, которое зависит от методического уровня и опыта исследователей, занимающихся этой проблемой.

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

Corresponding author: Galina Skaletskaya. Address: 1, Shchukinskaya str., Moscow, 123182, Russian Federation.
Phone: (499) 190-42-66; (903) 771-18-13. E-mail: Skalink@mail.ru

Правильность применения препаратов коллагеназы, являющихся важнейшими реагентами, используемыми для изоляции островков, существенно влияет на количество и качество островков (точнее, эквивалентов островков) и в конечном итоге определяет результаты их трансплантации больным сахарным диабетом [3]. В течение ряда лет для выделения островков из препаратов коллагеназного ряда наиболее широко использовалась Либераза H1 (Roche), которая, по сути, считалась ферментом выбора [4]. Однако в 2007 году возникли опасения по поводу использования этого препарата. Дело в том, что в процессе его производства использовалось сырье, полученное из мозга крупного рогатого скота, которое теоретически потенциально может передавать заболевания, связанные с прионами [5]. С тех пор были предприняты усилия по замене этого препарата путем модификации его компонентов и изучения переваривающей активности новых ферментов [6]. В результате стали применять смеси ферментов, включающие Коллагеназу NB1 (Serva), версию Либеразы без использования тканей млекопитающих (Roche) и новую смесь Vitacyte [7–9]. Несмотря на то что Либераза H1 и Коллагеназа NB1 были наиболее широко исследованными ферментами для выделения островков человека, количественные и качественные результаты, полученные в ряде центров, существенно различались и нередко оказывались противоречивыми. При этом критерием качественной оценки образцов островков, выделенных в нескольких центрах США от доноров с различными характеристиками, являлось определение функции островковых β -клеток (базальная и стимулированная секреция инсулина) [10].

Отсутствие стандартизации ферментной обработки ткани ПЖ человека может в определенной степени объяснить высокую вариабельность результатов изоляции островков. С целью определения разумного выбора наиболее приемлемого варианта обработки панкреатической ткани был проведен сравнительный метаанализ результатов применения смесей различных ферментных препаратов при изоляции островков из ПЖ посмертных доноров [11]. При этом оценивали влияние различных ферментов на эквивалентное количество островков, полученных из 1 грамма поджелудочной железы, определяя степень их очистки, жизнеспособность и стимулированную глюкозой секрецию инсулина. Проведенный метаанализ показал, что, по-видимому, исследования по стандартизации изоляции достаточного количества островков из донорской ПЖ достигли предела своих возможностей, и после всплеска достижений в начале 2000-х годов в этой области наступил стагнационный период, что сделало практически невозможным значимое увеличение эффективных пересадок островков в клинику. Многочисленные эксперименты с

использованием ПЖ лабораторных животных, прежде всего грызунов, продолжающиеся до настоящего времени, не позволили существенно улучшить метод изоляции островков [12–14] и экстраполировать полученные данные на протокол выделения островков из ПЖ посмертных доноров. Некоторую надежду на увеличение длительности выживания и повышение функциональных возможностей островков дают опыты по совместному их культивированию с мезенхимальными стромальными клетками [15, 16].

Важно отметить, что помимо экзогенных ферментных препаратов существенное влияние на количество и качество островков, изолируемых из донорской ПЖ, может оказывать активация ее собственных протеолитических ферментов, продуцируемых ацинарными клетками. Как известно, внешнесекреторная функция ПЖ заключается в выделении в двенадцатиперстную кишку панкреатического сока, способствующего расщеплению поступающего с пищей белка до аминокислот. Протеолитические ферменты, представленные трипсином, химотрипсином и карбоксипептидазой, выделяются в просвет двенадцатиперстной кишки в неактивном состоянии, и активация их наступает под влиянием энтерокиназы кишечного сока. Однако внутриорганная активация собственных ферментов в донорской ПЖ вполне реальна и связана главным образом с нарушением подачи кислорода во время ее извлечения, хранения на холоде и при выполнении процедуры изоляции островков [17]. Увеличение продукции лактата в результате анаэробного распада глюкозы при гипоксии/аноксии вызывает внутриклеточный ацидоз, который является одним из основных индукторов преждевременной внутриклеточной аутоактивации трипсиногена и последующего запуска ферментного каскада в ацинарных клетках [18]. Поскольку 90% белков, синтезированных ацинарными клетками, являются пищеварительными ферментами, неизбежные периоды ишемии обеспечивают «идеальные» условия для запуска аутолитических процессов в ПЖ [19]. Отрицательное влияние эндогенных панкреатических протеаз на функциональные способности островков было отмечено, в частности, при ишемическом/реперфузионном панкреатите, развивающемся в процессе консервации донорской ПЖ [20]. Выживанию островков во время ишемии может препятствовать также то, что островки непосредственно окружены ацинарными клетками, которые отличаются более высокой плотностью гранул зимогена по сравнению с телеинсулярными клетками. Эта гистологическая особенность делает островки особенно уязвимыми к протеолитическому повреждению [21].

Отсутствие прогресса в разработке методов изоляции островков сделало востребованным поиск новых, более эффективных подходов к получению островковой ткани в количестве, достаточном для

осуществления успешного трансплантационного лечения больных сахарным диабетом. В настоящей работе изучена возможность получения культур островковых клеток, очищенных от экзокринного балласта, без использования стандартных ферментных препаратов, которые, как было указано выше, в значительной мере снижают выживаемость и функциональные возможности выделяемых островков.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В качестве доноров ПЖ использовали лабораторных кроликов породы «советская шиншилла» различного возраста и массы тела: 60 голов новорожденных (1–2-дневных) с массой тела 60–70 г и 12 голов одномесячных с массой тела 600–700 г, то есть на порядок большей, чем у новорожденных кроликов. Животных получали из питомника лабораторных животных ООО «КролИнфо» с представлением ветеринарного свидетельства.

Учитывая описанное выше пагубное влияние на островки протеолитических ферментов, высвобождающихся при продолжительных манипуляциях с донорской ПЖ, нами были использованы приемы, уменьшающие это воздействие, минимизирующие, в частности, длительность ишемии органа. При этом нами предполагалось, что умеренный протеолиз эндогенными ферментами, неизбежный даже при самой кратковременной обработке панкреатической ткани, приведет к гибели только ацинарных клеток, но не окажет повреждающего действия на островки. Поэтому с целью предупреждения избыточного аутолиза панкреатической ткани сразу после эвтаназии животных и извлечения у них ПЖ последнюю помещали в холодный (4 °C) раствор Хенкса (ПанЭко), затем быстро с помощью глазных пинцетов удаляли капсулу, видимые кровеносные сосуды и выводные протоки и разрезали орган на фрагменты величиной около 2 мм, которые дважды промывали холодным раствором Хенкса, после чего в течение 7–10 минут тщательно измельчали острыми глазными ножницами. Продолжительность микродиссекции зависела от видимых особенностей обрабатываемой железы и определялась исследователем в каждом конкретном случае. Образовавшуюся густую тканевую суспензию не менее трех раз промывали холодным раствором Хенкса. В результате указанных манипуляций обрабатываемая при комнатной температуре (20–24 °C) панкреатическая ткань подвергалась предположительно лишь щадящему протеолитическому воздействию эндогенных панкреатических ферментов, которые после обильного промывания полученной тканевой суспензии удаляли вместе с обрывками аутолизированной экзокринной ткани. Полученная после обработки 1 ПЖ одномесячного кролика или 5 ПЖ новорожденных кроликов тканевая суспензия состояла в основном из микрофрагментов размером

менее 1 мм³, которые переносили в культуральный флакон площадью 25 см² (Corning), куда сразу же вносили 10–12 мл среды RPMI-1640 HEPES без глутамина (ПанЭко) и добавляли 1 мл эмбриональной телячьей сыворотки (HyClone). Флаконы помещали в инкубатор и культивирование проводили при 37 °C. Замену ростовой среды на свежую выполняли каждые 2–3 суток. За изменениями, происходящими в процессе инкубации, наблюдали через инвертированный микроскоп Nikon Eclipse TS 100 путем ежедневного мониторинга, и значимые изменения фиксировали с помощью цифровой фотокамеры. Проводили гистологическое исследование нативных ПЖ новорожденных и одномесячных кроликов, а также образцов получаемых культур на разных сроках инкубации панкреатических микрофрагментов. Исследуемый материал фиксировали в формалине. После рутинной процедуры обезжизивания образцы заливали в парафин. Среда 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 (Sigma).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Гистологическое исследование ПЖ 1–2-дневных кроликов и ПЖ одномесячных кроликов выявило существенное различие в соотношении эндокринной (островковой) и экзокринной (ацинарной) тканей у этих разновозрастных животных. Доля экзокринной ткани у молодых животных существенно превышала таковую у новорожденных. При этом островки, имеющие овальную форму, были четко отграничены от окружающей экзокринной ткани прослойками соединительной ткани (рис. 1, а). В то же время у новорожденных животных из-за естественного отсутствия активного пищеварения экзокринный отдел ПЖ развит слабо, островки в неонатальной ПЖ заметно мельче, неправильной, «рваной» формы и не имеют выраженных соединительно-тканых прослоек на границе с экзокринными клетками (рис. 1, б).

Такие гистологические особенности делали нецелесообразным обработку панкреатической ткани новорожденных кроликов препаратами коллагеназного ряда из-за практического отсутствия точки приложения действия таких ферментов (коллагеновые волокна соединительно-тканых прослоек). Поэтому было решено изучить изменения, происходящие при культивировании ПЖ новорожденных кроликов, подвергшейся только механическому измельчению, без ферментной обработки.

Наблюдения, осуществлявшиеся с помощью инвертированного микроскопа, выявили существенное уменьшение массы экзокринной ткани уже на 2-е

3-и сутки инкубации микрофрагментов неонатальной ПЖ и их уплотнение и «ошаривание» на фоне окончательной гибели и элиминации ацинарных клеток к исходу 5–7-х суток (рис. 2).

Образующийся при деструкции ацинарных клеток детрит благополучно удалялся при очередной замене культуральной среды. В результате формировалась культура, почти полностью состоящая из флотирующих (свободно плавающих) плотных шаровидных или овоидных структур (рис. 3).

Гистологический анализ культур показал, что они состоят из эпителия и окружены по периферии слоем эпителиоподобных или фибробластоподобных клеток (рис. 4).

Иммуногистохимическое окрашивание позволило идентифицировать содержащийся в культурах эпителий как инсулин-позитивные клетки (в большей степени) и глюкагон-позитивные клетки (рис. 5).

Характерная шарообразная и/или овоидная форма полученных свободно плавающих культур и выявление в них островковых β - и α -клеток дали основания

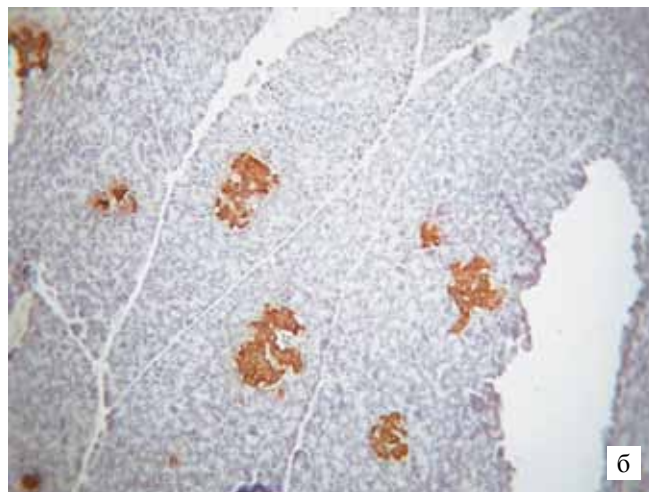
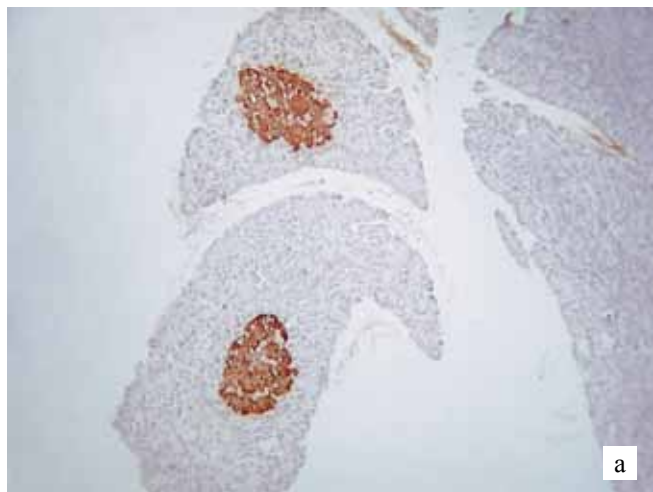


Рис. 1. Поджелудочная железа одномесячного кролика (а) и однодневного кролика (б). Иммуногистохимическое окрашивание β -клеток островков антителами к инсулину. $\times 200$

Fig. 1. Pancreas of a one-month-old rabbit (a) and of a one-day-old rabbit (b). Immunohistochemical staining of beta-cells of islets with insulin antibodies. $\times 200$

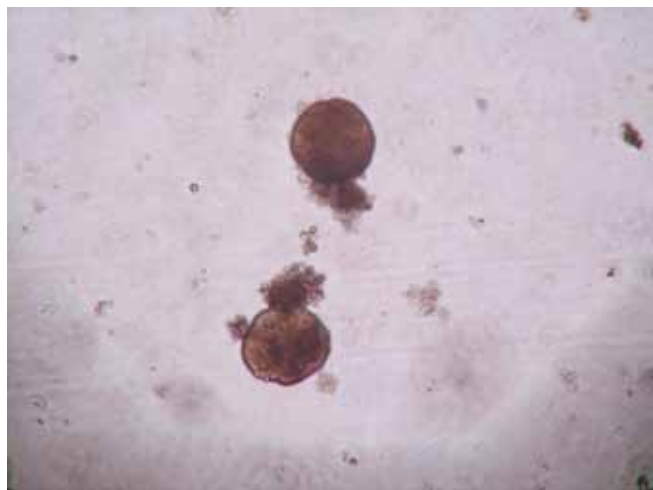


Рис. 2. Завершение процесса спонтанной очистки от экзокринной ткани микрофрагментов поджелудочной железы новорожденных кроликов. Инвертированный микроскоп. $\times 100$

Fig. 2. Completion of spontaneous purification of newborn rabbit pancreatic microfragments from exocrine tissue. Inverted microscope. $\times 100$

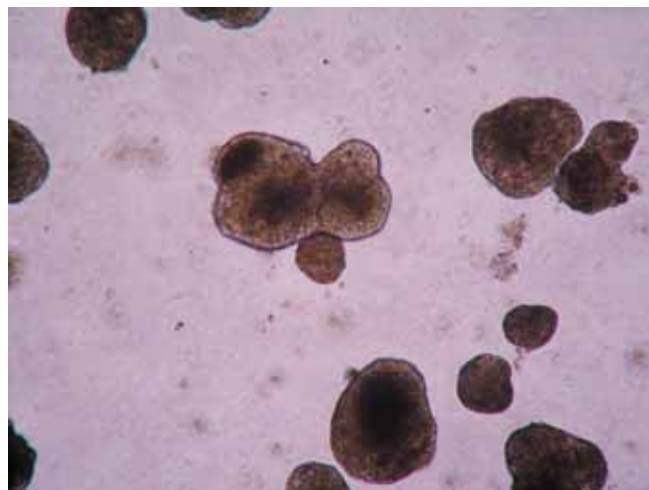


Рис. 3. Формирование флотирующих культур после 7-дневной инкубации микрофрагментов ПЖ новорожденных кроликов. Инвертированный микроскоп. $\times 100$

Fig. 3. Formation of floating cultures after 7-day incubation of pancreatic microfragments of newborn rabbits. Inverted microscope. $\times 100$

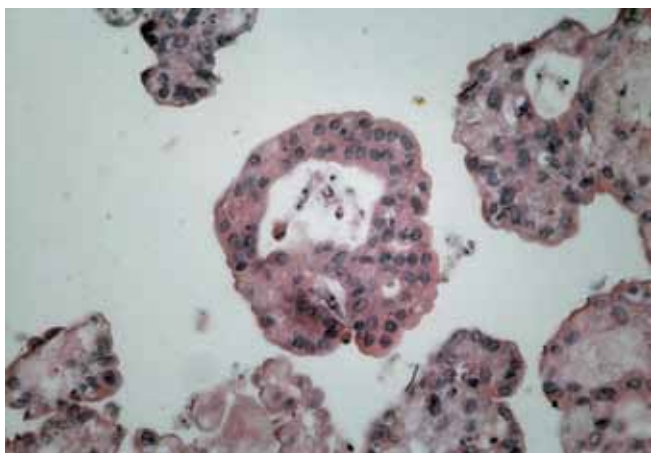


Рис. 4. Флотирующие культуры, полученные из поджелудочной железы новорожденных кроликов. Окрашивание гематоксилином и эозином. $\times 200$

Fig. 4. Floating cultures obtained from the pancreas of newborn rabbits. H&E stain. $\times 200$

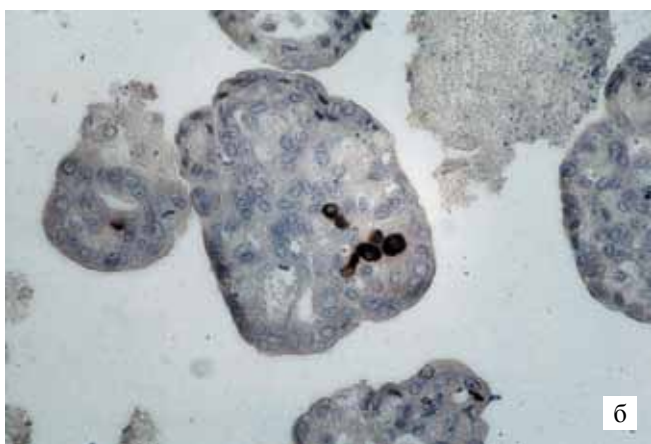
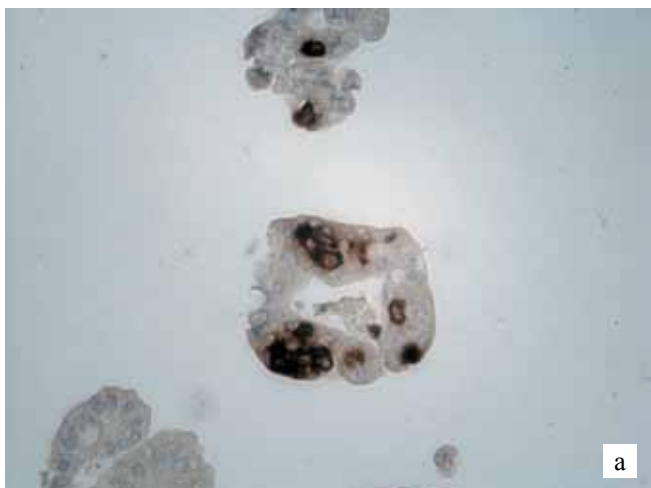


Рис. 5. Иммуногистохимическое окрашивание флотирующих культур, полученных из ПЖ новорожденных кроликов с помощью антител к инсулину (а) и глюкагону (б). $\times 200$

Fig. 5. Immunohistochemical staining of floating cultures obtained from the pancreas of newborn rabbits using insulin (a) and glucagon (б) antibodies. $\times 200$

назвать их флотирующими островковоподобными культурами (ФОК).

В отличие от результатов получения культур из ПЖ новорожденных кроликов использование аналогичных условий при инкубации микрофрагментов ПЖ однемесячных кроликов не привело к выраженному устранению экзокринной ткани. По всей видимости, причиной этой неудачи явилось наличие существенно большей доли экзокринной панкреатической ткани у молодых кроликов по сравнению с неонатальной ПЖ. Дегенерация ацинусов происходила медленно, и значительное их количество сохранялось даже после 8–10-дневного срока инкубации (рис. 6).

При этом продолжительное действие высвобождающихся из ацинарных клеток протеолитических ферментов на островковую ткань, по-видимому, отрицательно сказывалось на ее морфофункциональном состоянии, что препятствовало формированию ФОК. В связи с этим было решено повысить температуру инкубации, что предположительно могло ускорить гибель экзокринной ткани и обеспечить более благоприятные конкурентные условия для выживания эндокринной ткани.

Несмотря на то что классическим условием инкубации является нормотермия (температура не выше 37°C), нами, учитывая данную природой устойчивость островков ПЖ к неблагоприятным условиям и отсутствие таковой у экзокринной ткани, было решено впервые провести инкубацию панкреатических микрофрагментов при 38°C , тем более что в норме температура внутри организма человека и млекопитающих животных может достигать 38°C .

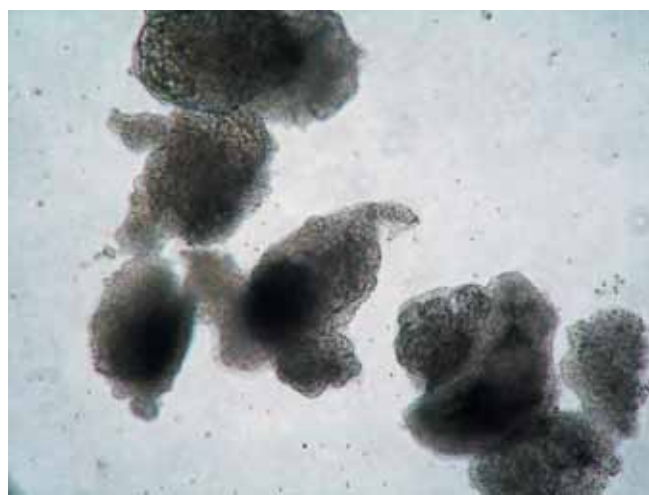


Рис. 6. Сохранившаяся экзокринная ткань в микрофрагментах ПЖ однемесячных кроликов после 10-дневной инкубации. Инвертированный микроскоп. $\times 100$

Fig. 6. Preserved exocrine tissue in the pancreatic microfragments of one-month-old rabbit after 10-day incubation. Inverted microscope. $\times 100$

Как показали наблюдения, проведенные с помощью инвертированного микроскопа, такой режим (формально гипертермический) способен ускорить гибель и элиминацию экзокринной панкреатической ткани, что значительно сокращает возможное протеолитическое воздействие на островки, способствуя их быстрой очистке и выживанию. Благодаря созданию таких температурных условий уже к 3–4-м суткам

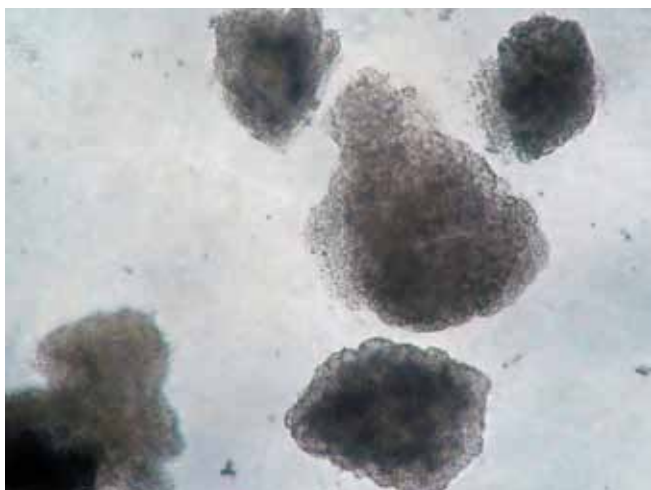


Рис. 7. Начало процесса спонтанной очистки от экзокринной ткани на 4-е сутки инкубации микрофрагментов ПЖ одномесячных кроликов в гипертермических условиях. Инвертированный микроскоп. $\times 100$

Fig. 7. Beginning of spontaneous purification against exocrine tissue at day 4 of incubation of pancreatic microfragments of one-month-old rabbits under hyperthermic conditions. Inverted microscope. $\times 100$

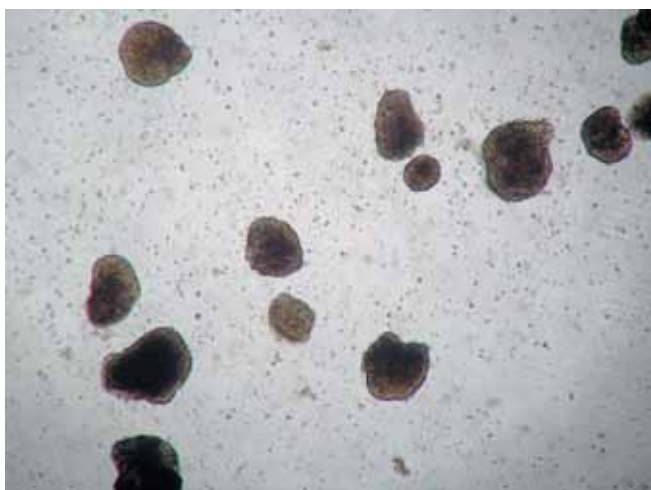


Рис. 8. Формирование флотирующих культур на 10-е сутки инкубации микрофрагментов ПЖ одномесячных кроликов в гипертермических условиях. Инвертированный микроскоп. $\times 40$

Fig. 8. Formation of floating cultures at day 10 of incubation of pancreatic microfragments of one-month-old rabbits under hyperthermic conditions. Inverted microscope. $\times 40$

инкубации наблюдалась отчетливая деградация экзокринной ткани (рис. 7), и к 8–10-м суткам происходило формирование очищенных от балласта культур (рис. 8).

Как показало гистологическое исследование полученных флотирующих культур, они состоят в основном из жизнеспособных эпителиальных клеток (рис. 9).

С помощью иммуногистохимического окрашивания в центральной их части были выявлены гранулы инсулина, свидетельствующие о секреторной активности островковых β -клеток (рис. 10). Таким образом, было подтверждено получение из поджелудочной железы одномесячных кроликов островкоподобных культур.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

По нашему мнению, сама природная обособленность, закрытость островков от окружающей экзокринной ткани, этого «кипящего ферментами котла», позволяет надеяться на то, что собственная ферментная система ПЖ менее опасна для островков, чем агрессивная ферментная смесь, которая неестественным путем вводится в панкреатическую ткань с одной лишь целью – «выбить» островки, изолировать их от экзокринной ткани. Это соображение подтверждается тем фактом, что при острых панкреатитах крайне редко страдает эндокринная (островковая) ткань, и лишь в случаях многократно повторяющихся эпизодов рецидивирующего панкреатита или, чаще всего, в результате обширного панкреонекроза наступает гибель значимого коли-

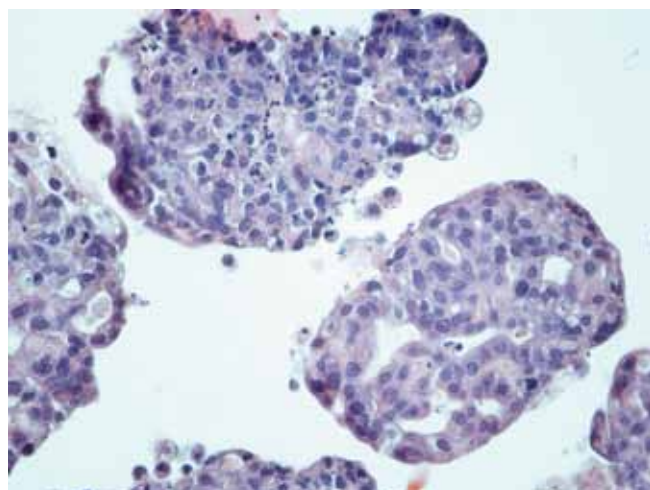


Рис. 9. Флотирующие культуры, полученные из поджелудочной железы одномесячных кроликов, 8-е сутки инкубации в гипертермических условиях. Окрашивание гематоксилином и эозином. $\times 400$

Fig. 9. Floating cultures obtained from the pancreas of one-month-old rabbits, day 8 of incubation under hyperthermic conditions. H&E stain. $\times 400$

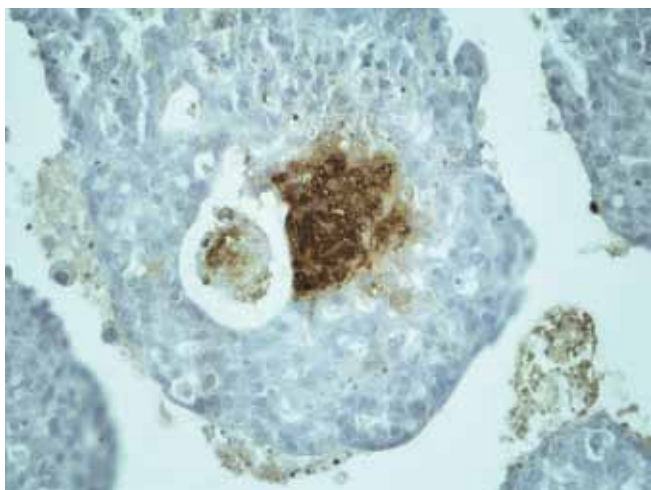


Рис. 10. Флотирующие культуры, полученные из поджелудочной железы одномесячных кроликов, 8-е сутки инкубации в гипертермических условиях. Иммуногистохимическое окрашивание с помощью антител к инсулину. $\times 400$

Fig. 10. Floating cultures obtained from the pancreas of one-month-old rabbits, day 8 of incubation under hyperthermic conditions. Immunohistochemical staining with insulin antibodies. $\times 400$

чества островков, которая приводит к выраженному дефициту инсулинпродуцирующих β -клеток, развитию инсулиновой недостаточности, и естественно, к клинической манифестации инсулинозависимого сахарного диабета. Результаты, полученные в настоящем исследовании, свидетельствуют о возможности отказа от применения экзогенных ферментов при обработке ткани донорской ПЖ в процессе получения культур, состоящих в основном из эндокринных (островковых) клеток. Многочисленные наблюдения с помощью инвертированного микроскопа показали, что в стандартных условиях инкубации микрофрагментов механически измельченной ПЖ происходит спонтанная гибель ее экзокринной ткани. Этот деструктивный процесс, по всей видимости, обусловлен происходящим при нормотермическом культивировании аутолизе ацинарных клеток под влиянием содержащихся в них пищеварительных ферментов. Образующийся в результате детрит своевременно удаляется при очередной замене культуральной среды. В то же время природно защищенные островки существенно не повреждаются, что можно объяснить наличием окружающей островок базальной мембраны, состоящей из различных белков внеклеточного матрикса [22, 23]. Базальная мембрана служит своеобразным интерфейсом между островками, эндотелиальными клетками и ацинарными клетками через интегрины и другие клеточные рецепторы [24, 25], образуя защитный барьер, обеспечивающий морфологическую целостность островков при неинтен-

сивном самопереваривании поджелудочной железы. В результате происходит как бы спонтанное самоочищение эндокринной (островковой) ткани от ненужной, балластной, но при этом высокоиммуногенной экзокринной ткани при сохранении необходимого для выживания и функционирования островковых клеток внеклеточного матрикса, представленного, в частности, упомянутой выше периостровковой мембраной. Наиболее быстро процесс избавления от экзокринной ткани происходит при стандартной температуре инкубации (37°C) микрофрагментов ПЖ новорожденных кроликов. Однако этот режим оказался не подходящим для ПЖ молодых (одномесячных) животных, что может быть объяснено наличием значительно большего процента экзокринной ткани. Было решено с целью интенсификации аутолитических процессов впервые применить нестандартную гипертермическую (38°C) инкубацию. Как и предполагалось, в новых температурных условиях уже к 5–7-м суткам была отмечена существенно большая потеря экзокринной ткани, содержащейся в измельченных панкреатических микрофрагментах, их постепенное уплотнение и ошаривание. Эти процессы привели к формированию флотирующих островковоподобных культур, аналогичных тем, которые нами были получены из ПЖ новорожденных кроликов.

Таким образом, разрабатываемые в настоящем исследовании рациональные методические подходы позволяют получать очищенные от экзокринной ткани островковоподобные культуры без использования дорогостоящих и неоднозначно действующих ферментных препаратов. По нашему мнению, последующие опыты по модификации бесферментного метода получения культур островковых клеток из ПЖ взрослых кроликов позволят получить данные, которые могут быть экстраполированы на разработку более рационального и продуктивного способа выделения островков из ПЖ посмертных доноров человека.

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

The authors declare no conflict of interest.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ / REFERENCES

1. Shapiro AM, Lakey JR, Ryan EA, Korbutt GS, Toth E, Warnock GL 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.
2. 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; 35: 1436–1445.

3. Misawa R, Ricordi C, Miki A, Barker S, Molano RD, Khan A et al. Evaluation of viable beta-cell mass is useful for selecting collagenase for human islet isolation: comparison of collagenase NB1 and liberase HI. *Cell Transplant*. 2012; 21: 39–47.
4. Linetsky E, Bottino R, Lehmann R, Alejandro R, Inverardi L, Ricordi C. Improved human islet isolation using a new enzyme blend, liberase. *Diabetes*. 1997; 46: 1120–1123.
5. Alejandro R, Barton FB, Hering BJ, Wease S. 2008 Update from the Collaborative Islet Transplant Registry. *Transplantation*. 2008; 86: 1783–1788.
6. Sabek OM, Cowan P, Fraga DW, Gaber AO. The effect of isolation methods and the use of different enzymes on islet yield and in vivo function. *Cell Transplant*. 2008; 17: 785–792.
7. Bertuzzi F, Cainarca S, Marzorati S, Bachi A, Antoniolli B, Nano R et al. Collagenase isoforms for pancreas digestion. *Cell Transplant*. 2009; 18: 203–206.
8. Szot GL, Lee MR, Tavakol MM, Lang J, Dekovic F, Kurlan RK et al. Successful clinical islet isolation using a GMP-manufactured collagenase and neutral protease. *Transplantation*. 2009; 88: 753–756.
9. Wang Y, Paushter D, Wang S, Barbaro B, Harvat T, Danielson K et al. Highly purified versus filtered crude collagenase: comparable human islet isolation outcomes. *Cell Transplant*. 2011; 20: 1817–1825. PMID: 21396158.
10. Kayton S, Poffenberger G, Henske J, Dai Ch, Thompson C, Aramandla R et al. Human islet preparations distributed for research exhibit a variety of insulin-secretoory profiles. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2015 Apr 1; 308 (7): E592–E602. doi: 10.1152/ajpendo.00437.2014.
11. Rheinheimer J, Klarmann Ziegelmann P, Carlessi R, Ross Reck L, Bauer AC, Leitão B. Different digestion enzymes used for human pancreatic islet isolation: A mixed treatment comparison (MTC) meta-analysis. *Islets*. 2014; 6 (4): e977118. Published online 2014 Nov 7.
12. Khatri R, Hussmann B, Rawat D, Gürol AO, Linn T. Intraportal Transplantation of Pancreatic Islets in Mouse Model. *J Vis Exp*. 2018 May 5; (135): 57559. doi: 10.3791/57559.
13. Saliba Y, Farès N. Isolation, Purification, and Culture of Mouse Pancreatic Islets of Langerhans. *Methods Mol Biol*. 2019; 1940: 255–265. doi: 10.1007/978-1-4939-9086-3_18. PMID: 30788831.
14. Corbin KL, West HL, Brodsky S, Whitticar NB, Koch WJ, Nunemaker CS. A Practical Guide to Rodent Islet Isolation and Assessment Revisited. *Biol Proced Online*. 2021 Mar 1; 23 (1): 7. doi: 10.1186/s12575-021-00143-x. PMID: 33641671.
15. Dietrich I, Girdlestone J, Giele H. Differential cytokine expression in direct and indirect co-culture of islets and mesenchymal stromal cells. *Cytokine*. 2021 Dec 17; 150: 155779. doi: 10.1016/j.cyto.2021.155779.
16. Hubber EL, Rackham CL, Jones PM. Protecting islet functional viability using mesenchymal stromal cells. *Stem Cells Transl Med*. 2021 May; 10 (5): 674–680. doi: 10.1002/sctm.20-0466.
17. Brandhorst D, Brandhorst H, Johnson PRV. Enzyme Development for Human Islet Isolation: Five Decades of Progress or Stagnation? *Rev Diabet Stud*. 2017 Spring; 14 (1): 22–38.
18. Gorelick FS, Otani T. Mechanisms of intracellular zymogen activation. *Baillieres Best Pract Res Clin Gastroenterol*. 1999; 13 (2): 227–240.
19. Piton G, Barbot O, Manzoni C, Moronval F, Patry C, Navellou JC et al. Acute ischemic pancreatitis following cardiac arrest: a case report. *JOP*. 2010; 11 (5): 456–459.
20. Dembinski A, Warzecha Z, Ceranowicz P, Tomaszewska R, Dembinski M, Pabianczyk M et al. Ischemic preconditioning reduces the severity of ischemia/reperfusion-induced pancreatitis. *Eur J Pharmacol*. 2003; 473 (2–3): 207–216.
21. Trimble ER. In: Lanza RP, Chick WL. Pancreatic islet transplantation. 1994. Pancreatic islet-acinar relationships; 19–25.
22. van Deijnen JH, Hulstaert CE, Wolters GH, van Schilf-gaarde 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 (1): 139–146.
23. van Suylichem PT, van Deijnen JE, Wolters GH, van Schilf-gaarde R. Amount and distribution of collagen in pancreatic tissue of different species in the perspective of islet isolation procedures. *Cell Transplant*. 1995; 4 (6): 609–614.
24. Otonkoski T, Banerjee M, Korsgren O, Thornell LE, Virtanen I. Unique basement membrane structure of human pancreatic islets: implications for beta-cell growth and differentiation. *Diabetes Obes Metab*. 2008; 10 (Suppl): 119–127.
25. Jiang FX, Naselli G, Harrison LC. Distinct distribution of laminin and its integrin receptors in the pancreas. *J Histochem Cytochem*. 2002; 50 (12): 1625–1632.

Статья поступила в редакцию 12.11.2021 г.

The article was submitted to the journal on 12.11.2021