

DOI: 10.15825/1995-1191-2022-4-109-117

ВЛИЯНИЕ БИОМАТРИКСОВ НА ЖИЗНЕСПОСОБНОСТЬ И ИНСУЛИНПРОДУЦИРУЮЩУЮ ФУНКЦИЮ ОСТРОВКОВ ЛАНГЕРГАНСА ЧЕЛОВЕКА *IN VITRO*

A.C. Пономарева, Н.В. Баранова, И.А. Милосердов, В.И. Севастьянов

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

Культивирование островков Лангерганса с биоматриксами – миметиками внеклеточного матрикса (ВКМ) может обеспечивать характерное для островков нативное микроокружение, что является одним из основных условий создания тканевого эквивалента поджелудочной железы (ПЖ). **Цель работы:** сравнение секреторной способности жизнеспособных панкреатических островков человека в монокультуре (контрольная группа) и культивированных в присутствии двух биоматрикса: биополимерного коллагенсодержащего гидрогелевого матрикса (опытная группа 1) и тканеспецифического матрикса из децеллюляризованной ПЖ посмертного донора (опытная группа 2). **Материалы и методы.** Островки Лангерганса выделяли из хвостовой части ПЖ по методике с использованием коллагеназы. Жизнеспособность культивированных островков определяли методом флуоресцентного окрашивания витальным красителем, секреторную способность – методом иммуноферментного анализа (ИФА). **Результаты.** Панкреатические островки, культивированные с биоматриксами, не проявляли признаков дегенерации и фрагментации и оставались жизнеспособными в течение всего срока наблюдения (7 суток). В монокультуре островков на этом сроке происходили значительные деструктивные изменения. Базальная концентрация инсулина в опытных группах 1 и 2 на первые сутки культивирования повышалась на 18,8 и 39,5% по сравнению с контрольной группой, на четвертые сутки инкубации – на 72,8 и 102,7%, на седьмые сутки – на 146,4 и 174,6% соответственно. Уровень секреции инсулина островков с тканеспецифическим матриксом был на 17,4% выше, чем при культивировании с биополимерным коллагенсодержащим матриксом. **Заключение.** Биополимерный и тканеспецифический миметики ВКМ способствуют не только сохранению жизнеспособности изолированных островков Лангерганса, но и поддержанию их инсулинпродуцирующей функции в течение 7 суток на более высоком уровне по сравнению с монокультурой. В условиях проведенных экспериментов выявлено незначительное потенциальное преимущество применения тканеспецифического матрикса по сравнению с биополимерным матриксом для создания тканевого эквивалента поджелудочной железы.

Ключевые слова: поджелудочная железа, культивирование островков Лангерганса, инсулинпродуцирующая функция, тканеспецифический матрикс, биополимерный матрикс.

IN VITRO EFFECT OF BIOSCAFFOLDS ON VIABILITY AND INSULIN-PRODUCING FUNCTION OF HUMAN ISLETS OF LANGERHANS

A.S. Ponomareva, N.V. Baranova, I.A. Miloserdov, V.I. Sevastianov

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

Introduction. The culture of islets of Langerhans with bioscaffolds – extracellular matrix (ECM) mimetics – can provide a native microenvironment suitable for islets. This is one of the main conditions for creating a pancreatic tissue equivalent. **Objective:** to compare the secretory capacity of viable human pancreatic islets in monoculture (control group) and cultured in the presence of two bioscaffolds: biopolymer collagen-based hydrogel scaffold (experimental group 1) and tissue-specific scaffold from decellularized deceased donor pancreas (experimental

Для корреспонденции: Пономарева Анна Сергеевна. Адрес: 123182, Москва, ул. Щукинская, д. 1. Тел.: (499) 196-26-61, (926) 585-23-73. E-mail: a.s.ponomareva@gmail.com

Corresponding author: Anna Ponomareva. Address: 1, Shchukinskaya str., Moscow, 123182, Russian Federation. Phone: (499) 196-26-61, (926) 585-23-73. E-mail: a.s.ponomareva@gmail.com

group 2). **Materials and methods.** Islets of Langerhans were isolated from the caudal pancreas using a collagenase technique. The viability of cultured islets was accessed by vital fluorescence staining, while secretory capacity was evaluated by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). **Results.** Pancreatic islets cultured with bioscaffolds showed no signs of degradation and fragmentation, they remained viable throughout the entire period of observation (7 days). The monoculture of islets showed significant destructive changes during this period. Basal insulin levels in experimental groups 1 and 2 increased by 18.8% and 39.5% on day 1 of culture compared to the control group, by 72.8% and 102.7% on day 4 of incubation, and by 146.4% and 174.6% on day 7, respectively. The insulin secretion level of islets with tissue-specific scaffolds was 17.4% higher than that when cultured with biopolymer collagen-based scaffolds. **Conclusion.** Biopolymer and tissue-specific ECM mimetics contribute not only to preservation of the viability of isolated islets of Langerhans but also maintain their insulin secretion capacity for 7 days at a higher level in comparison with monoculture. The experiments revealed that the use of a tissue-specific scaffold for the creation of a pancreatic tissue equivalent has slight potential advantage over biopolymer scaffold.

Keywords: pancreas, culture of the islets of Langerhans, insulin-producing function, tissue-specific scaffold, biopolymer scaffold.

ВВЕДЕНИЕ

К одному из направлений технологий тканевой инженерии и регенеративной медицины относится создание тканевого эквивалента эндокринного отдела поджелудочной железы (ПЖ) [1]. Заболеваемость сахарным диабетом 1-го типа (СД1) в мире увеличивается из года в год [2], а совершенствование традиционного метода лечения – инсулинотерапии [3] – не спасает больных от развития тяжелых осложнений, таких как диабетические ангиопатия и нейропатия [4, 5]. Аллотрансплантация панкреатических островков способна обеспечить инсулинонезависимость больных на определенный срок, не подвергая пациентов серьезному хирургическому вмешательству, как при трансплантации ПЖ [6–8], но существенным недостатком такого метода лечения является низкая функциональная активность островков, обусловленная действием ряда повреждающих факторов во время процедур выделения и культивирования.

Известно, что в основе механизма развития СД1 является аутоиммунное повреждение β -клеток островков Лангерганса, что приводит к истощению пула этих клеток и постепенно нарастающей, прогрессирующей недостаточности синтеза эндогенного инсулина [9].

Панкреатические островки в процессе выделения подвергаются воздействию ряда повреждающих факторов, таких как ишемия, окислительный стресс, возможное цитотоксическое действие фермента. В процессе культивирования островки претерпевают фрагментацию и деградацию из-за нарушения иннервации и васкуляризации, обеспечиваемых в организме внеклеточным матриксом (ВКМ) [10, 11]. ВКМ, участвуя в процессах морфогенеза, дифференцировки, внутриклеточной передачи сигналов, экспрессии генов, адгезии, миграции, пролиферации, секреции и выживания панкреатических островков [12], способствует сохранению целостности

структуры островков, что является необходимым условием их функционирования.

Ранее нами была изучена возможность получения жизнеспособных изолированных панкреатических островков из фрагмента хвостовой части донорской ПЖ человека по методике с использованием коллагеназы [13]. Представляется существенным в пост-изоляцияционный период обеспечить для островков микроокружение, характерное для нативного ВКМ *in situ*. Такая задача может быть решена в результате создания тканевого эквивалента ПЖ, состоящего из островковых клеток и биоматрикса, который в наибольшей степени может имитировать структуру и состав ВКМ для сохранения жизнеспособности и функциональной активности изолированных островков *in vitro* и *in vivo* [14].

К таким биоматриксам относится коммерчески доступный биополимерный микрогетерогенный коллагенсодержащий гидрогель (БМКГ-матрикс), зарегистрированный в России для клинического применения как биоимплантат «Композиция микрогетерогенного коллагенсодержащего геля *Сферо*[®]ГЕЛЬ» (АО «БИОМИР сервис, г. Краснознаменск). *Сферо*[®]ГЕЛЬ, производимый из компонентов тканей сельскохозяйственных животных методом экстракции уксусной кислотой, содержит основные компоненты ВКМ: пептиды частично гидролизованного коллагена, гликопротеины, уроновые кислоты и факторы роста, необходимые для жизнедеятельности клеток, синтеза экзогенных уроновых кислот, протеогликанов и коллагена [15].

Наиболее перспективными компонентами тканевых эквивалентов ПЖ представляются тканеспецифические биоматрицы, изготовленные из децеллюляризованной ПЖ или ее фрагментов (ДПЖ-матрикс) [16–18]. Разработка всех протоколов децеллюляризации ПЖ направлена на сохранение структурных, биохимических и биомеханических свойств нативного ВКМ с максимально полным удалением клеточного

материала (включая антигенный) для минимизации иммунного ответа на имплантацию ДПЖ-матрикса [19–21]. Присутствие основных компонентов ВКМ в децеллюляризованном панкреатическом каркасе, таких как структурные белки (коллагены I, III, IV, V и VI типа, эластин, фибронектин и ламинин), гликопротеины и факторы клеточной адгезии, позволяет создавать условия для пролонгированной жизнедеятельности островковых клеток и максимально имитировать свойства ВКМ [22]. Сохранение архитектуры ВКМ в ДПЖ-матриксе также влияет на выживаемость и секреторную функцию островков [23, 24]. Данные научной литературы и результаты наших исследований демонстрируют увеличение секреции инсулина панкреатическими островками свиньи [25] и островками крысы [18], культивированными в присутствии тканеспецифических матриксов аллогенного происхождения, по сравнению с монокультурой островков.

Цель работы заключалась в сравнении инсулин-продуцирующей функции жизнеспособных панкреатических островков человека в монокультуре и культивированных в присутствии двух биоматриксов: биополимерного микрогетерогенного коллагенсодержащего гидрогелевого матрикса и тканеспецифического матрикса из децеллюляризованной поджелудочной железы (ПЖ) человека.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Исходный материал

Для выделения панкреатических островков и получения тканеспецифического децеллюляризованного матрикса использовали хвостовую часть ПЖ, полученную в результате мультиорганного забора органов посмертных доноров и не пригодную для трансплантации.

Выделение и идентификация островков Лангерганса

Для получения островков Лангерганса небольшой фрагмент (~2,0 г) хвостовой части ПЖ механически измельчали (1,5 × 1,5 × 1,5 мм) и инкубировали в растворе коллагеназы NB1 (активность 20 PZ U/g ткани) с нейтральной протеазой NP (активность 1,5 DMC U/g ткани) (Serva, Германия) в течение 10–15 мин при 37 °С. Действие ферментов останавливали добавлением трехкратного объема холодного (4 °С) раствора Хэнкса (ПанЭко, Россия), с последующим фильтрованием через металлическое сито с диаметром ячеек 0,4–0,6 мм. Для очистки островков был подобран режим центрифугирования, позволяющий отказаться от использования градиента плотности фиколла (1 мин при скорости 900 об/мин, затем 2 мин при скорости 1300 об/мин).

Островки идентифицировали с помощью окрашивания дитизоном (Sigma-Aldrich, США) непосредственно после выделения. Для этого часть суспензии смешивали с раствором дитизона в соотношении 2 : 1 и инкубировали 20–30 мин при температуре 37 °С. Дитизон избирательно окрашивал панкреатические островки в красно-оранжевый цвет, при этом ацинарные клетки оставались неокрашенными. Свежевыделенные островки ресуспендировали в ростовой среде и использовали в эксперименте не позднее 24 часов после выделения.

Биополимерный микрогетерогенный коллагенсодержащий гидрогель (БМКГ-матрикс)

Одним из биоматриксов была выбрана инъекционная форма БМКГ (торговое название *Сфера*[®] ГЕЛЬ, производитель АО «Биомир сервис», Россия). БМКГ-матрикс состоит из микрочастиц (145,79 ± 0,09 мкм) склерального коллагена 1-го типа, сшитого γ -излучением (1,5 Мрад), и гомогенного гидрогеля, содержащего низкомолекулярные и высокомолекулярные компоненты ВКМ, в соотношении 1 : 1 [15]. Гетерогенная составляющая БМКГ-матрикса имеет пористую структуру микрочастиц с размером пор 2–4 мкм, что является положительным свойством в процессах неоваскуляризации и неиннервации тканеинженерных конструкций на его основе [18].

Тканеспецифический матрикс из децеллюляризованной поджелудочной железы (ДПЖ-матрикс)

В качестве тканеспецифического биомиметика ВКМ использовали биоматрикс, представляющий собой мелкодисперсные фрагменты децеллюляризованной панкреатической ткани человека. Методика получения ДПЖ-матрикса (рис. 1) была разработана ранее [21].

Протокол децеллюляризации включал в себя 3 цикла замораживания (при температуре –80 °С) и оттаивания (до температуры +37 °С) фрагментов ПЖ с последующим механическим измельчением ткани до размеров не более 1 × 1 × 2 мм. Измельченные фрагменты обрабатывали при комнатной температуре в трех сменах буферного раствора (pH = 7,4), содержащего 0,1% додецилсульфата натрия и повышающую концентрацию Тритона X100 (1, 2 и 3% соответственно) (Sigma, США), в условиях постоянного перемешивания в течение 24 ч. На конечной стадии процесса децеллюляризации мелкодисперсные фрагменты ДПЖ-матрикса тщательно отмывали от остатков поверхностно-активных веществ в течение 72 часов в трех сменах буферного раствора, содержащего антибиотик/антимикотик.

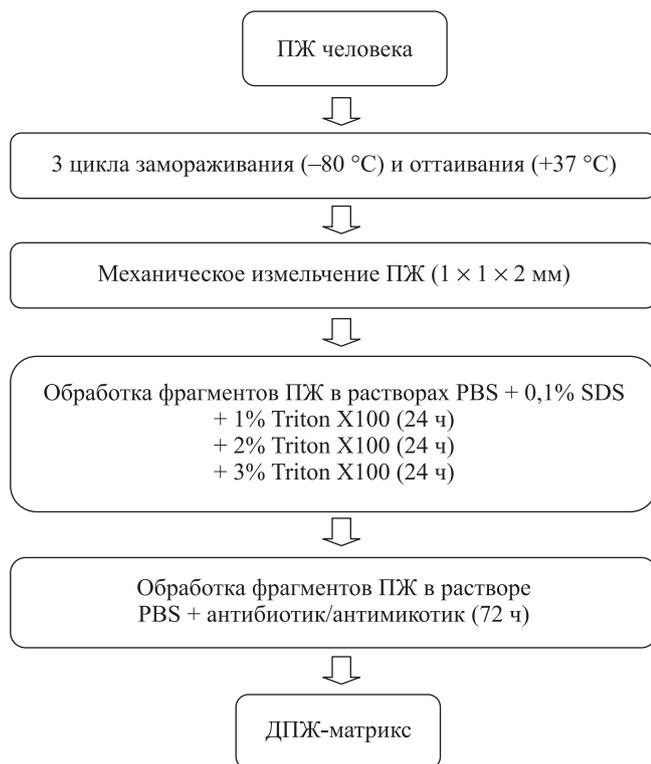


Рис. 1. Схематическое изображение этапов получения тканеспецифического матрикса из панкреатической ткани

Fig. 1. Schematic representation of the stages for obtaining tissue-specific scaffold from pancreatic tissue

Образцы мелкодисперсного ДПЖ-матрикса подвергали дегидратации с помощью фильтровальной бумаги, взвешивали и вносили в криопробирки по $20,0 \pm 0,1$ мг, стерилизовали γ -излучением (1,5 Мрад) и замораживали при температуре -80 °C. Срок хранения стерильных замороженных образцов ДПЖ-матрикса с сохранением биохимических и структурных свойств не более 1 года.

ДПЖ-матрикс содержит коллаген I типа и эластин, обладает низкой иммуногенностью (не более 0,1% ДНК), не цитотоксичен и сохраняет морфофункциональные свойства нативного ВКМ панкреатической ткани относительно адгезии и пролиферации клеточных культур [21].

Культивирование островков Лангерганса

Равное количество выделенных островков (~200) вносили в три культуральных флакона 25 см² (Greiner bio-one, Германия). В первый культуральный флакон (контроль) матрикс не добавляли. Во второй и третий культуральные флаконы вносили $20,0 \pm 0,1$ мг БМКГ-матрикса (опытная группа I) и $20,0 \pm 0,1$ мг ДПЖ-матрикса (опытная группа II) соответственно. Все островки культивировали в полной ростовой среде, содержащей DMEM (глюкоза 1,0 г/л)

(ПанЭко, Россия), 10% эмбриональной телячьей сыворотки (HyClone, США), Hepes (Gibco by Life technologies™, США), 2 mM L-глутамин (ПанЭко, Россия), 1% антибиотика/антимикотика (Gibco by Life technologies™, США). Культивирование островков проводили в стандартных условиях при 37 °C в увлажненной атмосфере, содержащей 5% CO₂, с ежедневным визуальным мониторингом и фотосъемкой с помощью инвертированного микроскопа (Nikon, Япония), оснащенного цифровой камерой. Смену культуральной среды осуществляли на сроках 1, 4 и 7 суток с целью отбора проб для последующего исследования на содержание инсулина.

Определение жизнеспособности

Жизнеспособность свежeweделенных островков, а также островков, культивированных в контрольной и опытных группах, оценивали на 1, 4 и 7-е сутки с помощью набора LIVE/DEAD® Cell Viability/Cytotoxicity Kit (Molecular probes® by Life technologies™, США). Для окрашивания LIVE/DEAD® часть суспензии островков (монокультуры или с матриксами) помещали в чашку Петри, смешивали с приготовленным рабочим раствором красителя в соотношении 1 : 2 и инкубировали в темноте в течение 15–30 мин. Результат оценивали с помощью люминесцентного микроскопа (Nikon, Япония).

Определение инсулинпродуцирующей функции

Для определения инсулинпродуцирующей функции островков контрольной и опытных групп на сроках 1, 4 и 7 суток в культуральных флаконах проводили замену ростовой среды. После 1 часа инкубации в прежних условиях (37 °C, 5% CO₂) осуществляли отбор проб ростовой среды из всех флаконов. Пробы хранили в замороженном состоянии (-23 °C) для последующего ИФА-исследования.

Базальную концентрацию инсулина в культуральной среде контрольной и опытных групп определяли с помощью набора для ИФА ELISA Kit for insulin Human SEA448 Hu-96 (Cloud-Clone Corp., США) согласно инструкции производителя.

В данном варианте ИФА используется метод конкурентного ингибирования. Моноклональное антитело, специфичное к инсулину, предварительно нанесено на микропланшет. Запускается реакция конкурентного ингибирования между меченым биотинилированной ферментативной меткой инсулином и немеченым инсулином (стандарт и образцы культуральной среды) с предварительно нанесенным антителом, специфичным к инсулину. После инкубации со всеми реагентами набора добавляли раствор субстрата, который реагировал с комплексом для получения сигнала в виде окрашенного продукта.

Интенсивность этого сигнала выражалась через оптическую плотность, которая обратно пропорциональна концентрации инсулина в исследуемых образцах. Обратная корреляция между концентрацией инсулина в образце и интенсивностью сигнала отображается в виде стандартной кривой с логарифмической функцией.

Результаты количественного метода ИФА рассчитывали, измеряя оптическую плотность на микропланшетном ридере Spark 10M (TecanTrading AG, Швейцария) с программным обеспечением Spark Control™ Magellan V1.2.20 на длинах волн 450 и 550 нм для учета оптических дефектов микропланшета. Полученные данные обрабатывали с помощью программы SPSS26.0. Представленные результаты продемонстрированы в виде среднего значения \pm среднеквадратичное отклонение. Различия считали достоверными при $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Свежевыделенные островки Лангерганса

С помощью инвертированного микроскопа наблюдали значительное количество свежевыделенных островков различных размеров с преимущественно округлой формой и гладкой поверхностью (рис. 2, а). Остатки экзокринной ткани выявлялись следующим образом: ацинарные клетки создавали определенную шероховатость на поверхности некоторых островков и не окрашивались дитизином. В то же время дитизон окрашивал панкреатические островки в оранжево-красный цвет, что позволяло легко их идентифицировать (рис. 2, б).

Прижизненное окрашивание LIVE/DEAD® свежевыделенных островков осложнялось наличием сильной фоновой яркости из-за присутствия клеток ацинарной ткани вокруг островков или в культуральной среде. Тем не менее отдельные живые клетки в структуре островков были четко визуализированы (рис. 2, в).

Жизнеспособность островков Лангерганса

Монокультура островков

Наблюдение в инвертированном микроскопе показало, что большинство островков, культивируемых без биоматрикса (контрольная группа), в течение первых трех суток инкубации сохраняли свою форму и целостность. Лишь немногие из них обнаруживали признаки фрагментации или подвергались разрушению.

Окрашивание LIVE/DEAD® в люминесцентном микроскопе продемонстрировало зеленую флуоресценцию островков, подтверждающую их жизнеспособность (рис. 3, а). Некоторые, окрашенные в красный цвет этидиум гомодимером, погибшие ацинарные клетки обнаруживались в культуральной среде, окружающей островки.

После 3 суток культивирования морфология островков в контрольной группе менялась. В некоторых островках обнаруживали появление полостей, признаки фрагментации, поверхность значительного количества островков приобретала неровные очертания, становилась бугристой (рис. 3, б). Прижизненное окрашивание LIVE/DEAD® на сроках 4–7 суток культивирования выявило в сохранившихся островках погибшие клетки с красной флуоресценцией (рис. 3, в). Таким образом, к недельному сроку культивирования без биоматрикса островки претерпевали значительные деструктивные изменения.

Островки Лангерганса в присутствии БМКГ-матрикса

Островки, культивируемые с БМКГ-матриком (опытная группа 1), оставались целостными, не подвергались фрагментации и деградации в течение всего периода наблюдения (7 суток). На вторые сутки инкубации наблюдали адгезию островков к гладкой поверхности БМКГ-матрикса (рис. 4, а), прикрепившиеся островки свободно флотировали

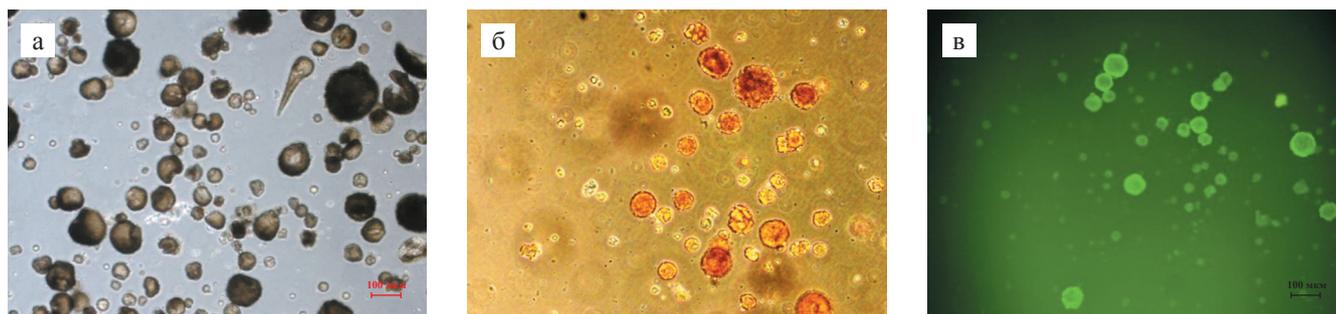


Рис. 2. Свежевыделенные островки Лангерганса человека: а – инвертированная фазово-контрастная микроскопия; б – окрашивание дитизином; в – флуоресцентное окрашивание LIVE/DEAD®. Бар 100 мкм

Fig. 2. Freshly isolated human islets of Langerhans: а – inverted phase-contrast microscopy; б – dithizone staining; в – LIVE/DEAD® fluorescence staining. Bar 100 µm

в культуральной среде. Флуоресцентное окрашивание LIVE/DEAD[®], проведенное на сроках 1, 4 и 7 суток инкубации, подтвердило жизнеспособность островков опытной группы 1 (рис. 4, б).

Островки Лангерганса в присутствии ДПЖ-матрикса

Островки, культивированные с ДПЖ-матриksom (опытная группа 2), так же, как и в опытной группе 1, не проявляли признаков деструкции и фрагментации в течение всего срока наблюдения (7 суток). На вторые сутки инкубации с ДПЖ-матриksom большая часть островков проявляла адгезивные качества и осаждалась на волокнистую поверхность матрикса (рис. 5, а), оставшиеся в культуральной среде островки продолжили флотировать. Прижизненное окрашивание островков опытной группы 2 LIVE/

DEAD[®], проведенное на сроке 1, 4 и 7 суток инкубации, подтвердило жизнеспособность сохранившихся островков (рис. 5, б).

Инсулинпродуцирующая функция панкреатических островков

Инсулинпродуцирующую функцию исследуемых островков определяли на сроках 1, 4 и 7 суток. Сравнительный анализ секреции инсулина опытных групп 1 и 2 проводили относительно контрольной группы.

После первых суток культивирования концентрация инсулина в опытных группах 1 и 2 была выше на 18,8% ($46,78 \pm 1,29$ пкг/мл) и на 39,5% ($54,93 \pm 1,58$ пкг/мл) по сравнению с контрольной группой ($39,37 \pm 1,25$ пкг/мл); на четвертые сутки ин-

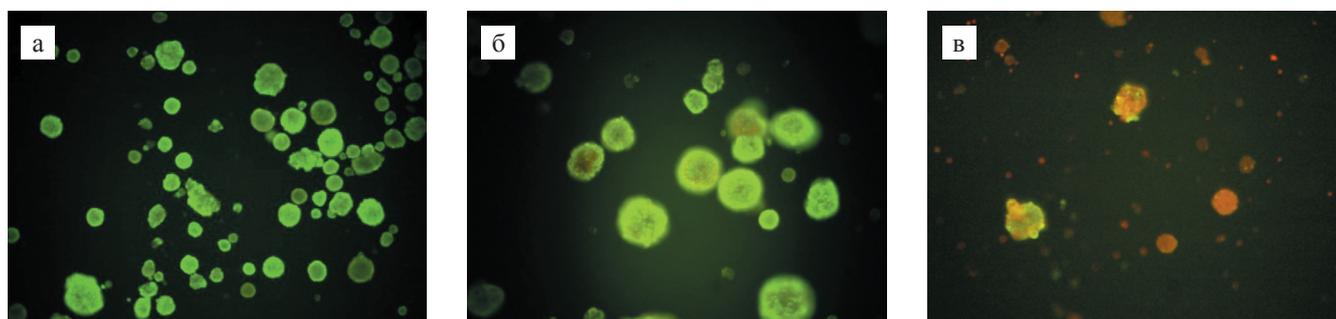


Рис. 3. Монокультура островков Лангерганса человека (контрольная группа). Флуоресцентное окрашивание LIVE/DEAD[®]: а – 3 суток культивирования, бар 100 мкм; б – 4 суток культивирования, бар 200 мкм; в – 7 суток культивирования, бар 100 мкм

fig. 3. Monoculture of human islets of Langerhans (control group): а – 3 days of culture, bar 100 μm; б – 4 days of culture, bar 200 μm; в – 7 days of culture, bar 100 μm

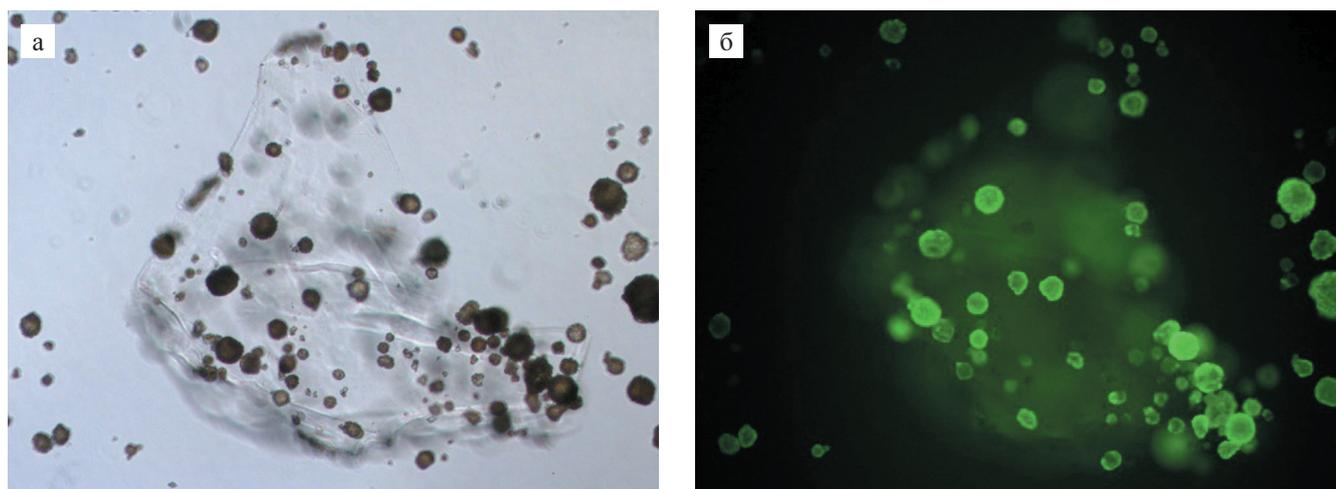


Рис. 4. Островки Лангерганса человека, культивированные с биополимерным коллагенсодержащим матриksom (БМКГ-матриksom). 7 суток культивирования: а – инвертированная фазово-контрастная микроскопия; б – флуоресцентное окрашивание LIVE/DEAD[®]. Бар 100 мкм

Fig. 4. Human Langerhans islets cultured with biopolymer collagen-containing scaffold (BMCH scaffold). 7 days of culture: а – inverted phase contrast microscopy; б – fluorescence, LIVE/DEAD[®]. Bar 100 μm

кубации – на 72,8% ($41,65 \pm 0,81$ пкг/мл) и 102,7% ($48,88 \pm 1,32$ пкг/мл) соответственно по сравнению с контрольной группой ($24,11 \pm 0,58$ пкг/мл). На сроке 7 суток наблюдали еще более значимую разницу между концентрациями инсулина опытных групп 1 ($32,9 \pm 1,08$ пкг/мл) и 2 ($36,66 \pm 1,38$ пкг/мл) и контрольной группы ($13,35 \pm 0,55$ пкг/мл) (табл.).

Позитивное влияние биоматрикса на инсулин-продуцирующую функцию островков проявляется в различии концентраций гормона в контрольной и опытных группах на всех сроках исследования (рис. 6). Значимую разницу между концентрациями

Таблица

Сравнительный анализ содержания инсулина (%) в опытных группах относительно контрольной группы (монокультура островков)
Comparative analysis of insulin levels (%) in the experimental groups relative to the control group (monoculture of islets)

Сутки	Островки + БМКГ-матрикс (опытная группа 1), %	Островки + ДПЖ-матрикс (опытная группа 2), %
1	$18,8 \pm 3,3$	$39,5 \pm 4,0$
4	$72,8 \pm 3,4$	$102,7 \pm 5,5$
7	$146,4 \pm 8,1$	$174,6 \pm 10,3$

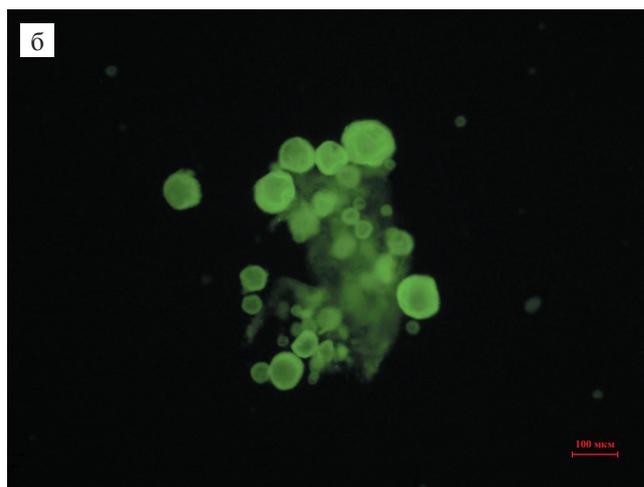
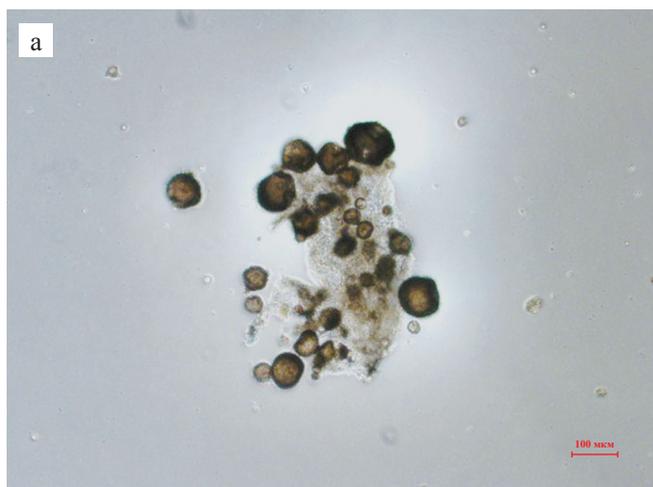


Рис. 5. Островки Лангерганса человека, культивированные с тканеспецифическим матриксом из децеллюляризованной поджелудочной железы человека (ДПЖ-матриксом). 7 суток культивирования: а – инвертированная фазово-контрастная микроскопия; б – флуоресцентное окрашивание LIVE/DEAD®. Бар 100 мкм

Fig. 5. Human Langerhans islets cultured with tissue-specific scaffold from decellularized pancreas (DP scaffold). 7 days incubation: а – inverted phase contrast microscopy; б – fluorescence, LIVE/DEAD®. Bar 100 μm

инсулина опытных групп 1 и 2 и контролем можно объяснить деструктивными изменениями монокультуры островков после трех суток культивирования, что подтверждается данными флуоресцентного окрашивания островков на разных сроках. Положительная тенденция влияния биополимерного и тканеспецифического миметиков ВКМ на секреторную функцию островков в процентном отношении сохранялась на протяжении всего срока наблюдения, несмотря на то что концентрация инсулина, выраженная в абсолютных значениях, с увеличением срока культивирования снижалась.

Уровень секреции инсулина на первые и четвертые сутки культивирования островков в группе 2 был на $17,37 \pm 0,05\%$ выше, чем в группе 1; на седьмые сутки – выше на $11,43\%$. Таким образом, выявлено незначительное преимущество применения тканеспецифического ДПЖ-матрикса по сравнению с БМКГ-матриксом при культивировании панкреатических

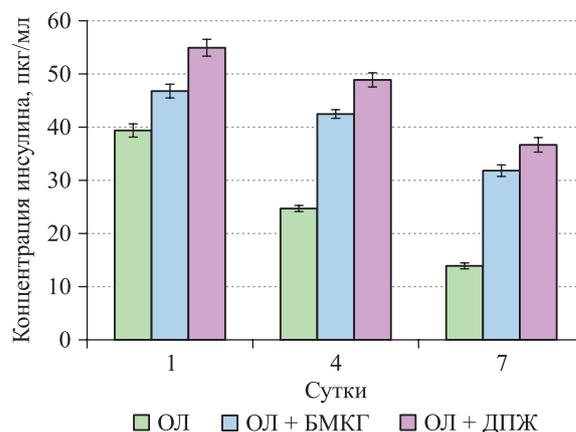


Рис. 6. Инсулинпродуцирующая функция островков Лангерганса человека в контрольной и опытных группах. ОЛ – островки Лангерганса. $p < 0,05$

Fig. 6. Insulin-producing function of human islets of Langerhans in control and experimental groups. ОЛ – islets of Langerhans. $p < 0.05$

островков человека. Ранее нами была исследована инсулинпродуцирующая функция островков крысы, культивированных в присутствии БМКГ-матрикса и матрикса из децеллюляризованной ПЖ крысы [18]. Сравнительный анализ секреции инсулина показал более выраженное влияние исследованных биоматрикса на островки крысы, чем на островки человека, при этом уровень секреции инсулина островков крысы, культивированных в присутствии ДПЖ-матрикса, был на 35,5% выше, чем у островков крысы, культивированных в присутствии БМКГ-матрикса.

Проведенное исследование показало, что изолированные островки человека, культивированные в присутствии биоматрикса, могут сохраняться в стандартных условиях инкубации без существенных потерь морфофункциональных свойств и жизнеспособности в течение 7 суток. Такой способ сохранения островкового потенциала *in vitro* перед имплантацией пациентам с СД1, вероятно, увеличит сроки функционирования островков *in vivo* и в постимплантационном периоде.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Культивирование изолированных островков Лангерганса с биополимерным и тканеспецифическим миметиками внеклеточного матрикса способствует не только сохранению жизнеспособности островков, но и поддержанию их секреторной функции в течение 7 суток на более высоком уровне по сравнению с культивированием островков без биоматрикса. В условиях проведенных экспериментов выявлено незначительное потенциальное преимущество применения тканеспецифического ДПЖ-матрикса по сравнению с БМКГ-матриksom для создания тканевого эквивалента поджелудочной железы.

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; 14 (4): 334–353.
2. Creusot RJ, Battaglia M, Roncarolo MG et al. Concise review: cell-based therapies and other non-traditional approaches for type 1 diabetes. *Stem Cells*. 2016; 34 (4): 809–819.
3. Gururaj Setty S, Crasto W, Jarvis J et al. New insulins and newer insulin regimens: a review of their role in improving glycaemic control in patients with diabetes. *Postgrad Med J*. 2016; 92 (1085): 152–164.
4. Gan MJ, Albanese-O'Neill A, Haller MJ. Type 1 diabetes: current concepts in epidemiology, pathophysiology, clinical care, and research. *Curr Probl Pediatr Adolesc Health Care*. 2012; 42 (10): 269–291.
5. Mannucci E, Monami M, Dicembrini I et al. Achieving HbA1c targets in clinical trials and in the real world: a systematic review and meta-analysis. *J Endocrinol Invest*. 2014; 37 (5): 477–495.
6. Bottino R, Knoll MF, Knoll CA et al. The future of islet transplantation is now. *Front Med (Lausanne)*. 2018; 5: 202.
7. Shapiro AM, Pokrywczynska M, Ricordi C. Clinical pancreatic islet transplantation. *Nat Rev Endocrinol*. 2017; 13 (5): 268–277.
8. Maffi P, Secchi A. Clinical results of islet transplantation. *Pharmacol Res*. 2015; 98: 86–91.
9. Ehlers MR. Strategies for clinical trials in type 1 diabetes. *J Autoimmun*. 2016; 71: 88–96.
10. Bosco D, Armanet M, Morel P et al. Unique arrangement of alpha- and beta-cells in human islets of Langerhans. *Diabetes*. 2010; 59 (5): 1202–1210.
11. Amer LD, Mahoney MJ and Bryant SJ. Tissue engineering approaches to cell-based type 1 diabetes therapy. *Tissue engineering*. 2014; 20 (5): 455–467.
12. Riopel M, Wang K. Collagen matrix support of pancreatic islet survival and function. *Frontiers in Bioscience*. 2014; 19: 77–90. doi: 10.2741/4196.
13. Пономарева АС, Кирсанова ЛА, Баранова НВ, Бубенцова ГН, Милосердов ИА, Волкова ЕА, Севастьянов ВИ. Методика выделения жизнеспособных островков Лангерганса из фрагмента хвостовой части поджелудочной железы человека. *Вестник трансплантологии и искусственных органов*. 2018; 20 (4): 76–82. Ponomareva AS, Kirsanova LA, Baranova NV, Bubentsova GN, Miloserdov IA, Volkova EA, Sevastianov VI. A technique for separating viable islets of Langerhans from a fragment of human pancreatic tail. *Russian Journal of Transplantology and Artificial Organs*. 2018; 20 (4): 76–82. doi.org/10.15825/1995-1191-2018-4-76-82.
14. Llacua LA, Faas MM, de Vos P. Extracellular matrix molecules and their potential contribution to the function of transplanted pancreatic islets. *Diabetologia*. 2018; 61 (6): 1261–1272.
15. Севастьянов ВИ, Перова НВ. Инъекционный гетерогенный биополимерный гидрогель для заместительной и регенеративной хирургии и способ его получения. Патент на изобретение РФ № 2433828. 2011. Sevastianov VI, Perova NV. Injectable heterogeneous biopolymer hydrogel for replacement and regenerative surgery and the method of its preparation. [Patent for invention of the Russian Federation No. 2433828]. 2011.
16. Goh SK, Bertera S, Olsen P et al. Perfusion-decellularized pancreas as a natural 3D scaffold for pancreatic tissue and whole organ engineering. *Biomaterials*. 2013; 34 (28): 6760–6772.
17. 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; 2 (7): 41777. doi: 10.1038/srep41777.
18. Sevastianov VI, Baranova NV, Kirsanova LA, Ponomareva AS, Basok YuB, Nemets EA, Gautier SV. Comparative analysis of the influence of extracellular matrix

- biomimetics on the viability and insulin-producing function of isolated pancreatic islets. *J Gene Engg Bio Res*. 2021; 3 (2): 17–25.
19. Rana D, Zreigat H, Benkirane-Jessel N et al. Development of decellularized scaffolds for stem cell-driven tissue engineering. *J Tissue Eng Regen Med*. 2017; 11 (4): 942–965.
 20. Shirakigawa N, Ijima H. Decellularized tissue engineering. *Advances in Biomaterials for Biomedical Applications*. Springer Nature Singapore Pte Ltd. 2017; 66: 185–226.
 21. Пономарева АС, Кирсанова ЛА, Баранова НВ, Сургученко ВА, Бубенцова ГН, Басок ЮБ и др. Децеллюляризация фрагмента донорской поджелудочной железы для получения тканеспецифического матрикса. *Вестник трансплантологии и искусственных органов*. 2020; 22 (1): 123–133. Ponomareva AS, Kirsanova LA, Baranova NV, Surguchenko VA, Bubentsova GN, Basok YuB et al. Decellularization of donor pancreatic fragment to obtain a tissue-specific matrix scaffold. *Russian Journal of Transplantology and Artificial Organs*. 2020; 22 (1): 123–133. doi: 10.15825/1995-1191-2020-1-123-133.
 22. Sackett SD, Tremmel DM, Ma F et al. Extracellular matrix scaffold and hydrogel derived from decellularized and delipidized human pancreas. *Sci Rep*. 2018; 8 (1): 10452.
 23. Guruswamy Damodaran R, Vermette P. Decellularized pancreas as a native extracellular matrix scaffold for pancreatic islet seeding and culture. *J Tissue Eng Regen Med*. 2018; 12 (5): 1230–1237.
 24. 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 DiabSci Technol*. 2014; 8 (1): 159–169. doi: 10.1177/1932296813519558.
 25. 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; 34 (22): 5488–5495. doi: 10.1016/j.biomaterials.2013.03.054.

Статья поступила в редакцию 22.07.2022 г.
The article was submitted to the journal on 22.07.2022