

DOI: 10.15825/1995-1191-2025-1-90-102

СКАФФОЛД НА ОСНОВЕ ДЕЦЕЛЛЮЛЯРИЗОВАННОЙ ПЕЧЕНИ СВИНЬИ ДЛЯ ПОДДЕРЖАНИЯ ЖИЗНЕСПОСОБНОСТИ И ФУНКЦИИ ОСТРОВКОВ ЛАНГЕРГАНСА

Н.В. Баранова¹, А.С. Пономарева¹, А.Д. Белова¹, Л.А. Кирсанова¹, Д.Д. Филин^{1, 2},
Е.А. Немец¹, Ю.Б. Басок¹, В.И. Севастьянов^{1, 3}

¹ ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр трансплантологии и искусственных органов имени академика В.И. Шумакова» Минздрава России, Москва, Российская Федерация

² ФГБОУ ВО «Российский химико-технологический университет имени Д.И. Менделеева», Москва, Российская Федерация

³ АНО «Институт медико-биологических исследований и технологий», Москва, Российская Федерация

Создание биоинженерных конструкций поджелудочной железы (ПЖ) на основе скаффолдов из децеллюляризованных тканей и островков Лангерганса (ОЛ) может позволить пролонгировать функциональную активность трансплантированных ОЛ больным сахарным диабетом I типа. **Цель:** исследование *in vitro* влияния скаффолда из фрагментов децеллюляризованной печени свиньи (СДПс) на жизнеспособность и инсулинпродуцирующую функцию изолированных ОЛ человека. **Материалы и методы.** Проводили гистологическое исследование полученного СДПс, количественное определение ДНК и исследование цитотоксического действия. ОЛ выделяли из фрагментов ПЖ человека, используя коллагеназную методику. Культивирование ОЛ в монокультуре (контрольная группа), в присутствии СДПс (опытная группа 1) или скаффолда из фрагментов децеллюляризованной ПЖ человека (СДПЖч) (опытная группа 2) проводили в стандартных условиях. Жизнеспособность ОЛ оценивали с помощью флуоресцентного окрашивания витальным красителем. Базальную и под нагрузкой глюкозой концентрации инсулина определяли методом иммуноферментного анализа. **Результаты.** Выбранный протокол децеллюляризации позволил сохранить в образцах СДПс основной состав и структуру внеклеточного матрикса ткани печени. Образцы не оказывали цитотоксического действия, а остаточное количество ДНК в скаффолде не превышало 1,0%. ОЛ опытных групп не проявляли значительных признаков деструкции и фрагментации в течение 10 суток инкубации по сравнению с ОЛ контрольной группы. На 10-е сутки жизнеспособность ОЛ опытной группы 1 составила 64%, опытной группы 2 – 72%, а ОЛ контрольной группы – менее 20%. После первых суток культивирования концентрация инсулина в опытной группе 1 была выше на 29,0% по сравнению с контрольной группой, в опытной группе 2 – на 39,1%. Разница между концентрациями инсулина опытных групп 1 и 2 относительно контрольной группы на 10-е сутки эксперимента составила 124,8 и 150,9% соответственно. Под нагрузкой глюкозы концентрация инсулина в опытной группе 1 была выше в 1,7 раза, чем в контрольной группе, в опытной группе 2 – выше в 2,2 раза. **Заключение.** Полученный СДПс положительно влияет на жизнеспособность и инсулинпродуцирующую функцию ОЛ. При создании биоинженерной конструкции ПЖ СДПс может быть использован в качестве компонента, получаемого в достаточном количестве из доступного источника.

Ключевые слова: децеллюляризация, печень свиньи, скаффолд, островки Лангерганса.

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

DECELLULARIZED PORCINE LIVER SCAFFOLD FOR MAINTAINING THE VIABILITY AND CAPACITY OF PANCREATIC ISLETS

N.V. Baranova¹, A.S. Ponomareva¹, A.D. Belova¹, L.A. Kirsanova¹, D.D. Filin^{1, 2}, E.A. Nemets¹, Yu.B. Basok¹, V.I. Sevastianov^{1, 3}

¹ Shumakov National Medical Research Center of Transplantology and Artificial Organs, Moscow, Russian Federation

² Mendeleev University of Chemical Technology of Russia, Moscow, Russian Federation

³ Institute of Biomedical Research and Technology, Moscow, Russian Federation

Bioengineered pancreatic constructs based on scaffolds made from decellularized tissues and pancreatic islets (PIs) may be used to extend the functional activity of transplanted PIs in patients with type I diabetes. Objective: to investigate *in vitro* the effect of decellularized porcine liver scaffold (DPLS) on the viability and insulin-producing capacity of isolated human PIs. **Materials and methods.** The resulting DPLS was subjected to histological examination, DNA quantification, and cytotoxic effect testing. The PIs were isolated from human pancreas fragments using the collagenase technique. Under standard conditions, PIs were cultured in three different environments: monoculture (control group), with DPLS present (experimental group 1) or with decellularized human pancreas scaffold (DHPS) present (experimental group 2). Vital fluorescent dyes were used to evaluate the viability of PIs. Basal and glucose-loaded insulin concentrations were determined by enzyme immunoassay. **Results.** The basic composition and structure of the extracellular matrix of liver tissue in DPLS samples were preserved thanks to the selected decellularization procedure. The samples had no cytotoxic effect, and the residual amount of DNA in the scaffold did not exceed 1.0%. PIs from the experimental groups showed no significant signs of degradation and fragmentation during the 10-day incubation period compared to PIs from the control group. On day 10, the viability of PIs from experimental group 1 was 64%, that of experimental group 2 was 72%, and that of the control group was less than 20%. After the first day of culturing, insulin concentration were 29.0% higher in experimental group 1 and 39.1% higher in experimental group 2 compared to the control group. On day 10 of the experiment, insulin levels in experimental groups 1 and 2 differed by 124.8% and 150.9%, respectively, from the control group. Under a glucose load, the insulin level in experimental group 1 was 1.7 times higher than in the control group, whereas that of experimental group 2 was 2.2 times higher. **Conclusion.** The resulting DPLS has a positive effect on the viability and insulin-producing capacity of PIs. When creating a bioengineered construct of PIs, DPLS can be used as a component obtained in sufficient quantity from an available source.

Keywords: decellularization, porcine liver, scaffold, pancreatic islets.

ВВЕДЕНИЕ

Трансплантацию функционально активных панкреатических островков можно считать одним из самых безопасных и наименее инвазивных трансплантационных методов лечения тяжелых случаев сахарного диабета I типа (СД I) [1]. Приоритетной задачей клеточной терапии при лечении СД I является максимально длительное сохранение жизнеспособности и функциональной активности пересаженных β -клеток, поскольку на метаболическую функцию островкового трансплантата отрицательно влияют такие факторы, как гипоксия, окислительный стресс, частичный тромбоз воротной вены и мгновенная воспалительная реакция, опосредованная кровью. Кроме того, в процессе выделения островки подвергаются действию ряда повреждающих факторов, что также приводит к снижению функции островкового трансплантата. Нарушается васкуляризация и иннервация панкреатических островков, а также принципиально меняется сигнальное взаимодействие между остров-

ковыми клетками и компонентами внеклеточного матрикса (ВКМ).

Последние достижения тканевой инженерии продемонстрировали перспективность применения новых технологий для увеличения продолжительности жизни пересаженных островков [2–4], в том числе создание биоинженерных конструкций эндокринного отдела поджелудочной железы на основе децеллюляризованных скаффолдов, рецеллюляризованных инсулинпродуцирующей клеточной популяцией [5]. Для получения скаффолдов органы или ткани подвергают процессу децеллюляризации для удаления клеточных компонентов, несущих наибольшую антигенную нагрузку, при максимально полном сохранении состава ВКМ (белки и факторы роста) [6, 7]. Трехмерные скаффолды, очищенные от ДНК и сохранившие в своем составе основные белки, обеспечивают близкое к естественному микроокружение для функциональных клеток, что позволяет оптимизировать условия для их пролонгированной жизнедеятельности [3]. Кроме того, скаффолды из

децеллюляризованных тканей обеспечивают эффективную репопуляцию функциональными клетками, поскольку содержат соответствующую трехмерную архитектуру и сохраненный пространственный каркас из компонентов ВКМ для поддержания клеточной адгезии и функциональной активности.

Культивирование островков Лангерганса (ОЛ) в присутствии скаффолдов из децеллюляризованной поджелудочной железы (СДПЖ) способствует сохранению их структуры, пролонгирует жизнеспособность и инсулинпродуцирующую функцию по сравнению с островками, культивированными в стандартных условиях [5, 8, 9]. СДПЖ также обеспечивают островковым клеткам пролонгированное выживание и функционирование *in vivo* [10, 11].

Как известно, печень и поджелудочная железа (ПЖ) имеют сходный путь эмбрионального развития (возникают из одной и той же части энтодермы передней кишки). Кроме того, ВКМ печени и ПЖ сопоставимы между собой и включают такие компоненты, как коллаген I, III, IV типа, эластин, ламинин, фибронектин, гликозаминогликаны [4, 7]. В связи с этим скаффолд из децеллюляризованной ткани печени (СДП) может служить альтернативным каркасом при создании биоинженерных конструкций, способным обеспечить благоприятную среду для инсулинпродуцирующих клеток. Помимо этого, на сегодняшний день пересадка островков в паренхиму печени через порталную вену является основным клинически одобренным местом трансплантации [12, 13]. СДП обеспечивает сохранность не только клеток печени [14, 15], но и эндокринных островковых клеток [16]. Так, исследователи продемонстрировали, что трехмерный скаффолд, полученный с помощью децеллюляризации целых долей печени мыши, способствует пролонгированному выживанию и поддержанию функции изолированных ОЛ мыши *in vitro* [17].

Goh et al. показали возможность заселения скаффолда из децеллюляризованной печени мыши инсулинпродуцирующими клеточными агрегатами, сформированными из дифференцированных плюрипотентных эмбриональных стволовых клеток человека. Обширная структура сосудистой сети СДП в отличие от СДПЖ позволила равномерно заселить весь его объем клеточными агрегатами, а также обеспечить клеткам эффективную доставку питательных веществ при культивировании в биореакторе в течение девяти суток [18].

Также был продемонстрирован потенциал скаффолдов из других децеллюляризованных органов для пролонгирования функции ОЛ. В работе [19] скаффолд из децеллюляризованной селезенки крысы повышает секрецию инсулина засеянных на него клеток MIN6 по сравнению с двумерной (2D) культурой и

может считаться подходящим носителем для трансплантации β -клеток. Разработанная биоискусственная ПЖ на основе децеллюляризованных легких свиньи и ОЛ человека оставалась жизнеспособной и поддерживала секрецию инсулина *in vitro*, сопоставимую с секрецией свежeweделенными островками, и следовательно, может быть использована для скрининга лекарств в режиме реального времени [20].

Ожидается, что такая стратегия создания биоинженерной конструкции поджелудочной железы найдет потенциальное применение в доклинических испытаниях, разработке лекарств и терапии сахарного диабета.

При создании биоинженерной конструкции на основе функциональных клеток человека и децеллюляризованного скаффолда из аллогенных тканей не удастся избежать проблемы нехватки донорских органов, что обуславливает необходимость получения скаффолда из ксеногенного материала, например свиного. Кроме того, имплантаты, полученные на основе децеллюляризованных тканей и органов свиньи, например кожи, мочевого пузыря, клапанов сердца, тонкого кишечника, успешно применяются в клинической практике [21]. Также отметим, что экзокринная активность поджелудочной железы, а соответственно, возможность самопереваривания панкреатической ткани осложняет забор и транспортировку ксеногенного органа. Печень лишена данного недостатка, что делает ее привлекательной для тканевой инженерии поджелудочной железы.

Целью нашей работы было получение скаффолда из фрагментов децеллюляризованной печени свиньи (СДПс) и исследование *in vitro* его влияния на жизнеспособность и инсулинпродуцирующую функцию изолированных островков Лангерганса человека.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Объекты исследования

Для выделения ОЛ и получения скаффолда из децеллюляризованной ткани поджелудочной железы человека (СДПЖч) использовали фрагменты панкреатической ткани, полученные при резекции поджелудочной железы (ПЖ) у пациентов. Все манипуляции были проведены согласно Хельсинкской декларации Всемирной медицинской ассоциации «Рекомендации для врачей, занимающихся биомедицинскими исследованиями с участием людей», принятой 18-й Всемирной медицинской ассамблеей (Финляндия, 1964 г.) в соответствии с действующим текстом пересмотра. Получено заключение об одобрении проведения экспериментальных исследований от Локального этического комитета при ФГБУ «НМИЦ ТИО им. ак. В.И. Шумакова» Минздрава России от 16 марта 2018, протокол № 160318-1/1э.

Фрагменты панкреатической ткани помещали в раствор Хенкса (+4 °С) с антибиотиком/антимикотиком и хранили при температуре +4...+6 °С до процедуры выделения островков не более 10 часов.

В экспериментах использовали СДПЖч, полученный в результате децеллюляризации фрагментов панкреатической ткани человека по разработанному нами ранее протоколу [22].

Скаффолд из децеллюляризованной ткани печени (СДПс) получали, используя печень свиньи (вес 20 кг, возраст 3 месяца, ООО «АПК «Промагро», г. Старый Оскол).

Получение и исследование скаффолда из децеллюляризованных фрагментов печени свиньи

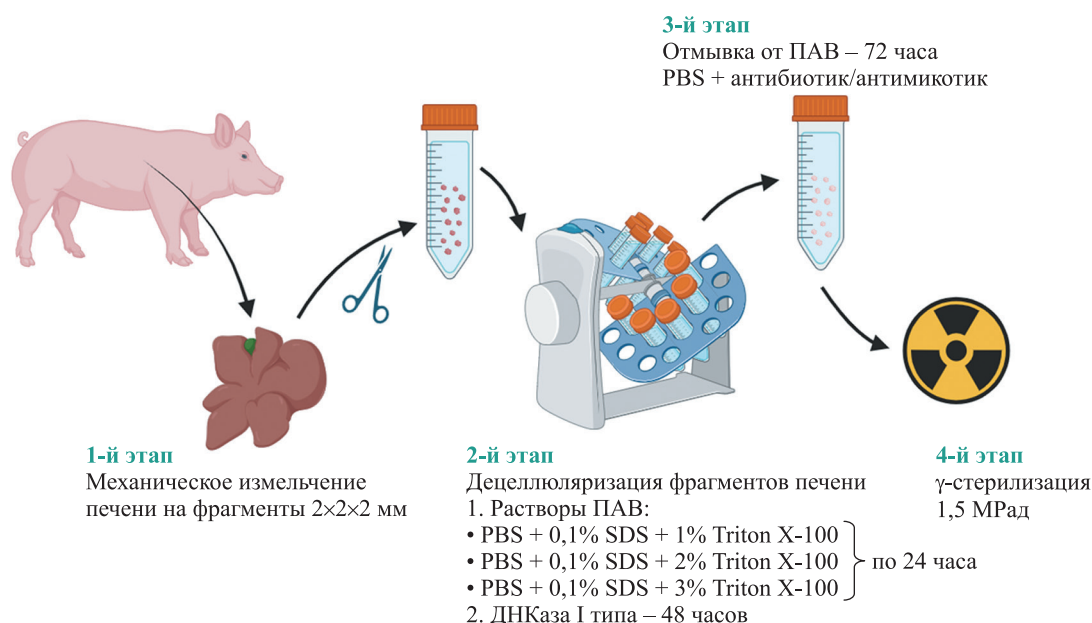
Децеллюляризацию печени свиньи проводили, ориентируясь на протокол, включающий обработку измельченной механическим способом ткани (размер фрагментов не более 2×2×2 мм) в трех сменах (по 24 ч для каждой смены) фосфатно-солевого буферного раствора (PBS), содержащего 0,1% додецилсульфата натрия (SDS) и повышающуюся концентрацию Triton X-100 (1, 2 и 3%), а также обработку ДНКазой I типа (Sci-Store, Россия) [23]. Фрагменты печени свиньи обрабатывали при комнатной температуре в условиях непрерывного перемешивания на магнитной мешалке со скоростью 300 об/мин. Для достижения полноты удаления клеточных компонентов, измеряемой по остаточному количеству ДНК, СДПс

обрабатывали в растворе ДНКазы I типа. Далее СДПс отмывали от остатков поверхностно-активных веществ в течение 72 часов, проводя инкубацию образцов в PBS, содержащем антибиотик/антимикотик. Образцы СДПс стерилизовали γ -облучением дозой 1,5 Мрад (рис. 1).

Стерильные образцы СДПс хранили при температуре –20 °С и непосредственно перед началом эксперимента измельчали до размера частиц 500 ± 45 мкм для уменьшения степени микрогетерогенности.

Осуществляли определение содержания ДНК в исходной и децеллюляризованной ткани печени свиньи. Для этого проводили выделение ДНК из образцов с помощью набора DNeasy Blood & Tissue Kit (QIAGEN, Германия) согласно инструкции производителя. Для количественного определения ДНК использовали флуоресцентный краситель Picogreen Quant-iT (Thermo Fisher Scientific, США) и микропланшетный ридер Spark 10M (Tecan Trading, Швейцария), с помощью которого проводили анализ полученной термоэлектронной эмиссии при длине волны 520 нм.

Для гистологического исследования образцы исходной ткани и СДПс фиксировали в 10% растворе забуференного формалина (Биовитрум, Россия), промывали в проточной воде, обезвоживали в этаноле восходящей концентрации (70, 80, 90 и 96%), выдерживали в смеси 96% этанола с хлороформом и заливали в парафин. Гистологические срезы депарафинировали, регидратировали и окрашивали гема-



Created in BioRender.com bio

Рис. 1. Схема получения скаффолда из децеллюляризованной ткани печени свиньи (СДПс)

Fig. 1. Schematic representation of how a decellularized porcine liver scaffold (DPLS) is obtained

токсилином Майера (Dako, Дания) и 1% раствором эозина (Биовитрум, Россия) и по методу Массона на общий коллаген. Окрашенные срезы заключали в бальзам Bio Mount (Bio-Optica, Италия). Анализ и фотосъемку препаратов проводили с использованием инвертированного микроскопа Nikon Eclipse Ti (Nikon, Япония).

Цитотоксичность образцов СДПс *in vitro* оценивали методом прямого контакта в соответствии со стандартом ГОСТ ISO 10993-5-2011 [24] на культуре фибробластов мыши линии NIH/3T3. Клетки высевали в культуральные плоскодонные 24-луночные планшеты и инкубировали при температуре +37 °C в стандартных условиях до образования монослоя со степенью конfluence 80–85%. На поверхность образовавшегося монослоя клеток помещали исследуемые образцы. Через 24 часа инкубации оценивали морфологию клеток. Отрицательным контролем служила полная ростовая среда для клеток NIH/3T3, положительным – стандартный раствор цинка в азотной кислоте (9,95 мг Zn в 1–2 масс.% HNO₃, разведение 1 : 200 раствором 0,9% NaCl для инъекций). Визуально культуру клеток оценивали с помощью светового микроскопа Nikon Eclipse Ti (Nikon, Япония).

Выделение и идентификация островков Лангерганса человека

Выделение островков проводили, ориентируясь на коллагеназную методику, используя коллагеназу NB1 (активность 20 PZ U/g ткани) и нейтральную протеазу NP (активность 1,5 DMC U/g ткани) (Serva, Германия) [9, 22].

Свежевыделенные островки идентифицировали с помощью окрашивания дитизоном (Sigma-Aldrich, США), который маркирует цинк в гранулах инсулина. Для этого часть суспензии смешивали с раствором красителя в соотношении 2 : 1 и инкубировали 20–30 мин при температуре +37 °C. Результат окрашивания, а также подсчет островков осуществляли с помощью светового микроскопа Nikon Eclipse Ti (Nikon, Япония). Полученную суспензию островков ресуспендировали в полной ростовой среде и использовали в эксперименте не позднее 24 часов после выделения.

Культивирование островков Лангерганса человека в монокультуре и в присутствии скаффолдов

Приблизительно равное количество изолированных островков ($n = 250 \pm 10$) вносили в три культуральных флакона 25 см² (Greiner bio-one, Германия). В первый культуральный флакон (контрольная группа) скаффолды не добавляли. Во второй культураль-

ный флакон вносили $20,0 \pm 0,1$ мг СДПс (опытная группа 1). В третий культуральный флакон вносили $20,0 \pm 0,1$ мг СДПЖч (опытная группа 2). Островки контрольной и опытных групп культивировали в полной ростовой среде, содержащей DMEM (глюкоза 1,0 г/л) (ПанЭко, Россия), 10% ЭТС (HyClone, США), Hepes (Gibco, США), 2 mM L-глутамина (ПанЭко, Россия), 1% антибиотика/антимикотика (Gibco, 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 Eclipse Ti (Nikon, Япония), оснащенного цифровой камерой. Смену культуральной среды осуществляли на сроках 1, 3, 7 и 10 суток с целью отбора проб для последующего исследования на содержание инсулина методом иммуноферментного анализа (ИФА).

Определение жизнеспособности островков Лангерганса

Для определения жизнеспособности свежeweделенных и культивированных ОЛ человека проводили флуоресцентное окрашивание витальным красителем LIVE/DEAD Cell Viability/Cytotoxicity Kit (Molecular Probes, США). Для окрашивания витальным красителем часть суспензии островков (монокультуры или со скаффолдами) помещали в чашку Петри, смешивали с приготовленным рабочим раствором красителя в соотношении 2 : 1 и инкубировали в темноте в течение 15–30 мин. Используя люминесцентный микроскоп Nikon Eclipse 50i (Nikon, Япония), подсчитывали процент жизнеспособных островков, демонстрирующих зеленую флуоресценцию в окрашенном образце.

Определение инсулинпродуцирующей функции островков Лангерганса

Для определения базальной концентрации инсулина в контрольной и опытных группах на сроках 1, 3, 7 и 10 суток определяли с помощью набора для ИФА ELISA Kit for insulin Human CEA448 Hu-96 (Cloud-Clone Corp., США) согласно инструкции производителя. Для этого в культуральных флаконах проводили замену ростовой среды с содержанием глюкозы 2,8 ммоль/л. После 1 часа инкубации в прежних условиях (+37 °C, 5% CO₂) осуществляли отбор проб культуральной среды.

Изменения содержания гормона под нагрузкой глюкозой до 25 ммоль/л оценивали на вторые сутки инкубации. Для этого ростовую среду заменяли на свежую с низким содержанием глюкозы 2,8 ммоль/л. После 60-минутной инкубации в прежних условиях отбирали и замораживали (–23 °C) пробы культуральной среды. Затем из этих культуральных флако-

нов удаляли ростовую среду и заменяли на свежую с высокой концентрацией глюкозы 25 ммоль/л. Через 60 минут инкубации в указанных условиях также отбирали пробы культуральной среды (по 2 пробы для каждого срока культивирования) и также замораживали (-23°C) для дальнейшего исследования методом ИФА.

Результаты количественного определения рассчитывали, измеряя оптическую плотность на микропланшетном ридере Spark 10M (Tecan Trading, Швейцария) с программным обеспечением Spark Control Magellan V1.2.20 на длинах волн 450 и 550 нм для учета оптических дефектов микропланшета. Статистическую обработку полученных данных проводили с помощью приложения Microsoft Office Excel (2016). Различия считали статистически достоверными, когда уровень значимости p не превышал порогового значения 0,05.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Скаффолд из фрагментов децеллюляризованной печени свиньи

В результате децеллюляризации фрагментов печени свиньи, основанной на комплексном использовании химического (обработка растворами SDS и Triton X-100) и ферментативного (обработка ДНКазой I типа) способов обработки ткани печени, получен мелкодисперсный СДПс с остаточным количеством ДНК не более $10,3 \pm 1,5$ нг/мг, что составляет менее 1% от количества ДНК в нативной печени, и с сохранением тонковолокнистой структуры и основного состава ВКМ печени свиньи.

Для нативной ткани печени свиньи характерно выраженное деление паренхимы на дольки, ограниченные прослойками соединительной ткани (рис. 2, а). При окрашивании по методу Массона в соединительно-тканых тяжах хорошо идентифицируются синие коллагеновые волокна (рис. 2, б).

Образцы СДПс характеризуются сохраненной волокнистой структурой с наличием отчетливо различимых тонких волокон ВКМ. В структуре скаффолда определяется как междольковая, так и внутридольковая строма (рис. 2, в, г). При этом в образцах наблюдается отсутствие клеток и клеточного детрита, что подтверждается также количественной оценкой содержания сохранившейся ДНК.

Согласно проведенной оценке *in vitro*, биосовместимые свойства СДПс отвечают критериям биологической безопасности по показателям цитотоксичности. Анализ результатов исследования на цитотоксичность проводился согласно оценочной шкале степени ответной реакции клеток после инкубации с образцами. При контакте с образцами СДПс морфология и жизнеспособность фибробластов от-

носительно отрицательного контроля не изменились (степень реакции 0) (рис. 2, д, е). Таким образом, исследованные образцы не оказывают цитотоксического действия.

Свежевыделенные островки Лангерганса человека

После выделения наблюдали значительное количество островков различных размеров с преимущественно округлой формой и гладкой поверхностью. Избирательное окрашивание дитизоном β -клеток в красно-оранжевый цвет позволило идентифицировать ОЛ (рис. 3, а). Прижизненное окрашивание LIVE/DEAD демонстрировало зеленую флуоресценцию 95–98% свежевыделенных островков (рис. 3, б).

Жизнеспособность островков Лангерганса

После выделения большинство ОЛ контрольной группы в течение первых трех суток инкубации сохраняли свою форму и целостность, лишь в отдельных островках выявляли признаки фрагментации и деструкции. Подсчет ОЛ контрольной группы в люминесцентном микроскопе через сутки культивирования выявил наличие 78% жизнеспособных островков, на 3-и сутки инкубации – около 60% (рис. 4). После 3 суток культивирования морфология ОЛ в контрольной группе менялась. В некоторых островках обнаруживали появление полостей, признаки фрагментации, поверхность значительного количества ОЛ приобретала неровные очертания. К недельному сроку культивирования ОЛ в контрольной группе претерпевали значительные деструктивные изменения, их жизнеспособность составляла не более 30%, а на 10-е сутки – менее 20% (рис. 5, а, б).

Изолированные островки, культивированные с СДПс (опытная группа 1) и с СДПЖч (опытная группа 2), на протяжении 10 суток наблюдения не проявляли признаков деструкции и фрагментации в течение всего срока. Большая часть островков проявляла адгезивные качества и осаждалась на волокнистую поверхность скаффолда, оставшиеся в культуральной среде островки продолжили флотировать. Прижизненное окрашивание островков LIVE/DEAD, проведенное на сроке 1 сутки, подтвердило жизнеспособность большинства сохранившихся островков: в опытной группе 1 – 83% и в опытной группе 2 – 85%; на третьи сутки инкубации жизнеспособность островков опытных групп 1 и 2 составила 77 и 82% соответственно (рис. 4). Незначительное снижение числа жизнеспособных островков выявилось на сроке 7 суток – 71% (опытная группа 1) и 78% (опытная группа 2), на 10-е сутки жизнеспособность островков

опытных групп составила 64% (рис. 5, в, г) и 72% (рис. 5, д, е) соответственно. Стоит отметить, что одним из путей повышения жизнеспособности может быть использование перфузионного биореактора, так

как циркуляция культуральной среды позволит улучшить поступление к клеткам питательных веществ и газов, а также выведение продуктов обмена, что особенно важно для ОЛ в объеме скаффолда [25, 26].

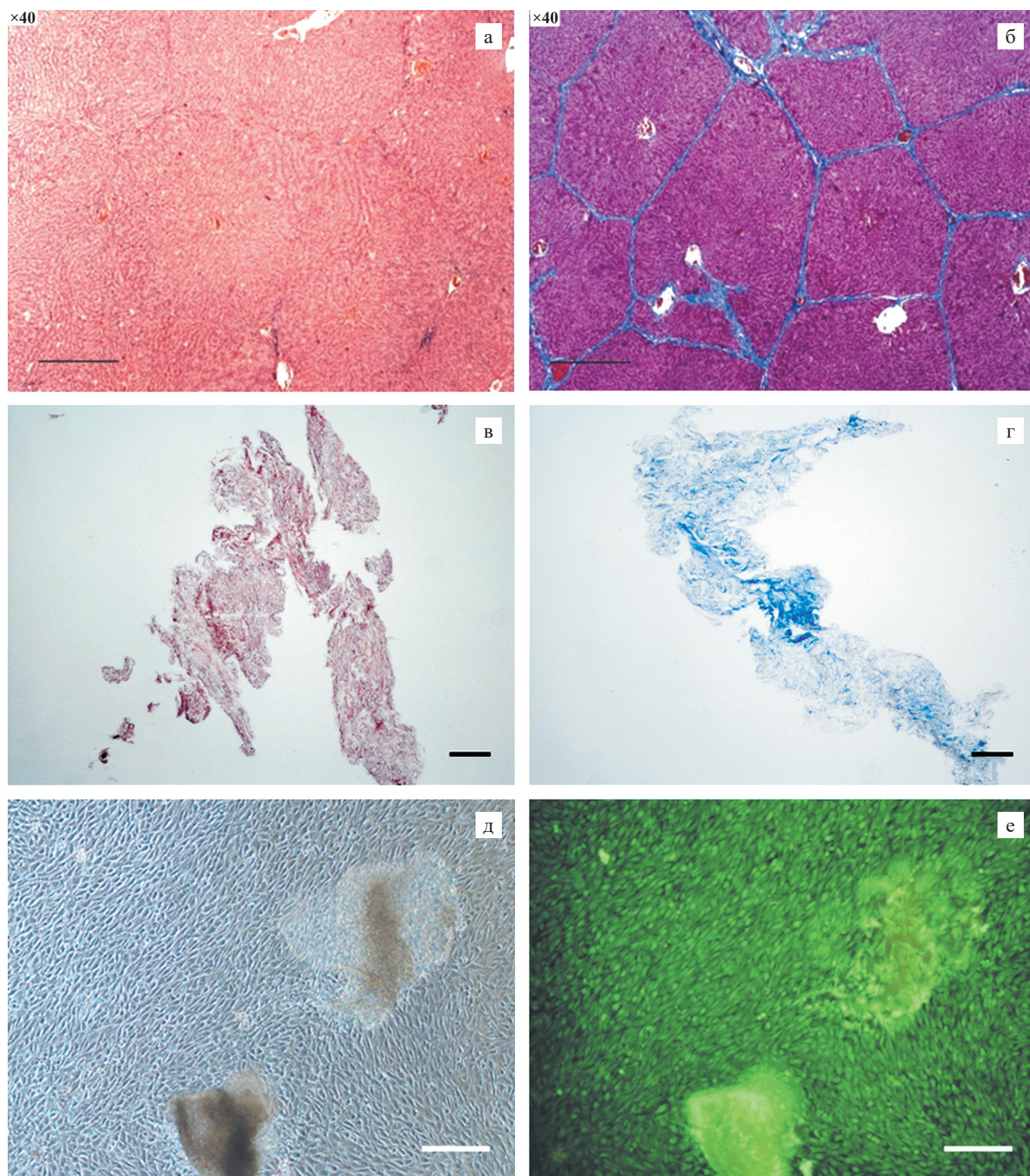


Рис. 2. Нативная ткань печени свиньи (а, б) и СДПс (в, г): а, в – окрашивание гематоксилином и эозином; б, г – окрашивание по методу Массона. Фибробласты NIH/3T3, культивированные с СДПс: д – фазово-контрастная микроскопия; е – флуоресцентное окрашивание LIVE/DEAD. Размер масштабной линейки 100 мкм

Fig. 2. Native porcine liver (a, б) and DPLS (в, г): а, в – H&E staining; б, г – Masson trichrome staining. NIH/3T3 fibroblasts cultured with DPLS: д – phase-contrast microscopy; е – LIVE/DEAD fluorescent staining. Scale bar 100 μm

Сравнительный анализ инсулинпродуцирующей функции островков Лангерганса человека в монокультуре и при культивировании со скаффолдами

Секреторную способность ОЛ человека контрольной и опытных групп определяли на сроках 1, 3, 7 и

10 суток, оценивая базальную концентрацию инсулина в культуральной среде.

После первых суток культивирования концентрация инсулина в опытной группе 1 была выше на 29,0% ($73,9 \pm 8,0$ пкг/мл) и в опытной группе 2 на 39,1% ($79,7 \pm 7,6$ пкг/мл) по сравнению с контрольной группой ($57,3 \pm 6,1$ пкг/мл); на третьи сутки инкубации – на 49,0% ($62,0 \pm 7,4$ пкг/мл) в опытной группе 1 и на 69,0% ($70,3 \pm 7,0$ пкг/мл) в опытной

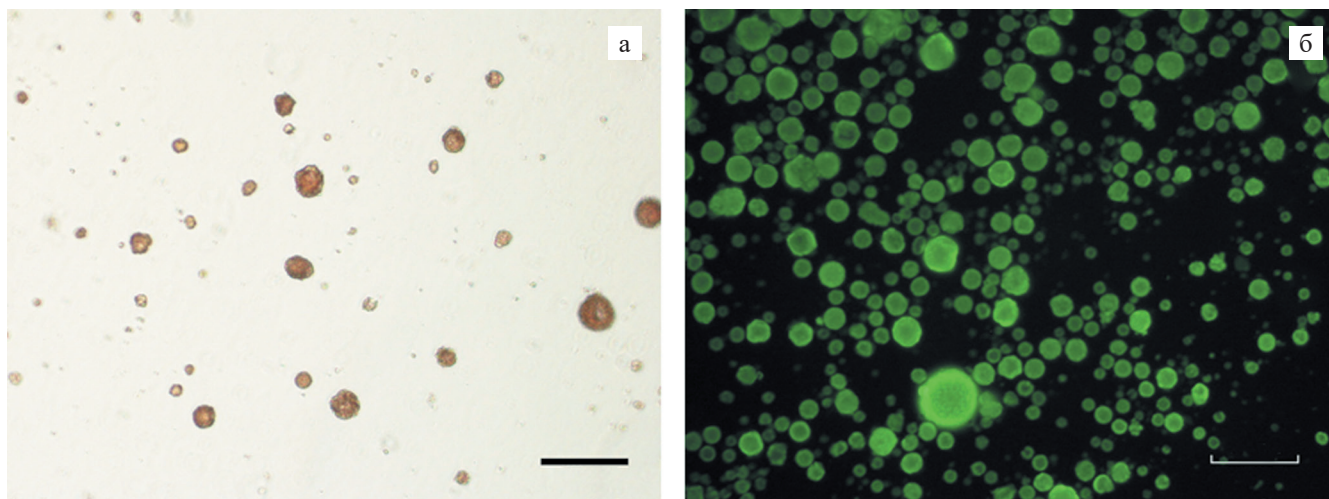


Рис. 3. Изолированные ОЛ человека: а – окрашивание дитизоном; б – флуоресцентное окрашивание LIVE/DEAD. Размер масштабной линейки 100 мкм

Fig. 3. Isolated human pancreatic islets: a – dithizone staining; б – LIVE/DEAD fluorescent staining. Scale bar 100 μm

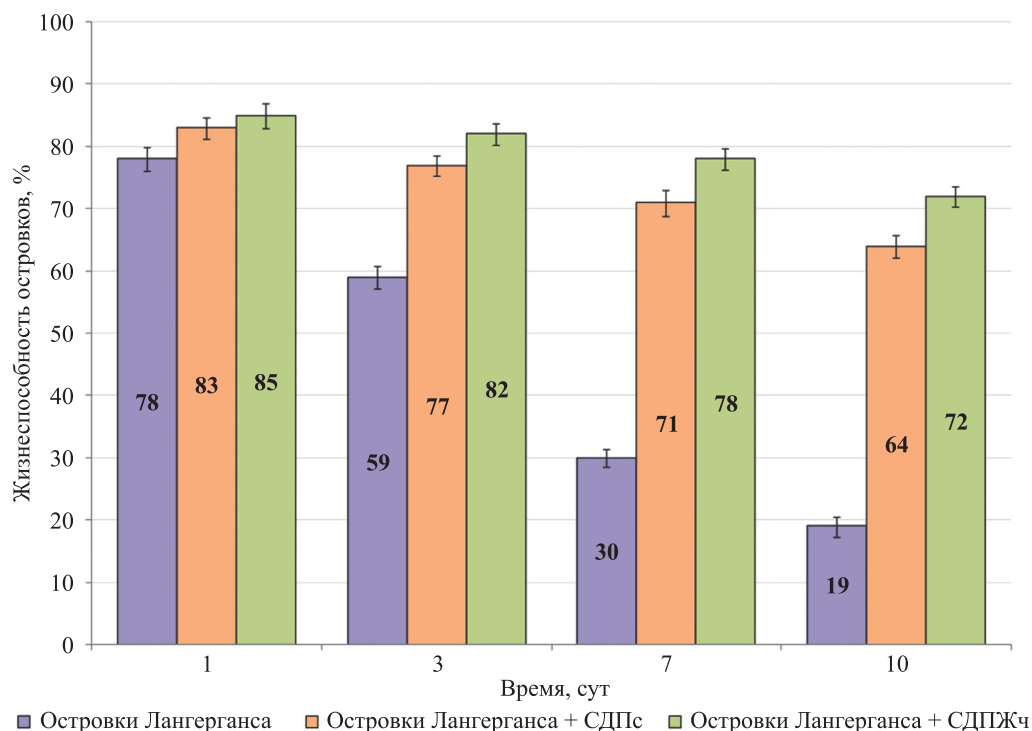


Рис. 4. Сравнительный анализ жизнеспособности ОЛ, культивированных в монокультуре, с СДПс и с СДПЖч

Fig. 4. Comparative analysis of the viability of pancreatic islets cultured in monoculture, with DPLS present and with DHPS present

группе 2 по сравнению с контрольной группой ($41,6 \pm 4,9$ пкг/мл). На сроке 7 суток наблюдали еще более значимую разницу между концентрациями инсулина опытных и контрольной групп. У опытной группы 1

($58,4 \pm 6,9$ пкг/мл) концентрация инсулина на 70,8% выше, чем у контрольной группы ($34,2 \pm 5,1$ пкг/мл), у опытной группы 2 ($63,3 \pm 7,2$ пкг/мл) – на 85,1%. На 10-е сутки эксперимента разница в базальных

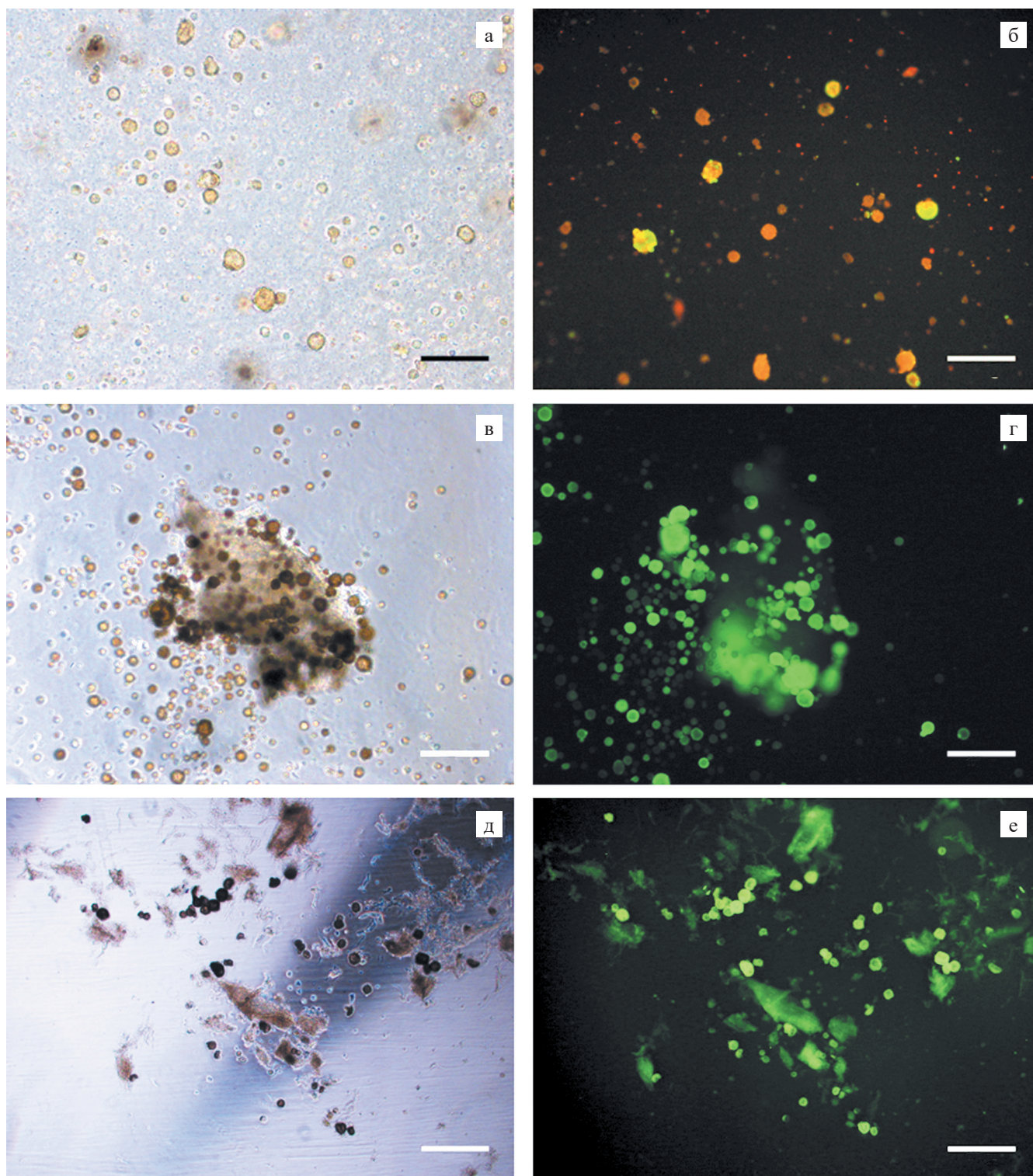


Рис. 5. Островки Лангерганса человека, культивированные в монокультуре (а, б), с СДПС (в, г) и с СДПЖ (д, е). 10 суток культивирования: а, в, д – инвертированная фазово-контрастная микроскопия; б, г, е – флуоресцентное окрашивание LIVE/DEAD. Размер масштабной линейки 100 мкм

Fig. 5. Human pancreatic islets cultured in monoculture (a, б), with DPLS present (в, г) and with DHPS present (д, е). 10 days of culturing: а, в, д – inverted phase-contrast microscopy; б, г, е – LIVE/DEAD fluorescent staining. Scale bar 100 μm

концентрациях инсулина между опытными (1 и 2) и контрольной группами составила уже 124,8 и 150,9% соответственно (рис. 6, а). Таким образом, уровень секреции инсулина в опытной группе 1 был в 2,25 раза выше, чем в контрольной группе, а в опытной группе 2 – в 2,51 раза (рис. 6, б).

Результаты анализа проб культуральной среды, отобранных на вторые сутки инкубации до и после стимуляции глюкозой (25 ммоль/л), подтвердили функциональную активность культивированных ОЛ. В пробах контрольной группы после стимуляции глюкозой концентрация инсулина увеличилась на

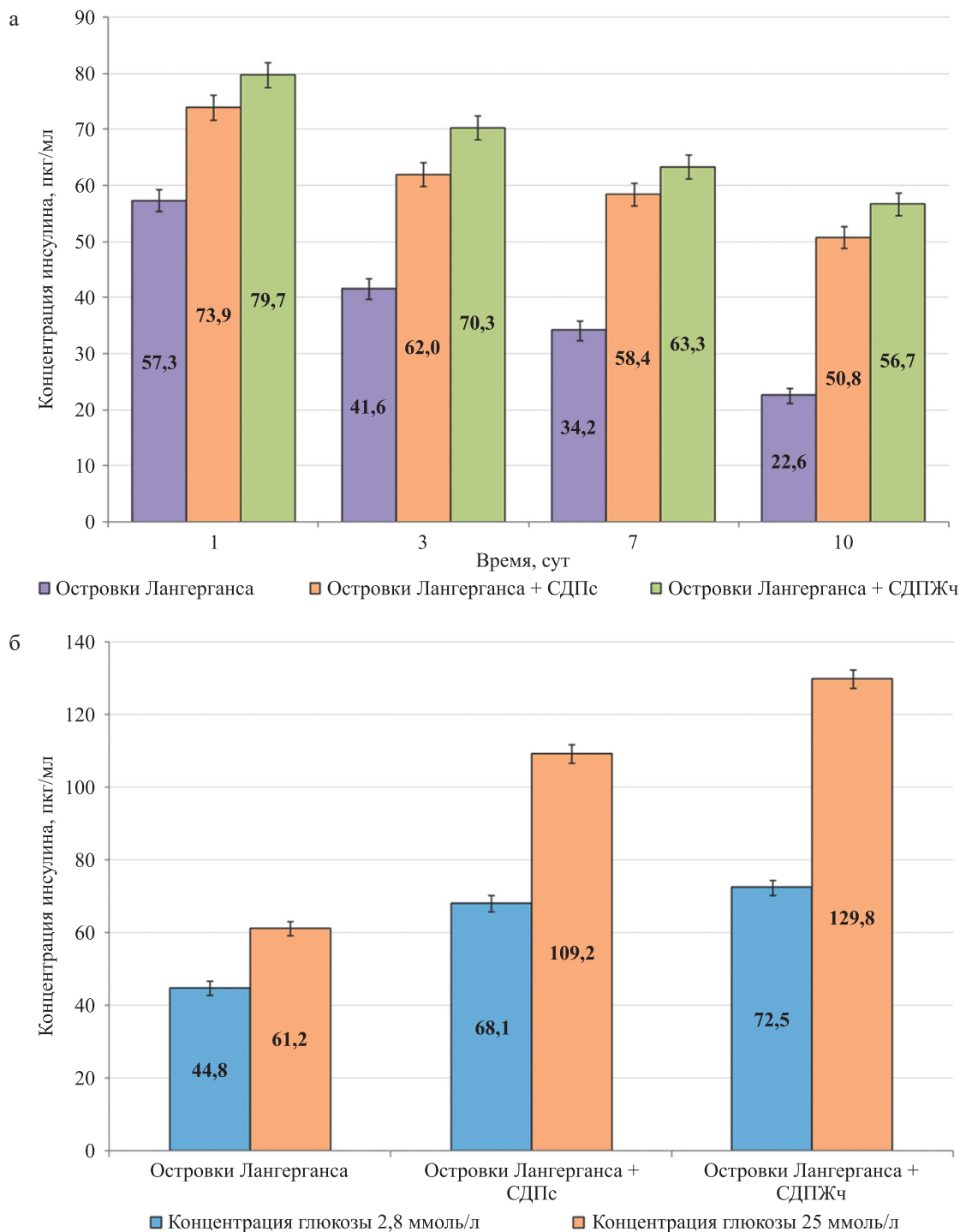


Рис. 6. Сравнительный анализ секреторной способности (а) и функциональной активности при стимуляции глюкозой (б) ОЛ человека в монокультуре (контрольная группа), культивированных с СДПС (опытная группа 1) и культивированных с СДПЖч (опытная группа 2)

Fig. 6. Comparative analysis of the secretory capacity (a) and functional activity under glucose stimulation (б) of human pancreatic islets in monoculture (control group), cultured with DPLS (experimental group 1) and cultured with DHPS (experimental group 2)

36,6% (с $44,8 \pm 1,88$ до $61,2 \pm 1,98$ пкг/мл), в опытной группе 1 – на 60,4% (с $68,1 \pm 2,13$ до $109,2 \pm 2,53$), что выше показателей контрольной группы в 1,7 раза. В опытной группе 2 концентрация инсулина в пробах среды после стимуляции увеличилась на 79,0% (с $72,5 \pm 2,07$ до $129,8 \pm 2,47$), что выше показателей контрольной группы в 2,2 раза, а показателей опытной группы 1 – в 1,2 раза.

Отметим, что относительные значения базальной концентрации инсулина для исследуемых культуральных систем при определении функциональной активности на вторые сутки инкубации сопоставимы с показателями, полученными при выявлении секреторной способности островков на первые и третьи сутки, что свидетельствует о достоверности полученных результатов.

Сравнительный анализ жизнеспособности и секреции инсулина ОЛ человека, культивированных в присутствии СДПЖч или СДПс, показал, что оба скаффолда могут обеспечивать выживание и инсулинпродуцирующую функцию ОЛ, культивированных в стандартных условиях в течение 10 суток, по сравнению с монокультурой. Несмотря на менее выраженное влияние СДПс на культивированные ОЛ, преимущество использования этого скаффолда можно считать возможность его получения в достаточных количествах из доступного источника по сравнению с СДПЖч. Использование скаффолдов, как СДПЖч, так и СДПс, для сохранения островкового потенциала *in vitro*, вероятно, увеличит сроки функционирования ОЛ *in vivo*.

В будущем СДПс может также стать источником для получения на его основе новых материалов – макропористых губок и гидрогелей. Пористая структура таких скаффолдов способствует не только улучшению транспорта питательных веществ и газов, но и облегчает заселение носителя клетками, а следовательно, прорастание сосудов и нервов [27–29]. Одним из возможных вариантов формирования макропористых губок с заданными механическими свойствами может стать криоструктурирование продуктов гидролиза СДПс [30]. Например, криогенно-структурированные биополимерные подложки на основе губчатого агарозного криогеля, модифицированного желатином, были полностью биосовместимы и служили эффективным носителем для культивирования линии островковых клеток мыши, в течение продолжительного времени секретировавших инсулин [31, 32]. Гидрогель из СДПс позволит приступить к созданию инъекционной инкапсулированной формы клеточно-инженерных конструкций, а также может быть использован в технологиях 3D-печати [33].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Скаффолд из децеллюляризованных фрагментов печени свиньи незначительно уступает скаффолду из фрагментов децеллюляризованной ПЖ человека относительно положительного влияния на жизнеспособность, секрецию инсулина и функциональную активность ОЛ человека. При разработке клеточно-инженерных конструкций дальнейшие исследования, направленные на использование скаффолда из децеллюляризованной ткани печени как компонента, получаемого в достаточном количестве из доступного источника, будут способствовать созданию не только биоискусственной печени, но и биоискусственной ПЖ для поддержания и функционирования β -клеток *in vitro* и *in vivo*.

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

The authors declare no conflict of interest.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ / REFERENCES

1. Ludwig B, Ludwig S, Steffen A, Saeger HD, Bornstein SR. Islet versus pancreas transplantation in type 1 diabetes: Competitive or complementary? *Curr Diab Rep.* 2010; 10 (6): 506–511. doi: 10.1007/s11892-010-0146-y. PMID: 20830612.
2. Abadpour S, Wang C, Niemi EM, Scholz H. Tissue Engineering Strategies for Improving Beta Cell Transplantation Outcome. *Curr Transpl Rep.* 2021; 8 (3): 205–219. doi: 10.1007/s40472-021-00333-2.
3. Abualhassan N, Sapozhnikov L, Pawlick RL, Kahana M, Pepper AR, Bruni A et al. Lung-Derived Microscaffolds Facilitate Diabetes Reversal after Mouse and Human Intraperitoneal Islet Transplantation. *PLoS One.* 2016; 11 (5): e0156053. doi: 10.1371/journal.pone.0156053. PMID: 27227978; PMCID: PMC4881949.
4. Damodaran GR, 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. doi: 10.1002/term.2655. PMID: 29499099.
5. Napierala H, Hillebrandt KH, Haep N, Tang P, Tintemann M, Gassner J et al. Engineering an endocrine Neo-Pancreas by repopulation of a decellularized rat pancreas with islets of Langerhans. *Sci Rep.* 2017; 7: 41777. doi: 10.1038/srep41777. PMID: 28150744; PMCID: PMC5288794.
6. Orlando G, Farney AC, Iskandar SS, Mirmalek-Sani SH, Sullivan DC, Moran E et al. Production and implantation of renal extracellular matrix scaffolds from porcine kidneys as a platform for renal bioengineering investigations. *Annals of Surgery.* 2012; 256 (2): 363–370. doi: 10.1097/SLA.0b013e31825a02ab. PMID: 22691371.
7. Song JJ, Ott HC. Organ engineering based on decellularized matrix scaffolds. *Trends Mol Med.* 2011; 17 (8): 424–432. doi: 10.1016/j.molmed.2011.03.005. PMID: 21514224.
8. Mirmalek-Sani SH, Orlando G, McQuilling JP, Pareta R, Mack DL, Salvatori M et al. Porcine pancreas extracel-

- lular matrix as a platform for endocrine pancreas bioengineering. *Biomaterials*. 2013; 34 (22): 5488–5495. doi: 10.1016/j.biomaterials.2013.03.054. PMID: 23583038; PMCID: PMC3680884.
9. Biomimetics of Extracellular Matrices for Cell and Tissue Engineered Medical Products / Ed. V.I. Sevastianov, Yu.B. Basok. Newcastle upon Tyne, UK: Cambridge Scholars Publishing, 2023; 339.
 10. Lim LY, Ding SSL, Muthukumaran P, Teoh SH, Koh Y, Teo AKK. Tissue engineering of decellularized pancreas scaffolds for regenerative medicine in diabetes. *Acta biomater*. 2023; 157: 49–66. doi: 10.1016/j.actbio.2022.11.032. PMID: 36427686.
 11. Wu D, Wan J, Huang Y, Guo Y, Xu T, Zhu M et al. 3d Culture of MIN-6 Cells on Decellularized Pancreatic Scaffold: *in vitro* and *in vivo* Study. *Biomed Res Int*. 2015; 2015: 432645. doi: 10.1155/2015/432645. PMID: 26688810; PMCID: PMC4672115.
 12. Shapiro AM. Strategies toward single-donor islets of Langerhans transplantation. *Curr Opin Organ Transplant*. 2011; 16 (6): 627–631. doi: 10.1097/MOT.0b013e32834cfb84. PMID: 22068022; PMCID: PMC3268080.
 13. Pepper AR, Gala-Lopez B, Ziff O, Shapiro AJ. Current status of clinical islet transplantation. *World J Transplant*. 2013; 3 (4): 48–53. doi: 10.5500/wjt.v3.i4.48. PMID: 24392308; PMCID: PMC3879523.
 14. Yang W, Xia R, Zhang Y, Zhang H, Bai L. Decellularized liver scaffold for liver regeneration. *Methods Mol Biol*. 2018; 1577: 11–23. doi: 10.1007/7651_2017_53. PMID: 28856614.
 15. Rossi EA, Quintanilha LF, Nonaka CKV, Souza BSF. Advances in hepatic tissue bioengineering with decellularized liver bioscaffold. *Stem Cells Int*. 2019; 2019: 2693189. doi: 10.1155/2019/2693189. PMID: 31198426; PMCID: PMC6526559.
 16. Zhou P, Guo Y, Huang Y, Zhu M, Fan X, Wang L et al. The dynamic three-dimensional culture of islet-like clusters in decellularized liver scaffolds. *Cell Tissue Res*. 2016; 365 (1): 157–171. doi: 10.1007/s00441-015-2356-8. PMID: 26796204.
 17. Xu T, Zhu M, Guo Y, Wu D, Huang Y, Fan X et al. Three-dimensional culture of mouse pancreatic islet on a liver-derived perfusion-decellularized bioscaffold for potential clinical application. *J Biomater Appl*. 2015; 30 (4): 379–387. doi: 10.1177/0885328215587610. PMID: 26006767.
 18. Goh SK, Bertera S, Richardson T, Banerjee I. Repopulation of decellularized organ scaffolds with human pluripotent stem cell-derived pancreatic progenitor cells. *Biomed Mater*. 2023; 18 (2). doi: 10.1088/1748-605X/abc7bf. PMID: 36720168.
 19. Khorsandi L, Orazizadeh M, Bijan Nejad D, Heidari Moghadam A, Nejaddehbashi F, Asadi Fard Y. Spleen extracellular matrix provides a supportive microenvironment for β -cell function. *Iran J Basic Med Sci*. 2022; 25 (9): 1159–1165. doi: 10.22038/IJBMS.2022.65233.14360. PMID: 36246063; PMCID: PMC9526894.
 20. Goldman O, Puchinsky D, Durlacher K, Sancho R, Ludwig B, Kugelmeier P et al. Lung Based Engineered Micro-Pancreas Sustains Human Beta Cell Survival and Functionality. *Horm Metab Res*. 2019; 51 (12): 805–811. doi: 10.1055/a-1041-3305. PMID: 31826275.
 21. Crapo PM, Gilbert TW, Badylak SF. An overview of tissue and whole organ decellularization processes. *Biomaterials*. 2011; 32 (12): 3233–3243. doi: 10.1016/j.biomaterials.2011.01.057. PMID: 21296410; PMCID: PMC3084613.
 22. Sevastianov VI, Ponomareva AS, Baranova NV, Kirsanova LA, Basok YuB, Nemets EA et al. Decellularization of Human Pancreatic Fragments with Pronounced Signs of Structural Changes. *Int J Mol Sci*. 2022; 24 (1): 119. doi: 10.3390/ijms24010119.28. PMID: 36613557; PMCID: PMC9820198.
 23. Кириллова АД, Басок ЮБ, Лажско АЭ, Григорьев АМ, Кирсанова ЛА, Немец ЕА, Севастьянов ВИ. Создание тканеспецифического микродисперсного матрикса из децеллюляризованной печени свиньи. *Физика и химия обработки материалов*. 2020; 4: 41–50. Kirillova AD, Basok YuB, Lazhko AE, Grigoryev AM, Kirsanova LA, Nemets EA, Sevastianov VI. Creating a tissue-specific microdispersed matrix from a decellularized porcine liver. *Physics and Chemistry of Materials Processing*. 2020; 4: 41–50.
 24. ГОСТ ISO 10993-5-2011. Изделия медицинские. Оценка биологического действия медицинских изделий. Часть 5. Исследование на цитотоксичность: методы *in vitro*. М.: Стандартиформ, 2014; 9. GOST ISO 10993-5-2011. Medical devices. Biological evaluation of medical devices. Part 5. Tests for *in vitro* cytotoxicity. М.: Standartinform, 2014; 9.
 25. Daoud J, Heileman K, Shapka S, Rosenberg L, Tabrizian M. Dielectric spectroscopy for monitoring human pancreatic islet differentiation within cell-seeded scaffolds in a perfusion bioreactor system. *Analyst*. 2015; 140 (18): 6295–6305. doi: 10.1039/c5an00525f. PMID: 26280028.
 26. Севастьянов ВИ, Басок ЮБ, Григорьев АМ, Кирсанова ЛА, Василец ВН. Применение технологии тканевой инженерии для формирования хрящевой ткани человека в проточном биореакторе. *Вестник трансплантологии и искусственных органов*. 2017; 19 (3): 81–92. Sevastianov VI, Basok YuB, Grigoriev AM, Kirsanova LA, Vasilets VN. Application of tissue engineering technology for formation of human articular cartilage in perfusion bioreactor. *Russian Journal of Transplantology and Artificial Organs*. 2017; 19 (3): 81–92. [In Russ, English abstract]. doi: 10.15825/1995-1191-2017-3-81-92.
 27. Watanabe T, Sassi S, Ulziibayar A, Hama R, Kitsuka T, Shinoka T. The Application of Porous Scaffolds for Cardiovascular Tissues. *Bioengineering (Basel)*. 2023; 10 (2): 236. doi: 10.3390/bioengineering10020236. PMID: 36829730; PMCID: PMC9952004.
 28. Flores-Jiménez MS, Garcia-Gonzalez A, Fuentes-Aguilar RQ. Review on Porous Scaffolds Generation Process: A Tissue Engineering Approach. *ACS Appl Bio Mater*. 2023; 6 (1): 1–23. doi: 10.1021/acsabm.2c00740. PMID: 36599046.
 29. Севастьянов ВИ, Григорьев АМ, Басок ЮБ, Кирсанова ЛА, Василец ВН, Малкова АП и др. Биосовместимые и матричные свойства полилактидных губок. *Вестник трансплантологии и искусственных орга-*

- нов. 2018; 20 (2): 82–90. Sevastianov VI, Grigoriev AM, Basok YuB, Kirsanova LA, Vasilets VN, Malkova AP et al. Biocompatible and matrix properties of polylactide scaffolds. *Russian Journal of Transplantology and Artificial Organs*. 2018; 20 (2): 82–90. [In Russ, English abstract]. doi: 10.15825/1995-1191-2018-2-82-90.
30. Carriero VC, Di Muzio L, Petralito S, Casadei MA, Paolicelli P. Cryogel Scaffolds for Tissue-Engineering: Advances and Challenges for Effective Bone and Cartilage Regeneration. *Gels*. 2023; 9 (12): 979. doi: 10.3390/gels9120979. PMID: 38131965; PMCID: PMC10742915.
31. Ioch K, Lozinsky VI, Galaev IY, Yavriyantz K, Vorobeychik M, Azarov D et al. Functional activity of insulinoma cells (INS-1E) and pancreaTEC islets cultured in agarose cryogel sponges. *J Biomed Mater Res A*. 2005; 75 (4): 802–809. doi: 10.1002/jbm.a.30466. PMID: 16138321.
32. Lozinsky VI, Damshkaln LG, Bloch RO, Vardi P, Grinberg NV, Burova TV, Grinberg VYa. Cryostructuring of polymer systems. Preparation and characterization of supermacroporous (spongy) agarose-based cryogels used as three-dimensional scaffolds for culturing insulin-producing cell aggregates. *J Appl Polym Sci*. 2008; 108 (5): 3046–3062. doi: 10.1002/app.27908.
33. Saldin LT, Cramer MC, Velankar SS, White LJ, Badylak SF. Extracellular matrix hydrogels from decellularized tissues: Structure and function. *Acta Biomater*. 2017; 49: 1–15. doi: 10.1016/j.actbio.2016.11.068. PMID: 27915024; PMCID: PMC5253110.

Статья поступила в редакцию 16.07.2024 г.

The article was submitted to the journal on 16.07.2024

УВАЖАЕМЫЕ ЧИТАТЕЛИ!

Подписку на журнал «Вестник трансплантологии и искусственных органов» можно оформить в ближайшем к вам почтовом отделении.

Подписной индекс нашего издания нашего издания в каталоге почты России – **ПН380**



Ф. СП-1	ВЕСТНИК ТРАНСПЛАНТОЛОГИИ И ИСКУССТВЕННЫХ ОРГАНОВ	ПН380 (индекс издания)																								
		КОЛИЧЕСТВО комплектов																								
	на 2025 год по месяцам																									
	<table border="1" style="width: 100%; text-align: center;"> <tr> <th>1</th><th>2</th><th>3</th><th>4</th><th>5</th><th>6</th><th>7</th><th>8</th><th>9</th><th>10</th><th>11</th><th>12</th></tr> <tr> <td> </td><td> </td><td> </td><td> </td><td> </td><td> </td><td> </td><td> </td><td> </td><td> </td><td> </td><td> </td></tr> </table>		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12												
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12															
	Куда _____ (почтовый индекс) _____ (адрес) _____																									
	Кому _____ (фамилия, инициалы) _____																									

Ф. СП-1	ВЕСТНИК ТРАНСПЛАНТОЛОГИИ И ИСКУССТВЕННЫХ ОРГАНОВ	ПН380 (индекс издания)																								
		КОЛИЧЕСТВО комплектов																								
	на 2025 год по месяцам																									
	<table border="1" style="width: 100%; text-align: center;"> <tr> <th>1</th><th>2</th><th>3</th><th>4</th><th>5</th><th>6</th><th>7</th><th>8</th><th>9</th><th>10</th><th>11</th><th>12</th></tr> <tr> <td> </td><td> </td><td> </td><td> </td><td> </td><td> </td><td> </td><td> </td><td> </td><td> </td><td> </td><td> </td></tr> </table>		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12												
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12															
	Куда _____ (почтовый индекс) _____ (адрес) _____																									
	Кому _____ (фамилия, инициалы) _____																									