

DOI: 10.15825/1995-1191-2026-1-197-205

МЕТОД ВЫДЕЛЕНИЯ ОСТРОВКОВ ЛАНГЕРГАНСА ИЗ ПОДЖЕЛУДОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ ЧЕЛОВЕКА ДЛЯ КЛИНИЧЕСКОЙ ТРАНСПЛАНТАЦИИ ПРИ САХАРНОМ ДИАБЕТЕ I ТИПА

Ю.Б. Басок¹, А.С. Пономарева¹, Н.В. Баранова¹, Н.В. Грудинин¹, Д.Н. Круглов^{1, 2}, Л.А. Кирсанова¹, Е.Г. Кузнецова¹, Г.Н. Скалецкая¹, А.Д. Белова¹, Е.А. Гусева¹, А.М. Григорьев¹, В.И. Севастьянов¹, С.В. Готье^{1, 2}

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

² ФГАОУ ВО Первый Московский государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский университет), Москва, Российская Федерация

Трансплантация островков Лангерганса является современным методом лечения тяжелого течения сахарного диабета I типа (СД I). При получении островкового трансплантата существует множество факторов, снижающих долю успешных выделений островков и эффективность трансплантации. В связи с этим продолжаются разработки различных модификаций выделения островков, что приводит к появлению новых уникальных протоколов. **Целью** работы было оценить эффективность модифицированного метода выделения островков Лангерганса из поджелудочной железы посмертного донора для клинической трансплантации реципиентам с СД I. **Материалы и методы.** Островки Лангерганса выделяли по модифицированной методике без использования перфузионной системы Рикорди на этапе ферментативного переваривания, а также градиента плотности на этапе очистки. Идентификацию островков проводили с помощью окрашивания дитизоном. Жизнеспособность островков определяли с помощью флуоресцентного окрашивания акридиновым оранжевым и йодистым пропидием. Функциональную активность, выраженную через индекс стимуляции, определяли методом иммуоферментного анализа (ИФА). Гистологическое исследование исходной поджелудочной железы (n = 3) включало рутинные методы окрашивания, а также иммуногистохимическое окрашивание основных типов островковых клеток. **Результаты.** Островки Лангерганса, выделенные из поджелудочной железы посмертного донора по модифицированному методу, сохраняли целостность и имели различные размеры и форму. Количество выделенных островков составило $630\,000 \pm 30\,000$ с жизнеспособностью $90 \pm 3\%$ и индексом стимуляции $1,41 \pm 0,01$, что свидетельствует о высоком качестве выделенного биоматериала и способности β -клеток реагировать на изменение содержания глюкозы. Морфологическое исследование поджелудочной железы донора свидетельствует о структурной сохранности островкового аппарата и потенциальной возможности получения жизнеспособных и функционально активных островков. Также показана эффективность выхода островков из поджелудочной железы в процессе ферментативной обработки. **Заключение.** В результате оптимизации методических приемов апробирован модифицированный способ обработки поджелудочной железы посмертного донора, позволяющий выделять значительное количество жизнеспособных и функциональных островков Лангерганса. Характеристики островкового трансплантата позволяют использовать полученный клеточный материал для трансплантации пациентам с СД I.

Ключевые слова: островки Лангерганса, поджелудочная железа, трансплантация, сахарный диабет I типа.

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

METHOD FOR THE ISOLATION OF HUMAN PANCREATIC ISLETS FOR CLINICAL TRANSPLANTATION IN TYPE 1 DIABETES MELLITUS

Yu.B. Basok¹, A.S. Ponomareva¹, N.V. Baranova¹, N.V. Grudinin¹, D.N. Kruglov^{1, 2}, L.A. Kirsanova¹, E.G. Kuznetsova¹, G.N. Skaletskaya¹, A.D. Belova¹, E.A. Guseva¹, A.M. Grigoriev¹, V.I. Sevastianov¹, S.V. Gautier^{1, 2}

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

² Sechenov University, Moscow, Russian Federation

Islet transplantation is a modern method of treating severe type 1 diabetes mellitus (T1D). However, multiple factors can negatively affect both the efficiency of islet isolation and subsequent transplantation outcomes. Consequently, ongoing efforts to optimize isolation techniques have led to the emergence of new unique protocols. The **objective** of this study is to evaluate the effectiveness of a modified method for isolating pancreatic islets (islets of Langerhans) from deceased donors for clinical transplantation in recipients with T1D. **Materials and methods.** Pancreatic islets were isolated using a modified technique that excluded the use of the Ricordi islet isolator during the enzymatic digestion stage, as well as density gradient centrifugation during the purification stage. Islet identification was performed using dithizone staining. Islet viability was assessed by fluorescent staining with acridine orange and propidium iodide. Functional activity was evaluated by determining the stimulation index using enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Histological examination of the native pancreas ($n = 3$) included routine staining, as well as immunohistochemical analysis targeting the main types of islet cells. **Results.** Pancreatic islets isolated from the pancreas of deceased donors using the modified technique retained their structural integrity and demonstrated variability in size and shape. The total islet yield was $630,000 \pm 30,000$, with a viability rate of $90 \pm 3\%$ and a stimulation index of 1.41 ± 0.01 . These findings indicate the high quality of the isolated biomaterial and confirm the ability of β -cells to respond to changes in glucose content. Morphological assessment of the donor pancreas demonstrated preserved structural integrity of the islet apparatus, supporting the potential for obtaining viable and functionally active islets. The efficiency of islet isolation during enzymatic pancreatic processing was also confirmed. **Conclusion.** Optimization of the methodological approach enabled the development and validation of a modified technique for processing the pancreas of deceased donors, resulting in the isolation of a substantial number of viable and functional islets of Langerhans. The characteristics of the obtained islet graft support its suitability for clinical transplantation in T1D patients.

Keywords: pancreatic islets, pancreas, transplantation, type 1 diabetes mellitus.

ВВЕДЕНИЕ

Трансплантацию панкреатических островков можно рассматривать как альтернативный вариант органной пересадке поджелудочной железы, при этом более безопасный и менее инвазивный, не подвергающий больных серьезному хирургическому вмешательству [1, 2]. Трансплантация островков Лангерганса является современным методом лечения сахарного диабета I типа (СД I), осложненного высокой восприимчивостью к тяжелой гипогликемии и гликемическому дисбалансу [3, 4].

Клинические исследования, проведенные за последние три десятилетия, свидетельствуют, что замещение пораженных β -клеток путем трансплантации островков Лангерганса, секретирующих весь спектр биологически активных пептидов, позволит добиться эффекта, не наблюдаемого при стандартной инсулинотерапии [5–7]. Получены данные о положительных эффектах трансплантации островков на замедление развития вторичных осложнений СД I: улучшение показателей при диабетической нефро-

патии, снижение прогрессирования ретинопатии и нейропатии [8, 9]. Выявлено, что трансплантация островков обеспечивает устойчивое выживание и увеличение срока функционирования трансплантата почки у большинства реципиентов [10].

В основе проведения трансплантации панкреатических островков пациентам с СД I лежит Эдмонтонский протокол (Edmonton Protocol), предложенный Shapiro et al. в 2000 г. [11]. Выделяют ключевые этапы успешной процедуры выделения островков: 1) ферментативная обработка (переваривание) поджелудочной железы, в результате которой происходит диссоциация панкреатической ткани и выход островков из окружающей экзокринной ткани; 2) очистка островков от экзокринной ткани с помощью различных манипуляций, например инкубации, фильтрации, центрифугирования в градиентах плотности [12]. После процедуры выделения и очистки пробы суспензии островков оценивают, определяя идентичность, чистоту, жизнеспособность, функциональность и стерильность, для обеспечения безопасного введения

реципиентам адекватного количества инсулинпродуцирующих клеток [1, 5].

Важно отметить, что несмотря на достигнутый прогресс в области клинической трансплантации островков, существуют сложности, которые препятствуют ее широкому применению. Для достижения инсулинонезависимости одного реципиента обычно необходимо более одной донорской поджелудочной железы вследствие сложности и непредсказуемости результата выделения островков. На каждом этапе получения островкового трансплантата существует множество факторов, снижающих долю успешных выделений островков, и следовательно, эффективность трансплантации [13]. Согласно данным Консорциума по клинической трансплантации островков (Collaborative Islet Transplant Registry), успешность получения островкового трансплантата составляет 52,5% [14]. В связи с этим продолжаются разработки различных модификаций выделения островков, что приводит к появлению новых уникальных протоколов [15–17].

Ранее в ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр трансплантологии и искусственных органов имени академика В.И. Шумакова» Минздрава России была разработана и испытана оригинальная методика выделения островков Лангерганса из поджелудочной железы крысы, кролика и фрагментов панкреатической ткани человека, позволяющая получать в 2,1 раза больше островков при сохранении морфофункционального состояния по сравнению с другими опубликованными протоколами [18–22].

В данном исследовании апробирован модифицированный протокол выделения островков из поджелудочной железы посмертного донора. Предложенный подход исключает использование дорогостоящей перфузионной системы Рикорди на этапе ферментативного переваривания, а также градиента плотности фиколла на этапе очистки.

Цель исследования: оценить эффективность модифицированного метода выделения островков Лангерганса из поджелудочной железы посмертного донора для клинической трансплантации реципиентам с СД I.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Выделение островков Лангерганса

Островки выделяли по модифицированному способу, ориентируясь на традиционные протоколы [23, 24].

Поджелудочную железу получали в результате мультиорганного забора органов у посмертного донора ($n = 3$) с констатированной смертью мозга, соответствующего всем критериям оптимального донора для забора поджелудочной железы.

Полученную поджелудочную железу извлекали из трехслойного пакета с холодным (+4 °C) консервирующим раствором («Кустодиол», Др. Франц Келер Хеми, Германия), помещали в стерильный лоток и удаляли окружающую жировую ткань, кровеносные сосуды и прилегающую соединительную ткань. В стерильных условиях осуществляли забор образца консервирующего раствора для бактериологического контроля стерильности эксплантации поджелудочной железы. Затем железу взвешивали и промывали холодным раствором Хенкса («ПанЭко», Россия), содержащим 2% раствора пенициллина, стрептомицина и амфотерицина В (Thermo Fisher Scientific, США). Поджелудочную железу разрезали на 6–8 равных частей, в панкреатическую ткань последовательными инъекциями интрапаренхиматозно вводили 2 мл/г ткани рабочего раствора коллагеназы NB1 (активность 20 PZ U/g ткани) (Serva, Германия) с нейтральной протеазой NP (активность 1,5 DMU U/g ткани) (Serva, Германия). Растянутую панкреатическую ткань механически измельчали до фрагментов размером 1×1×1 см, переносили в стерильную емкость и инкубировали в течение 12–15 мин при температуре 37,0 °C до появления свободных островков в пробе раствора переваренной панкреатической ткани. Действие ферментов останавливали добавлением трехкратного объема холодного (+4 °C) раствора Хенкса.

Очистку островков от экзокринной ткани осуществляли фильтрованием продукта ферментативной обработки панкреатической ткани через сито с размером пор 600 мкм (Sigma, США). К фильтрату добавляли равный объем полной ростовой среды на основе питательной среды ДМЕМ с добавлением глюкозы 1,0 г/л («ПанЭко», Россия), содержащей 10% эмбриональной телячьей сыворотки (HyClone, США), 1% Hepes (Thermo Fisher Scientific, США), 2 ммоль аланил-глутамина («ПанЭко», Россия), 1% раствора пенициллина, стрептомицина и амфотерицина В (Thermo Fisher Scientific, США) и отстаивали в течение 40 минут. Затем фильтрат однократно центрифугировали в течение 2,5 мин при относительном ускорении 110 g с помощью центрифуги (Rotina 38R, Hettich Zentrifugen, Германия). Свежевыделенные островки, отобранные из образовавшегося осадка, ресуспендировали и вносили в культуральные флаконы с полной ростовой средой.

Инкубацию островков проводили при 37 °C в CO₂-инкубаторе (Series 8000 WJ, Thermo Fisher Scientific, США) в увлажненной атмосфере (относительная влажность 100%), содержащей 5% CO₂ в течение 12 часов для повышения их очистки, удаления мертвых или апоптотических клеток. Сбор инкубированных островков для последующей инфузии осуществляли путем центрифугирования в течение 3,5 мин при относительном ускорении 180 g. Затем

островковую суспензию, образовавшуюся в осадке, дополнительно дважды центрифугировали в растворе Хенкса при том же режиме для отмывки от полной ростовой среды. Готовую островковую суспензию добавляли в приготовленный инфузионный раствор.

Идентификация островков Лангерганса

Непосредственно после выделения островки идентифицировали с помощью окрашивания суспензии дитизоном («Ленреактив», Россия), которое позволяет не только подтвердить наличие инсулинцитов среди выделенных клеток, но и оценить чистоту островковой суспензии, выявив иные клеточные компоненты, не окрашенные дитизоном.

Рабочий раствор дитизона готовили непосредственно перед окрашиванием, растворяя 10 мг красителя в 2 мл диметилсульфоксида («ПанЭко», Россия) и 8 мл раствора Хенкса и фильтровали через стерилизационную насадку на шприц с размером пор 0,22 мкм (Corning Costar, США).

Пробу островковой суспензии смешивали с рабочим раствором дитизона в соотношении объемов 2 : 1 и инкубировали в течение 20 мин при температуре 37 °С. Результат окрашивания, а также подсчет выделенных окрашенных островков проводили с помощью инвертированного люминесцентного микроскопа Nikon Eclipse TS 100 (Nikon, Япония).

Оценка жизнеспособности островков Лангерганса

Жизнеспособность выделенных островков определяли через 12 часов инкубации путем флуоресцентного окрашивания акридиновым оранжевым и йодистым пропидием («ПанЭко», Россия).

Для окрашивания часть островковой суспензии помещали в чашку Петри, смешивали с рабочим раствором красителя в соотношении объемов 2 : 1 и инкубировали в темноте в течение 20 мин. Подсчет жизнеспособных островков проводили с помощью инвертированного люминесцентного микроскопа.

Оценка функциональной активности островков Лангерганса

Функциональную активность выделенных островков, инкубированных 12 часов, выражали через индекс стимуляции: соотношение концентрации инсулина, секретлируемого островками под нагрузкой глюкозы, к базальной концентрации инсулина. Для этого сначала кондиционированную среду заменяли свежей с низким содержанием глюкозы 2,8 ммоль/л. После 60-минутной инкубации в стандартных условиях отбирали пробы среды (n = 5) для определения базальной концентрации инсулина в исследуемых образцах. Затем среду удаляли и заменяли свежей с высокой концентрацией глюкозы 25 ммоль/л для

последующего определения содержания инсулина под влиянием традиционного стимулятора секреции гормона. Через 60 минут инкубации в стандартных условиях также отбирали пробы среды (n = 5) и определяли в них содержание инсулина методом иммуноферментного анализа (ИФА), используя набор реактивов (АО «Вектор-Бест», Россия).

Гистологическое исследование

Образцы поджелудочной железы (n = 3), а также панкреатической ткани после ферментативной обработки (n = 3) подвергали морфологическому исследованию с помощью рутинных гистологических методов окрашивания. Материал фиксировали в 10% забуференном растворе формалина, дегидратировали в спиртах восходящей концентрации, выдерживали в хлороформе и заливали в парафин. Срезы толщиной 4–5 мкм получали на микротоме RM 2245 (Leica, Германия), депарафинировали, регидратировали и проводили окрашивание гематоксилином Майера (BioVitrum, Россия) и эозином (BioVitrum, Россия), а также по методу Массона, используя готовый набор реактивов (BioVitrum, Россия). Анализ и фотосъемку препаратов проводили с помощью инвертированного микроскопа Nikon eclipse 50i (Nikon, Япония), оснащенного цифровой камерой.

Для выявления основных типов эндокринных клеток островков окрашивание антителами к инсулину (Abcam, Великобритания) и глюкагону (Merck, Германия) проводили по стандартной методике с пероксидазой хрена, используя систему визуализации Rabbit specific HRP/DAB(ABC)Detection IHC Kit (Abcam, Великобритания).

Статистический анализ

Статистическую обработку данных проводили с использованием программного обеспечения SPSS 26.0. Для определения статистической достоверности различий средних между выборками при оценке функциональной активности островков Лангерганса применяли t-критерий Стьюдента. Различия считали статистически достоверными в том случае, если уровень значимости p не превышал порогового значения 0,05.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Характеристика островкового трансплантата

Схема выделения островков Лангерганса из донорской поджелудочной железы по модифицированному методу представлена на рис. 1.

Использованная нами модифицированная методика позволила получить из поджелудочной железы донора (n = 3) значительное количество островков разных размеров с сохранением их целостности. Ос-

тровки имели преимущественно округлую форму и ровную поверхность. На поверхности некоторых островков обнаруживались неровности, образованные остатками окружающей экзокринной ткани (рис. 2, а). Окрашивание дитизоном придавало островкам красно-оранжевый цвет (рис. 2, б) и позволило подсчитать их количество, из одной поджелудочной железы человека нам удалось выделить $630\,000 \pm 30\,000$ островков.

Наблюдение показало, что островки после 12 часов инкубации сохраняли первоначальные внешние характеристики. Прижизненное окрашивание акридиновым оранжевым и йодистым пропидием продемонстрировало зеленую флуоресценцию островков, подтверждающую их жизнеспособность (рис. 2, в). Одиночные, окрашенные в красный цвет йодистым пропидием, погибшие ацинарные клетки обнаруживались лишь в культуральной среде, окружающей островки. При окрашивании выделенных панкреатических островков витальным красителем было установлено, что $90 \pm 3\%$ из них остаются жизнеспособными.

После 12 часов инкубации островков концентрация инсулина в пробах культуральной среды составила $4,4 \pm 0,8$ мМЕ/л, что свидетельствовало о способности содержащихся в островках β -клеток к секреции инсулина. После стимуляции глюкозой концентрация инсулина увеличилась до $6,2 \pm 0,7$ мМЕ/л, то есть на 41% (рис. 2, г). Таким образом, индекс стимуляции составил $1,41 \pm 0,01$, что указывает на способность β -клеток реагировать на изменение концентрации глюкозы.

Морфологическое исследование

Оценку исходного состояния панкреатической ткани проводили, исследуя поджелудочные железы доноров, имеющих похожие исходные данные (возраст донора: от 49 до 54 лет, вес железы: от 97 до 100 г). Проведенное исследование образцов не выявило выраженных морфологических изменений в состоянии паренхимы, что свидетельствовало о хорошей сохранности органа в консервирующем растворе.

Паренхима железы выглядела сохранной и носила дольчатый характер во всех исследованных образцах. Слабая степень липоматоза обнаруживалась в некоторых дольках экзокринной ткани (рис. 3, а, в). Признаки фиброза не выявлялись и синие коллагеновые волокна четко идентифицировались только в перидуктальной зоне (рис. 3, б, г). Редко в отдельных дольках можно было визуализировать мелкие одиночные очаги панкреатоцитов с признаками дистрофических изменений. Многочисленные дискретные островки Лангерганса обнаруживались рассеянными в паренхиме. Островки характеризовались классической округлой формой, компактной структурой без признаков патологии (рис. 3, а–г).

Иммуногистохимическое окрашивание основных типов островковых клеток (β - и α -клеток) демонстрировало иммунопозитивный сигнал к инсулину и глюкагону во всех исследуемых образцах (рис. 3, д, е). Коричневые гранулы преципитата в обилии заполняли инсулинпозитивные β -клетки, составляющие основную клеточную массу островка (рис. 3, д). Менее

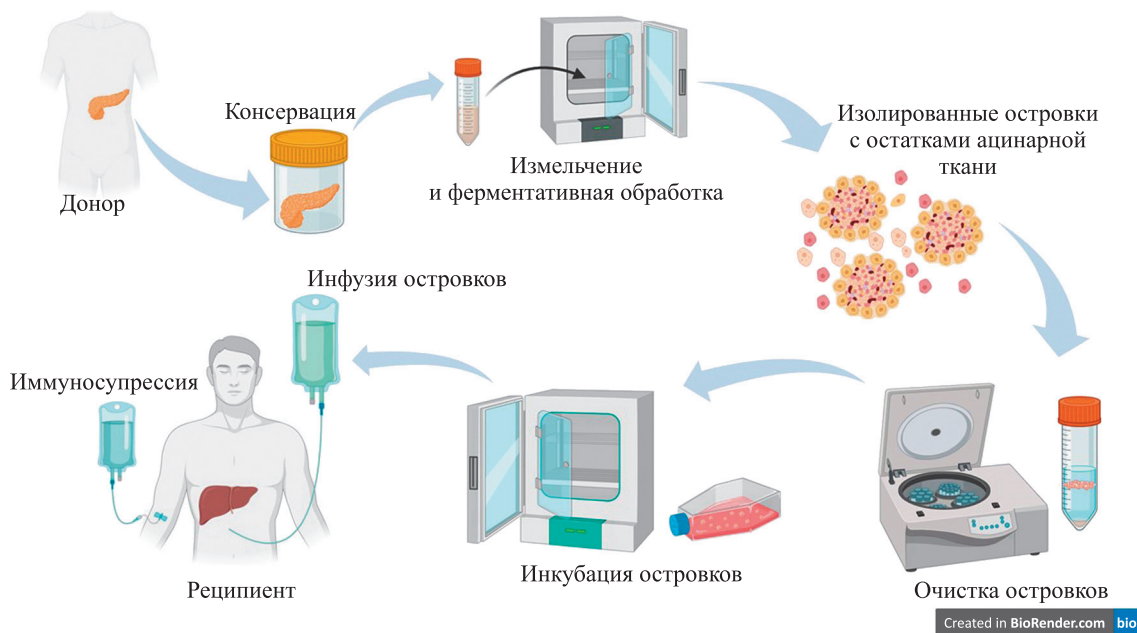


Рис. 1. Схема выделения островков Лангерганса из поджелудочной железы посмертного донора

Fig. 1. Schematic representation of the isolation of pancreatic islets from the pancreas of a deceased donor

многочисленные глюкагонпозитивные α -клетки были мозаично разбросаны в островке (рис. 3, е).

Описанные результаты свидетельствуют о структурной сохранности островкового аппарата исследованных поджелудочных желез и потенциальной возможности получения жизнеспособных и функционально активных островков.

Оценку эффективности выхода островков из поджелудочной железы в процессе ферментативной обработки дополняли морфологическим исследованием переваренной панкреатической ткани. Показана дезагрегация ткани в дольках железы с отсутствием или минимальным содержанием островков в дольках (рис. 4).

Модификацию традиционной методики проводили с целью оптимизации методических приемов, которые способствуют повышению выхода остров-

ков Лангерганса при сохранении их морфофункционального состояния. Так, важно было минимизировать неблагоприятное воздействие отдельных этапов обработки поджелудочной железы [25], чтобы по возможности избежать структурного повреждения и потери жизнеспособности островков во время выделения. Введение раствора фермента в панкреатическую ткань проводили интрапаренхиматозно, а не интрадуктально, что сокращало период ишемии и в значительной степени ускоряло и облегчало процедуру растягивания поджелудочной железы. Определенные навыки инъекционного введения в паренхиму поджелудочной железы раствора фермента позволяют достигать равномерного его распределения в ткани. Учитывая, что некоторые характеристики реагентов для градиентного центрифугирования по плотности, как гипертоничность, высокая вязкость,

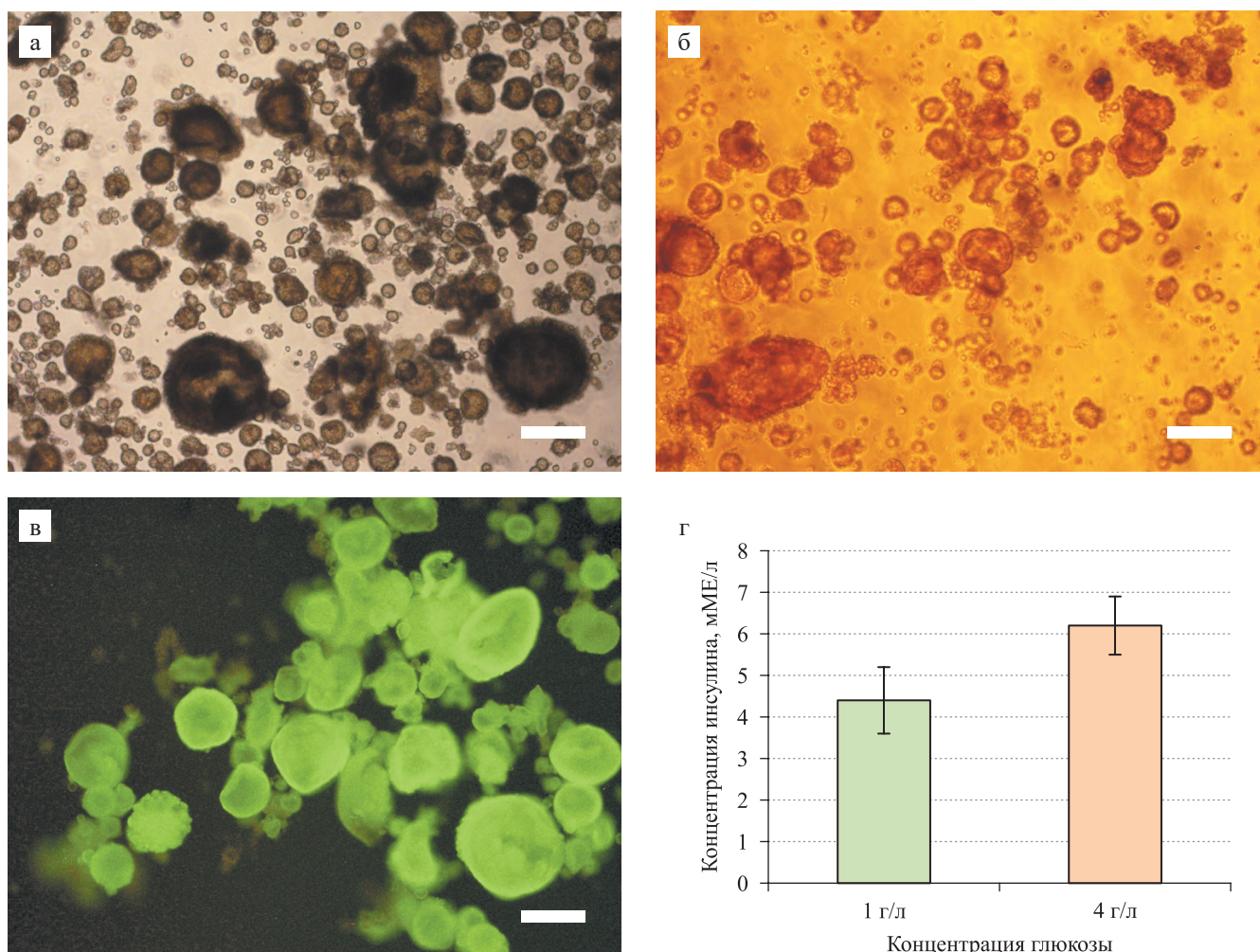


Рис. 2. Свежевыделенные островки Лангерганса человека: а – фазово-контрастная микроскопия без окрашивания; б – окрашивание дитизином; в – островки, инкубированные 12 часов, флуоресцентное окрашивание акридиновым оранжевым и йодистым пропидием; г – сравнительный анализ секреции инсулина островками до и после стимуляции глюкозой. Время инкубации островков *in vitro* 12 часов. Размер масштабной линейки 100 мкм

Fig. 2. Freshly isolated human pancreatic islets: а – phase-contrast microscopy without staining; б – islets incubated for 12 hours, assessed by fluorescent staining with acridine orange and propidium iodide; г – comparative analysis of insulin secretion by islets before and after glucose stimulation. Incubation time: 12 hours. Scale bar: 100 μ m

возможное содержание эндотоксинов, могут негативно сказываться на морфофункциональном состоянии островков [26], мы отказались от их очистки в градиенте плотности, заменив его на полную ростовую

среду и солевой раствор Хенкса при установленных режимах центрифугирования. Подобранный режим центрифугирования представляется равноценным и продуктивным вследствие реальной и значимой

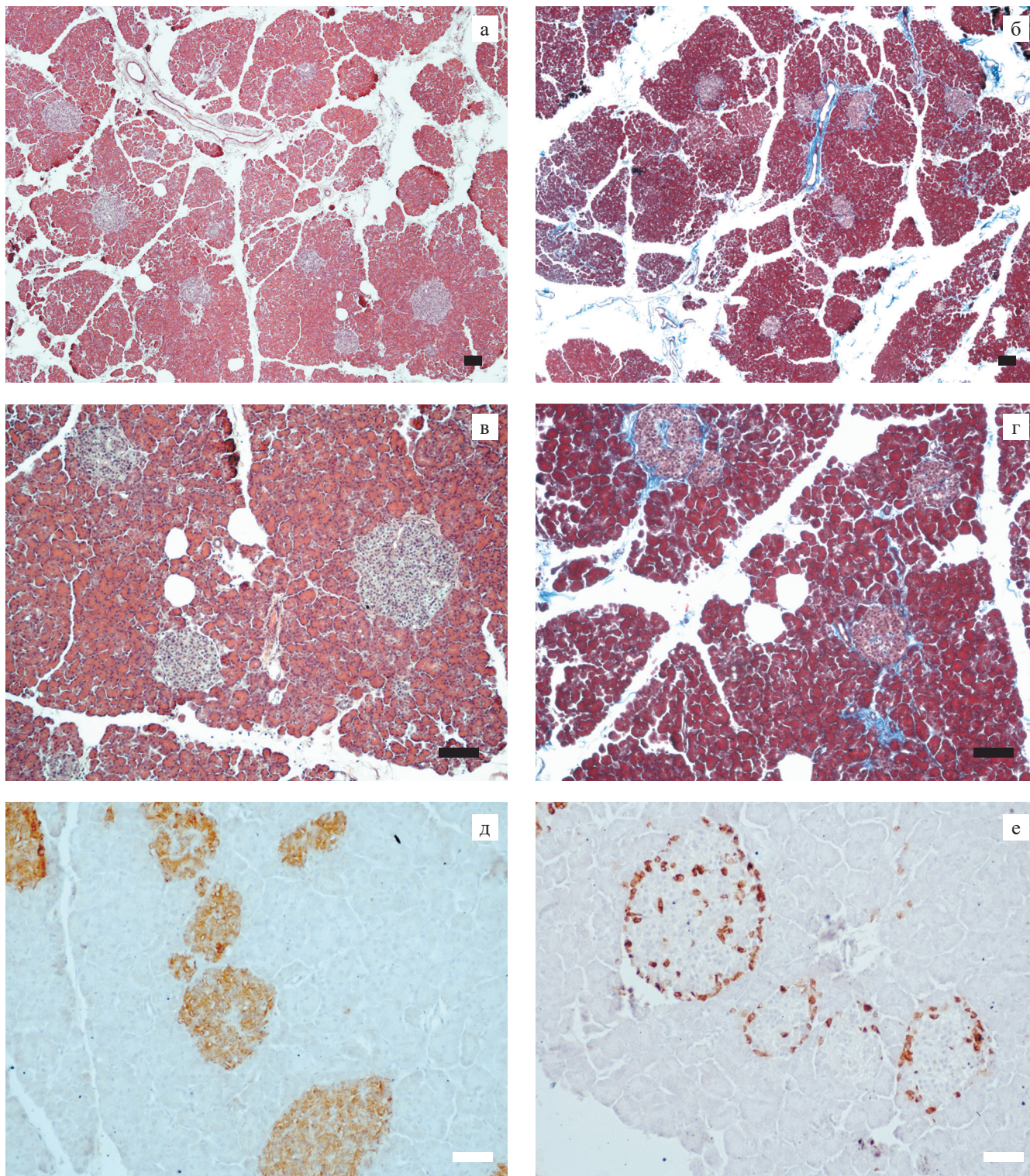


Рис. 3. Поджелудочная железа донора: а, в – окрашивание гематоксилином и эозином; б, г – окрашивание по методу Массона; д – иммуногистохимическое окрашивание на инсулин; е – иммуногистохимическое окрашивание на глюкагон. Размер масштабной линейки 100 мкм

Fig. 3. Donor pancreas: а, в – H&E staining; б, г – Masson's trichrome staining; д – Immunohistochemical staining for insulin; е – Immunohistochemical staining for glucagon. Scale bar: 100 μ m

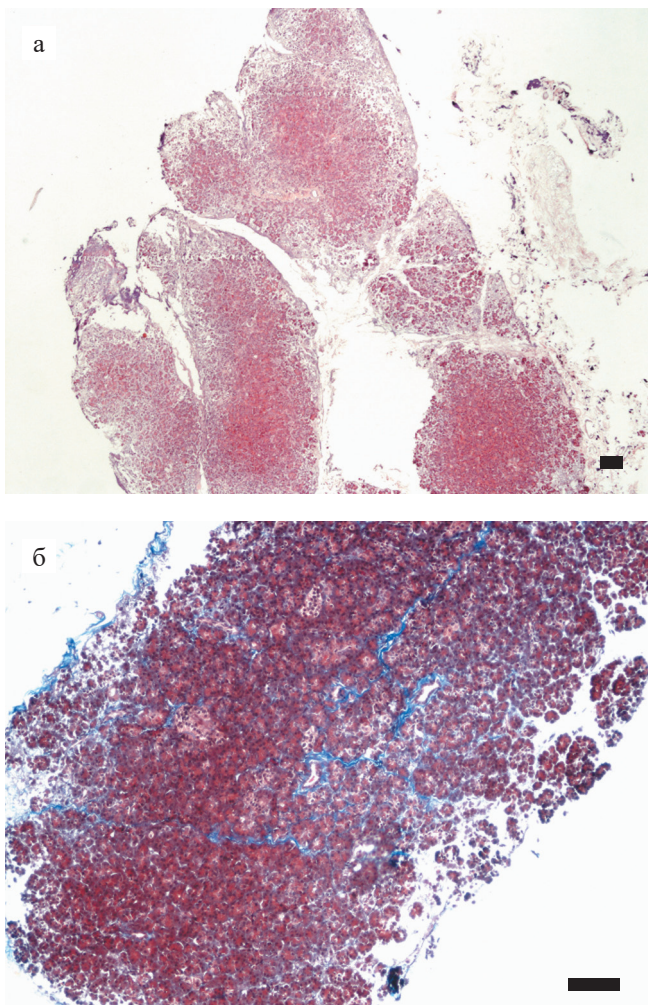


Рис. 4. Панкреатическая ткань после ферментативной обработки: а – окрашивание гематоксилином и эозином; б – окрашивание по методу Массона. Размер масштабной линейки 100 мкм

Fig. 4. Pancreatic tissue after enzymatic digestion: a – H&E staining; б – Masson's trichrome staining. Scale bar: 100 µm

клеточно-тканевой селекции. Мы полагаем, что исключение нежелательного воздействия градиента плотности и дополнительной отмывки островков благоприятно сказывается на их жизнеспособности.

Наши результаты оказались сопоставимы с данными аналогичных работ, посвященных выделению островков Лангерганса с использованием перфузионной системы Рикорди и градиента плотности на стадии очистки [5, 14]. Так, в мировой практике необходимыми критериями качества для островкового продукта являются количество более 5000 островкового эквивалента на 1 кг массы тела реципиента с жизнеспособностью не менее 70% и индексом стимуляции больше 1 [14]. Полученные по модифицированной методике островковые трансплантаты соответствовали установленным требованиям – имели достаточное количество с подтвержденной идентич-

ностью, высокую жизнеспособность и достаточный уровень функциональной активности.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В результате оптимизации методических приемов апробирован модифицированный способ обработки поджелудочной железы посмертного донора, позволяющий выделять значительное количество жизнеспособных и функциональных островков Лангерганса. Количество выделенных островков составило $630\,000 \pm 30\,000$ с жизнеспособностью $90 \pm 3\%$ и индексом стимуляции $1,41 \pm 0,01$, что свидетельствует о высоком качестве выделенного биоматериала и способности β -клеток реагировать на изменение содержания глюкозы. Характеристики островкового трансплантата позволяют использовать полученный клеточный материал для трансплантации пациентам с СД I.

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

The authors declare no conflict of interest.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ / REFERENCES

1. *Piemonti L.* Islet Transplantation. In: Feingold KR, Anawalt B, Blackman MR, Boyce A, Chrousos G, Corpas E et al. editors. *Endotext [Internet]. South Dartmouth (MA): MDText.com, Inc. 2025; 2000.*
2. *Gruessner AC, Gruessner RWG.* The 2022 International Pancreas Transplant Registry Report – A Review. *Transplant Proc.* 2022; 54 (7): 1918–1943. doi: 10.1016/j.transproceed.2022.03.059.
3. *Cheboun M, Drumez E, Ballou C, Maanaoui M, Payne E, Barton F et al.* Association between primary graft function and 5-year outcomes of islet allogeneic transplantation in type 1 diabetes: A retrospective, multicentre, observational cohort study in 1210 patients from the Collaborative Islet Transplant Registry. *Lancet Diabetes Endocrinol.* 2023; 11: 391–401. doi: 10.1016/S2213-8587(23)00082-7.
4. *Hering BJ, Ballou CM, Bellin MD, Payne EH, Kandeel F, Witkowski P et al.* Factors associated with favourable 5 year outcomes in islet transplant alone recipients with type 1 diabetes complicated by severe hypoglycaemia in the Collaborative Islet Transplant Registry. *Diabetologia.* 2023; 66: 163–173. doi: 10.1007/s00125-022-05804-4.
5. *Shapiro AM, Pokrywczynska M, Ricordi C.* Clinical pancreatic islet transplantation. *Nat Rev Endocrinol.* 2017; 13 (5): 268–277. doi: 10.1038/nrendo.2016.178.
6. *Berney T, Andres A, Bellin MD, de Koning EJP, Johnson PRV, Kay TWH et al.* International Islet Transplant Centers. A Worldwide Survey of Activities and Practices in Clinical Islet of Langerhans Transplantation. *Transpl Int.* 2022; 35: 10507. doi: 10.3389/ti.2022.10507.
7. *Marfil-Garza BA, Imes S, Verhoeff K, Hefler J, Lam A, Dajani K et al.* Pancreatic islet transplantation in type 1 diabetes: 20-year experience from a single-centre cohort in Canada. *Lancet Diabetes Endocrinol.* 2022; 10: 519–532. doi: 10.1016/S2213-8587(22)00114-0.

8. Reid L, Baxter F, Forbes S. Effects of islet transplantation on microvascular and macrovascular complications in type 1 diabetes. *Diabet Med.* 2021; 38 (7): e14570. doi: 10.1111/dme.14570.
9. Alhaidar M, Soliven B, Liao C, Rubeiz H, Ogledzinski M, Witkowski P et al. Long-term effects of pancreatic islet transplantation on polyneuropathy in patients with brittle diabetes: A single-center experience. *Muscle Nerve.* 2023; 68 (3): 329–333. doi: 10.1002/mus.27930.
10. Maanaoui M, Lenain R, Foucher Y, Buron F, Blanche G, Antoine C et al. Islet-after-kidney transplantation versus kidney alone in kidney transplant recipients with type 1 diabetes (KAIK): a population-based target trial emulation in France. *Lancet Diabetes Endocrinol.* 2024; 12 (10): 716–724. doi: 10.1016/S2213-8587(24)00241-9.
11. 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 (4): 230–238. doi: 10.1056/NEJM200007273430401.
12. Wei L. Isolation and Purification of Human Pancreatic Islets. In: Moore A., Wang P. (eds.). *Type-1 Diabetes. Methods in Molecular Biology.* 2023; 2592. Humana, New York, NY. doi: 10.1007/978-1-0716-2807-2_16.
13. Langlois A, Pinget M, Kessler L, Bouzakri K. Islet Transplantation: Current Limitations and Challenges for Successful Outcomes. *Cells.* 2024; 13 (21): 1783. doi: 10.3390/cells13211783.
14. Ricordi C, Goldstein JS, Balamurugan AN, Szot GL, Kin T, Liu C et al. National Institutes of Health-Sponsored Clinical Islet Transplantation Consortium Phase 3 Trial: Manufacture of a Complex Cellular Product at Eight Processing Facilities. *Diabetes.* 2016; 65 (11): 3418–3428. doi: 10.2337/db16-0234.
15. Mohammadi Ayenehdeh J, Niknam B, Hashemi SM, Rahavi H, Rezaei N, Soleimani M et al. Introducing a New Experimental Islet Transplantation Model using Biomimetic Hydrogel and a Simple High Yield Islet Isolation Technique. *Iran Biomed J.* 2017; 21 (4): 218–227. doi: 10.18869/acadpub.ijb.21.4.218.
16. Zongyi Y, Funian Z, Hao L, Ying C, Jialin Z, Baifeng L. A rapid, efficient, and economic device and method for the isolation and purification of mouse islet cells. *PLoS One.* 2017; 12 (2): e0171618. doi: 10.1371/journal.pone.0171618.
17. Kwak K, Park JK, Shim J, Ko N, Kim HJ, Lee Y et al. Comparison of islet isolation result and clinical applicability according to GMP-grade collagenase enzyme blend in adult porcine islet isolation and culture. *Xenotransplantation.* 2021; 28 (4): e12703. doi: 10.1111/xen.12703.
18. Патент на изобретение RU 2853008 C1, 17.12.2025 (заявка № 2025118364 от 03.07.2025). Способ выделения островков Лангерганса из поджелудочной железы для регенеративной медицины и тканевой инженерии. Басок Ю.Б., Пономарева А.С., Баранова Н.В., Севастьянов В.И., Готье С.В. Заявитель: Федеральное государственное бюджетное учреждение «Национальный медицинский исследовательский центр трансплантологии и искусственных органов имени академика В.И. Шумакова» Министерства здравоохранения Российской Федерации. Patent for invention RU 2853008 C1, 17.12.2025 (application no. 2025118364 dated 03.07.2025). Method for isolating islets of Langerhans from the pancreas for regenerative medicine and tissue engineering. Basok Yu.B., Ponomareva A.S., Baranova N.V., Sevastyanov V.I., Gautier S.V. Applicant: Federal State Budgetary Institution «National Medical Research Center of Transplantology and Artificial Organs named after Academician V.I. Shumakov» of the Ministry of Health of the Russian Federation.
19. Sevastianov VI, Ponomareva AS, Baranova NV, Belova AD, Kirsanova LA, Nikolskaya AO et al. A Tissue-Engineered Construct Based on a Decellularized Scaffold and the Islets of Langerhans: A Streptozotocin-Induced Diabetic Model. *Life (Basel).* 2024; 14 (11): 1505. doi: 10.3390/life14111505.
20. 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.* 2023; 24: 119. doi: 10.3390/ijms24010119.28.
21. 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. (English). doi: 10.15825/1995-1191-2018-4-76-82.
22. Баранова НВ, Курсанова ЛА, Пономарева АС, Немец ЕА, Басок ЮБ, Бубенцова ГН и др. Сравнительный анализ секреторной способности островков Лангерганса, культивированных с биополимерным микрогетерогенным коллагенсодержащим гидрогелем и тканеспецифическим матриксом. *Вестник трансплантологии и искусственных органов.* 2019; 21 (4): 45–53. Baranova NV, Kirsanova LA, Ponomareva AS, Nemets EA, Basok YB, Bubentsova GN et al. Comparative analysis of the secretory capacity of islets of langerhans cultured with biopolymer-based collagen-containing hydrogel and tissue-specific matrix. *Russian Journal of Transplantology and Artificial Organs.* 2019; 21 (4): 45–53. doi: 10.15825/1995-1191-2019-4-45-53.
23. Ricordi C, Hering BJ, Shapiro AM. Beta-cell transplantation for diabetes therapy. *Lancet.* 2008; 372 (9632): 27–28. doi: 10.1016/S0140-6736(08)60984-8.
24. Matsumoto S, Noguchi H, Yonekawa Y, Okitsu T, Iwanaga Y, Liu X et al. Pancreatic islet transplantation for treating diabetes. *Expert Opin Biol Ther.* 2006; 6 (1): 23–37. doi: 10.1517/14712598.6.1.23.
25. Sevastianov VI, Basok YB. *Biomimetics of Extracellular Matrices for Cell and Tissue Engineered Medical Products*; Cambridge Scholars Publishing: Newcastle upon Tyne, UK. 2023; 212–230.
26. Min T, Yi L, Chao Z, Haitao Z, Wei W, Liang Y et al. Superiority of visipaque (iodixanol)-controlled density gradient over Ficoll-400 in adult porcine islet purification. *Transplant Proc.* 2010; 42 (5): 1825–1829. doi: 10.1016/j.transproceed.2010.01.068.

Статья поступила в редакцию 22.01.2026 г.
The article was submitted to the journal on 22.01.2026