

## ВЛИЯНИЕ МИКРОСТРУКТУРИРОВАННОГО КОЛЛАГЕНСОДЕРЖАЩЕГО ГИДРОГЕЛЯ НА КУЛЬТУРЫ ОСТРОВКОВЫХ КЛЕТОК ПОДЖЕЛУДОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ

Кирсанова Л.А.<sup>1</sup>, Баранова Н.В.<sup>1</sup>, Бубенцова Г.Н.<sup>1</sup>, Скалецкая Г.Н.<sup>1</sup>, Перова Н.В.<sup>2</sup>, Севастьянов В.И.<sup>2</sup>, Скалецкий Н.Н.<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Лаборатория клеточной трансплантации ФГБУ «Федеральный научный центр трансплантологии и искусственных органов им. ак. В.И. Шумакова» Минздрава РФ, Москва, Российская Федерация

<sup>2</sup> Лаборатория тканевой инженерии и систем доставки отдела биомедицинских технологий и тканевой инженерии ФГБУ «Федеральный научный центр трансплантологии и искусственных органов им. ак. В.И. Шумакова» Минздрава РФ, Москва, Российская Федерация

**Цель.** Изучение влияния микроструктурированного коллагенсодержащего гидрогеля (биоматрикса) на выживаемость и особенности роста культуры островковых клеток при их совместной инкубации. **Материалы и методы.** В качестве биоматрикса использовали микроструктурированный коллагенсодержащий гидрогель линейного ряда *Сферо*<sup>®</sup>ГЕЛЬ. Культуры островковых клеток, полученные из поджелудочной железы новорожденных кроликов, засеивали на поверхность биоматрикса, заливали ростовой средой и помещали в CO<sub>2</sub>-инкубатор. Изменения, происходившие с биоматриksom и культурами, фиксировали с помощью инвертированного микроскопа и гистологических исследований, включая иммуногистохимический анализ. **Результаты.** Присутствие микроструктурированного коллагенсодержащего гидрогелевого матрикса при инкубации флотирующих культур островковых клеток способствовало длительному сохранению их структурной целостности и гормональной активности. Одновременно выявлено формирование культур прогениторных клеток поджелудочной железы, являющихся предшественниками островковых клеток. **Заключение.** Коллагенсодержащий гидрогель оказывает благоприятное действие на формирование и выживание культур островковых клеток и может быть использован в качестве матрикса тканеинженерной конструкции поджелудочной железы.

*Ключевые слова:* культуры островковых клеток поджелудочной железы, микроструктурированный коллагенсодержащий гидрогель.

## INFLUENCE OF MICROSTRUCTURED COLLAGEN HYDROGEL ON PANCREATIC ISLET CELL CULTURES

Kirsanova L.A.<sup>1</sup>, Baranova N.V.<sup>1</sup>, Bubentsova G.N.<sup>1</sup>, Skaletskaya G.N.<sup>1</sup>, Perova N.V.<sup>2</sup>, Sevastianov V.I.<sup>2</sup>, Skaletskiy N.N.<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Laboratory of cell transplantation («V.I. Shumakov Federal Research Center of Transplantology and Artificial Organs»), Moscow, Russian Federation

<sup>2</sup> Laboratory of tissue engineering and delivery systems, department of biomedical technologies and tissue engineering, «V.I. Shumakov Federal Research Center of Transplantology and Artificial Organs»), Moscow, Russian Federation

**Aim.** A study of the influence of microstructured collagen hydrogel (biomatrix) on survival and growth characteristics of islet cell cultures at their co-incubation. **Materials and methods.** As a biomatrix, the microstructured collagen hydrogel of linear series Sphero<sup>®</sup> GEL was used. Islet cell cultures obtained from newborn rabbit pancreas were inoculated onto the biomatrix surface, covered with growth medium, and placed in a CO<sub>2</sub> incubator. Changes occurring with biomatrix and cultures were observed by means of an inverted microscope and histological studies, including immunohistochemical analysis. **Results.** The presence of the microstructured collagen hydrogel matrix during the incubation of floating islet cell cultures promoted long-term preservation of the structural integrity and hormonal activity. Simultaneously the formation of cultures of pancreatic progenitor cells (islet cells precursors) was observed. **Conclusion.** Collagen hydrogel has a favorable effect on the formation and survival of islet cell cultures and can be used as a matrix of a tissue-engineered pancreas construct.

*Key words:* pancreatic islet cell cultures, microstructural collagen hydrogel.

## ВВЕДЕНИЕ

В настоящее время клеточная трансплантация является одним из наиболее интенсивно развивающихся научных направлений в биологии и медицине. Одновременное наступательное развитие науки о биоматериалах сделало реальной разработку клеточно-инженерных и тканеинженерных конструкций (ТИК) [1]. В качестве тканевого компонента при создании ТИК применяют, как правило, культуры клеток, входящих в состав регенерируемой ткани или являющихся их предшественниками. Помимо клеточной культуры в состав ТИК входит специальный носитель (матрикс, каркас, матрица). Матрикс могут быть выполнены из различных биосовместимых материалов. Большинство из них являются биodeградируемыми, при этом в процессе их резорбции не должны образовываться промежуточные продукты, обладающие токсичностью, резко изменяющие pH среды или ухудшающие рост и дифференцировку клеточной культуры. Клетки полученной культуры наносятся на матрицу, после чего такая трехмерная структура может быть перенесена в биореактор с питательной средой, где инкубируется в течение определенного времени. Другим вариантом создания ТИК может быть наслоение прокультивированных клеток на матрицу, помещенную в культуральный флакон или пробирку с последующим добавлением питательной среды и инкубацией в различных условиях термостата. Проведенные в последние годы исследования показали, что в полной мере качествами, необходимыми для матрицы, входящей в состав ТИК, обладает коллагенсодержащая композиция гетерогенного имплантируемого геля (торговая марка «Сферо®ГЕЛЬ», производитель ЗАО «БИОМИР сервис», Россия).

Коллагенсодержащую композицию гетерогенного имплантируемого геля получают из гидролизата эмбриональных или постнатальных коллагенсодержащих тканей животного происхождения (исключая человека), состоящего из двух компонентов: твердого – микрочастиц из сшитого гидролизата и жидкого – исходного гидролизата, взятых в определенном соотношении [патент РФ на изобретение № 2433828].

Формирование гетерогенной структуры гидрогеля позволило существенно увеличить время его биорезорбции по сравнению с биоимплантатами из коллагена, рассасывающимися в течение 3–4 недели.

*Сферо®ГЕЛЬ* относится к классу биополимерных имплантатов и предназначен для замещения и восполнения объемов мягких тканей, что происходит за счет стимуляции синтеза собственного внеклеточного матрикса жизнеспособными клетками. Так, например, была показана перспективность применения *Сферо®ГЕЛЯ* в качестве биodeградируемого матрикса при создании клеточно-инженерной конструкции хрящевой ткани [2] и клеточно-инженерной конструкции печени [3]. Настоящее исследование посвящено изучению влияния микроструктурированного коллагенсодержащего гидрогелевого матрикса на культуры островковых клеток, что является важным этапом на пути создания ТИК поджелудочной железы.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Донорами поджелудочной железы служили 1–3-дневные новорожденные кролики, доставленные из специализированного питомника ФГБУН

---

*Кирсанова Людмила Анфилофьевна* – к. б. н., старший научный сотрудник лаборатории клеточной трансплантации отдела биомедицинских технологий и тканевой инженерии ФГБУ «Федеральный научный центр трансплантологии и искусственных органов им. ак. В.И. Шумакова» Минздрава РФ, Москва, Российская Федерация. *Баранова Наталья Владимировна* – научный сотрудник той же лаборатории. *Бубенцова Галина Николаевна* – научный сотрудник той же лаборатории. *Скалецкая Галина Николаевна* – научный сотрудник той же лаборатории. *Перова Надежда Викторовна* – д. б. н., ведущий научный сотрудник лаборатории тканевой инженерии и систем доставки отдела биомедицинских технологий и тканевой инженерии того же центра. *Севастьянов Виктор Иванович* – д. б. н., профессор, руководитель отдела биомедицинских технологий и тканевой инженерии того же центра. *Скалецкий Николай Николаевич* – д. м. н., заведующий лабораторией клеточной трансплантации отдела биомедицинских технологий и тканевой инженерии того же центра.

**Для корреспонденции:** Скалецкий Николай Николаевич. Адрес: 123182, г. Москва, ул. Щукинская, д. 1.

Тел.: 8 (499) 190-42-66; 8-903-790-95-39. E-mail: NSkaletsky@mail.ru

*Kirsanova Lyudmila Anfilofievna* – senior research, cell transplantation laboratory, department of biomedical technologies and tissue engineering «V.I. Shumakov Federal Research Center of Transplantation and Artificial Organs», Ministry of Health of the Russian Federation, Moscow, Russian Federation. *Baranova Natalia Vladimirovna* – research fellow at the same laboratory. *Bubentsova Galina Nikolaevna* – research at the same laboratory. *Skaletskaya Galina Nikolaevna* – research fellow at the same laboratory. *Perova Nadezhda Viktorovna* – leading research fellow, laboratory of tissue engineering and delivery systems, department of biomedical technologies and tissue engineering at the same center. *Sevastianov Viktor Ivanovich* – professor, head of department of biomedical technologies and tissue engineering at the same center. *Skaletskiy Nikolay Nikolaevich* – head of cell transplantation laboratory, department of biomedical technologies and tissue engineering at the same center.

**For correspondence:** Skaletskiy Nikolay Nikolaevich. Address: 123182, Moscow, Shchukinskaya, 1.

Tel.: 8 (499) 190-42-66; 8-903-790-95-39. E-mail: NSkaletsky@mail.ru

«Научный центр биомедицинских технологий» ФМБА. Культуры островковых клеток (ОК) поджелудочной железы получали с помощью ранее разработанного нами метода [4]. Для проведения опытов использовали оригинальные культуральные пробы конической формы с горизонтальным дном площадью 10 см<sup>2</sup> (фирма TRP, Швейцария). В качестве микроструктурированного коллагенсодержащего гидрогелевого матрикса (МКГМ) использовали специально разработанную для клеточных технологий композицию имплантируемого гетерогенного геля линейного ряда *Сферо*<sup>®</sup>ГЕЛЬ (ЗАО «БИОМИР сервис», Россия), представляющую собой находящийся в шприце стерильный прозрачный, слегка опалесцирующий, вязкий, рН-сбалансированный гидрогель с зернистой структурой. Средний размер микрочастиц – 150 ± 20 мкм, вязкость МКГМ – 62,9 ± 7,9 Па и рН – 6,8 ± 0,1.

Биоматрикс в количестве 2 мл выдавливали из стерильного шприца и равномерно распределяли по дну культуральной пробирки. Затем флотирующую фракцию культуры, сформировавшуюся после 12 суток инкубации 40 измельченных поджелудочных желез новорожденных кроликов, наслаивали на МКГМ, покрывая всю его поверхность. После добавления 7–8 мл ростовой среды 199 (без сыворотки) пробирку помещали в инкубатор с увлажненной атмосферой, содержащей 5% CO<sub>2</sub>. Смена среды проводилась каждые 2–3 дня. Наблюдение за культурой, инкубируемой вместе с биоматриком, проводили в инвертированном микроскопе Nikon Eclipse TS 100 путем ежедневного мониторинга, и значимые изменения фиксировали с помощью цифровой фотокамеры. Для гистологического исследования на определенных сроках совместной инкубации культуры и МКГМ

(7 и 14 дней) материал фиксировали в жидкости Буэна. После рутинной процедуры обезвоживания образцы заливали в парафин. Срезы толщиной 4 мкм окрашивали гематоксилином и эозином, а также подвергали иммуногистохимическому окрашиванию по стандартной методике с пероксидазой хрена для выявления основных типов ОК с использованием соответствующих моноклональных антител: antiinsulin и antiglucagon (Sigma). Для выявления протокового эпителия окрашивание препаратов на цитокератин 19 осуществляли с использованием Novocastra Concentrated Peroxidase Detection System (RE 7130-K, Leica Microsystems), следуя инструкции производителя. Предварительно перед окрашиванием депарафинированные срезы подвергали ретривизации инкубацией в 0,1%-ном растворе трипсина при 37 °С в течение 30 минут.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

К 12-дневному сроку инкубации микрофрагментов поджелудочной железы новорожденных кроликов происходило формирование культуры, которая состояла в основном из флотирующей фракции. Последняя представляла собой плотные островковоподобные структуры, в которых методом иммуногистохимии определялись основные типы ОК – бета-клетки и альфа-клетки (рис. 1, 2). При совместной, достаточно длительной (2 недели) инкубации культур и биоматрикса во флотирующих микрофрагментах не выявлялось выраженных деструктивных изменений, и с помощью иммуногистохимического окрашивания подтверждалось сохранение значительного количества гормонально-активных ОК как на 7-е, так и на 14-е сутки со-

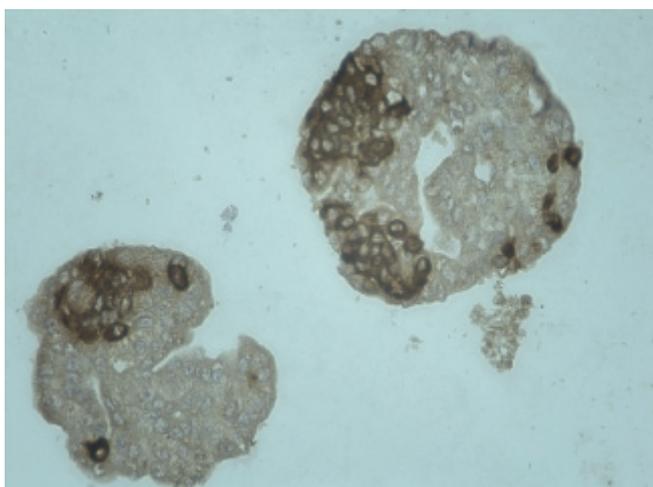


Рис. 1. Флотирующая культура островковых клеток поджелудочной железы новорожденных кроликов. Иммунопозитивное окрашивание бета-клеток антителами к инсулину. ×400

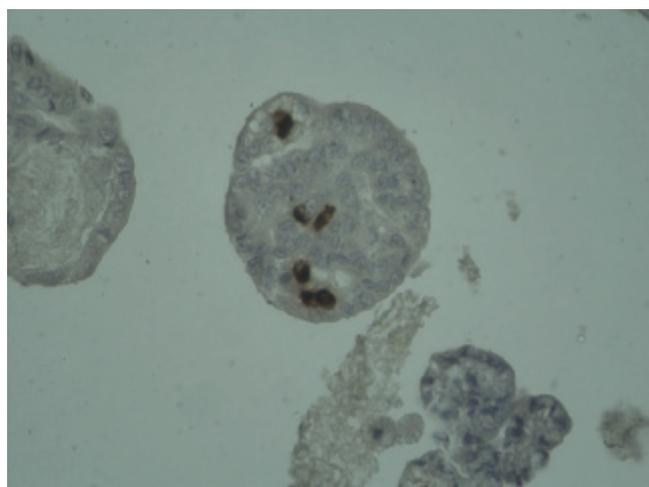


Рис 2. Флотирующая культура островковых клеток поджелудочной железы новорожденных кроликов. Иммунопозитивное окрашивание альфа-клеток антителами к глюкагону. ×400

культивирования. Это свидетельствовало, по меньшей мере, об отсутствии отрицательного влияния МКГМ на выживаемость и морфофункциональные качества культур ОК. При этом отмечалось прикрепление таких культур к поверхности биоматрикса и их распластывание, которое, вероятно, обеспечивало наилучшие условия для выживания и сохранения функции ОК (рис. 3). Часть флолирующих культур, соединившихся с МГМК, содержали, как показал иммуногистохимический анализ, значительное количество клеток, которые демонстрировали позитивную реакцию при окрашивании антителами к цитокератину 19 – специальному маркеру протокового эпителия (рис. 4). Одновременно в процессе совместной инкубации культур, полученных из поджелудочной железы новорожденных кроликов, с биоматриksom вокруг части

прикрепившихся культур формировались эпителиоподобные однослойные зоны роста (рис. 5, 6). На основании ранее проведенных нами исследований [5] можно с большой долей вероятности предположить, что клетки, входящие в образовавшийся монослой, также происходят из протокового эпителия и являются прогениторными клетками поджелудочной железы, то есть предшественниками ОК. Перспективность использования прогениторных клеток поджелудочной железы подтверждена исследованиями, в которых показано, что отсутствие предшественников ОК в трансплантате приводит к снижению массы бета-клеток [6], в то время как трансплантация островковой ткани, богатой прогениторными клетками, существенно повышает антидиабетический эффект [7]. Важно отметить, что в контрольном опыте инкубации только фло-

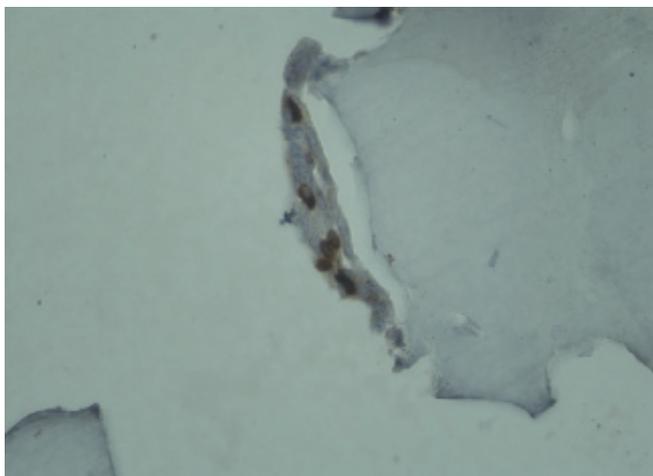


Рис. 3. Прикрепление флолирующей культуры к биоматриксу. Иммунопозитивное окрашивание бета-клеток антителами к инсулину. ×400

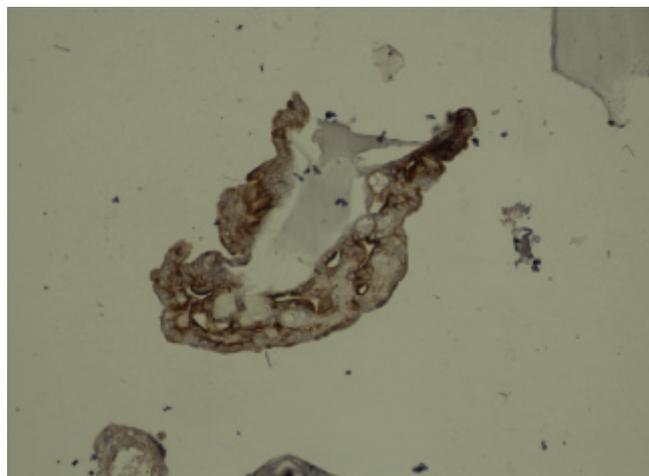


Рис. 4. Культура, прикрепленная к биоматриксу. Иммунопозитивное окрашивание на цитокератин 19. ×200

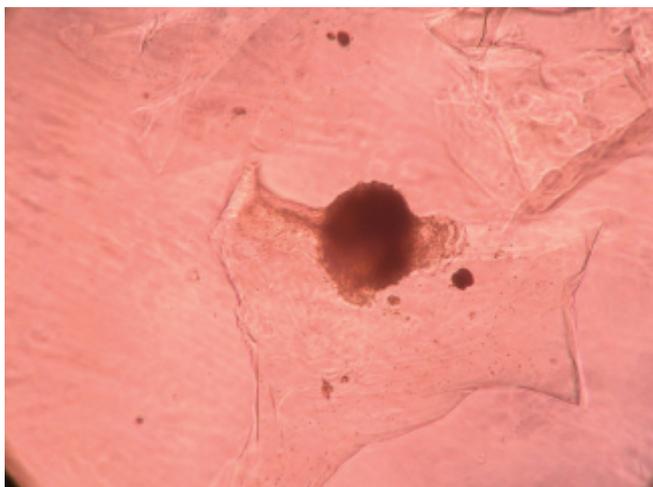


Рис. 5. Прикрепление флолирующей культуры островковых клеток поджелудочной железы новорожденных кроликов к биоматриксу. ×200

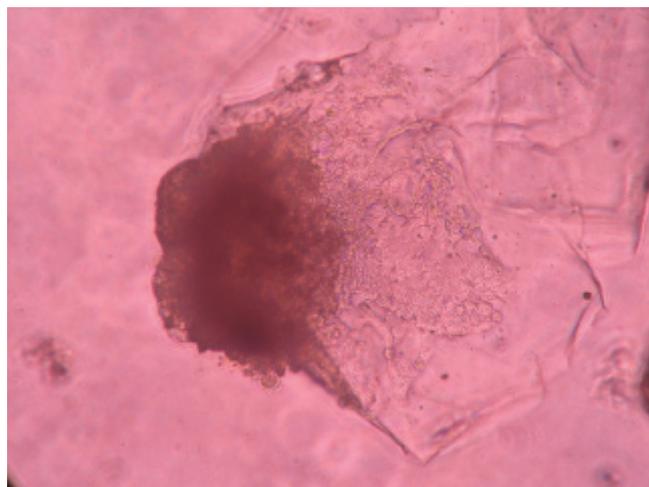


Рис. 6. Формирование однослойной культуры вокруг очага прикрепления флолирующей культуры островковых клеток поджелудочной железы новорожденных кроликов к биоматриксу. ×400

тирующих культур поджелудочной железы новорожденных кроликов (без МКГМ) не наблюдалось формирования однослойных зон роста вокруг очагов прикрепления культур ко дну культурального флакона.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Проведенные исследования показали, что присутствие микроструктурированного коллагенсодержащего гидрогелевого матрикса не только не оказывает токсического воздействия, но благоприятно влияет на выживание флотирующих культур, полученных из поджелудочной железы новорожденных кроликов. При этом сохраняются структурные особенности и гормональная способность, характерные для нативных островков поджелудочной железы. Значительная часть флотирующих культур, находящихся в непосредственном контакте с биоматриком, содержат как зрелые ОК, так и прогениторные клетки поджелудочной железы. Кроме того, при совместной инкубации таких культур с биоматриком в бессывороточной ростовой среде происходит формирование однослойных культур, которые, по всей видимости, состоят из прогениторных клеток поджелудочной железы, являющихся, как известно, предшественниками ОК. То, что именно МКГМ оказывает стимулирующее действие на образование этих клеток, доказывает отсутствие формирования однослойных культур при инкубации флотирующих культур в бессывороточной среде без добавления МКГМ. Таким образом, использованный нами биоматрикс способствует длительному сохранению морфофункциональных свойств флотирующих культур, содержащих ОК, а также способствует росту прогениторных клеток поджелудочной железы. Последний факт позволяет надеяться на то, что с помощью микроструктурированного коллагенсодержащего гидрогелевого матрикса можно будет существенно увеличить количество островковых клеток, получаемых из донорской поджелудочной железы, которые могут быть использованы в дальнейшем для трансплантации больным сахарным диабетом. Таким образом, биополимерный гетерогенный коллагенсодержащий гидрогель оказывает благоприятное воздействие на формирование и выживание культур островковых клеток *in vitro* и может быть использован в качестве матрикса тканеинженерной конструкции поджелудочной железы.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ в рамках научных проектов № 13-04-12017 офи\_м и № 13-02-12215 офи\_м.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ / REFERENCES

1. Биосовместимые материалы (учебное пособие) / Под ред. В.И. Севастьянова и М.П. Кирпичникова. М.: МИА, 2011; 544.  
Biosovmestimiye materialy (uchebnoe posobie). Editors Sevastianov V.I. and Kirpichnikov M.P. M: MIA, 2011: 544 (in rus).
2. Surguchenko V.A., Ponomareva A.S., Kirsanova L.A., Bubentsova G.N., Skaletskij N.N., Sevastianov V.I. On the possibility of *in vitro* formation of tissue-engineered construct of cartilage on the basis of cell-engineered construct composed of biopolymer hydrogel matrix and human adipose tissue-derived mesenchymal stromal cells. *Advanced Metals, Ceramics and Composites* (ed. H. Tu, K. Solntsev, R. Zhou), Yunnan Publ. Group Corp., Kunming, China, 2013: 242–245.
3. Готье С.В., Шагидулин М.Ю., Онищенко Н.А., Крашенинников М.Е., Ильинский И.М., Можейко Н.П., Люндуп А.В., Волкова Е.Н., Петраков К.В., Аврамов П.В., Перова Н.В., Севастьянов В.И. Коррекция хронической печеночной недостаточности при трансплантации клеток печени в виде суспензии и клеточно-инженерных конструкций (экспериментальное исследование). *Вестник РАМН*. 2013; 4: 44–51.  
Gauthier S.V., Shagidulin M.Yu., Onishchenko N.A., Krashennnikov M.E., Il'inskiy I.M., Mazhejko N.P., Lyundup A.V., Volkov E.N., Petrakov K.V., Avramov P.V., Perov N.V., Sevastianov V.I. Correction of chronic liver failure in the transplantation of liver cells in suspension and cell engineering structures (an experimental study). *Vestnik RAMSci*. 2013; 4: 44–51 (in rus).
4. Шумаков В.И., Скалецкий Н.Н. Трансплантация островковых клеток поджелудочной железы. *Трансплантология (руководство для врачей)* / Под ред. акад. В.И. Шумакова. М.: МИА, 2006: 418–430.  
Shumakov V.I., Skaletsky N.N. Transplantation of pancreatic islet cells. *Transplantologiya (posobie dla vrachey)*. Editor acad. V.I. Shumakov. M: MIA, 2006: 418–430 (in rus).
5. Кирсанова Л.А., Баранова Н.В., Скалецкий Н.Н., Зайденев В.А., Бубенцова Г.Н., Пушкова И.А. Поджелудочная железа новорожденных кроликов как источник прогениторных клеток. *Вестник трансплантологии и искусственных органов*. 2011; 11 (1): 61–64.  
Kirsanova L.A., Bubentsova G.N., Baranova N.V., Skaletskiy N.N., Zaydenov V.A., Pushkova I.A. Newborn rabbits pancreas as a source of progenitor cells. *Vestnik transplantologii i iskusstvennyh organov*. 2011; 13 (1): 61–64 (in rus).
6. Lee S.-H., Hao E., Savinov A.Y., Geron I., Strong A.J., Itkin-Ansari P. Human B-cell precursors mature into functional insulin-producing cells in an immunoisolation device: implications for diabetes cell therapies. *Transplantation*, 2009; 87 (7): 983–991.
7. Smith R.N., Kent S.C., Nagle J., Selig M., Lafrate A.J., Najafian N. Pathology of an islet transplant 2 years after transplantation: evidence for a nonimmunological loss. *Transplantation*. 2008; 86 (7): 54–62.

Статья поступила в редакцию 27.01.2014 г.