

DOI: 10.15825/1995-1191-2016-4-133-145

ПЕРСПЕКТИВЫ ПРИМЕНЕНИЯ ТКАНЕИНЖЕНЕРНЫХ КОНСТРУКЦИЙ ПОДЖЕЛУДОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ В ЛЕЧЕНИИ САХАРНОГО ДИАБЕТА 1-го ТИПА

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

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

Наиболее эффективным методом лечения сахарного диабета 1-го типа по-прежнему является аллотрансплантация островков поджелудочной железы, которая при сочетании благоприятных условий (достаточное количество выделенных островков, удачная комбинация иммуносупрессивных препаратов) способна достичь инсулиннезависимости реципиентов на протяжении нескольких лет. Однако постоянный дефицит донорских поджелудочных желез и ограниченность выживания островков в организме реципиента не позволяют увеличить количество таких трансплантаций и повысить их эффективность. В настоящем обзоре дан критический анализ работ российских и зарубежных авторов по созданию тканеинженерных конструкций поджелудочной железы, направленных на решение трех главных проблем трансплантации островков поджелудочной железы: 1) дефицит донорского материала; 2) необходимость проведения иммуносупрессивной терапии; 3) непродолжительность выживания и функциональной активности пересаженных островков.

Ключевые слова: сахарный диабет 1-го типа, трансплантация, островки, поджелудочная железа, тканеинженерные конструкции.

PROSPECTS OF APPLICATION OF TISSUE-ENGINEERED PANCREATIC CONSTRUCTS IN THE TREATMENT OF TYPE 1 DIABETES

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

V.I. Shumakov Federal Research Center of Transplantology and Artificial Organs of the Ministry of Healthcare of the Russian Federation, Moscow, Russian Federation

Allotransplantation of pancreatic islets remains the most effective method of treatment of diabetes mellitus type 1 being capable under combination of favorable conditions (sufficient number of isolated islets, effective combination of immunosuppressive drugs) to reach the recipients' insulin independence for several years. However, the overwhelming shortage of donor pancreas and limited post-transplantation islet survival do not allow increasing the number of such transplants and their effectiveness. This review presents a critical analysis of the work done by Russian and foreign authors onto creation of tissue-engineered pancreatic constructs that may lead to the resolution of the three main pancreatic islet transplantation issues: 1) lack of donor material; 2) necessity of immunosuppressive therapy; 3) limited survival and functional activity of the islet.

Key words: diabetes mellitus type 1, transplantation, islets, pancreas, tissue-engineered constructs.

ВВЕДЕНИЕ

Общий уровень заболеваемости сахарным диабетом был оценен приблизительно в 280 млн человек в 2010 году, и по прогнозам, он увеличится к 2030 г. до 440 млн [6], из которых на долю сахарного диабета 1-го типа придется 10–15%.

В настоящее время золотым стандартом лечения сахарного диабета 1-го типа по-прежнему является введение экзогенного инсулина в ответ на повышенный уровень глюкозы в крови. Создание синтетических аналогов инсулина, их введение с помощью носимых дозаторов, возможность регулярного кон-

Для корреспонденции: Скалецкий Николай Николаевич. Адрес: 123182, Москва, ул. Щукинская, д. 1. Тел.: (499) 190-42-66, (903) 790-95-39. E-mail: NSkaletsky@mail.ru.

For correspondence: Skaletskiy Nikolai Nikolaevich. Address: 1, Shchukinskaya St., Moscow, 123182, Russian Federation. Tel.: (499) 190-42-66, (903) 790-95-39. E-mail: NSkaletsky@mail.ru

троля уровня гликемии позволили повысить уровень компенсации нарушений углеводного обмена. Однако при этом сохранилась большая вероятность развития поздних диабетических осложнений, таких как невропатия и ангиопатия с дегенерацией кровеносных сосудов почек (диабетическая нефропатия) и сетчатки глаз (диабетическая ретинопатия), которые нередко заканчиваются почечной недостаточностью и слепотой.

В связи с достижением определенных успехов в клинической практике резко возрос интерес к научным разработкам, посвященным регенеративной медицине. Этому способствовало проведение многочисленных исследований в клеточной биологии, особенно в области стволовых клеток и биосовместимых материалов, обеспечивших прогресс в развитии тканевой и клеточной инженерии [1–3]. Появились сообщения об успешном применении тканеинженерных конструкций кожи, мочевого пузыря, трахеи, сосудов, представляющих собой искусственный или биологический двухмерный или трехмерный матрикс (*синонимы*: каркас, скаффолд) с соответствующими аутологичными клетками [4, 5].

В качестве альтернативы лечения экзогенным инсулином была предложена клеточная терапия в виде трансплантации островков / островковых клеток (ОК), выделенных из поджелудочной железы (ПЖ), в качестве средства для восстановления нормальной эндокринной функции поджелудочной железы.

В обзоре описаны возможности создания тканеинженерных конструкций поджелудочной железы (ТИК ПЖ), использование которых приблизит нас к решению трех главных проблем трансплантации островков поджелудочной железы: 1) дефицит донорского материала; 2) необходимость проведения иммуносупрессивной терапии; 3) непродолжительность выживания и функциональной активности пересаженных островков/ОК ПЖ.

ТРАНСПЛАНТАЦИЯ ОСТРОВКОВ/ОК ПЖ

Наиболее заметным прорывом в клеточной терапии сахарного диабета явилось появление в 2000 г. Эдмонтонского протокола, который включает в себя пересадку большого количества островков, полученных последовательно от 2–4 трупных доноров, в сочетании с оптимизированным протоколом иммуносупрессии. Выполнение этого протокола обеспечило устранение гипергликемии на один год у всех первых семи пациентов, перенесших трансплантацию островков [7]. Тем не менее через пять лет после трансплантации только 10% пациентов сохранили инсулиннезависимость, длительность которой в среднем составила 15 месяцев [8]. Позднее резуль-

таты были улучшены – до инсулиннезависимости в течение пяти лет у 50% реципиентов и сохранении секреции С-пептида (свидетельство инсулинпродуцирующей активности пересаженных островков) у более чем 70% трансплантатов до восьми лет.

Следует отметить, что остается общепринятым оценивать эффективность клинической трансплантации ОК по длительности и частоте достижения инсулиннезависимости. Однако главное – это профилактика, устранение или хотя бы существенное торможение развития и прогрессирования таких поздних осложнений сахарного диабета, как невропатия и ангиопатия нижних конечностей, нефропатия и ретинопатия, грозящих пациентам ампутациями, потерей функции почек и слепотой. При этом хирургический риск самой трансплантации должен быть минимальным, а сопутствующая иммуносупрессия не давать серьезных побочных эффектов или не применяться совсем.

Более 20 лет назад было показано, что возникновение и неуклонное прогрессирование поздних осложнений обусловлено прежде всего отсутствием в организме больного сахарным диабетом 1-го типа С-пептида [9], секретируемого наряду с инсулином островковыми β -клетками, которые полностью погибают вследствие аутоиммунного процесса. Если отсутствие собственной секреции инсулина у больных сахарным диабетом 1-го типа покрывается инсулинотерапией, то дефицит С-пептида никак не компенсируется. Единственное реальное решение этой проблемы может быть осуществлено путем пересадки длительно функционирующих гормонально-активных донорских β -клеток [10]. Кроме того, такая трансплантация способна инициировать восстановление секреции С-пептида собственными β -клетками пациента за счет их регенерации. Поэтому в качестве приоритетной цели трансплантационного лечения сахарного диабета 1-го типа должно быть не только и не столько достижение инсулиннезависимости, а максимально длительное сохранение функциональной активности пересаженных β -клеток, чтобы обеспечить поступление в организм реципиента С-пептида и реализацию его продолжительного ангио- и нейропротектного эффекта.

ТАНЕИНЖЕНЕРНЫЕ КОНСТРУКЦИИ ПОДЖЕЛУДОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ

Потенциальные возможности технологий тканевой инженерии и регенеративной медицины способны преодолеть многие из недостатков упомянутого выше Эдмонтонского протокола. Идея применения тканевой инженерии при клеточной терапии диабета 1-го типа состоит в имплантации островков, а точнее β -клеток, на биосовместимом

матрикс-носителе, который с введенными в его состав биомолекулами обеспечивает возможность создания трехмерной структуры и подходящую внеклеточную среду (микроокружение) для обеспечения выживания и функционирования клеток *in vitro* и *in vivo* [11].

Данные последних лет указывают на трехмерные (3D) культуральные системы как методологическую основу для улучшения клинических результатов трансплантации островков. Кроме того, в этих условиях можно обеспечить направленную дифференцировку стволовых клеток в β -клетки, что создаст неограниченный потенциал инсулин-продуцирующих клеток (ИПК), пригодных для трансплантации. Таким образом, тканеинженерный подход в сочетании с принципами регенеративной медицины может решить проблему долгосрочной адекватной терапии сахарного диабета 1-го типа.

Исходя из общих принципов тканевой инженерии и регенеративной медицины, три основных компонента являются ключевыми для ТИК ПЖ: 1) жизнеспособные ИПК, которые могут формировать клеточные островкоподобные агрегаты и выделять инсулин в ответ на повышение уровня глюкозы в крови; 2) каркас (скаффолд) из биосовместимого биостабильного или биорезорбируемого материала, обеспечивающего механическую поддержку клеточного компонента ТИК; 3) биомолекулы внеклеточного матрикса для создания среды, обеспечивающей длительное выживание и функционирование ИПК, а также усиление дифференцировки клеток-предшественников.

Источники ИПК

Из различных типов клеток, прежде всего стволовых, могут быть получены клетки, способные секретировать инсулин. Однако самыми естественными, и поэтому самыми совершенными продуцентами инсулина остаются β -клетки, находящиеся в островках ПЖ.

Островки ПЖ

Островки представляют собой скопления эндокринных клеток в поджелудочной железе, с размерами у человека в диапазоне от 50 до 300 мкм [12]. Островки состоят из α -, β -, γ -, δ - и ϵ -клеток, из которых α -клетки и β -клетки имеют непосредственное отношение к метаболизму глюкозы. Существуют межвидовые различия процентного содержания и локализации β -клеток в островках [13]. В человеческих островках β -клетки являются преобладающим типом клеток (диапазон 32–77%, в среднем 59%), расположенных преимущественно на периферии внутри островковых кровеносных сосудов. Островки, изолированные из трупной ПЖ, являют-

ся оптимальным источником β -клеток, но их количество ограничено из-за дефицита доноров. В качестве альтернативы свиные островки являются наиболее распространенным источником, так как человеческий и свиной инсулин отличаются одной аминокислотой [14]. В той же степени близок инсулину человека кроличий инсулин [15]. Количество доклинических испытаний со свинными островками на людях крайне ограничено, хотя свиные островки сохранялись и функционировали в течение до 6 месяцев у нечеловеческих приматов с применением иммуносупрессии [16]. Несколько доклинических испытаний с использованием макро- или микроинкапсуляции свиных островков продемонстрировали, что их имплантация давала позитивный эффект в течение нескольких лет без использования иммуносупрессии [17]. Тем не менее сохраняется мнение о том, что трансплантация островков свиньи остается несовершенным методом лечения в связи с ограниченной долгосрочной жизнеспособностью *in vivo* и постоянной потребностью в применении иммуносупрессивных препаратов [18].

Учитывая весьма ограниченную возможность использования островков от доступных доноров ПЖ, которыми являются чаще всего люди, погибшие в результате черепно-мозговой травмы, все более активной областью исследований становится изучение перспектив получения ИПК из стволовых клеток или клеток-предшественников [19].

Стволовые клетки

Стволовые клетки (СК) определяются по их способности к самообновлению и дифференцировке в различные типы клеток и попадают в одну из двух категорий: плюрипотентные (имеют способность стать всеми типами клеток организма) или мультипотентные (имеют ограниченную способность к дифференцировке). Эмбриональные СК и индуцированные плюрипотентные СК являются наиболее широко исследованным источником для панкреатической дифференцировки.

Эмбриональные СК

СК, полученные из эмбрионов, являются потенциальным источником суррогатных β -клеток, и вполне возможно, могут использоваться для замещения дефицита островков, получаемых из ПЖ трупов человека. Первая документальная попытка получения ИПК из эмбриональных стволовых клеток (ЭСК) человека была осуществлена в 2001 г. по протоколу, установленному для дифференцировки нейронов в инсулин-позитивные кластеры [20]. В дальнейшем попытались создавать клетки, которые более похожи на панкреатические β -клетки, а не инсулин-позитивные нейрноподобные клетки.

Были осуществлены многочисленные попытки получения ИПК в процессе культивирования СК различного происхождения, в том числе ЭСК, индуцируя онтогенетический путь дифференцировки клеток ПЖ в β -клетки [21]. Для этого использовали различные сочетания дифференцирующих факторов, которые смогли обеспечить формирование из энтодермы прогениторных клеток ПЖ и их дифференцировку в ИПК с конечным образованием β -клеток с некоторыми, но не со всеми их фенотипическими и функциональными характеристиками [22–24].

Успешным подходом к получению ИПК из ЭСК явилось решение имитировать среду, окружающую островки в процессе развития, обеспечивая поступление факторов роста через определенные промежутки времени. Для создания такой среды используют множество факторов роста и фармакологических средств, действие которых направлено на суммирование сигнальных каскадов, имеющих отношение к панкреатической дифференцировке *in vitro* [19]. В результате *in vitro* удалось из ЭСК получить 25% ИПК от конечной популяции, но реакция ИПК *in vitro* на нагрузку глюкозой отсутствовала [25]. Кроме того, использование частично дифференцированных ЭСК остается ограниченным из-за их способности образовывать цисты и тератомы после трансплантации в эксперименте лабораторным животным [11].

Мезенхимальные стволовые клетки

Мезенхимальные стволовые клетки (МСК) представляют собой фибробластоподобные клетки, которые обладают способностью дифференцироваться в ряд клеточных клонов [26]. В нескольких работах была исследована возможность дифференцировки МСК в эндокринные клетки поджелудочной железы, включая β -клетки [27–29], но не обладающих способностью отвечать на глюкозную нагрузку *in vitro*. Однако трансплантация культур ИПК, полученных в результате дифференцировки СК, выделенных из жировой ткани, лабораторным животным с экспериментальным сахарным диабетом обеспечила нормализацию у них уровня гликемии [30].

Таким образом, несмотря на невозможность получения истинных (полноценных) β -клеток или островков, человеческие ЭСК или другие СК удавалось дифференцировать в панкреатическом направлении, что подтверждается их способностью *in vivo* отвечать на глюкозную нагрузку секретацией инсулина. Этот факт позволяет предположить, что «окружение», в которое попадают пересаженные клетки, обеспечивает их необходимыми сигналами, индуцирующими окончательную дифференцировку [31].

Использование таких транскрибирующих факторов, как Pdx1 и MaFA, индуцирующих репрограммирование, повышает эффективность образования панкреатоподобных клеток из СК [32]. Так, было обнаружено, что экспрессия MaFA облегчает дифференцировку СК, выделенных из плаценты, в ИПК, так как они становятся способными отвечать на высокую концентрацию глюкозы *in vitro* (в среде культивирования) и обеспечивать нормогликемию после трансплантации у мышей-реципиентов с сахарным диабетом [33].

Наиболее подходящими для получения ИПК представляются эндометриальные мезенхимальные стволовые клетки, потенциально способные дифференцироваться в мезодермальные и энтодермальные ткани [34]. После успешного выделения СК из эндометрия человека был использован трехступенчатый протокол, обеспечивающий их дифференцировку в β -клетки поджелудочной железы. Фибрин был использован в качестве 3D-основы. Через 2 недели клетки образовывали островкоподобные кластеры, способные секретировать инсулин, проинсулин и С-пептид, выявленные методом иммунофлуоресценции.

В нескольких исследованиях после введения МСК диабетическим мышам наблюдали снижение уровня глюкозы в крови, хотя это, по-видимому, обусловлено регенерацией пула β -клеток реципиента, а не дифференцировкой МСК в β -клетки [35, 36]. Регенерация β -клеток, как полагают, происходит вследствие иммуномодулирующего и ангиогенного эффектов МСК, хотя точный механизм неизвестен [37].

Наиболее широкое распространение получило использование МСК в совместной культуре с имплантированными островками, которое показало, что происходит улучшение клинического результата путем реваскуляризации трансплантата и защиты ОК от иммунной атаки. Использование МСК, как представляется, оказывает, в первую очередь, иммуномодулирующее действие, хотя способность этих клеток дифференцироваться в ИПК продолжает исследоваться [38].

Известен способ подготовки жизнеспособных и функционально активных островков для последующей их успешной трансплантации путем совместного культивирования первично изолированных островков с МСК жировой ткани (ЖТ) в вогнутых микролунках [39]. Проведенные наблюдения показали, что МСК ЖТ, отделенные от островков, участвовали в образовании трехмерных сфероидов, состоящих из островковой ткани. Впоследствии было обнаружено, что ультраструктурная морфология сфероидов существенно отличается от таковой в первично изолированных островках. При этом ОК, культивированные с МСК ЖТ, продемонстрирова-

ли более высокую жизнеспособность и усиленную инсулинсекретирующую способность по сравнению с монокультурами островков. Это позволяет предположить, что МС КЖТ имеют значительный потенциал для защиты ОК клеток от повреждений в процессе культивирования и могут быть использованы для улучшения выживаемости островков и их функции. В экспериментах *in vivo*, включавших ксенотрансплантацию микроинкапсулированных сфероидов мышам с экспериментальной моделью диабета, было показано, что по сравнению с первично изолированными островками использование сфероидов, полученных в результате сокультивирования, обеспечивало более длительную реверсию диабета и меньшее количество необходимого трансплантационного материала.

Неэндокринные клетки поджелудочной железы

Были сделаны попытки получать ИПК из клеток, которые онтогенетически близки к β -клеткам, такие как клетки ацинусов и протоков поджелудочной железы [40–42]. Основная концепция такого подхода включает в себя дедифференцировку популяции клеток обратно в их прогениторное состояние, а затем стимулирование повторной дифференцировки в β -клетки [43–45]. На сегодняшний день использование этих клеточных популяций клеток оказалось безуспешным при получении функциональных β -клеток и достижении реверсии гипергликемии *in vivo* [46]. Тем не менее исследования в данном направлении продолжают. Панкреатические клетки-предшественники, которые могут быть легко вы-

делены у пренатальных мышей, экспрессируют ряд генов, свидетельствующих об их принадлежности к панкреатическому фенотипу, но не к инсулину. Таким образом, они могут быть полезным источником клеток для выявления условий, способствующих дифференцировке *in vitro* клеток-предшественников в функционирующие β -клетки. Показано, что неэндокринные клетки, остающиеся после изоляции островков из донорской поджелудочной железы, после введения в них гена нейрогенной дифференцировки могут дифференцироваться в β -клетки после культивирования *in vitro* [47]. Доказана также возможность получения культур прогениторных клеток из поджелудочной железы новорожденных кроликов [48]. Перспективность использования прогениторных клеток поджелудочной железы подтверждена исследованиями, в которых показано, что отсутствие предшественников островковых клеток в трансплантате приводит к снижению массы β -клеток [49], в то время как трансплантация островковой ткани, богатой прогениторными клетками, существенно повышает антидиабетический эффект [50].

Примеры тканеинженерных конструкций поджелудочной железы

В одном из последних обзоров [11] приведены основные типы ТИК ПЖ, исследование функциональных свойств которых *in vitro* и *in vivo* дало наиболее значимые результаты (табл.).

Путем поддержания клеток в физиологически более подходящих структурах и сохранения клеточно-клеточных и клеточно-матриксных контактов

Таблица

Краткое описание основных типов тканеинженерных конструкций [11]

Summary of types of tissue-engineering constructs [11]

Особенности культуры	Модификации	Типы клеток	Основные характеристики
2D-культуры			
Суспензия или монослой		Островки плодов мышей [51, 52]	Способность приводить к реверсии экспериментального сахарного диабета после трансплантации [52]
3D-системы			
Засев в пористые каркасы из жесткоцепных полимерных материалов	Добавление молекул внеклеточного матрикса (ВКМ)	Островки, выделенные из ПЖ человека и животных [53]	Островки, культивированные в пористых каркасах, имеют более высокую жизнеспособность и инсулинпродуцирующую активность по сравнению с 2D-культурами [53–55]. Включение в каркас молекул ВКМ усиливает секрецию инсулина [53]. Островки, имплантированные <i>in vivo</i> в скаффолды, васкуляризируются и снижают уровень гликемии [55]
Инкубация с гидрогелем	Добавление молекул ВКМ	Островки человека и крыс [54, 56]. Прогениторные клетки ПЖ крысы [57]. Островки, культивированные с МСК [58]	Островки, культивированные в гидрогеле, имеют более высокую жизнеспособность по сравнению с 2D-культурами и вызывают реверсию гипергликемии в опытах <i>in vivo</i> [56, 59, 60]. Включение молекул ВКМ в гидрогель повышает секрецию инсулина [61]. При культивировании прогениторных клеток в гидрогеле происходит их дифференцировка в β -клетки [62]. Сокультивирование островков с МСК усиливает секрецию инсулина [63]

может быть имитирована окружающая среда, близкая к естественным условиям. Это особенно важно для островков, представляющих собой клеточную популяцию в культуре, которая должна иметь многочисленные клеточно-клеточные контакты между эндокринными клетками и клеточно-матричные контакты между эндокринными клетками и окружающей базальной мембраной. При подготовке трансплантации островков процесс их изоляции часто разрушает внеклеточную среду, приводя к потере функции островков после пересадки. Восстановление контактов с внеклеточной матрицей и механическая поддержка изолированных островков может увеличить долгосрочный успех трансплантации островков.

Обеспечение трехмерности, вероятно, играет важную роль в культивировании *in vitro* островков/ОК ПЖ и их выживании и функционировании *in vivo*. Совместное культивирование островков взрослых крыс Wistar и трехмерного тонковолокнистого гидрогелевого скаффолда показало, что выживаемость и инсулинсекретирующая активность ОК, непосредственно контактировавших со скаффолдом, были выше, чем при его отсутствии [54].

По-видимому, основной причиной низкого выживания ОК ПЖ после их трансплантации является процедура выделения островков из ткани ПЖ [64]. Недостаточную эффективность трансплантации ОК ПЖ связывают также с тем, что в процессе их получения они лишаются привычного микроокружения, нарушается их внутренняя васкуляризация и иннервация [65]. При этом существенно изменяются сигнальные взаимоотношения между ОК и ВКМ, что нарушает регуляцию морфофизиологических процессов, включающих выживание, пролиферацию, секреторную активность, и в конце концов, ухудшает результаты трансплантации островков. В связи с этим чрезвычайно важным является создание матриц, обладающих свойствами, характерными для микроокружения островков в нативной ПЖ [66].

В последние годы для создания биорезорбируемых 3D-матриц, для изготовления которых привлекается целый ряд технологий – от простого «выщелачивания» до технологий прототипирования [67, 68], все чаще стали использовать биополимеры (коллаген, хитозан, полилактогликолиды, бактериальные полимеры и др.) [3]. Трехмерные биорезорбируемые пористые матрицы являются каркасными элементами клеточно-инженерных конструкций, обеспечивающими жизнедеятельность клеток в процессе формирования определенных типов тканей. 3D-матрицы способствуют локализации клеток в области имплантации, одновременно являясь их носителем, временно выполняющим функции естественного ВКМ.

Панкреатические островки представляют собой обильно насыщенные сосудами эндокринные клеточные кластеры, которые находятся в непосредственном контакте с базальной мембраной эндотелиальных клеток и экзокринных клеток в поджелудочной железе. Существуют два неиммунных фактора [58], способствующих гибели островков, изолированных из донорской ПЖ, в процессе их культивирования: формирование амилоидоза и потеря ВКМ. Использование в качестве матрицы для культивируемых человеческих островков трехмерных коллагенсодержащих скаффолдов по сравнению с культивированием в 2D-условиях приводило к существенному уменьшению образования амилоида и снижению уровня апоптоза β -клеток на 75%.

Наличие информации о внеклеточных сигналах, присутствующих в панкреатических островках, может быть использовано для разработки биологически приближенных к ВКМ скаффолдов. ВКМ имеет несколько функций, таких как обеспечение структурной поддержки, пролиферации, дифференциации и метаболизма клеток, передатчика сигналов к клеткам через интегрин-опосредованные взаимодействия [69]. Основные компоненты ВКМ в значительной степени сохраняются у многих видов животных и включают бифункциональные белки, такие как коллаген, фибронектин и ламинин, гликозаминогликаны, и в меньшей степени, факторы роста и цитокины [70]. Этот принцип лежит в основе биологической совместимости матриц и допускает использование биологических каркасов, полученных из ксеногенных источников в клинической практике. Точное распределение и трехмерное расположение указанных молекул является тканеспецифичным, и по меньшей мере, частично ответственно за различные механические, функциональные и структурные свойства различных тканей.

Рассмотрим несколько примеров использования бифункциональных белков в качестве матриц для ТИК ПЖ.

Ламинин. Изоформы ламинина представлены в кровеносных сосудах и ацинарных клетках в поджелудочной железе, распределены внутри и вокруг островков, в переходных экзокринно-эндокринных клетках и присутствуют во внутриостровковых кровеносных сосудах [71, 72]. Было показано, что ламинин-111, ассоциированный с панкреатическим протоковым эпителием, усиливает дифференцировку и рост островков плода мыши [73], избирательно увеличивает количество ИПК и поддерживает жизнеспособность островков взрослых крыс на протяжении нескольких дней [74]. Показано, что клеточно-матричные взаимодействия могут иметь видовую специфичность [75]. Кроме того, ламинин, по-видимому, усиливает дифференцировку ЭСК в ИПК [76].

При культивировании ЭСК человека на микропринтерированных покрытых ламинином покровных стеклах с соблюдением протокола направленной дифференцировки клеточные кластеры демонстрировали профили экспрессии генов, определенно напоминающих энтодерму, из которой развиваются предшественники панкреатических клеток. Когда происходило открепление и дальнейшая дифференцировка суспензионной культуры, небольшая часть (<5%) клеток экспрессировала факторы транскрипции ПЖ Pdx1 и NKX6. В целом, по-видимому, ламинин играет важную роль в поддержании функции островков и выделении инсулина *in vitro* и в поддержании дифференцировки человеческих ЭСК в предшественников β -клеток.

Коллаген. Коллагены типа I, IV, V и VI присутствуют на границе экзокринно-эндокринных клеточных взаимодействий и в непосредственной близости к внутриостровковым эндотелиальным клеткам [77]. Коллагены I, V, VI типов являются наиболее распространенными изоформами в пределах островково-экзокринного интерфейса поджелудочной железы человека с лишь слабой экспрессией коллагена IV типа, хотя его присутствие сильно выражено в эпителиальной основе плодной ПЖ [78]. Коллаген IV типа обнаружен в развивающейся ПЖ человека и участвует в развитии структуры островков, о чем свидетельствует его близость к инокуляции кластеров инсулин- и глюкагон-позитивных клеток [79]. При культивировании островков ПЖ крысы на коллагене I и IV типов сохранение ими жизнеспособности наблюдали у 60 и 89% островков соответственно. В то же время более 90% тех островков, которые культивировали в суспензии, подверглись апоптической гибели через 48 часов. За 24 часа инкубации островков в чашках Петри, покрытых коллагеном типа I и IV, инсулина выделялось соответственно в 4 и 6 раз больше, чем при использовании чашек, покрытых БСА, или стандартных полилизинных чашек [80]. Интересно отметить, что островки, которые образовывали монослой на поверхности коллагена I типа с последующим наложением второго слоя коллагена, были способны образовывать островкоподобные агрегаты и поддерживать базальный уровень выделения инсулина в течение 8 недель. Несмотря на способность островков прикрепляться и размножаться на поверхностях, покрытых коллагеном I и IV типов, наблюдавшаяся эпителиально-мезенхимальная трансдифференцировка ограничивает целесообразность использования этих субстратов для культивирования клеток. Так как коллаген IV типа наблюдается преимущественно в развивающейся ПЖ, он может быть более подходящим субстратом для направленной дифференцировки СК. Был проведен сравнительный анализ жизнеспособности и инсулинпродуцирующей

активности островков *in vitro* в коллагенсодержащем матриксе, заселенном фибробластами, и *in vivo* на сингенной модели трансплантации островков мышам [81]. Использование 3D-матрикса значительно улучшало выживание трансплантата и позволяло снижать эффективную дозу пересаживаемых островков вдвое. Фибробласты, помещенные в скаффолд, продуцировали фибронектин и ростовые факторы, индуцировали пролиферацию ОК.

Фибрин. Связываясь с рецепторами клеточной мембраны, такими как интегрины, фибрин способствует дифференцировке клеток, их пролиферации, функционированию и выживанию [82]. Фибрин также способен сохранять архитектуру ОК, стимулировать секрецию ими инсулина, ангиогенез островков, оказывать протективный эффект в отношении гибели клеток. После трансплантации островков в фибриновом гидрогеле происходит активная неоваскуляризация трансплантата, налаживается его гормонпродуцирующая функция. Таким образом, фибрин как биосовместимый и биodeградируемый скаффолд может рассматриваться в качестве подходящего компонента тканеинженерной конструкции поджелудочной железы. Кроме того, фибрин оказывал защитное действие по отношению к внедренным в него островкам, выделенным из ПЖ молодых поросят и подвергшимся воздействию перекиси водорода [83]. При этом островки, окруженные фибрином, сохраняли инсулинпродуцирующую активность в ответ на глюкозный стимул, в то время как у островков, помещенных в культуральные полистироловые чашки, эта способность под воздействием перекиси водорода значительно снижалась. Высокая степень биосовместимости и специфических свойств фибрин-гидрогеля делает его похожим на нормальную ПЖ и представляется нам идеальной «подложкой». Кроме того, фибрин был использован в качестве 3D-основы для обеспечения дифференцировки МСК, выделенных из эндометрия, в панкреатические β -клетки.

Коллагенсодержащие гидрогели. Сравнительно недавно было разработано новое поколение инъекционных форм многокомпонентных биополимерных микрогетерогенных коллагенсодержащих гелей (БМКГ) с высокими регенераторными свойствами [84].

В состав БМКГ, относящегося к классу биоактивных биомиметических гидрогелей [85] и запатентованного как композиция гетерогенного имплантируемого геля [86], входят основные компоненты ВКМ мягких тканей животного происхождения (пептиды частично гидролизованного коллагена, гликопротеины и уоновые кислоты) и другие биологически активные вещества ВКМ, в том числе факторы роста, необходимые для жизнедеятельности

ти окружающих клеток и синтеза экзогенных уроновых кислот, протеогликанов и коллагена.

Наличие микрогетерогенной структуры гидрогеля позволило увеличить время его биорезорбции до нескольких месяцев [87] по сравнению с однокомпонентными биоимплантатами из коллагена, гиалуроновой кислоты, фибрина и др., рассасывающимися в течение 3–4 недель, что недостаточно для формирования ТИК ПЖ.

В качестве первого шага на пути создания ТИК ПЖ с последующим формированием из нее ТИК

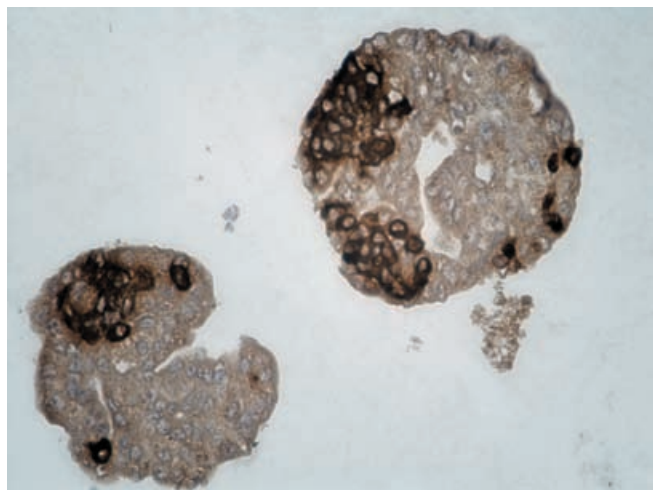


Рис. 1. Флотирующая островкоподобная культура, полученная из поджелудочной железы новорожденных кроликов (ФОК ПЖНК), через 2 недели после совместного культивирования с биоматриксом. Иммунопозитивное окрашивание β -клеток антителами к инсулину. $\times 400$ [48]

Fig. 1. Floating islet-like culture, obtained from the pancreas of newborn rabbits (FIC PNR) after 2 weeks co-culture with biomatrix. Immunopositive staining of β -cells with antibodies to insulin. $\times 400$ [48]

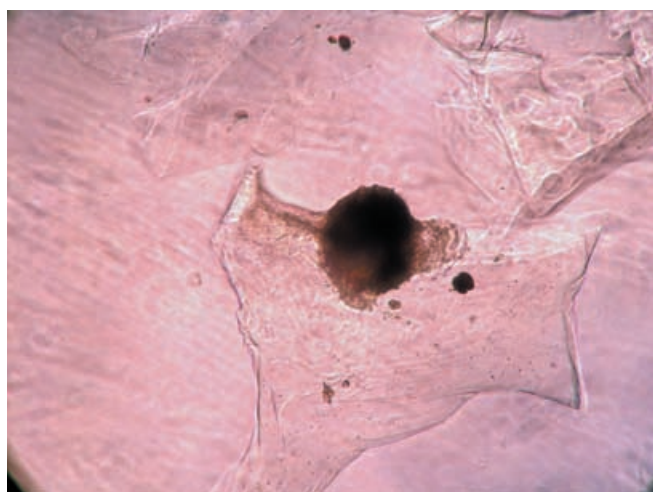


Рис. 2. Прикрепление ФОК ПЖНК к биоматриксу. Инвертированный микроскоп. $\times 200$ [48]

Fig. 2. Attaching FIC PNR to the biomatrix. Inverted microscope. $\times 200$ [48]

ПЖ явилось исследование влияния БМКГ на культуры ОК [48]. При совместной, достаточно длительной (2 недели) инкубации БМКГ и полученных из ПЖ новорожденных кроликов флотирующих островкоподобных культур (ФОК) в последних не выявлялось выраженных деструктивных изменений. С помощью иммуногистохимического окрашивания подтверждалось сохранение значительного количества гормонально-активных β -клеток как на 7-е, так и 14-е сутки сокультивирования (рис. 1). Это свидетельствовало, по меньшей мере, об отсутствии отрицательного влияния 3D-биоматрикса на выживаемость и морфофункциональные качества ФОК. При этом отмечалось прикрепление таких культур к поверхности биоматрикса (рис. 2). Некоторые из них содержали значительное количество клеток, демонстрировавших позитивную реакцию при окрашивании антителами к цитокератину 19 – специальному маркеру протокового эпителия (рис. 3). Одновременно в процессе совместной инкубации культур и БМКГ вокруг части прикрепившихся ФОК формировались эпителиоподобные однослойные зоны роста (рис. 4). На основании ранее проведенных исследований можно с большой долей вероятности предположить, что эти клетки, происходящие из протокового эпителия, являются прогениторными клетками ПЖ, то есть предшественниками ОК. В контрольном опыте инкубации ФОК (без БМКГ) не наблюдали формирования однослойных зон роста вокруг очагов прикрепления культур ко дну культурального флакона. Таким образом, гидрогелевый коллагенсодержащий 3D-биоматрикс способствует длительному сохранению морфофункциональных свойств ФОК и росту прогениторных клеток ПЖ в условиях *in vitro* и может

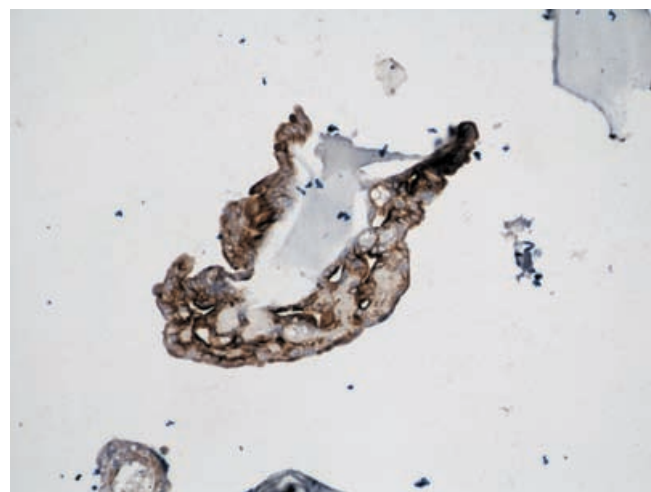


Рис. 3. ФОК ПЖНК, прикрепившаяся к биоматриксу. Иммунопозитивное окрашивание на цитокератин 19. $\times 200$ [48]

Fig. 3. FIC PNR attached to biomatrix. Immunopositive staining for cytokeratin 19. $\times 200$ [48]

быть использован в качестве инъекционного носителя при создании ТИК ПЖ.

Функциональная эффективность ТИК ПЖ в условиях *in vivo* была исследована путем ее внутрибрюшинного введения животным (крысы Wistar) с экспериментальным сахарным диабетом 1-го типа (стрептозотоциновая модель) [48]. Определяли не только сахароснижающий эффект выполненной имплантации, но и ее влияние на островковый аппарат собственной ПЖ крыс-реципиентов. Было отмечено существенное снижение гликемии (к исходу 4–5 недель содержание глюкозы в крови не превышало 11 ммоль/л), субнормальный уровень которой сохранялся, по меньшей мере, на протяжении 8 недель (заданный общепринятый срок наблюдения) после имплантации. При этом у крыс с диабетом без имплантации ТИК ПЖ гипергликемия оставалась высокой – более 25 ммоль/л. По окончании эксперимента при гистологическом анализе ПЖ крыс-реципиентов с сахарным диабетом были выявлены признаки активной регенерации β -клеток в островках (рис. 5) при отсутствии таких изменений в ПЖ диабетических крыс из контрольной группы.

Каркасные матриксы. Посевы клеток на сборные пористые каркасы исследованы как средство повышения жизнеспособности и функции изолированных островков *in vitro* и для улучшения результатов их трансплантации. Например, островки крысы, культивированные в пористом полигликолевом каркасе, были почти в 2 раза более жизнеспособными и давали в 4 раза большую секрецию инсулина по сравнению с островками, которые культивировали на необработанном 2D-каркасе в течение 15 дней [88]. В отдельном исследовании человеческие островки были помещены в коллагеновый гель, содержащий фибронектин и коллаген IV типа в порах полилактогликолидного каркаса [89]. Интересно, что островки внутри такого каркаса поддерживали высокий уровень секреции инсулина при стимуляции глюкозой, аналогично свежим островкам, и он был выше, чем у островков, которые культивировали в геле с коллагеном типа I, но при отсутствии каркаса, или у островков, культивированных в суспензии. Эти результаты демонстрируют важность как клеточно-матриксных контактов, так и структурной поддержки, оказываемой каркасом в поддержании функции островковых клеток *in vitro* и в усилении функции островков после трансплантации.

В работе [90] был использован 3D-биоблоттинг для изготовления пористого 3D-скаффолда на основе альгината для внепеченочной доставки островков. В таких скаффолдах отношение поверхности к объему, и таким образом, транспорт кислорода и питательных веществ увеличивается по сравнению с гидрогелями, нанесенными обычным способом. Еще одним преимуществом использования каркас-

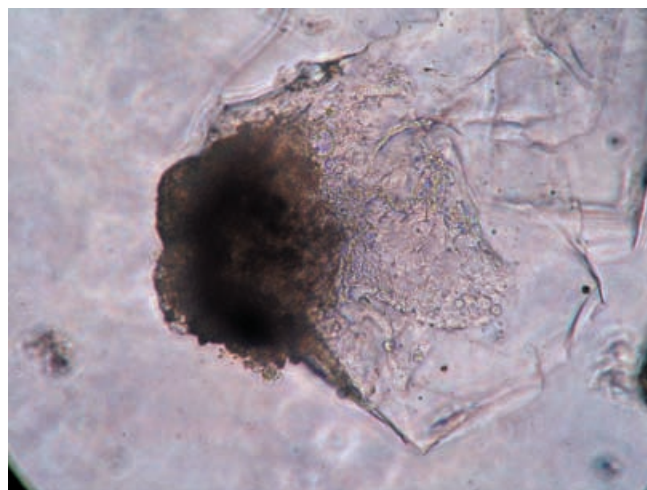


Рис. 4. Формирование однослойной культуры вокруг ФОК ПЖНК, прикрепившейся к биоматриксу. $\times 400$ [48]

Fig. 4. Formation of monolayer culture around FIC PNR attached to the biomatrix. $\times 400$ [48]

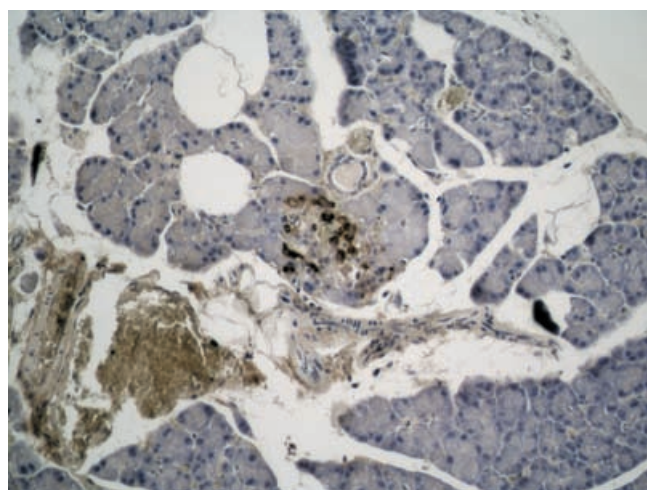


Рис. 5. Регенерация β -клеток в островке (в центре) поджелудочной железы диабетической крысы через 8 недель после внутрибрюшинной имплантации тканеинженерной конструкции поджелудочной железы. Окрасивание гематоксилином и эозином. Иммуногистохимическое окрасивание на инсулин. $\times 200$ [48]

Fig. 5. Regeneration of β -cells in the pancreatic islet (in center) of the diabetic rat in 8 weeks after intraperitoneal implantation of pancreatic tissue-engineering construct. Staining with hematoxylin and eosin. Immunohistochemical staining for insulin. $\times 200$ [48]

ных материалов является возможность совместного культивирования множества типов клеток и создания условий, напоминающих аспекты природных тканевых структур с взаимодействием с ВКМ и близостью к сосудистой системе. Это было продемонстрировано в исследовании, в котором мышечные островки, эндотелиальные клетки пупочной вены человека и МСК, полученные из крайней плоти человека, совместно культивировали на по-

ристых полилактогликолидных каркасах [91]. Такая трехкультуральная система улучшила жизнеспособность островков (75% жизнеспособность после 4 недель инкубации *in vitro*) по сравнению с 2D-контролем (через 2 недели культивирования жизнеспособные клетки отсутствовали). При этом островки в 3D-скаффолде выделяли примерно на 50% больше инсулина, чем в 2D-системе.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

За последние 10 лет благодаря небольшим усовершенствованиям Эдмонтонского протокола первоначальная продолжительность периода инсулин-независимости пациентов увеличилась до 5 лет после аллотрансплантации островков у 50% реципиентов [92]. Однако через длительные сроки после трансплантации пересаженные островки неизбежно теряют жизнеспособность и функциональную активность.

Учитывая отсутствие необходимой доступности донорских островков, крайне важно разработать надежные подходы, обеспечивающие направленную дифференцировку стволовых клеток в ИПК. В конечном счете β -клетки, полученные из стволовых клеток, смогут не только стать дополнительным источником трансплантационного материала, но и в перспективе в значительной мере удовлетворить потребности клиники. Очевидный прогресс в разработке биосовместимых материалов и технологий получения 3D-систем заданной конфигурации и структуры [3] позволит создать матрицы, которые смогут обеспечить для донорских островков микроокружение, сходное с таковым в нативной ПЖ [11]. Ряд исследований, как *in vitro*, так и *in vivo*, показали, что островки, β -клетки и их предшественники, культивированные в 3D-скаффолде и в присутствии компонентов ВКМ, проявляют улучшенную жизнеспособность и повышенную секрецию инсулина. Эти данные убедительно указывают на важность клеточно-матриксных контактов. Необходимо проведение доклинических исследований, доказывающих, что значительные улучшения в жизнеспособности и функциональности ИПК *in vitro* в составе ТИК ПЖ будут наблюдаться и при имплантации ТИК ПЖ.

Использование в качестве клеточного компонента неиммуногенных или слабо иммуногенных островковых клеток позволит отказаться от проведения иммуносупрессии либо сделать ее минимально опасной при клиническом применении. Кроме непосредственного антидиабетического действия ТИК ПЖ, обусловленного гормонсекретирующей функцией пересаженных островков, общему терапевтическому эффекту должно способствовать восстановление пула активно функционирующих

β -клеток реципиента вследствие их регенерации в постимплантационном периоде.

Работа выполнена при частичной финансовой поддержке Российского научного фонда, грант № 14-25-00055.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ / REFERENCES

1. Atala A, Lanza R, Thompson J, Nerem R. Principles of regenerative medicine, Academic Press is an imprint of Elsevier, First edition, 2008.
2. Биология стволовых клеток и клеточные технологии: учебное пособие. Под редакцией М.А. Пальцева. М.: Медицина, Шик, 2009. Том 1 и 2. *Biologia stvolovykh kletok i kletochkiye tekhnologii: uchebnoye posobiye.* Pod redaktsiyey M.A. Paltseva. M.: Meditsina, Shik, 2009. Tom 1 i 2.
3. Биосовместимые материалы: учебное пособие. Под ред. В.И. Севастьянова, М.П. Кирпичникова. М.: МИА, 2011. *Biosovmestimiye materialy: uchebnoye posobiye.* Pod redaktsiyey V.I. Sevastianova, M.P. Kirpichnikova. M.: MIA, 2011.
4. Atala A, Baue SB, Soker S, Yoo JJ, Retik AB. Tissue-engineered autologous bladders for patients needing cystoplasty. *Lancet.* 2006; 367: 1241–1247.
5. Macchiarini P, Jungebluth P, Go T. Clinical transplantation of a tissue-engineered airway. *Lancet.* 2008; 372: 2023–2028.
6. Gan MJ, Albanese-O'Neill A., Haller MJ. Type 1 diabetes: current concepts in epidemiology, pathophysiology, clinical care, and research. *Curr. Probl. Pediatr. Adolesc. Health Care.* 2012; 42: 269–291.
7. Shapiro A, Lakey J. Islet transplantation in seven patients with type 1 diabetes mellitus using a glucocorticoid-free immunosuppressive regimen. *N. Engl. J. Med.* 2000; 343: 230–238.
8. Ryan EA, Lakey JRT, Rajotte RV, Korbitt GS, Kin T, Imes S, Rabinovitch A et al. Five-year follow-up after clinical islet transplantation. *Diabetes.* 2005; 54: 2060–2069.
9. Wahren J, Johansson B-L, Wallberg-Henriksson H. Does C-peptide have a physiological role? *Diabetologia.* 1996; 37, suppl. 2: 99–107.
10. Шумаков ВИ, Скалецкий НН. Трансплантация островковых клеток поджелудочной железы. *Трансплантология: руководство для врачей.* Под ред. В.И. Шумакова. М.: МИА, 2006: 418–430. *Shumakov VI, Skaletskiy NN. Transplantatsia ostrovkovykh kletok podzheludochnoy zhelezy. Transplantologia: rukovodstvo dlya vrachey.* Pod red. VI. Shumakova. M.: MIA, 2006: 418–430.
11. Amer LD, Mahoney MJ, Bryant SJ. Tissue Engineering Approaches to Cell-Based Type 1 Diabetes. *Therapy Tissue Engineering Part B: Reviews.* October 2014; 20 (5): 455–467. doi: 10.1089/ten.teb.2013.0462.
12. Bosco D, Armanet M, Morel P, Niclauss N. Unique arrangement of α - and β -cells in human islets of Langerhans. *Diabetes.* 2010; 59.
13. Cabrera O. The unique cytoarchitecture of human pancreatic islets has implications for islet cell function. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2006; 103: 2334–2339.

14. Dufrane D, Gianello P. Pig islet for xenotransplantation in human: structural and physiological compatibility for human clinical application. *Transplant. Rev. (Orlando)*. 2012; 26: 183–188.
15. Шпейбер В. Патология желез внутренней секреции. Прага: Медицинское издательство, 1987: 414. Shreiber V. Patofiziologia zhelez vnutrenney sekretsii. Praga: Meditsinskoye izdatelstvo, 1987: 414.
16. Marigliano M, Bertera S, Grupillo M, Trucco M, Bottino R. Pig-to-nonhuman primates pancreatic islet xenotransplantation: an overview. *Curr. Diab. Rep.* 2011; 11: 402–412.
17. Dufrane D, Gianello P. Macro- or microencapsulation of pig islets to cure type 1 diabetes. *World J. Gastroenterol.* 2012; 18: 6885–6893.
18. Van der Windt DJ. Clinical Islet Xenotransplantation: How Close Are We? *Diabetes*. 2012; 61: 3046–3055.
19. Sumi S, Gu Y, Hiura A, Inoue K. Regenerative medicine for insulin deficiency; creation of pancreatic islets and bioartificial pancreas. *J. Hepatobiliary Pancreat. Sci.* 2011; 18 (1): 6–12.
20. Lumelsky N, Blondel O, Laeng P, Velasco I, Ravin R, McKay R. Differentiation of embryonic stem cells to insulin-secreting structures similar to pancreatic islets. *Science*. 2001; 292: 1389–1394.
21. Aguayo-Mazzucato C, Bonner-Weir S. Stem cell therapy for type 1 diabetes mellitus. *Nat. Rev.* 2010; 6: 139–149.
22. D'Amour K, Bang AG, Eliazer S. Production of pancreatic hormone-expressing endocrine cells from human embryonic stem cells. *Nat. Biotechnol.* 2006; 24: 1392–1311.
23. Shi Y. Generation of functional insulin-producing cells from human embryonic stem cells *in vitro*. *Methods Mol. Biol.* 2010; 636: 79–85.
24. Chandra V, Phadnis S, Nair P.D, Bhonde RR. Generation of pancreatic hormone-expressing islet-like cell aggregates from murine adipose tissue-derived stem cells. *Stem. Cells*. 2009; 27: 1941–1945.
25. Basford CL. The functional and molecular characterisation of human embryonic stem cell-derived insulin-positive cells compared with adult pancreatic beta cells. *Diabetologia*. 2012; 55: 358–371.
26. Uccelli A, Moretta L, Pistoia V. Mesenchymal stem cells in health and disease. *Nat. Rev. Immunol.* 2008 Sep; 8 (9): 726–736. doi: 10. 1038/nri2395.
27. Milanesi A. B-Cell regeneration mediated by human bone marrow mesenchymal stem cells. *PLoSOne*. 2012; 7: e42177.
28. Tang DQ, Cao LZ, Burkhardt BR, Xia CQ, Litherland SA, Atkinson MA, Yang LJ. *In vivo* and *in vitro* characterization of insulin-producing cells obtained from murine bone marrow. *Diabetes*. 2004; 53: 1721–1732.
29. Chen L-B, Jiang X-B, Yang L. Differentiation of rat marrow mesenchymal stem cells into pancreatic islet beta-cells. *World J. Gastroenterol.* 2004; 10: 3016–3020.
30. Kroon E, Martinson LA, Kadoya K. Pancreatic endoderm derived from human embryonic stem cells generates glucose-responsive insulin-secreting cells *in vivo*. *Nat. Biotechnol.* 2008; 26: 443–451.
31. Gabr MM, Sobh MM, Zakaria MM, Refaie AF, Ghoneim MA. Transplantation of insulin-producing clusters derived from adult bone marrow stem cells to treat diabetes in rats. *Exp. Clin. Transplant.* 2008; 6: 236–241.
32. Chiou SH, Chen SJ, Chang YL. A promotes the reprogramming of placenta-derived multipotent stem cells into pancreatic islets-like and insulin-positive cells. *J. Cell Mol. Med.* 2010; Feb: 16–22.
33. Bernardo AS, Cho CH, Mason S. Biphasic induction of Pdx 1 in mouse and human embryonic stem cells can mimic development of pancreatic beta-cells. *Stem. Cells*. 2009; 27: 341–349.
34. Niknamasl A, Ostad SN, Soleimani M, Azami M, Salmani MK, Lotfibakhshaiesh N et al. A new approach for pancreatic tissue engineering: human endometrial stem cells encapsulated in fibrin gel can differentiate to pancreatic islet beta-cell. *Cell Biol. Int.* 2014 Oct; 38 (10): 1174–1182. doi: 10.1002/cbin.10314. Epub 2014 Jul 3.
35. Lee RH, Seo MJ, Reger RL, Spees JL, Pulin AA, Olson SD, D.J. Multipotent stromal cells from human marrow home to and promote repair of pancreatic islets and renal glomeruli in diabetic NOD/scid mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2006; 103: 17438–17443.
36. Chang C. Mesenchymal stem cells adopt beta-cell fate upon diabetic pancreatic microenvironment. *Pancreas*. 2009; 38: 275–281.
37. Franquesa M, Hoogduijn MJ, Bestard O, Grinyo JM. Immunomodulatory effect of mesenchymal stem cells on B cells. *Front. Immunol.* 2012; 3: 212.
38. Hematti P, Kim J, Stein AP, Kaufman D. Potential role of mesenchymal stromal cells in pancreatic islet transplantation. *Transplant. Rev. (Orlando)*. 2013; 27: 21–29.
39. Jun Y, Kang AR, Lee JS, Park S-J, Lee DY, Moon S-H. Microchip-based engineering of super-pancreatic islets supported by adipose-derived stem cells. *Biomaterials*. 2014; 35: 4815–4826.
40. Baeyens L, De Breuck S, Lardon J, Mfopou JK, Roorman I, Bouwens L. *In vitro* generation of insulin-producing beta cells from adult exocrine pancreatic cells. *Diabetologia*. 2005; 48: 49–57.
41. Song K-H. *In vitro* transdifferentiation of adult pancreatic acinar cells into insulin-expressing cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2004; 316: 1094–1100.
42. Minami K, Seino S. Pancreatic acinar-to-beta cell transdifferentiation *in vitro*. *Front. Biosci.* 2008; 1: 5824–5837.
43. Yamada S, Yamamoto Y, Nagasawa M. *In vitro* transdifferentiation of mature hepatocytes into insulin-producing cells. *Endocr. J.* 2006; 53: 789–795.
44. Aviv V. Exendin-4 promotes liver cell proliferation and enhances the PDX-1-induced liver to pancreas transdifferentiation process. *J. Biol. Chem.* 2009; 284: 33509–33520.
45. Lu Y, Li Y. Transdifferentiation of hepatic oval cells into pancreatic islet beta-cells. *Front. Biosci.* 2012; 17: 2391–2395.
46. Ulrich AB, Schmied BM, Standop J, Schneider MB, Pour PM. Pancreatic cell lines: a review. *Pancreas*. 2002; 24: 111–120.

47. Shimoda M., Chen S., Noduchi H., Matsumoto S., Grayburn P.A. Neurogenic differentiation directs differentiation of cytokeratin 19 – positive human pancreatic nonendocrine cells into insulin-producing cells. *Transpl. Proc.* 2010; 42 (6): 2071–2074.
48. Скалецкий НН, Кирсанова ЛА, Севастьянов ВИ. Разработка и экспериментальное исследование тканеинженерных конструкций поджелудочной железы из культур островковых клеток поджелудочной железы и биodeградируемых носителей с целью стимуляции регенерации β -клеток у больных сахарным диабетом. *Трансплантология: итоги и перспективы.* 2013; V: 140–152. Skaletskiy NN., Kirsanova LA., Sevastianov VI. Razrabotka i experimentalnoye issledovaniye tkaneinzhenernykh konstruktsey podzheludochnoy zhelezy iz kultur ostrovkovykh kletok podzheludochnoy zhelezy i biodegradiruemykh nositeley s tselyu stimulatsii regeneratsii β -kletok u bolnykh sakharnym diabetom. *Transplantologia: itogi i perspektivy.* 2013; V: 140–152.
49. Lee S-H, Hao E, Savinov AY, Geron I, Strong AJ, Itkin-Ansari P. Human B-cell precursors mature into functional insulin-producing cells in an immunisolation device: implications for diabetes cell therapies. *Transplantation.* 2009; 87 (7): 983–991.
50. Smith RN, Kent SC, Nagle J, Selig M, Lafrate AJ, Najafian N et al. Pathology of an islet transplant 2 years after transplantation: evidence for an immunological loss. *Transplantation.* 2008; 86 (7): 54–62.
51. Page H, Flood P, Reynaud EG. Three-dimensional tissue cultures: current trends and beyond. *Cell Tissue Res.* 2013; 352: 123–131.
52. Saito H, Takeuchi M, Chida K, Miyajima A. Generation of glucose-responsive functional islets with a three-dimensional structure from mouse fetal pancreatic cells and iPS cells *in vitro*. *PLoS One.* 2011; 6: e28209.
53. Daoud J, Asami K, Rosenberg L, Tabrizian M. Long-term *in vitro* human pancreatic islet culture using three dimensional microfabricated scaffolds. *Biomaterials.* 2011; 32: 1536–1542.
54. Zhao V, Song C, Zhang W. The three-dimensional nanofiber scaffold culture condition improves viability and function of islets. *J. Biomat. Res. A.* 2010; 94 (3): 667–672.
55. Kaufman-Francis K, Koffler J, Weinberg N., Dor Y. & Levenberg S. Engineered vascular beds provide key signals to pancreatic hormone-producing cells. *PLoS One.* 2012; 7: e40741.
56. Hall KK, Gattas-Asfura KM, Stabler CL. Microencapsulation of islets within alginate/poly (ethylene glycol) gels cross-linked via Staudinger ligation. *Acta Biomater.* 2011; 7: 614–624.
57. Mason MN, Mahoney MJ. Inhibition of Gamma-Secretase Activity Promotes Differentiation of Embryonic Pancreatic Precursor Cells into Functional Islet-like Clusters in Poly(Ethylene Glycol) Hydrogel Culture. *Tissue Eng. Part A.* 2010; 16: 2593–2603.
58. Zhang Y, Jalili RB, Warnock GL., Ao Z, Marzban L, Ghahary A. Three-dimensional scaffolds reduce islet amyloid formation and enhance function of cultured human islets. *Am. J. Pathol.* 2012 Oct; 181 (4): 1296–1305.
59. Weber LM, He J, Bradley B., Haskins K, Anseth KS. PEG-based hydrogels as an *in vitro* encapsulation platform for testing controlled beta-cell microenvironments. *Acta Biomater.* 2006; 2: 1–8.
60. Cruise G, Hubbel J. *In vitro* and *in vivo* performance of porcine islets encapsulated in interfacially polymerized poly(ethylene glycol) diacrylate membranes. *Cell Transplant.* 1999; 8: 293–306.
61. Weber LM, Hayda KN, Haskins K, Anseth KS. The effects of cell-matrix interactions on encapsulated beta-cell function within hydrogels functionalized with matrix-derived adhesive peptides. *Biomaterials.* 2007; 28: 3004–3011.
62. Mason MN, Mahoney MJ. Selective beta-Cell Differentiation of Dissociated Embryonic Pancreatic Precursor Cells Cultured in Synthetic Polyethylene Glycol Hydrogels. *Tissue Eng. Part A.* 2009; 15: 1343–1352.
63. Sabra G, Vermette P. A 3D cell culture system: separation distance between INS-1 cell and endothelial cell monolayers co-cultured in fibrin influences INS-1 cells insulin secretion. *Biotechnol. Bioeng.* 2013; 110: 619–627.
64. Cheng JY, Raghunath M, Whitelock J, Poole-Warren L. Matrix components and scaffolds for sustained islet function. *Tissue Eng. Part B Rev.* 2011. 17: 235–247.
65. Stendahl J., Kaufman D, Stupp S. Extracellular matrix in pancreatic islets: Relevance to scaffold design and transplantation. *Cell Transplant.* 2009; 18: 1–12.
66. Coronel M., Stabler C. Engineering a local microenvironment for pancreatic islet replacement. *Curr. Opin. Biotechnol.* 2013; 24: 900–908.
67. Василец ВН. Методы изготовления матриц. *Биосовместимые материалы: учебное пособие.* Под ред. В.И. Севастьянова, М.П. Кирпичникова. М.: МИА, 2011: 229–236. Vasilets VN. Metody izgotovleniya matrixov. *Biosovmestimiye materialy: uchebnoye posobiye.* Pod red. V.I. Sevastianova, M.P. Kirpichnikova. M.: MIA, 2011: 229–236.
68. Понов ВК. Имплантаты в заместительной и регенеративной медицине костных тканей. 253–294. Попов ВК. Имплантаты в заместительной и регенеративной медицине костных тканей. 253–294.
69. Hyne RO. The extracellular matrix: not just pretty fibrils. *Science.* 2009; 326, 1216–1219.
70. Londono R, Badylak SF. Biologic Scaffolds for Regenerative Medicine: Mechanisms of *in vivo* Remodeling. *Annals of Biomedical Engineering.* March 2015; 43, Issue 3: 577–592.
71. Deijnen JHM., Hulstaert CE, Wolters GHJ, Schilfgaarde R. Significance of the peri-insular extracellular matrix for islet isolation from the pancreas of rat, dog, pig, and man. *Cell Tissue Res.* 1992; 267: 139–146.
72. Jiang F-X, Harrison LC. Extracellular signals and pancreatic beta-cell development: a brief review. *Mol. Med.* 2002; 8: 763–770.
73. Jiang F-X, Georges-Labouesse E, Harrison LC. Regulation of laminin 1-induced pancreatic beta-cell differentiation by alpha 6 integrin and alpha-dystroglycan. *Mol. Med.* 2001; 7: 107–114.
74. Pinkse GGM, Bouwman WP, Jiawan-Lalai R, Terpstra OT, Bruijn JA, Heer de E. Integrin signaling via RGD

- peptides and anti-1 antibodies confers resistance to apoptosis in islets of Langerhans. *Diabetes*. 2006; 55: 1–6.
75. Ris F, Hammar E, Bosco D, Pilloud C, Maedler K, Donath MY et al. Impact of integrin-matrix matching and inhibition of apoptosis on the survival of purified human beta-cells *in vitro*. *Diabetologia*. 2002; 45: 841–850.
 76. Hammar G, Parnaud D, Bosco E. Extracellular Matrix Protects Pancreatic beta-Cells Against Apoptosis. *Diabetes*. 2004; 53: 2034–2041.
 77. Deijnen JH, Snylichem Van M, Wolters Van PTR, Schilf-gaarde Van GHR. Cell & Tissue Distribution of collagens type I, type III and type V in the pancreas of rat, dog, pig and man. *Cell Tissue Res*. 1994; 277: 115–121.
 78. Hughes SJ, Clark A, McShane P, Contractor HH, Gray DW, Johnson PR. Characterisation of collagen VI within the islet-exocrine interface of the human pancreas: implications for clinical islet isolation? *Transplantation*. 2006; 8: 1. 423–426.
 79. Cirulli V, Beattie GM, Klier G. Expression and function of alpha(v)beta(3) and alpha(v)beta(5) integrins in the developing pancreas: roles in the adhesion and migration of putative endocrine progenitor cells. *J. Cell Biol*. 2000; 150: 1445–1460.
 80. Kaido T, Yebra M, Cirulli V, Montgomery AM. Regulation of human beta-cell adhesion, motility, and insulin secretion by collagen IV and its receptor alpha1 beta1. *J. Bio. Chem*. 2004; 279: 53762–53769.
 81. Yalili RB, Moeen-Rezakhanlou A, Hosseini-Tabatabaei A, Ao Z, Warnock GL. Fibroblast populated collagen matrix promotes islet survival and reduces the number of islet required for diabetes reversal. *J. Cell Physiol*. 2011; 226 (7): 1813–1819.
 82. Riopel M, Trinder M, Wang R. Fibrin, a scaffold material for islet transplantation and pancreatic endocrine tissue engineering. *Tissue Eng. Part B Rev*. 2014, Jul. 24 (Epub ahead of print).
 83. Kuehn C, Lakey JR, Lamb MW, Vermette P. Young porcine endocrine pancreatic islets cultured in fibrin show improved resistance toward hydrogen peroxide. *Islets*. 2013 Sep–Dec; 5 (5): 207–215. doi: 10.4161/isl.26989. Epub 2013 Nov.
 84. Севастьянов ВИ, Перова НВ, Немец ЕА и др. Примеры экспериментально-клинического применения биосовместимых материалов в регенеративной медицине. *Биосовместимые материалы: учебное пособие*. Под ред. В.И. Севастьянова, М.П. Кирпичникова. М.: МИА, 2011: 237–252. Sevastianov VI, Perova NV, Nemets EA i dr. Primery experimentalno-klinicheskogo primeneniya biosovmestimyykh materialov v regenerativnoy meditsine. *Biosovmestimiye materialy: uchebnoye posobiye*. Pod red. V.I. Sevastianova, M.P. Kirpichnikova. M.: MIA, 2011: 237–252.
 85. Fisher SA, Tam RY, Shoichet MS. Tissue mimetics: engineered hydrogel matrices provide biomimetic environments for cell growth. *Tissue Engineering*. 2014; Part A. 20: 895–898.
 86. Севастьянов ВИ, Перова НВ. Инъекционный гетерогенный биополимерный гидрогель для заместительной и регенеративной хирургии и способ его получения. Патент РФ № 2433828 (2010). Sevastianov VI, Perova NV. Inyectionsionniy geterogenniy biopolimerniy gidrogel dla zamestitelnoy i regenerativnoy khirurgii i sposob yego polucheniya. Patent RF 2433828 (2010).
 87. Перова НВ, Севастьянов ВИ. Биополимерный гетерогенный гидрогель Сферо®ГЕЛЬ – инъекционный биodeградируемый имплантат. *Практическая медицина*. 2014; 8 (84): 111–116. Perova NV, Sevastianov VI. Sfero®GEL – inyectionsionniy biodegradiruyemiy implantat. *Prakticheskaya meditsina*. 2014; 8 (84): 111–116.
 88. Chun S, Huang Y, Xie WJ, Hou Y, Huang RP, Song Y. Adhesive growth of pancreatic islet cells on a polyglycolic acid fibrous scaffold. *Transplant. Proc*. 2008; 40: 1658–1663.
 89. Daoud J, Asami K, Rosenberg L, Tabrizian M. Long-term *in vitro* human pancreatic islet culture using three dimensional microfabricated scaffolds. *Biomaterials*. 2011; 32, 1536–1542.
 90. Marchioli G, van Gurp L, van Krieken PP. Fabrication of three-dimensional bioplotting hydrogel scaffolds for islets of Langerhans transplantation. *Biofabrication*. 2015 May 28; 7 (2): 025009. doi: 10.1088/1758-5090/7/2/025009.
 91. Kaufman-Francis K, Koffler J, Weinberg N, Dor Y, Levenberg S. Engineered vascular beds provide key signals to pancreatic hormone-producing cells. *PLoS One*. 2012; 7: 740–741.
 92. O'Connell PJ, Holmes-Walker DJ, Goodman D, Hawthorne WJ, Loudovaris T, Gunton JE et al. Multicenter Australian Trial of Islet Transplantation: Improving Accessibility and Outcomes. *Am. J. Transplant*. 2013; 13: 1850–1858.

Статья поступила в редакцию 3.10.2016 г.
The article was submitted to the journal on 3.10.2016