

DOI: 10.15825/1995-1191-2017-2-90-97

СРАВНИТЕЛЬНЫЙ МОРФОЛОГИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ ИЗОЛИРОВАННЫХ ОСТРОВКОВ ПОДЖЕЛУДОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ КРЫСЫ, КУЛЬТИВИРУЕМЫХ В СТАНДАРТНЫХ УСЛОВИЯХ И С БИОПОЛИМЕРНЫМ МИКРОГЕТЕРОГЕННЫМ КОЛЛАГЕНСОДЕРЖАЩИМ ГЕЛЕМ

Л.А. Кирсанова, Н.В. Баранова, Г.Н. Бубенцова, В.И. Севастьянов

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

Введение. Внеклеточный матрикс, основным компонентом которого является коллаген, играет существенную роль в сохранении структурной целостности и обеспечении функции островков Лангерганса поджелудочной железы (ПЖ). Даже частичное воссоздание нативного микроокружения может оказаться полезным для сохранения жизнеспособности изолированных островков в условиях *in vitro* и *in vivo*. **Цель.** Провести сравнительный морфологический анализ островков крысы, культивируемых с биополимерным микрогетерогенным коллагенсодержащим гидрогелем (БМКГ) и в стандартных условиях *in vitro*. **Материалы и методы.** Островки изолировали из ПЖ ($n = 11$), ориентируясь на классическую методику с использованием коллагеназы, с некоторыми модификациями. Были использованы методы рутинного гистологического окрашивания, методы иммунофлуоресценции и иммуногистохимии. **Результаты.** Островки, культивируемые с БМКГ, не обнаруживали признаков деградации структуры и сохраняли жизнеспособность в течение 7 суток культивирования. **Вывод.** Выявлено позитивное влияние БМКГ на сохранение целостности и жизнеспособности островков.

Ключевые слова: островки Лангерганса, поджелудочная железа, внеклеточный матрикс, культивирование, коллагенсодержащий гель.

MORPHOLOGICAL ANALYSIS OF ISOLATED RAT PANCREATIC ISLETS CULTURED UNDER STANDARD CULTURE TECHNIQUE AND WITH BIOPOLYMER MICROSTRUCTURED COLLAGEN-CONTAINING HYDROGEL

L.A. Kirsanova, N.V. Baranova, G.N. Bubentsova, 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

Introduction. Extracellular matrix play an essential role in providing structural integrity and physiological support to Langerhans islets in pancreas. Imitation of the native microenvironment can be useful for viability of isolated pancreatic islets *in vitro* and *in vivo*. **Aim.** The purpose of this study was to characterize and compare the effect of biopolymer microstructured collagen-containing hydrogel (BMCH) on isolated rat islets survival. **Materials and methods.** Islets were isolated by classic collagenase techniques with some modifications. There were used hystological, immunofluorescence and immunohystochemistry methods. **Results.** Rat islets cultured with collagen-based gel don't revealed destructive changes of structure and remained viable 7 days incubation. **Conclusion.** Positive effect of BMCH to rat islet survival was revealed.

Key words: Langerhans islets, pancreas, extracellular matrix, culture, collagen-containing hydrogel.

Для корреспонденции: Баранова Наталья Владимировна. Адрес: 123182, Москва, ул. Щукинская, д. 1.
Тел. (499) 190-42-66. E-mail: barnats@yandex.ru.

For correspondence: Baranova Natalya Vladimirovna. Address: 1, Shchukinskaya st., Moscow, 123182, Russian Federation.
Tel. (499) 190-42-66. E-mail: barnats@yandex.ru

ВВЕДЕНИЕ

Трансплантация островков Лангерганса является обещающей альтернативой органной трансплантации поджелудочной железы при лечении сахарного диабета и может обеспечивать инсулинонезависимость больных на некоторый срок [1, 2]. Ограниченное время функционирования трансплантата в определенной степени может быть связано с повреждением островков во время процедуры изоляции [3, 4]. В процессе выделения островки не только утрачивают васкуляризацию и иннервацию, но также лишаются связей с внеклеточным матриксом (ВКМ), играющим значимую роль в сохранности островков. Показано, что компоненты ВКМ (коллаген, ламинин, фибронектин) участвуют в обеспечении механической поддержки, сохранении целостности и функционирования островков [5–8]. Воссоздание (имитация) нативного микроокружения может способствовать сохранению структуры и функции изолированных островков *in vitro* и *in vivo* [5, 6, 9, 10].

Наиболее важным по значимости среди компонентов ВКМ является коллаген, самый распространенный белок у млекопитающих [9, 10]. В панкреатической ткани широко распространены коллагены I и IV типа, которые не только выполняют поддерживающую, каркасную роль, но и, связываясь с рецепторами трансмембранных белков, оказывают влияние на функции островковых клеток [3, 4, 10]. Показано, что островки, культивируемые на коллагенсодержащих матриксах, длительное время после выделения сохраняли жизнеспособность и проявляли секреторную активность [5, 11]. Трансплантация таких островков оказывалась более успешной: островки сохраняли характерную для них архитектуру и отвечали секрецией инсулина при стимуляции глюкозой [3, 6].

Наибольший, с нашей точки зрения, интерес представляют собой матриксы из многокомпонентных гидрогелей, получаемых из тканей сельскохозяйственных животных и относящихся к так называемым биомиметикам ВКМ, обеспечивающие сходное с ВКМ микроокружение для роста клеток [12]. К таким биомиметикам ВКМ относится биополимерный микроструктурированный коллагенсодержащий гидрогель (БМКГ-матрикс) – многокомпонентный продукт из природных соединений [13]. Функциональная эффективность БМКГ-матрикса была доказана, например, при лечении гонартроза и травматических повреждениях периферических нервов [14–16].

Ранее нами было изучено влияние биополимерного микрогетерогенного коллагенсодержащего гидрогеля (БМКГ) на органотипические культуры островковых клеток новорожденных кроликов [17].

Известно, что фетальные и неонатальные островковые клетки более устойчивы к условиям гипоксии, нежели островки взрослых животных и человека [18], и легче адаптируются к условиям культивирования *in vitro*. Более того, в органотипических культурах помимо островковых клеток присутствуют и другие клеточные типы – протоковый эпителий, фибробласты. Согласно Федеральному закону от 23 июня 2016 г. № 180-ФЗ «О биомедицинских клеточных продуктах», при разработке биомедицинских клеточных продуктов, в том числе клеточно-инженерных конструкций поджелудочной железы (КИК ПЖ для лечения сахарного диабета), могут быть использованы только культуры ОЛ взрослого организма. В связи с этим актуальной и практически важной задачей является поиск способов повышения функциональной эффективности клеточной компоненты КИК ПЖ.

Настоящая работа посвящена исследованию влияния матрикса БМКГ на жизнеспособность и сохранность изолированных ОЛ половозрелых крыс в процессе их культивирования.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Экспериментальные животные

Исследования проводили на половозрелых крысах-самцах линии Vistar (180–220 г), полученных из питомника лабораторных животных ФГУП ОПХ «Манихино». Акклиматизацию и содержание лабораторных животных осуществляли в соответствии с ГОСТ ISO 10993-2-2009 «Изделия медицинские. Оценка биологического действия медицинских изделий». Часть 2. «Требования к обращению с животными».

Все манипуляции с животными проводили в соответствии с «Правилами проведения работ с использованием экспериментальных животных» от 1973 г. и правилами, принятыми Европейской конвенцией по защите позвоночных животных, используемых для исследований и других научных целей (European Convention for the Protection of Vertebrate Animals Used for Experimental and other Scientific Purposes (ETS 123) Strasbourg, 1986).

Коллагенсодержащий матрикс

В качестве коллагенсодержащего матрикса при культивировании островков Лангерганса (ОЛ) был выбран БМКГ-матрикс из линейного ряда композиции имплантируемого гетерогенного геля (рег. уд. № ФСР 2012/13033 от 15.07.2015 г., торговый знак *Сферо*®ГЕЛЬ, АО «Биомир сервис», г. Краснознаменск) [19]. Ранее проведенные исследования показали, что из существующего линейного ряда БМКГ-матрикса оптимальным для клеточно- и тканеинженерных конструкций является БМКГ со

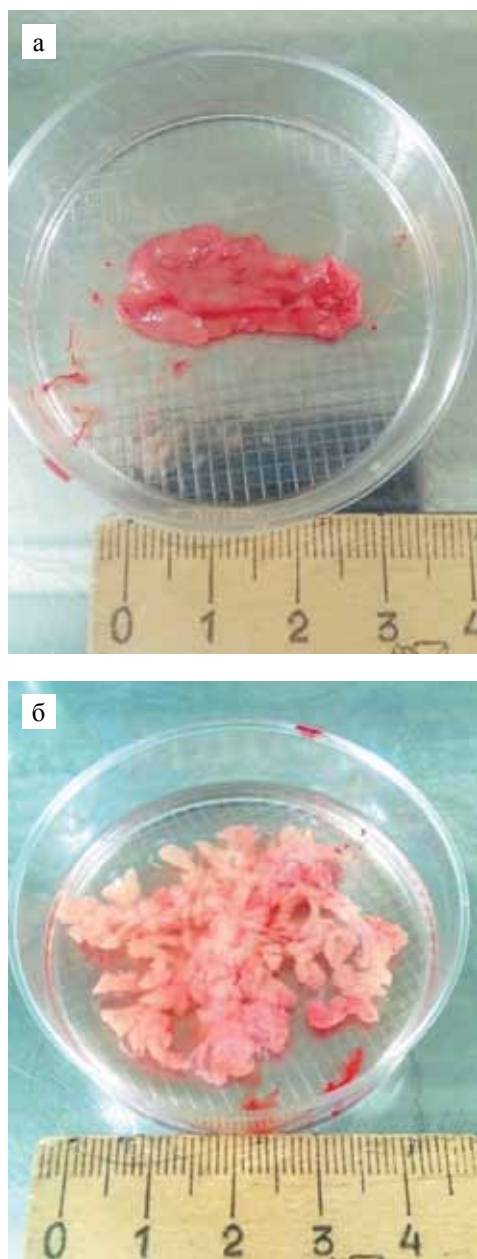


Рис. 1. Поджелудочная железа крысы: а – непосредственно после взятия (интактная железа); б – после обработки раствором коллагеназы

Fig. 1. Rat pancreas: а – intact gland; б – gland after injection collagenase solution

следующими характеристиками: средний размер микрочастиц – $145,79 \pm 0,09$ мкм; модуль упругости – 1170 ± 12 Па; модуль вязкости – $62,9 \pm 7,9$ Па; набухаемость – не ниже $86,6 \pm 3,0$ масс.%; время резорбции – до 9 месяцев.

Изоляция островков Лангерганса

Островки Лангерганса выделяли из поджелудочной железы 11 крыс. Процедуру выделения островков проводили, ориентируясь на классическую методику с использованием коллагеназы с некоторыми модификациями [20, 21].

Субтотально удаленную в стерильных условиях поджелудочную железу помещали в чашку Петри. Затем интрапаренхиматозно несколькими последовательными инъекциями вводили 10 мл раствора коллагеназы I типа («Sigma», активность 150 ед./мл) (рис. 1). Растянутую таким образом железу аккуратно разделяли на 10–12 равных частей, переносили во флакон и инкубировали 40 мин при $37,0\text{--}37,5^\circ\text{C}$. Переваривание останавливали добавлением холодного (4°C) раствора Хенкса. Флакон с дезагрегированной панкреатической тканью мягко встряхивали вручную в течение нескольких секунд. Образовавшиеся мелкие фрагменты фильтровали через металлическое сито с диаметром ячеек 0,6 мм. Перевар собирали в конические пробирки и центрифугировали 1 мин при скорости 600 об./мин.

Оценка содержимого осадка и надосадочной жидкости, проведенная с помощью инвертированного микроскопа (Nikon Eclipse TS 100), показала, что на дно пробирок осаждались клетки ацинарной ткани и одиночные островки. Основная масса островков обнаруживалась в надосадочной жидкости (супернатанте). Супернатант осторожно переносили в центрифужную пробирку и дважды отмывали 1 мин при 1100 об./мин.

Идентификация и подсчет островков

Идентификацию и подсчет островков осуществляли, проводя окрашивание дитизоном. В чашку Петри вносили 0,2–0,4 мл тканевой взвеси, добавляли 0,1–0,2 мл раствора дитизона и инкубировали в термостате в течение 20–30 мин при $37,0^\circ\text{C}$. Дитизон избирательно окрашивал панкреатические островки, при этом ацинарные клетки оставались неокрашенными. Подсчет окрашенных островков проводили с помощью инвертированного микроскопа при увеличении объектива $\times 10$.

Культивирование изолированных островков Лангерганса

Изолированные ОЛ ресуспендировали в среде DMEM, содержащей глюкозу (4,5 г/л), 10% эмбриональную телячью сыворотку, 2 мМ L-глутамин, 1 М Нерес и 80 мкг/мл гентамицина и по 1,5–2,0 мл вносили в 25 см² культуральные флаконы. Культивирование проводили при $37,0^\circ\text{C}$ в увлажненной атмосфере, содержащей 5% CO₂. Смену культуральной среды осуществляли через 2 суток инкубации.

Ежедневный мониторинг и фотосъемку культивируемых островков проводили с помощью инвертированного микроскопа Nikon Eclipse TS 100 (Nikon, Япония), оснащенного цифровой фотокамерой.

На третьи сутки инкубации в один из культуральных флаконов вводили 0,5–0,7 мл БМКГ и продолжали культивирование в прежних условиях до

достижения недельного срока. Островки, культивированные без добавления БМКГ, рассматривались в качестве контроля.

Прижизненное окрашивание панкреатических островков

Для определения жизнеспособности культивируемых островков проводили иммунофлуоресцентное окрашивание акридиновым оранжевым и пропидиум-йодидом на 3-и и 6-е сутки инкубации. Для этого 0,2–0,4 мл культуральной взвеси, содержащей островки, помещали в чашку Петри, добавляли 0,02–0,03 мл готового раствора красителей и инкубировали в темноте в течение 15–17 мин. Результат оценивали с помощью люминесцентного микроскопа Nikon Eclipse 50i (Nikon, Япония). Жизнеспособные клетки демонстрировали зеленую флуоресценцию, тогда как погибшие клетки, окрашенные пропидиум-йодидом, приобретали красную.

Гистологическое исследование островков

Для гистологического исследования свежeweделенные островки и островки, культивированные в течение 6–7 суток, фиксировали в смеси Буэна, обезживали в спиртах восходящей концентрации, выдерживали в смеси спирта и ксилола, ксилоле и заливали в парафин. Срезы толщиной 4–5 мкм, полученные на микротоме Leica RM 2245, депарафинировали, регидратировали и окрашивали гематоксилином и эозином, а также методом иммуногистохимии по классической методике с пероксидазой хрена и использованием антител к инсулину (anti-insulin, «Sigma»). Образование коричневого преципитата в цитоплазме клеток в результате иммуногистохимического окрашивания

позволяло идентифицировать инсулинпозитивные β -клетки в островках.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Свежeweделенные островки

Свежeweделенные островки, наблюдаемые в инвертированном микроскопе, демонстрировали в основном округлую или овальную форму и сохраняли целостность, что свидетельствовало о том, что в процессе изоляции макроструктура островков не пострадала (не была повреждена) (рис. 2, а). Значительная часть островков имела ровную поверхность, тогда как на поверхности некоторых островков обнаруживались неровности, шероховатости, образованные остатками окружающей экзокринной ткани.

Окрашивание дитизоном придавало островкам terraкотово-красный цвет и позволяло не только идентифицировать островки (рис. 3), но и подсчитать их количество: в 1 мл клеточной взвеси содержалось 235 ± 32 островка, а в целом из одной ПЖ крысы нам удавалось выделить 700–800 островков.

Проведенное гистологическое исследование показало, что островки на данном этапе сохраняли характерную для них структуру с преобладанием инсулинпозитивных β -клеток (рис. 2, б).

Культивированные островки

Наблюдение в инвертированном микроскопе показало, что островки, опытные и контрольные, в течение первых трех суток культивирования сохраняли первоначальные внешние характеристики. Прижизненное окрашивание акридиновым оранжевым и пропидиум-йодидом в люминесцентном микроскопе продемонстрировало зеленую флуоресценцию островков, подтверждающую их жизне-

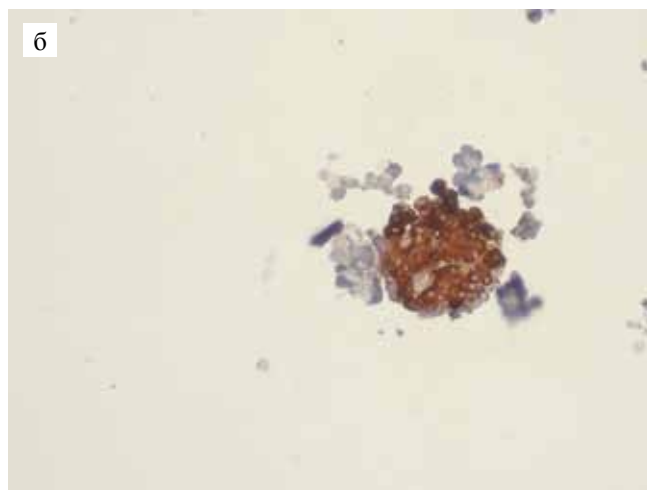
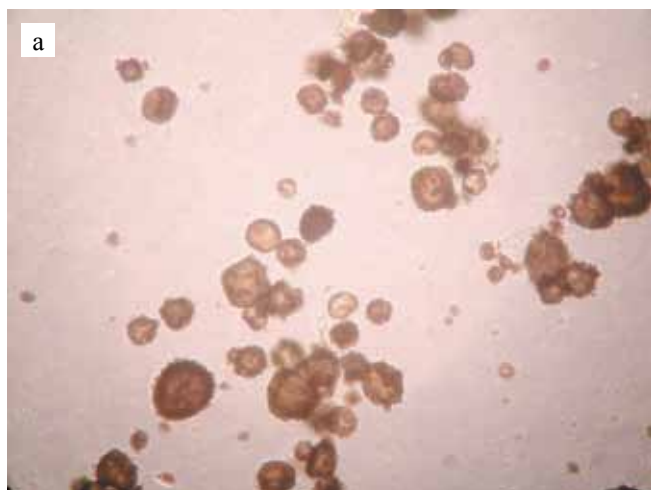


Рис. 2. Свежeweделенные панкреатические островки крысы: а – наблюдение в инвертированном микроскопе. $\times 100$; б – иммуногистохимическое окрашивание антителами к инсулину. $\times 200$

Fig. 2. Fresh isolated rat pancreatic islets: а – under inverted microscope. $\times 100$; б – immunohistochemical staining with anti-insulin antibodies. $\times 200$

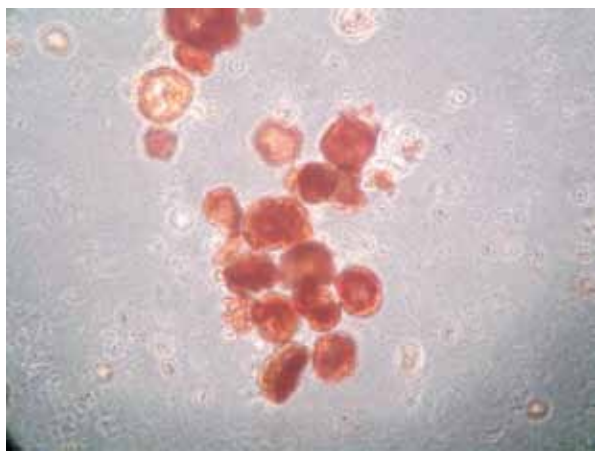


Рис. 3. Изолированные островки, окрашенные дитизоном. Наблюдение в инвертированном микроскопе. $\times 100$

Fig. 3. Isolated rat islets, dithizone staining. Inverted microscope. $\times 100$

способность (рис. 4, а). Одиночные, окрашенные в красный цвет пропидиум-йодидом, погибшие ацинарные клетки обнаруживались лишь в культуральной среде, окружающей островки.

Необходимо отметить, что островки, культивированные с коллагенсодержащим гелем, не проявляли адгезивных качеств, и находясь в непосредственной близости, не прикреплялись к гелю в течение всего срока наблюдения.

Через 6 суток культивирования наблюдаемая в инвертированный микроскоп Nikon Eclipse TS 100 морфологическая картина менялась. Обнаруживалось, что поверхность контрольных островков приобретала неровные очертания, становилась бугристой. В некоторых островках наблюдалось появление полостей, а в отдельных островках отмечались признаки фрагментации (рис. 5, а). Прижизненное окрашивание акридиновым оранжевым

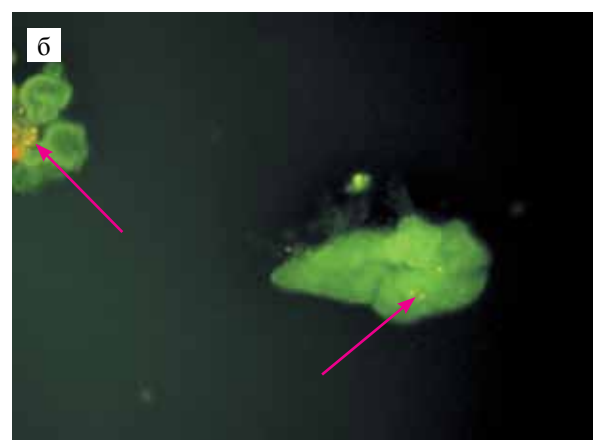
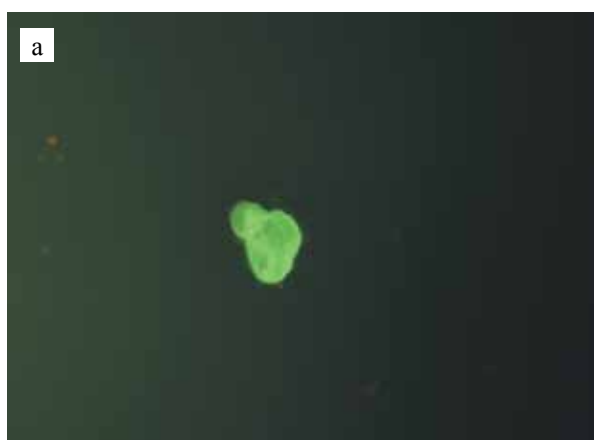


Рис. 4. Иммунофлуоресцентное окрашивание контрольных островков. Акридиновый оранжевый и пропидиум-йодид. $\times 100$: а – 3 суток культивирования; б – 6 суток культивирования. Погибшие клетки, окрашенные пропидиум-йодидом в красный цвет (указаны стрелками)

Fig. 4. Immunofluorescence, acridine orange and propidium-iodide staining. $\times 100$: а – 3 days incubation; б – 6 days incubation. Dead cells by propidium-iodide staining (arrows)

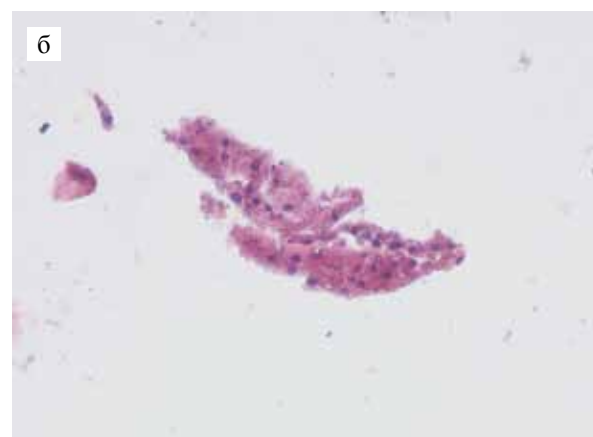
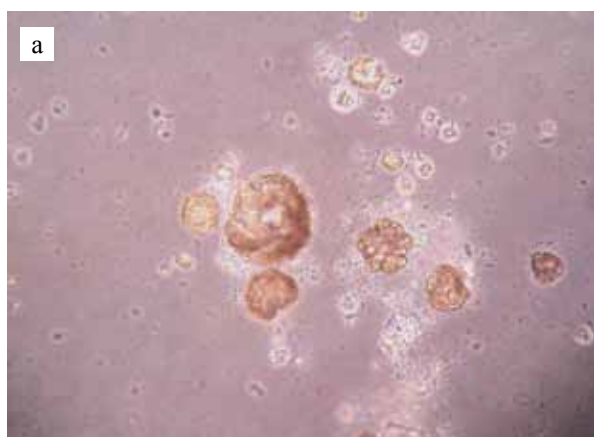


Рис. 5. Деструктивные изменения контрольных островков: а – наблюдение в инвертированном микроскопе. $\times 100$; б – пикнотичные ядра в клетках разрушающегося островка, гематоксилин и эозин. $\times 200$

Fig. 5. Destructive changes of the control islets: а – under inverted microscope. $\times 100$; б – cell picnotic nucleus in destroyed islet, haematoxylin and eosin. $\times 200$

и пропидиум-йодидом выявляло в сохранившихся островках наряду с живыми появлением погибших клеток с красной флуоресценцией (рис. 4, б), что коррелировало с гистологической картиной, выявляющей в таких островках многочисленные клетки с пикнотичными ядрами (рис. 5, б). Таким образом, на рубеже 6 суток культивирования большая часть контрольных островков претерпевала деструктивные изменения.

Островки, культивируемые с коллагенсодержащим матриксом, не обнаруживали признаков деградации структуры в течение 7 суток культивирования (рис. 7, а). Иммунофлуоресцентное окрашивание подтверждало жизнеспособность опытных островков (рис. 6). Гистологическое исследование ОЛ показало, что через 7 суток культивирования островки сохраняли целостность, не фрагментировались. При окрашивании гематоксилином и эозином ОЛ

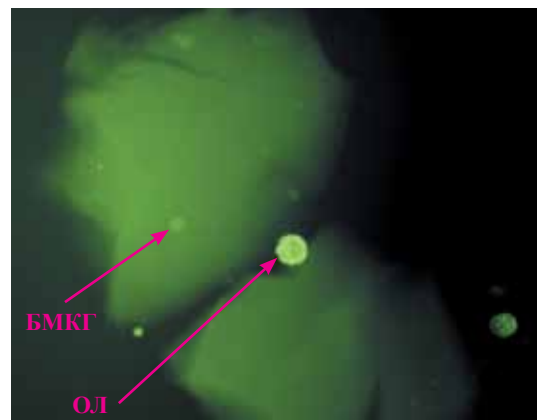


Рис. 6. Иммунофлуоресцентное окрашивание опытных островков. Акридиновый оранжевый и пропидиум-йодид. 6 суток инкубации. $\times 100$

Fig. 6. Immunofluorescence, acridine orange and propidium-iodide staining. 6 days incubation. $\times 100$

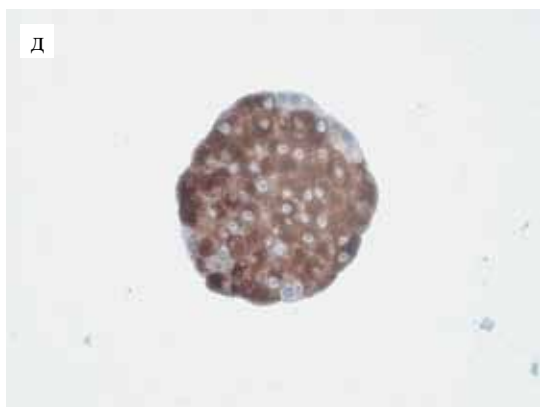
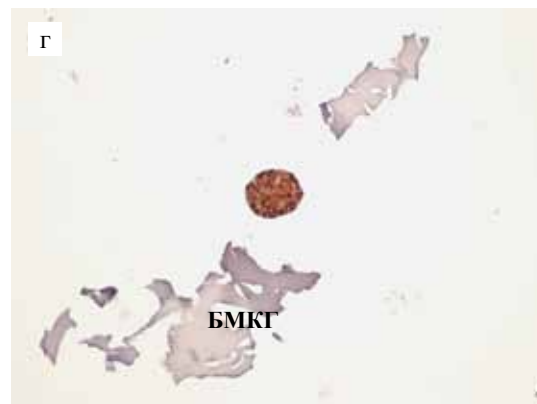
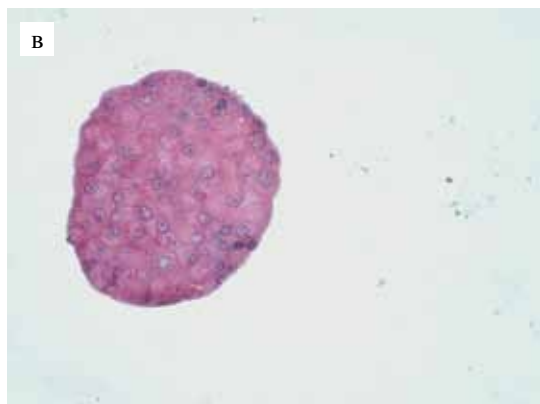
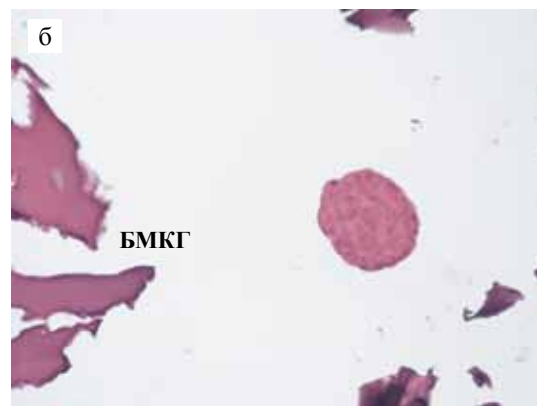
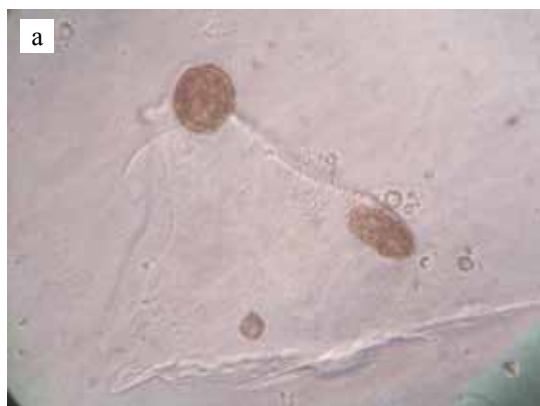


Рис. 7. Островки крысы, культивированные с коллагенсодержащим гелем. Семь суток культивирования (5 суток с гелем): а – островки, наблюдаемые в инвертированном микроскопе, $\times 100$; б – гематоксилин и эозин, $\times 200$; в – гематоксилин и эозин, $\times 400$; г – иммуногистохимическое окрашивание антителами к инсулину, $\times 100$; д – иммуногистохимическое окрашивание антителами к инсулину, $\times 400$

Fig. 7. Rat islets cultured with collagen-containing hydrogel. Seven days incubation (5 days with gel): а – islets under invert microscope, $\times 100$; б – haematoxylin and eosin, $\times 200$; в – haematoxylin and eosin, $\times 400$; г – immunohistochemical staining with anti-insulin antibodies, Abundant β -cells in islet. $\times 100$; д – immunohistochemical staining with anti-insulin antibodies, Abundant β -cells in islet. $\times 400$

представляли компактные образования, состоящие из некрупных светлых полигональных клеток с мелкозернистой цитоплазмой и четко очерченным сферической формы ядром. В ядре определялось крупное ядрышко и мелкодиспергированный хроматин (рис. 7, б, в). Описываемая гистологическая картина свидетельствовала о сохранении не только макроструктуры, но и базовой микроструктуры островков. При окрашивании антителами к инсулину подавляющее большинство клеток в ОЛ оказывалось иммунопозитивными β -клетками с обильной специфической зернистостью в цитоплазме (рис. 7, г, д).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

На основании проведенного морфологического анализа можно сделать вывод о том, что культивирование изолированных ОЛ с биополимерным микрогетерогенным коллагенсодержащим гидрогелем – биомиметиком внеклеточного матрикса, обладающего биоактивными свойствами и обеспечивающего для изолированных островков ПЖ сходное с нативным ВКМ микроокружение (нишу), обеспечивает их жизнеспособность, сохраняет целостность и характерную структуру *in vitro* в течение 7 суток. В то же время при культивировании в стандартных условиях (без добавления матрикса) культуры изолированных ОЛ к 6 суткам инкубации претерпевали деструктивные изменения.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ / REFERENCES

1. Shapiro AM, Hao EG, Lakey JR, Yakimets WJ, Churchill TA, Mitlianga PG, Papadopoulos GK et al. Novel approaches toward early diagnosis of islet allograft rejection. *Transplantation*. 2001 Jun 27; 71 (12): 1709–1718. PMID: 11455247.
2. Shapiro AM, Pokrywczynska M, Ricordi C. Clinical pancreatic islet transplantation. *Nat. Rev. Endocrinol.* 2016 Nov 11. doi: 10.1038/nrendo.2016.178. PMID: 27834384.
3. Llacua A, de Haan BJ, Sminc SA, de Vos P. Extracellular matrix components supporting human islet function in alginate-based immunoprotective microcapsules for treatment of diabetes. *J. Biomed. Mater. Res. A*. 2016 Jul; 104 (7): 1788–1796. doi: 10.1002/jbm.a.35706.
4. Stendahl JC, Kaufman DB, Stupp SI. Extracellular matrix in pancreatic islets: relevance to scaffold design and transplantation. *Cell Transplantation*. 2009; 18 (1): 1–12.
5. Abualhassan N, Sapozhnikov L, Pawlick RL, Kahana M, Pepper AR, Bruni A, Gala-Lopez B et al. Lung-derived microscaffolds facilitate diabetes reversal after mouse and human intraperitoneal islet transplantation. *PLoS One*. 2016 May 26; 11 (5): e0156053. doi: 10.1371/journal.pone.0156053. e Collection 2016. PMID 27227978.
6. Amer LD, Mahoney MJ, Bryant SJ. Tissue engineering approaches to cell-based type 1 diabetes therapy. *Tissue engineering*. 2014; part B, 20 (5): 455–467. doi: 10.1089/ten.TEB.2013.04.62. PMID: 24417705.
7. Hynes RO. The extracellular matrix: not just pretty fibrils. *Science*. 2009 Nov 27; 326 (5957): 1216–1219. doi: 10.1126/science.1176009. PMID: 19965464.
8. Tziampazis E, Sambanis A. Tissue engineering of a bioartificial pancreas: modeling the cell environment and device function. *Biotechnol. Prog.* 1995 Mar-Apr; 11 (2): 115–126. doi: 10.1021/bp00032a001. PMID: 7766095.
9. Ko JH, Kim YH, Jeong SH, Lee S, Park SN, Shim IK, Kim SC. Collagen esterification enhances the β -cells in 2D and 3D culture systems. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2015 Aug 7; 483 (4): 1084–1090. doi: 10.1016/j.bbrc.2015.06.062. PMID: 26079884.
10. Riopel M, Wang R. Collagen matrix support of pancreatic islet survival and function. *Front. Biosci.* (Landmark Ed). 2014 Jan 1; 19: 77–90. PMID: 24389173.
11. Szebeni GJ, Tancos Z, Feher LZ, Alfoldi R, Kobolak J, Dinnyes A, Puskas LG. Real architecture for 3D Tissue (RAFT) culture system improves viability and maintains insulin and glucagon production of mouse pancreatic islet cells. *Cytotechnology*. 2017; 69 (2): 359–369. doi: 10.1007/s10616-017-0067-6. PMID: 28/81140.
12. Fisher SA, Tam RY, Shoichet MS. Tissue mimetics: engineered hydrogel matrices provide biomimetic environments for cell growth. *Tissue Engineering*. 2014; Part A, 20 (5, 6): 895–898.
13. Севастьянов ВИ, Перова НВ. Инъекционный гетерогенный биополимерный гидрогель для заместительной и регенеративной хирургии и способ его получения. Патент РФ № 2433828 (2011). Sevast'yanov VI, Perova NV. In'ekcionnyj geterogennyj biopolimernyj gidrogel' dlya zamestitel'noj i regenerativnoj hirurgii i sposob ego polucheniya. Patent RF № 2433828 (2011).
14. Соловьева ИВ, Шестерня Н, Перова НВ, Севастьянов ВИ. Комбинированное применение биополимерного гетерогенного гидрогеля и гиалуроновой кислоты при ОА (первый опыт). *Врач*. 2016; 1: 12–17. Solovyeva IV, Shesternya N, Perova NV, Sevastianov VI. Coadministration of heterogeneous biopolymer hydrogel and hyaluronic acid in osteoarthritis: the first experience. *Vrach*. 2016; 1: 12–17.
15. Соловьева ИВ, Перова НВ, Севастьянов ВИ. Возможности применения биополимерного микрогетерогенного коллагенсодержащего геля при травмах и заболеваниях опорно-двигательного аппарата. *Современная медицина*. 2016; 2: 66–69. Solov'eva IV, Perova NV, Sevast'yanov VI. Vozmozhnosti primeneniya biopolimernogo mikrogeterogennogo kollagensoderzhashchego gelya pri travmah i zabolevaniyah oporno-dvigatel'nogo apparata. *Sovremennaya medicina*. 2016; 2: 66–69.
16. Федяков АГ, Древалъ ОН, Севастьянов ВИ, Перова НВ, Кузнецов АВ, Чапандзе ГН. Экспериментально-клиническое обоснование применения биодеградируемых имплантатов в хирургическом лечении поражений периферических нервов. *Вопросы нейрохирургии им. Н.Н. Бурденко*. 2010; 3: 15–18. Fed'akov AG, Dreval' ON, Sevast'yanov VI, Perova NV, Kuznecov AV, Chapandze GN. Ehksperimental'no-kli-

- nicheskoe obosnovanie primeneniya biodegradiruemih implantatov v hirurgicheskom lechenii porazhenij perifericheskikh nervov. *Voprosy neyrohirurgii im. N.N. Burdenko*. 2010; 3: 15–18.
17. 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*. 2014; VI: 120–124. Skaletskiy NN, Kirsanova LA, Sevastianov VI. Development and experimental research cell-engineering constructs from cultures of pancreatic islet cells and biodegradable scaffolds in order to stimulate the regeneration of β -cells in patients with diabetes. *Transplantation: results and prospects*. 2014; VI: 120–124.
 18. Hawthorne WJ, Simond DM, Stokes R, Patel AT, Walters S, Burgess J, O Connell PJ. Subcapsular fetal pig pancreas fragment transplantation provides normal blood glucose control in a preclinical model diabetes. *Transplantation*. 2011 Mar 15; 91 (5): 515–521. doi: 10.1097/TP.0b013e3182079474. PMID: 21183867.
 19. Готье СВ, Шагидулин МЮ, Онищенко НА, Севастьянов ВИ. Разработка и экспериментальное исследование тканеинженерных конструкций печени из ассоциатов клеток печени и биodeградируемых носителей. *Трансплантология: итоги и перспективы*. 2014; VI: 131–136. Gautier SV, Shagidulin MY, Onishchenko NA, Sevastianov VI. Development and experimental research hepar cell-engineering constructs from hepatocytes and biodegradable scaffolds. *Transplantation: results and prospects*. 2014; VI: 131–136.
 20. Berney T, Molano RD, Cattani P, Pileggi A, Vizzardelli C, Oliver R, Ricordi C, Inverardi L. Endotoxin-mediated delayed islet graft function is associated with increased intra-islet cytokine production and islet cell apoptosis. *Transplantation*. 2001 Jan 15; 71 (1): 125–132. PMID: 11211177.
 21. Kenmochi T, Asano T, Jingu K, Iwashita C, Miyauchi H, Takahashi S, Saito T, Ochiai T. Development of a fully automated islet digestion system. *Transplant. Proc.* 2000 Mar; 32 (2): 341–343. PMID: 10715434.

Статья поступила в редакцию 8.02.2017 г.
The article was submitted to the journal on 8.02.2017