

DOI: 10.15825/1995-1191-2018-2-74-81

## КУЛЬТУРЫ ОСТРОВКОВЫХ КЛЕТОК КАК КОМПОНЕНТ ТКАНЕИНЖЕНЕРНОЙ КОНСТРУКЦИИ ПОДЖЕЛУДОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ

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

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

**Цель работы** – разработка методов получения культур островковых клеток (ОК) с целью дальнейшего их использования в качестве клеточного компонента тканеинженерной конструкции поджелудочной железы (ПЖ). В качестве источника культур ОК была выбрана ПЖ новорожденных кроликов как доступная и хорошо изученная донорская модель. **Материалы и методы.** Культуры ОК выделяли из ПЖ 1–3-дневных новорожденных кроликов. Изменения, происходящие в процессе культивирования панкреатической ткани, фиксировали с помощью инвертированного микроскопа и биостанции. Морфологический анализ образцов культур проводили с использованием гистологических и специфических иммуногистохимических методов. Инсулинпродуцирующую активность культур определяли с помощью иммуноферментного анализа. **Результаты.** Получены три основных типа культур: флотирующие островковоподобные, имеющие органотипический характер, суспензионные, имеющие цитотипический характер, и однослойные, состоящие из прогениторных клеток протокового происхождения. Большая морфологическая сохранность и адекватная инсулинпродуцирующая способность была выявлена у флотирующих островковоподобных культур. **Заключение.** По своим морфофункциональным свойствам флотирующие островковоподобные культуры, полученные из ПЖ новорожденных кроликов, могут быть использованы в качестве основного клеточного компонента экспериментальной модели ТИК ПЖ.

*Ключевые слова:* поджелудочная железа новорожденных кроликов, культуры островковых клеток, морфологические исследования, продукция инсулина, тканеинженерная конструкция.

## ISLET CELL CULTURES AS COMPONENT OF TISSUE-ENGINEERING CONSTRUCT OF PANCREAS

*N.N. Skaletskiy, G.N. Skaletskaya, L.A. Kirsanova, N.V. Baranova,  
G.N. Bubentsova, V.I. Sevastianov*

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

**Aim:** to develop methods for obtaining islet cell cultures for the purpose of their further use as a suitable component of the pancreatic tissue engineered construct. As a source of islet cell cultures, pancreas of newborn rabbits was used as an accessible and well-studied donor model. **Materials and methods.** For the obtaining of islet cell cultures, pancreas of 1–3-day-old newborn rabbits were used. Changes occurring during the cultivation of pancreatic tissue were recorded using an inverted microscope and a biostation. Morphological analysis of culture samples was carried out using histological and specific immunohistochemical methods. The insulin-producing activity of the cultures was determined by enzyme immunoassay. **Results.** Three main types of cultures were obtained: islet-like organotypic, suspensionalcytotypic, and monolayered, consisting of progenitor cells. Greater morphological safety and adequate insulin-producing ability was revealed in floating islet-like cultures. **Conclusion.** According to their morphofunctional properties, flotation islet-like cultures obtained from pancreas of the newborn rabbits can be used as basal cell component of the experimental model of the tissue engineered construct of the pancreas.

*Key words:* pancreas of newborn rabbits, culture of islet cells, morphological studies, insulin secretion, tissue engineering construct.

**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 Nikolay Nikolaevich. Address: 1, Shchukinskaya st., Moscow, 123182, Russian Federation.  
Tel.: (499) 190-42-66; (903) 790-95-39. E-mail: NSkaletsky@mail.ru

## ВВЕДЕНИЕ

Благодаря проведению в последние годы многочисленных исследований в клеточной биологии и прогрессу в разработке биосовместимых материалов [1–3] стало возможным создание тканеинженерных конструкций.

Основным определяющим, и пожалуй, наиболее сложным по созданию компонентом любой тканеинженерной конструкции (ТИК) является ее тканевая (клеточная) составляющая. Если изначально тканевый (клеточный) компонент не обладает достаточной жизнеспособностью и функциональной активностью, то становится невозможным успешное испытание ТИК *in vitro*, и тем более *in vivo*. При создании ТИК поджелудочной железы (ПЖ) неотъемлемым качеством клеточного компонента является его способность осуществлять адекватную продукцию инсулина на протяжении длительного времени.

Благодаря достижениям современной биологии из различных типов клеток, прежде всего стволовых, могут быть получены клетки, способные секретировать инсулин. Наиболее обнадеживающими по-прежнему являются попытки получения инсулинпродуцирующих клеток из мезенхимальных стволовых клеток (МСК). В ряде работ [4–6] исследовали возможность дифференцировки МСК в эндокринные клетки ПЖ, включая  $\beta$ -клетки, но с ограниченным успехом. При этом их способность осуществлять адекватную секрецию инсулина, аналогичную нативным островкам ПЖ, вызывает обоснованные сомнения. Это понятно, так как в должной мере повторить структурно-функциональные особенности островков естественного происхождения практически невозможно. Поэтому в качестве тканевого компонента ТИК ПЖ идеально использовать островки донорской ПЖ. Клиническое применение аллогенных островков по понятной причине (дефицит посмертных доноров) крайне ограничено. Единственной достойной альтернативой является использование островков животных, которые могут быть получены в необходимом, практически неограниченном количестве. Хотя по ряду субъективных и объективных причин (в первую очередь, из-за предполагаемой опасности передачи человеку вирусной инфекции) клиническое применение клеточной ксенотрансплантации крайне затруднено, проведение экспериментов по использованию островков животных, которые являются идеальной моделью клеточного компонента ТИК ПЖ, безусловно, целесообразно. Их результаты могут быть с успехом реализованы после снятия моратория на клиническую клеточную ксенотрансплантацию.

Целью нашего исследования была разработка методов получения культур островковых клеток из поджелудочной железы новорожденных кроликов

с целью дальнейшего их использования в качестве клеточного компонента ТИК ПЖ.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Донорами ПЖ служили 1–3-дневные новорожденные кролики ( $n = 240$ ), которые доставлялись из специализированного питомника Федерального государственного бюджетного учреждения науки «Научный центр биомедицинских технологий Федерального медико-биологического агентства». Каждая партия животных (не менее 20 голов) сопровождалась представлением ветеринарного свидетельства, подтверждавшего отсутствие в кролиководческом хозяйстве инфекционных заболеваний.

В день доставки животных подвергали эвтаназии путем дислокации спинного мозга, сразу после которой в стерильных условиях вскрывали брюшную полость и иссекали ПЖ, которую немедленно помещали в чашку Петри с холодным (+4 °С) раствором Хенкса без фенолового красного. Дальнейшие манипуляции по получению культур проводились в условиях ламинарного бокса, обеспечивающего поток стерильного воздуха.

После последовательного извлечения и помещения в чашку Петри с холодным раствором 10 ПЖ новорожденных кроликов быстро, но тщательно очищали от капсулы и видимых кровеносных сосудов и выводных панкреатических протоков с помощью глазных пинцетов. Затем каждый очищенный таким образом орган разрезали на фрагменты размерами 2–3 мм. Полученные панкреатические микрофрагменты переносили на вогнутую поверхность часового стекла и 3 раза промывали холодным бесцветным раствором Хенкса. Затем с помощью острых глазных ножниц в течение 10–12 мин тщательно измельчали ткань ПЖ до микрофрагментов размером не более 1 мм. Образовавшуюся тканевую массу промывали холодным раствором Хенкса. После удаления последнего измельченную ткань ресуспендировали в 5 мл среды 199 и переносили в культуральный флакон площадью 75 см<sup>2</sup>, равномерно распределяя полученную суспензию по его дну. Затем во флакон вносили 20 мл среды 199 и 2 мл эмбриональной телячьей сыворотки. В процессе подготовки культуры в качестве сбалансированного солевого раствора использовали раствор Хенкса и среду 199, изготовленные в Институте полиомиелита и вирусных энцефалитов им. М.П. Чумакова РАМН, в качестве добавки – эмбриональную телячью сыворотку фирмы NuClone (Бельгия).

В опытах по получению культур из ПЖ использовали одноразовую пластиковую лабораторную посуду (культуральные флаконы, пипетки, чашки Петри, скребки и др.) фирмы Corning (США).

Выращивание культур проводили в инкубаторе Sanyo при 37 °С в увлажненной атмосфере, содержа-

шей 5% CO<sub>2</sub>. Наблюдение за формированием культур и их последующей инкубацией с биополимерными матриксами проводили через инвертированный микроскоп Nikon Eclipse TS 100 путем ежедневного мониторинга и значимые изменения фиксировали с помощью цифровой фотокамеры. В части исследований для выявления деталей морфологических изменений, происходящих при различных вариантах культивирования, инкубацию и микроскопическое наблюдение осуществляли в условиях биостанции Nikon IMq, позволяющей проводить мониторинг изменений в любой части культуры путем ежечасного (или с другим временным интервалом) фотографирования объекта на протяжении многих суток. Эта биостанция включает в себя автоматизированный инвертированный микроскоп, обеспечивающий высококачественные фазово-контрастные изображения, инкубатор и охлаждаемую ССD камеру. Клеточные культуры в биостанции всегда находятся в условиях заданной температуры, влажности и уровня CO<sub>2</sub>.

Для гистологического исследования на определенных сроках формирования культур производили забор их образцов. Полученный материал фиксировали в формалине или смеси Буэна. После рутинной процедуры обезвоживания образцы заливали в парафин. Среды толщиной 4 мкм окрашивали гематоксилином и эозином, а также подвергали иммуногистохимическому окрашиванию по стандартной методике с пероксидазой хрена для выявления основных типов островковых клеток с использованием соответствующих моноклональных антител: antiinsulin и antiglucagon (Sigma, США). Для выявления протокового эпителия, являющегося источником прогениторных клеток, 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 ретрификации инкубацией в 0,1% растворе трипсина при 37 °С в течение 30 минут.

Содержание инсулина в культуральной жидкости определяли с помощью набора для иммуноферментного анализа фирмы DRG (Германия). При этом определяли не только базальную концентрацию гормона, но и ее изменение под влиянием традиционных стимуляторов секреции инсулина: повышенного до 25 ммоль/л содержания глюкозы в культуральной среде (имитация высокого уровня гипергликемии) и теofilлина (10 ммоль/л). Теофиллин используется в этом тесте для повышения инсулинпродуцирующей реакции на высокую концентрацию глюкозы через его действие по повышению внутриклеточного уровня цАМФ путем ингибирования фосфоэстеразы. Ниже описывается более подробно процедура этих исследований.

Из флакона с культурами островковых клеток, полученными из поджелудочных желез новорожденных кроликов, на 10–12-дневном сроке инкубации удаляется ростовая среда и заменяется свежей питательной средой с низким содержанием глюкозы (2,8 ммоль/л). После 24-часовой инкубации в обычных условиях (37 °С, 5% CO<sub>2</sub>) берется проба (в 3 экземплярах) ростовой среды и замораживается (–20 °С). Сразу же из флакона с культурами удаляется ростовая среда и заменяется свежей с высокой концентрацией глюкозы и добавлением теofilлина. Через 60 минут инкубации в указанных условиях берется проба (в 3 экземплярах) ростовой среды и замораживается (–20 °С).

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Для выбора наиболее рациональных подходов к получению культур ОК, было решено провести наблюдение за морфологическим состоянием механически измельченной ткани ПЖ новорожденных кроликов с целью выявления изменений, происходящих как бы спонтанно при ее культивировании *in vitro*. Железу подвергали только очистке от соединительно-тканной капсулы, видимых сосудов и выводных протоков и микродиссекции, не применяя обработки каким-либо ферментным препаратом. При этом мы все-таки рассчитывали на то, что при измельчении панкреатической ткани последняя будет неизбежно подвергнута деликатному воздействию тех протеолитических ферментов, которые будут высвобождаться при механическом разрушении экзокринных (ацинарных) клеток.

При наблюдении с помощью инвертированного микроскопа Nikon Eclipse TS 100 и анализе серийного фотографирования, выполненного в условиях биостанции Nikon IMq, были выявлены следующие структурные изменения в инкубируемых микрофрагментах ПЖ.

Уже через 2–3 суток культивирования панкреатических микрофрагментов в них отмечалась выраженная, прогрессирующая и необратимая деграция экзокринных клеток. В последующие несколько дней происходила их гибель и элиминация. Образовавшиеся при этом детритные массы удаляли при очередной смене ростовой среды. В результате происходило как бы самоочищение островковой ткани от окружающей ее экзокринной ткани. К 4–5-м суткам образовавшиеся структуры в определенной степени напоминали плавающие ананасы (рис. 1), в которых быстро уменьшающийся в объеме «пучок листьев» представлял собой погибающую экзокринную ткань, а остающийся «плод» – уплотняющуюся островковую ткань.

В то же время на поверхности многих флотирующих (свободно плавающих) панкреатических микрофрагментов, постепенно приобретающих шарообразную или овоидную форму, появлялись единичные клетки эпителиального характера, мигрирующие из объема микрофрагментов, и вскоре наблюдаемый

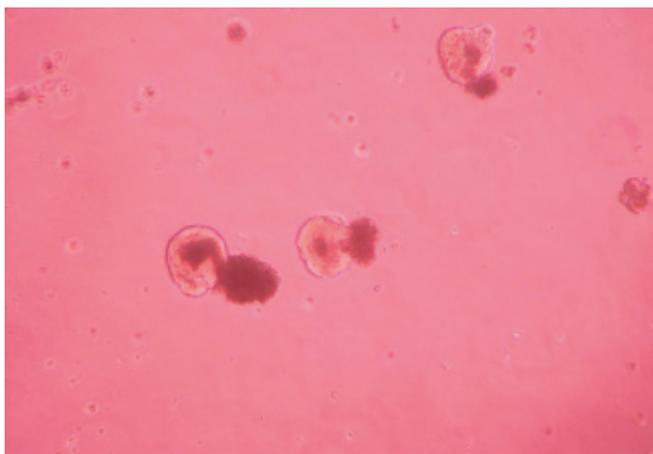


Рис. 1. Состояние культуры после 4-суточной инкубации микрофрагментов ПЖ: самоочищение островковой ткани от экзокринной ткани. Инвертированный микроскоп. ×40

Fig. 1. The state of the culture after a 4-day incubation of the pancreatic microfragments: self-cleaning of islet tissue from exocrine tissue. Inverted microscope. ×40

процесс приобретал достаточно интенсивный характер (рис. 2).

При этом вышедшие клетки начинали группироваться и образовывать вокруг флотирующих микрофрагментов нечто похожее на корону, состоящую из эпителиальных клеток. Затем эти клетки, по одной или группами, начинали покидать поверхность формирующихся флотирующих структур и оседать на дно культурального флакона (рис. 3). В результате такой своеобразной миграции отделившиеся клетки начинали более или менее равномерно покрывать его поверхность. При этом осевшие «клетки-мигранты»

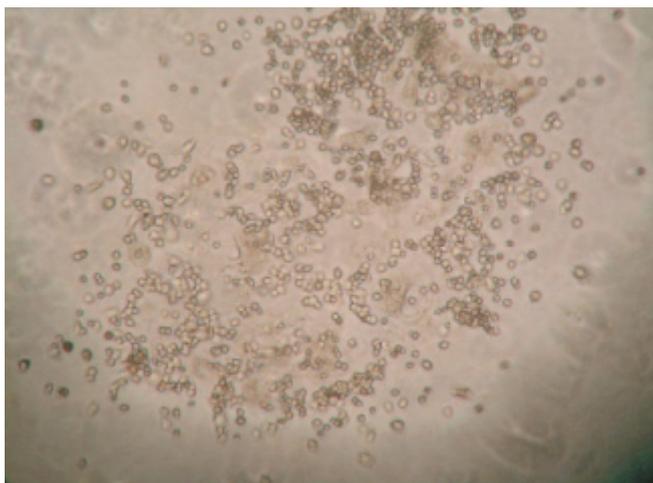


Рис. 3. Мигрировавшие островковые клетки покрывают значительную поверхность дна культурального флакона. Инвертированный микроскоп. ×40

Fig. 3. The migrated islet cells cover a significant surface of the bottom of the culture flask. Inverted microscope. ×40

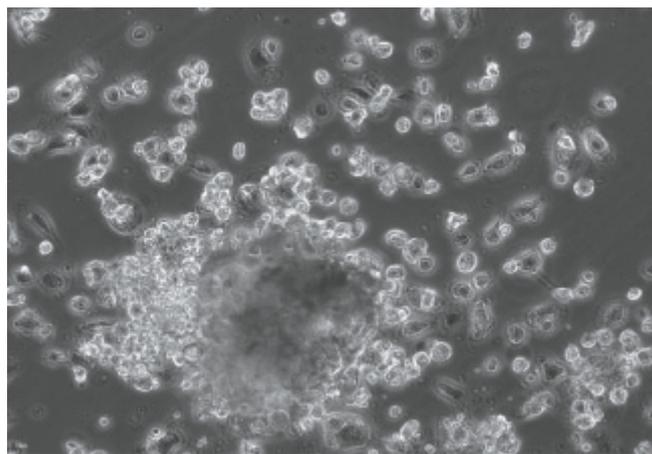


Рис. 2. Миграция островковых клеток из панкреатического микрофрагмента. Инвертированный микроскоп биостанции. Фазовый контраст. ×100

Fig. 2. Migration of islet cells from the pancreatic microfragment. Inverted biostation microscope. Phase contrast. ×100

с помощью псевдоподий начинали перемещаться по дну культурального флакона и, кооперируясь друг с другом, образовывать диплеты, триплеты, различной величины скопления (кластеры). К 6–7-м суткам инкубации активная миграция приводила к тому, что многочисленные островковые клетки, как отдельные, так и в виде кластеров, покрывали значительную часть культурального флакона (рис. 3).

Однако в это же время в мигрировавших и осевших островковых клетках начинали появляться признаки их деградации, которые проявлялись прежде всего в вакуолизации цитоплазмы (рис. 4). В даль-

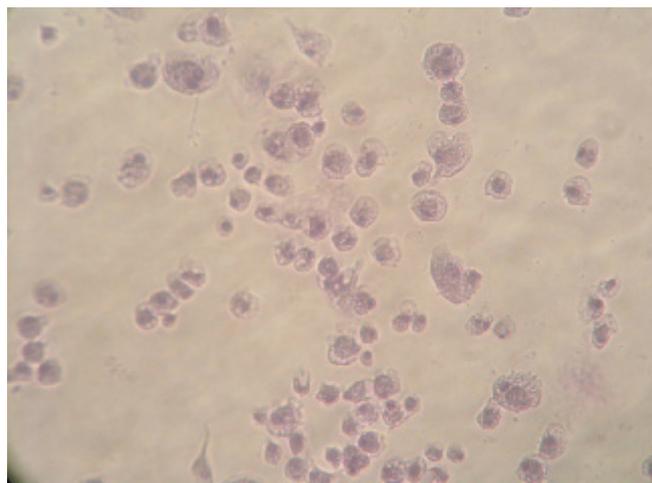


Рис. 4. Вакуолизация цитоплазмы мигрировавших островковых клеток. Окрашивание гематоксилином. ×100

Fig. 4. Vacuolization of the cytoplasm of migrated islet cells. Staining with hematoxylin. ×100

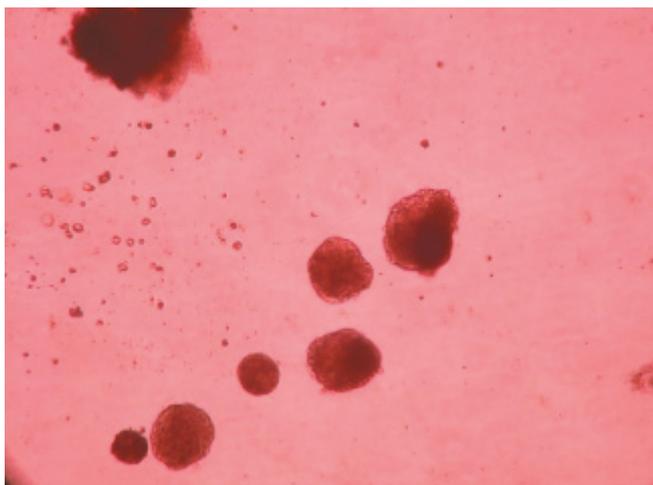


Рис. 5. Флотирующие культуры, полученные из ПЖ новорожденных кроликов. Инвертированный микроскоп.  $\times 40$

Fig. 5. Flotation cultures obtained from the pancreas of newborn rabbits. Inverted microscope.  $\times 40$

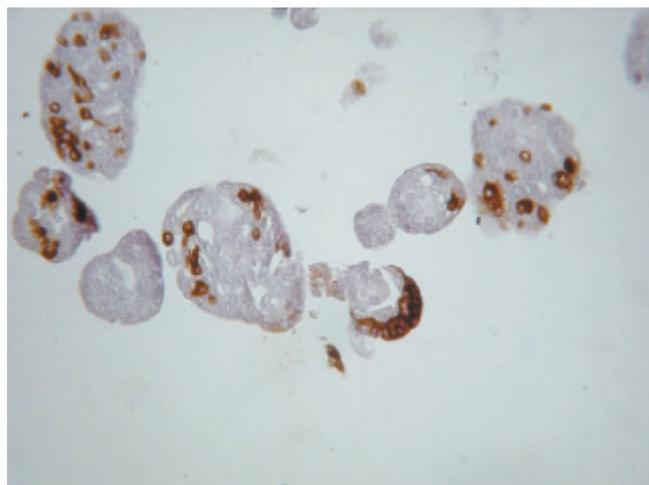


Рис. 6. Флотирующие культуры, полученные из поджелудочной железы новорожденных кроликов. Иммунопозитивное окрашивание  $\beta$ -клеток антителами к инсулину.  $\times 200$

Fig. 6. Flotation cultures obtained from the pancreas of newborn rabbits. Immunopositive staining of  $\beta$ -cells with antibodies to insulin.  $\times 200$

нейшем дегенеративные процессы охватывали все большее количество клеток-мигрантов, и к исходу 2 недель их деградация приобретала массовый характер. Погибшие клетки (как остатки экзокринной ткани, так и апоптировавшие островковые) превращались в детрит, который удалялся из культуры при очередной смене ростовой среды.

В результате после гибели и элиминации экзокринной ткани и мигрировавших островковых клеток в культуре сохраняются только свободно плавающие (флотирующие), с четкими очертаниями плотные структурные образования шарообразной или овоидной формы (рис. 5).

Специфическое иммуногистохимическое окрашивание таких культур выявило наличие значительного количества главных островковых клеток:  $\beta$ -клеток и  $\alpha$ -клеток (рис. 6 и 7), что дало основание называть такие флотирующие культуры островковоподобными.

В то же время часть культивируемых микрофрагментов ПЖ на 3–4-е сутки инкубации оседала на дно культурального флакона и прикреплялась к нему. Еще через 2–3 суток отмечалось появление монослоя вокруг очага прикрепления панкреатической ткани (рис. 8, а).

В дальнейшем происходило значительное увеличение площади монослоя. По мере периферического однослойного роста наблюдалось постепенное «истощение», а затем и исчезновение очага изначальной адгезии панкреатической ткани. В результате к 12–14-м суткам образовывался однородный клеточный пласт (рис. 8, б). Проведенные ранее иммуногистохимические исследования [4] показали, что свыше 90% клеток, формирующих такие однослойные

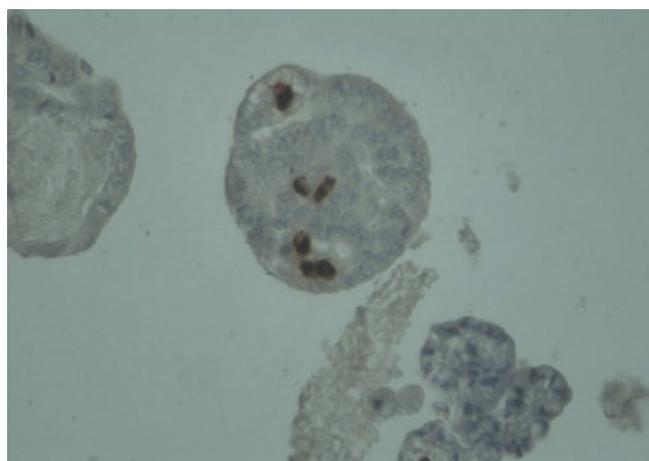


Рис. 7. Флотирующие культуры, полученные из поджелудочной железы новорожденных кроликов. Иммунопозитивное окрашивание  $\alpha$ -клеток антителами к глюкагону.  $\times 400$

Fig. 7. Flotation cultures obtained from the pancreas of newborn rabbits. Immunopositive staining of  $\alpha$ -cells with antibodies to glucagon.  $\times 400$

культуры, являются прогениторными клетками ПЖ. Полученные данные позволяют определить, что основным клеточным типом, формирующим монослой, является панкреатический протоковый эпителий, который как раз и служит источником прогениторных клеток ПЖ. При этом негативная реакция на окрашивание монослоя антителами к инсулину и глюкагону свидетельствовала об отсутствии достаточной дифференцировки прогениторных клеток в островковые клетки на данном сроке культивирования.

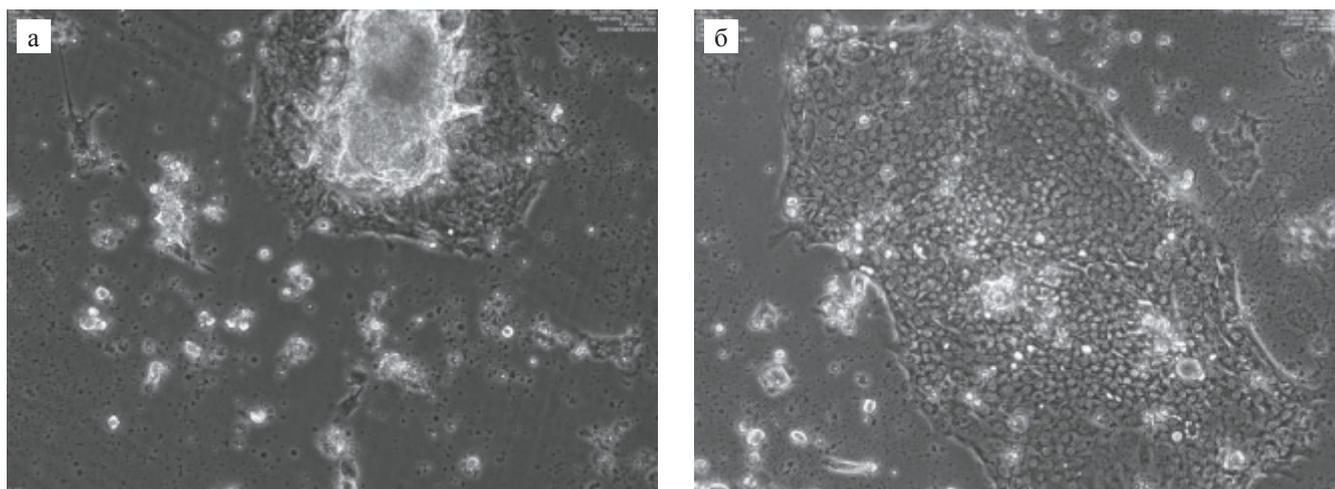


Рис. 8. Формирование монослоя эпителиальных клеток вокруг очага прикрепления микрофрагмента ПЖ новорожденного кролика на 6-е (а) и 12-е (б) сутки культивирования. Инвертированный микроскоп биостанции. Фазовый контраст.  $\times 100$

Fig. 8. Formation of a monolayer of epithelial cells around the attachment site of a newborn rabbit microfragment to the 6th (a) and 12th (b) day of culture. Inverted biostation microscope. Phase contrast.  $\times 100$

Таким образом, были получены три основных типа культур островковых клеток: флотирующие островковоподобные, имеющие органотипический характер, суспензионные цитотипические, полученные в результате миграции островковых клеток, и прогениторные клетки, происходящие из эпителия выводных протоков. Для определения возможности дальнейшего использования полученных культур в качестве компонента тканеинженерной конструкции была проведена их морфофункциональная оценка.

Так как в состав ТИК ПЖ должны входить островковые клетки, способные к адекватной инсулин-продуцирующей активности, было решено не использовать с этой целью культуры, состоящие из прогениторных клеток. Последние не содержат существенного количества зрелых  $\beta$ -клеток и поэтому не могут секретировать значимое количество инсулина. Возможно, в дальнейших исследованиях будут созданы условия для активной дифференцировки прогениторных клеток в  $\beta$ -клетки, что обусловит их включение в клеточный компонент ТИК ПЖ.

Цитотипические культуры, представляющие собой суспензию островковых клеток, не могут служить основным компонентом ТИК ПЖ по другой причине. Несмотря на содержание значительного количества инсулинпродуцирующих зрелых  $\beta$ -клеток, суспензионные культуры, как оказалось, не обладают достаточной жизнеспособностью: уже к 5–7-м суткам инкубации *in vitro* у части культивируемых клеток отмечалась вакуолизация цитоплазмы, которая в дальнейшем приобретала массовый характер, и к исходу 10–12-х суток инкубации доля жизнеспособных клеток была уже очень мала. Кроме того, следует

отметить, что довольно высокая концентрация инсулина, которая была зарегистрирована на 7-е сутки инкубации на ее базальном уровне (возможно, частично за счет освобождения инсулина из разрушающихся  $\beta$ -клеток), после стимуляции практически не повышалась, что свидетельствовало о неспособности содержащихся в культуре  $\beta$ -клеток осуществлять выброс инсулина по принципу обратной связи, что необходимо для их функционирования *in vivo*. Однако такие суспензионные культуры цитотипического характера, состоящие из ОК, очищенных от экзокринных элементов, имеют определенную ценность как клеточный препарат, который может использоваться в непродолжительных экспериментах по испытанию сахароснижающих и других фармакологических веществ, воздействующих на островковый аппарат ПЖ. Очень важным является то, что такие культуры могут быть получены как бы естественным путем, в результате спонтанной клеточной миграции при инкубации микрофрагментов ПЖ. Этот подход к получению препарата ОК в корне отличается от способов выделения очищенной фракции  $\beta$ -клеток, применяющихся не одно десятилетие и состоящих из целого ряда методических приемов [5]. Они включают прежде всего процедуру изоляции островков, требующую как минимум применения ферментного переваривания и центрифугирования в градиентах плотности. Затем проводится диссоциация островков с целью получения суспензии ОК. При этом применение таких далеко не деликатных, даже насильственных, манипуляций приводит не только к существенной потере ценного клеточного материала, но и к снижению функциональных возможностей выделенных клеток.

В отличие от описанных двух типов культур (прогениторные и суспензионные цитотипические) флоатирующие культуры по мере инкубации приобретали островковоподобные черты и длительно сохраняли жизнеспособность и гормональную активность. При этом они продуцировали инсулин *in vitro* по принципу обратной связи, что было подтверждено тем, что базальный уровень концентрации инсулина увеличивался более чем в 1,5 раза после стимуляции высокой концентрацией глюкозы и теофиллином (рис. 9).

Поэтому такие органотипические культуры, которые были названы нами флоатирующими островковоподобными культурами, могут быть использованы в качестве основного компонента ТИК ПЖ.

### ЗАКЛЮЧЕНИЕ

То что из трех типов культур, полученных при длительной инкубации ткани ПЖ новорожденных кроликов, выбор сделан в пользу флоатирующих островковоподобных культур, является и вполне обоснованным, и логичным, потому что самыми естественными и поэтому наиболее совершенными продуцентами инсулина могут быть только  $\beta$ -клетки, находящиеся в островках поджелудочной железы – структурах, созданных самой природой. Однако помимо достижения высокой степени сходства культур с нативными островками, очень важным с практической точки зрения является получение максимально возможного количества островковой ткани, изначально заложенного в донорской ПЖ. В связи с этим при дальнейших исследованиях следует решить некоторые задачи. Первая из них – исключить в процессе формирования флоатирующих островковоподобных культур значимую миграцию ОК из инкубируемых панкреатических микрофрагментов, так как это приводит к частичной потере количества  $\beta$ -клеток и снижению потенциальной инсулинпродуцирующей активности получаемых культур. Вторая задача – в случаях невозможности купирования миграционного процесса обеспечить условия для формирования островковоподобных скоплений из отделившихся клеток и длительного сохранения их жизнеспособности и функциональной способности. Это в значительной мере может быть реализовано благодаря выявленной нами склонности клеток-мигрантов к кооперации и образованию кластеров. Учитывая их непродолжительную выживаемость при инкубации на культуральном пластике, потребуется использование биополимерного матрикса (прежде всего коллагенсодержащего гидрогеля) в качестве подложки с целью сохранения морфофункциональных свойств мигрировавших ОК и достижения вполне вероятного формирования островковоподобных кластеров, которые могут быть применены в качестве компонента ТИК ПЖ.

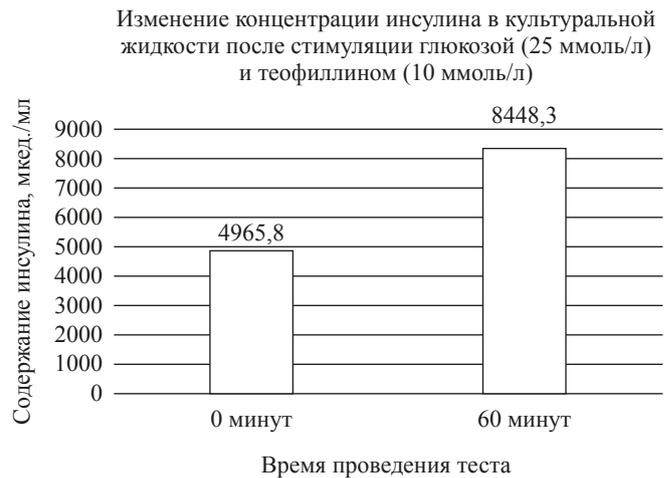


Рис. 9. Результаты стимуляционного теста на 10-е сутки инкубации флоатирующих островковоподобных культур

Fig. 9. Results of the stimulation test for 10th day incubation of floating islet-like cultures

Очень перспективным дополнительным источником островковой ткани могут стать однослойные культуры, полученные нами из протокового эпителия. Так как последний находится в экзокринной ткани, то целесообразно проведение ее специального культивирования с целью получения возможно большего количества пластов протокового эпителия, который, как было показано, в определенной степени представляет собой прогениторные клетки, способные дифференцироваться в ОК. В связи с этим в процессе получения флоатирующих островковоподобных культур отделяющаяся экзокринная ткань не будет удаляться, а будет использоваться для культивирования с целью получения протокового эпителия. При дальнейшей инкубации последнего должны быть созданы условия, обеспечивающие дифференцировку прогениторных клеток ПЖ в ОК.

Таким образом, все три типа культур, полученные из поджелудочной железы новорожденных кроликов, могут в той или иной степени использоваться в качестве источника клеточного компонента ТИК ПЖ, однако наиболее подходящими по своим морфофункциональным качествам являются флоатирующие островковоподобные культуры.

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

The authors declare no conflict of interest.

### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ / REFERENCES

1. 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. Inyektсионnyy geterogennyy biopolimernyy*

- gidrogel dla zamestitelnoy i regenerativnoy khirurgi i sposoby ego polucheniya. Patent RF 2433828 (2010).
- Биосовместимые материалы: учебное пособие / Под ред. В.И. Севастьянова и М.П. Кирпичникова. М.: МИА, 2011. Biosovmestimiye materialy: uchebnoye posobiye / Pod redaktsiyey V.I. Sevastianova i M.P. Kirpichnikova. M.: MIA, 2011.
  - 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.
  - 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.
  - 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.
  - 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.
  - Курсанова ЛА, Баранова НВ, Скалецкий НН, Зайденов ВА, Бубенцова ГН, Пушкова ИА. Поджелудочная железа новорожденных кроликов как источник прогениторных клеток. Вестник трансплантологии и искусственных органов. 2011; 13 (1): 61–64. Kirsanova LA, Baranova NV, Skaletskiy NN, Zaidenov VA, Bubentsova GN, Pushkova IA. Pancreas of newborn rabbits as a source of progenitor cells. Russian Journal of transplantology and artificial organs. 2011; 13 (1): 61–64. [In Russ. English abstract].
  - Martens GA, Cai Y, Hinke S, Stange G, van de Casteele M, Pipeleers D. Glucose suppresses superoxide generation in metabolically responsive pancreatic  $\beta$ -cells. *The Journal of Biological Chemistry*. 2005; 280 (21): 20389–20396.

Статья поступила в редакцию 26.03.2018 г.  
The article was submitted to the journal on 26.03.2018

### УВАЖАЕМЫЕ ЧИТАТЕЛИ!

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

**Подписной индекс** нашего издания в каталоге «Газеты и журналы» – **80248**

Ф. СП-1	<b>ВЕСТНИК</b> ТРАНСПЛАНТОЛОГИИ И ИСКУССТВЕННЫХ ОРГАНОВ		<b>80248</b> (индекс издания)
			КОЛИЧЕСТВО КОМПЛЕКТОВ
<b>на 2018 год по месяцам</b>			
1	2	3	4
5	6	7	8
9	10	11	12
Куда			
(почтовый индекс)		(адрес)	
Кому			
(фамилия, инициалы)			
-----			
Ф. СП-1	<b>ВЕСТНИК</b> ТРАНСПЛАНТОЛОГИИ И ИСКУССТВЕННЫХ ОРГАНОВ		<b>80248</b> (индекс издания)
			КОЛИЧЕСТВО КОМПЛЕКТОВ
<b>на 2018 год по месяцам</b>			
1	2	3	4
5	6	7	8
9	10	11	12
Куда			
(почтовый индекс)		(адрес)	
Кому			
(фамилия, инициалы)			