

DOI: 10.15825/1995-1191-2018-3-54-63

РОЛЬ МЕЗЕНХИМАЛЬНЫХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК КОСТНОГО МОЗГА КРЫСЫ В ЖИЗНЕСПОСОБНОСТИ ОСТРОВКОВ ЛАНГЕРГАНСА ПРИ СОВМЕСТНОМ КУЛЬТИВИРОВАНИИ С МИКРОГЕТЕРОГЕННЫМ КОЛЛАГЕНСОДЕРЖАЩИМ ГИДРОГЕЛЕМ

Н.В. Баранова, Л.А. Кирсанова, З.З. Гоникова, А.С. Пономарева, В.И. Севастьянов

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

Введение. В качестве альтернативы трансплантации островков Лангерганса (ОЛ) предпринимаются попытки создания тканеинженерной конструкции поджелудочной железы (ТИК ПЖ), состоящей из аллогенных ОЛ и биоактивного резорбируемого матрикса, создающего островкам микроокружение, сходное с нативным, и обеспечивающего островкам необходимые условия для выживаемости и функциональной активности. Кроме того, сохранности изолированных островков, по литературным данным, способствует сокультивирование с мезенхимальными стволовыми клетками (МСК). **Цель.** Изучить влияние мезенхимальных стволовых клеток костного мозга (МСК КМ) крысы на жизнеспособность изолированных ОЛ крысы при совместном культивировании с БМКГ. **Материалы и методы.** Островки и МСК КМ выделяли, ориентируясь на классические методики, с некоторыми модификациями. Эксперименты по сокультивированию проводили в стандартных условиях. Жизнеспособность островков определяли методом иммунофлуоресцентного окрашивания. **Результаты.** При культивировании ОЛ с БМКГ и МСК КМ на третьи сутки наблюдались деструктивные изменения островков, а на седьмые сутки отмечалось полное разрушение ОЛ. В то же время ОЛ, культивированные с БМКГ, сохраняли жизнеспособность в течение 14 суток инкубации. **Заключение.** Культивирование ОЛ с БМКГ и МСК КМ не способствовало длительному выживанию островков. Таким образом, позитивного влияния МСК КМ на жизнеспособность панкреатических островков не наблюдалось.

Ключевые слова: островки Лангерганса, мезенхимальные стволовые клетки костного мозга, коллагенсодержащий гель, культивирование.

INFLUENCE OF RAT BONE MARROW MESENCHYMAL STEM CELLS TO RAT LANGERHANS ISLETS VIABILITY DURING CO-CULTIVATION WITH MICROSTRUCTURED COLLAGEN-CONTAINING HYDROGEL

N.V. Baranova, L.A. Kirsanova, Z.Z. Gonikova, A.S. Ponomareva, 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 research the rat bone marrow mesenchymal stem cells (MSC BM) effect to the viability of isolated rat OL during cultivation with microstructured collagen-containing hydrogel (BMCH). **Materials and methods.** Rat

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

islets and MSC BM were isolated according to classical technique with some modifications. The experiments on the co-cultivation were carried out under standard conditions. Islet's viability was determined by immunofluorescence staining. **Results.** The OL cultivation with BMCH and MSCBM resulted in destructive changes of islets on the third day, and complete destruction of OL was observed on the seventh day. At the same time, OL cultured with BMCH remained viable for 14 days of incubation. **Conclusion.** Cultivation of OL with BMCH and MSC BM did not contribute to the long-term survival of the islets. Thus, there was no positive effect of MSC BM on the viability of pancreatic islets.

Key words: Langerhans islets, bone marrow mesenchymal stem cells, collagen-containing hydrogel, cultivation.

ВВЕДЕНИЕ

Трансплантация островков Лангерганса (ОЛ) считается одной из самых безопасных и наименее инвазивных процедур, обеспечивающих инсулин-независимость больных на определенный срок [1–5]. К существенному недостатку трансплантированных ОЛ относится их низкая функциональная активность. Во время процедуры выделения ОЛ претерпевают действие ряда повреждающих факторов (ишемия, окислительный стресс, возможное токсическое действие фермента) [2, 6, 7]. При этом нарушается не только васкуляризация и иннервация островков, но и принципиально меняется сигнальное взаимодействие между островковыми клетками (ОК) и компонентами внеклеточного матрикса (ВКМ) [8–10], регулирующее множество аспектов физиологии островков, включая выживаемость, пролиферацию и секрецию инсулина. В качестве альтернативы трансплантации ОК предпринимаются немногочисленные попытки создания тканеинженерной конструкции поджелудочной железы (ТИК ПЖ) [11], состоящей из аллогенных ОЛ и биоактивного резорбируемого матрикса, создающего островкам микроокружение, сходное с нативным ВКМ, и обеспечивающего ОЛ необходимые условия для выживаемости и функциональной активности [12–15].

Наиболее важным по значимости среди компонентов ВКМ считается коллаген; в поджелудочной железе (ПЖ) это коллагены 1-го и 4-го типа [8, 16–18]. Известно, что ОЛ, культивируемые на коллагенсодержащих матриксах, длительное время после выделения сохраняют целостность, жизнеспособность и проявляют секреторную активность [9]. При имплантации ОЛ на таких матриксах островки сохраняют характерную для них архитектуру и отвечают секрецией инсулина при стимуляции глюкозой [19].

По литературным данным последних лет [20–23], пролонгированию сохранности изолированных островков способствует также сокультивирование с другими типами клеток, прежде всего мезенхимальными стволовыми клетками (МСК). Известно, что МСК оказывают противовоспалительное, иммуномодулирующее и антиапоптотическое действие через паракринные трофические факторы [3]. МСК стимулируют васкуляризацию путем секреции факторов

роста, а также секретируют множество цитокинов, которые модулируют внутриклеточную сигнализацию [2, 23–26]. Вероятно, этими свойствами МСК можно объяснить позитивный эффект, наблюдаемый при сокультивировании изолированных островков *in vitro* [3].

Ранее нами было показано, что культивирование изолированных ОЛ крысы с биополимерным микрогетерогенным коллагенсодержащим гидрогелем (БМКГ-матрикс) [27] поддерживает жизнеспособность, способствует сохранению целостности и характерной структуры островков *in vitro* в течение 7 суток [28].

Было предположено, что совместное культивирование ОЛ ПЖ с БМКГ и МСК приведет к синергическому эффекту, который будет выражаться в значительном пролонгировании жизнеспособности ОЛ ПЖ *in vitro*.

Настоящая работа посвящена изучению влияния мезенхимальных стволовых клеток костного мозга (МСК КМ) крысы на жизнеспособность и сохранность изолированных ОЛ крысы при совместном культивировании с БМКГ.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Экспериментальные животные

Исследования проводили на половозрелых крысах-самцах линии Wistar (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 с ОЛ и с МСК КМ 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). Ранее проведенные исследования показали, что из существующего линейного ряда БМКГ-матрикса оптимальным для клеточно- и тканеинженерных конструкций является БМКГ со 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 [29].

Изоляция островков Лангерганса

Процедуру выделения островков из поджелудочной железы (ПЖ) половозрелой крысы ($n = 10$) проводили, используя модификацию классической методики с использованием коллагеназы [30, 31].

Поджелудочную железу в стерильных условиях субтотально удаляли и помещали в чашку Петри. Затем интрапаренхиматозно несколькими последовательными инъекциями вводили 6 мл раствора коллагеназы I типа («Sigma», активность 100–120 ед/мл). Растянутую таким образом железу аккуратно разделяли микропинцетами на 10–12 равных частей, переносили во флакон и инкубировали 40 мин в орбитальном шейкер-инкубаторе (Biosan ES-20/60) при 37 °С в режиме: 30 мин – 0 об/мин (статика), а затем 10 мин со скоростью вращения 150 об/мин. Переваривание останавливали добавлением холодного (4 °С) 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 супернатанта, 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 супернатанте, который осторожно переносили в центрифужную пробирку и дважды отмывали 1 мин при 1100 об/мин. Островки переносили в культуральные флаконы и в дальнейшем использовали в эксперименте.

Идентификация островков

Идентификацию 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 °С. Дитизон избирательно окрашивал панкреатические островки, при этом ацинарные клетки оставались неокрашенными [32].

Получение и культивирование МСК КМ крысы

Приготовление культуры МСК КМ осуществляли по общепринятой методике [33]. Для выделения и культивирования МСК КМ получали моноклеарную фракцию клеток из аспирата костного мозга крысы в стерильных условиях. Выделенные клетки, состоящие преимущественно из моноклеарных клеток КМ, ресуспендировали в среде DMEM/F12, содержащей 10% эмбриональную телячью сыворотку (ЭТС), 2 мМ L-глутамин, 0,4 мкМ инсулин, 1 МНерес, 0,4 мкМ дексаметазона и 50 мг/мл гентамицина, и затем высевали в количестве $2,0 \times 10^6$ кл/мл в культуральные флаконы для получения первичной культуры. Культивирование проводили в CO₂-инкубаторе в увлажненной атмосфере, содержащей 5% CO₂. Через двое суток неприкрепившуюся клеточную фракцию удаляли из культуральных флаконов, а оставшиеся клетки с фибробластоподобной морфологией продолжали культивировать. Замену культуральной среды осуществляли каждые 3–4 суток. После образования субконфлюэнтного монослоя клетки однократно отмывали раствором Версена, затем снимали 0,25% раствором трипсина, ресуспендировали в питательной среде и высевали в новую культуральную посуду. Для эксперимента использовали МСК КМ 1-го и 2-го пассажа, как монодисперсную взвесь, так и монослой.

Культивирование МСК КМ крысы с БМКГ

В 6-луночный планшет помещали тщательно измельченный и ресуспендированный *Сферо*® ГЕЛЬ (БМКГ-матрикс) в количестве 0,1–0,2 мл на лунку, а затем вносили суспензию МСК КМ в концентрации $2,5 \times 10^5$ кл/лунку. Культивирование проводили при 37 °С в CO₂-инкубаторе в увлажненной атмосфере, содержащей 5% CO₂, в питательной среде DMEM/F12, содержащей 10% ЭТС, 2 мМ L-глутамин, 0,4 мкМ инсулин, 1 МНерес, и 50 мг/мл гентамицина. На 2-е–3-и сутки инкубации происходило частичное прикрепление МСК КМ на поверхность гидрогеля, в то же время значительное количество клеток прикреплялись ко дну планшета. На 5–7-е сутки на поверхности БМКГ наблюдали появление небольших клеточных зон роста, что свидетельствовало о пролиферативной активности МСК КМ в данных условиях (рис. 1). Полученную суспензию из МСК КМ и микрогетерогенного коллагенсодержащего гидрогеля переносили в новые лунки планшета и

затем использовали в экспериментах не позднее 10–12 суток.

Культивирование островков Лангерганса с БМКГ (контроль I), с МСК КМ крысы (контроль IIa и контроль IIб) и совместно с БМКГ и МСК КМ крысы

Изолированные ОЛ ресуспендировали в среде DMEM/F12 (1 : 1) с 10% содержанием ЭТС, 2 мМ L-глутамин, 1 МНерес и 50 мг/мл гентамицина и вносили по 1,5–2,0 мл в культуральные флаконы 25 см². Культивирование проводили при 37 °С в CO₂-инкубаторе в увлажненной атмосфере, содержащей 5% CO₂. Смену культуральной среды осуществляли через каждые 2 суток инкубации (рис. 2).

На вторые сутки культивирования островки использовали в следующих вариантах:

- в культуральный флакон (флакон 1) с ~100 островками вносили 0,25–0,35 мл предварительно гомогенизированного для уменьшения степени микрогетерогенности БМКГ-матрикса – контроль I;
- в культуральный флакон (флакон 2) с предварительно внесенными ~100 островками добавляли монодисперсную взвесь МСК КМ крысы в расчете 10⁵ клеток на 100 островков – контроль IIa;
- в культуральный флакон (флакон 3) с субконфлюэнтным монослоем МСК КМ, посеянных в концентрации 10⁵ клеток на флакон, вносили приблизительно ~100 ОЛ – контроль IIб;
- в культуральный флакон (флакон 4) с предварительно внесенными ~100 островками добавляли 0,5 мл суспензии, состоящей из МСК КМ и БМКГ – опыт.

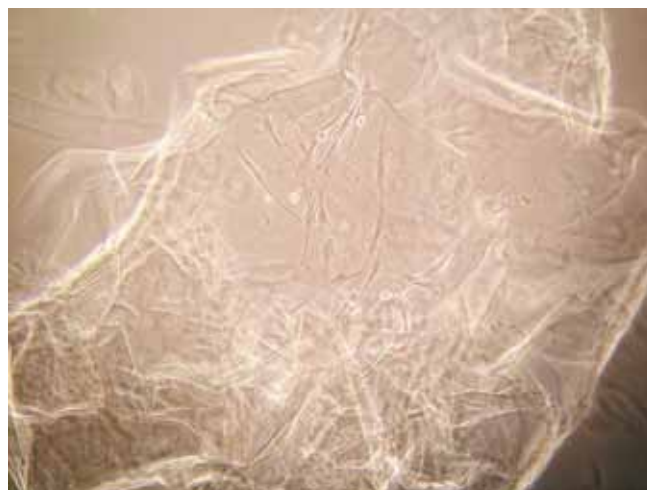


Рис. 1. Рост МСК КМ крысы на поверхности БМКГ, инвертированный микроскоп; ×200

Fig. 1. Growing of rat MSC's BM on the surface of collagen-containing hydrogel, under inverted microscope; ×200

Культивирование всех 4 флаконов продолжали в прежних условиях.

С помощью инвертированного микроскопа Nikon Eclipse TS100 (Nikon, Япония), оснащенного цифровой фотокамерой, проводили ежедневный мониторинг и фотосъемку культивируемых ОЛ и МСК КМ.

Прижизненное окрашивание панкреатических островков и подсчет процента жизнеспособных островков

Для определения жизнеспособности культивируемых островков проводили иммунофлуоресцентное окрашивание акридиновым оранжевым и пропиди-

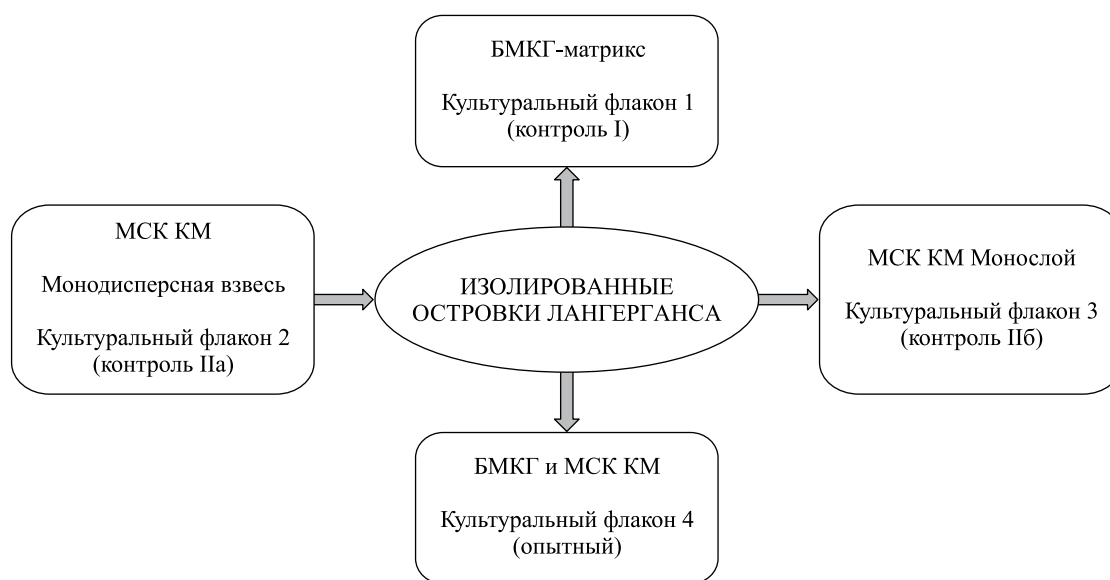


Рис. 2. Схема эксперимента

Fig. 2. Design of the experiment

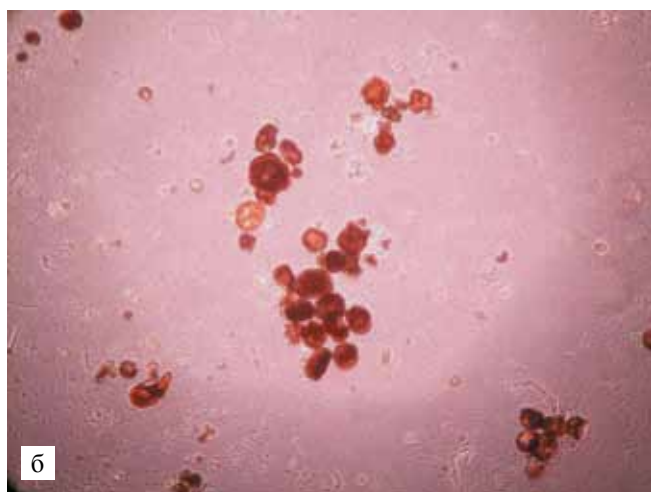
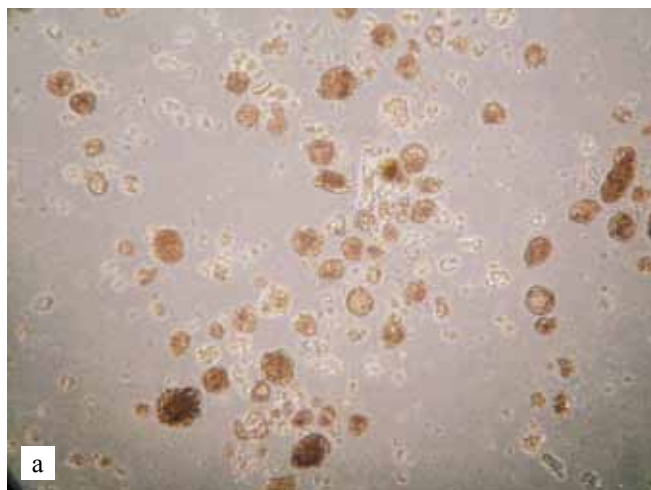


Рис. 3. Изолированные островки Лангерганса крысы: а – инвертированный микроскоп; б – окрашивание дитизоном. $\times 100$

Fig. 3. Fresh isolated rat pancreatic islets: а – under inverted microscope; б – dithizone staining. $\times 100$

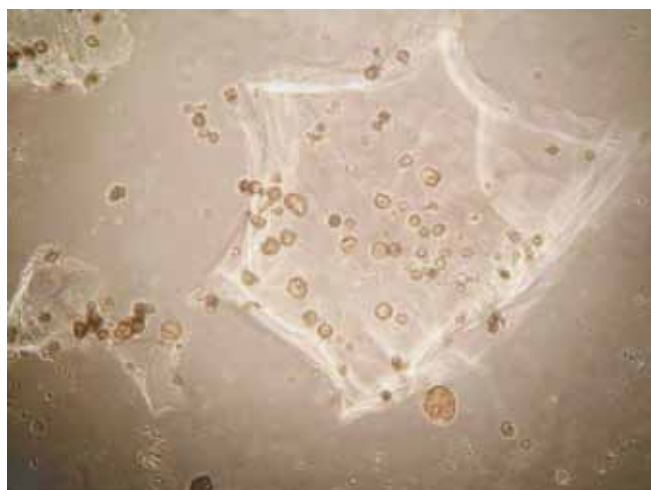


Рис. 4. ОЛ на поверхности БМКГ, 1 сутки инкубации, инвертированный микроскоп; $\times 100$

Fig. 4. Islets on the surface of collagen-containing hydrogel, 1 day incubation, under inverted microscope; $\times 100$

ум-йодидом (АО/PI). Для этого 0,2–0,4 мл культуральной взвеси, содержащей островки, помещали в чашку Петри, добавляли 0,02–0,03 мл готового раствора красителя и инкубировали в темноте в течение 15–17 минут. 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.

Используя люминесцентный микроскоп, подсчитывали процент жизнеспособных островков в окрашенном образце.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Свежевыделенные ОЛ

Значительная часть свежевыделенных ОЛ, наблюдаемая в инвертированном микроскопе, имела округлую или овальную форму, в основном ровную поверхность с небольшими шероховатостями, образованными остатками окружающей экзокринной ткани. Островки сохраняли целостность, что свидетельствовало о том, что в процессе изоляции макроструктура не была повреждена (рис. 3, а).

При окрашивании дитизоном островки демонстрировали терракотово-красный цвет, при этом остатки ацинарной ткани оставались неокрашенными (рис. 3, б).

ОЛ, культивированные с БМКГ

Островки, культивируемые с БМКГ (культуральный флакон 1, контроль I), преимущественно не теряли своей трехмерной структуры, сохраняя в целом первоначальные внешние характеристики, и не обнаруживали признаков деградации в течение всего периода наблюдения (до 14 суток). Уже на вторые сутки инкубации обнаруживалось, что значительная часть изолированных островков проявляла адгезивные свойства и прикреплялась к поверхности БМКГ-матрикса (рис. 4), тогда как остальные островки оставались флотирующими.

Иммунофлуоресцентное окрашивание акридиновым оранжевым и пропидиум-йодидом, проведенное на сроках 1,6 и 14 суток инкубации, подтвердило жизнеспособность островков, культивируемых с БМКГ-матриksom. В люминесцентном микроскопе наблюдались островки, окрашенные полностью (высокая степень жизнеспособности), частично (низкая степень жизнеспособности) и неокрашенные (погибшие островки). При подсчете учитывали наличие позитивного окрашивания в целом. Через 24 часа инкубации отмечалась практически 100% сохранность ОЛ (рис. 5, а). На шестые сутки наметилось незначительное (примерно на 10%) снижение числа жизнеспособных островков (рис. 5, б). На 14-е сутки

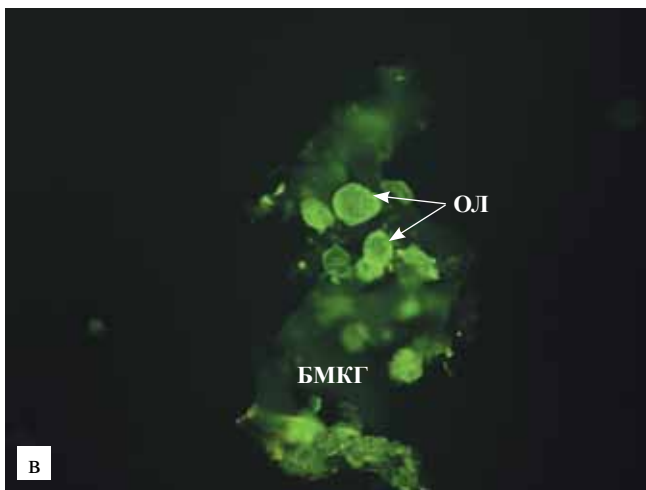
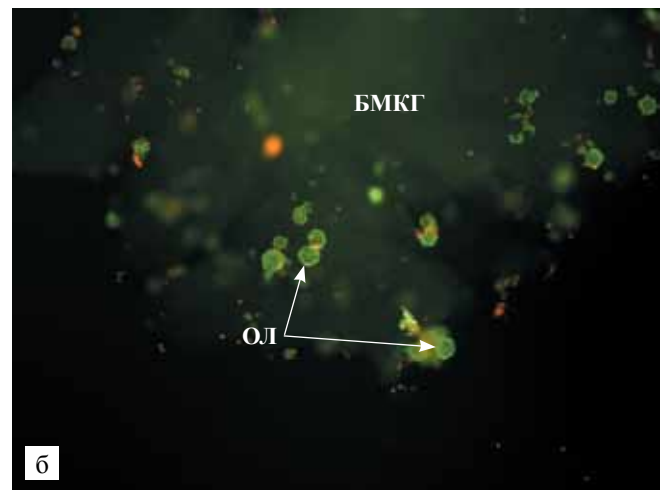
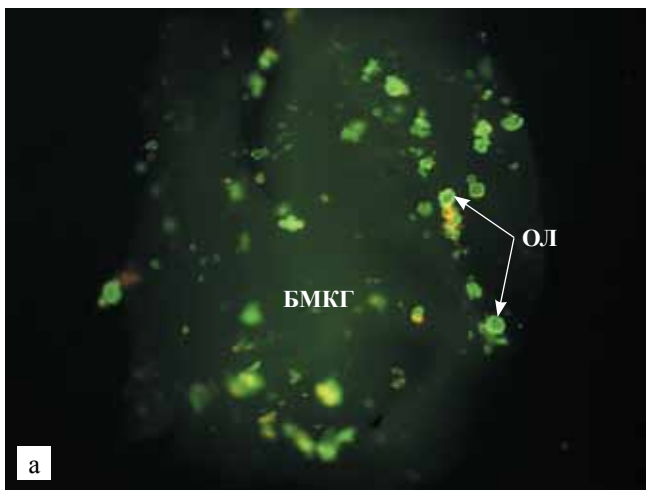


Рис. 5. Иммунофлуоресцентное окрашивание ОЛ, культивированных с БМКГ. Акридиновый оранжевый и пропидиум-йодид: а – 1 сутки, $\times 100$; б – 6 суток, $\times 100$; в – 14 суток, $\times 200$

Fig. 5. Immunofluorescence of islets cultured with collagen-containing hydrogel. Acridine orange and propidium iodide staining: а – 1 day, $\times 100$; б – 6 days, $\times 100$; в – 14 days, $\times 200$

культивирования позитивное окрашивание наблюдалось в большинстве сохранившихся к этому сроку островков (79,0%), при этом островки с высокой степенью жизнеспособности составили 17,0% (рис. 5, в).

ОЛ, культивированные с МСК КМ крысы

Наблюдение в инвертированном микроскопе показало, что при внесении монодисперсной взвеси МСК КМ к ОЛ (культуральный флакон 2 – контроль Па) часть МСК КМ прикреплялась на дно флакона в течение суток, а часть оставалась во взвешенном состоянии. При этом прикрепления клеток к поверхности ОЛ не отмечалось (рис. 6, а). На вторые сутки сокультивирования целые, сохранившиеся островки во флаконе не обнаруживались, что свидетельствовало об их разрушении. В то же время отмечалась и значительная деструкция прикрепленных и расплывших на пластике МСК КМ (рис. 6, б). С целью определения момента начала деструктивных процессов проводили дополнительные исследования жизнеспособности островков на ранних сроках инкубации: 1, 3 и 4 часа. Уже через 1 час сокультивирования ОЛ и МСК КМ иммунофлуоресцентное окрашивание демонстрировало наряду с сохранными, позитивно окрашенными ОЛ отдельные островки с признаками

выраженных морфологических изменений. Такие островки были представлены мелкогранулярной бесструктурной массой, на поверхности которой определялись пузырьчатые вздутия (вероятно, клетки на одной из стадий апоптоза – блеббинга) (рис. 7, а). В дальнейшем при увеличении срока инкубации островков с МСК до 3–4 часов в образцах выявлялись лишь одиночные ОЛ, демонстрирующие зеленую флуоресценцию, и многочисленные неокрашенные «тени» островков, свидетельствующие о гибели значительной части островков на ранних сроках сокультивирования (рис. 7, б).

В культуральном флаконе 3 (контроль Пб) с монослоем МСК КМ и внесенными ОЛ, начиная уже с первых и вплоть до пяти суток совместной инкубации, наблюдалась последовательная седиментация островков на поверхность расплавленных на дне флакона МСК. При этом осевшие ОЛ утрачивали свою трехмерную структуру и постепенно разрушались (рис. 6, а). Прижизненное окрашивание акридиновым оранжевым и пропидиум-йодидом на пятые сутки продемонстрировало наличие сохранившихся МСК КМ с зеленой флуоресценцией и прикрепленные к клеточному монослою погибшие островковые клетки с красной флуоресценцией (рис. 6, б). После пяти

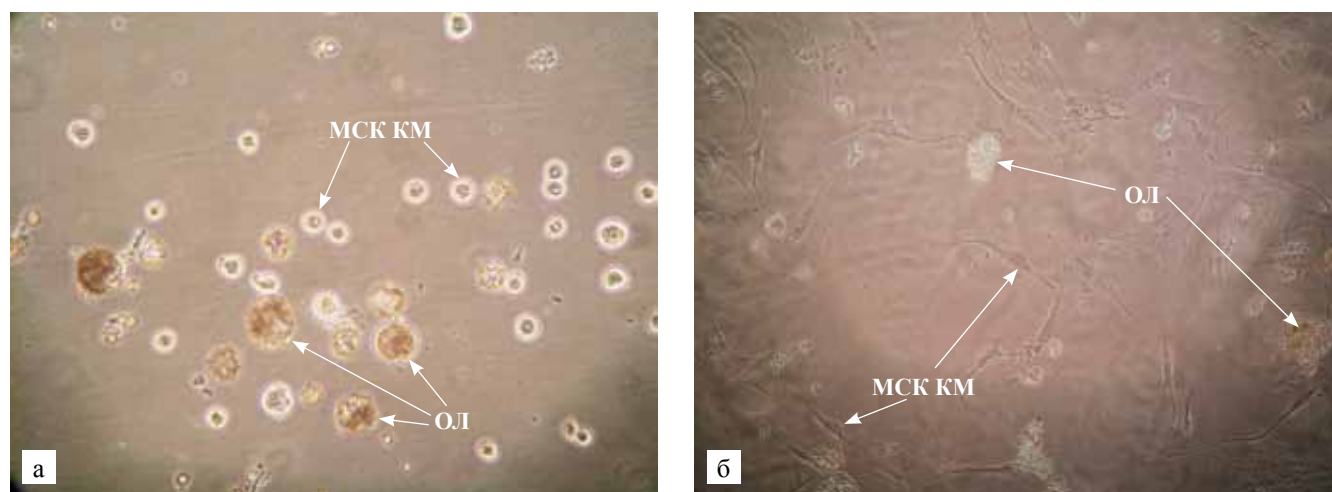


Рис. 6. Культивирование ОЛ с МСК КМ (монодисперсная взвесь), инвертированный микроскоп: а – 0 суток сокультивирования; б – разрушение островков через 1 сутки сокультивирования; $\times 200$

Fig. 6. Incubation of islets with MSC's BM (monodisperse suspension), under inverted microscope: а – 0 days incubation; б – destroyed islet after 1 day incubation; $\times 200$

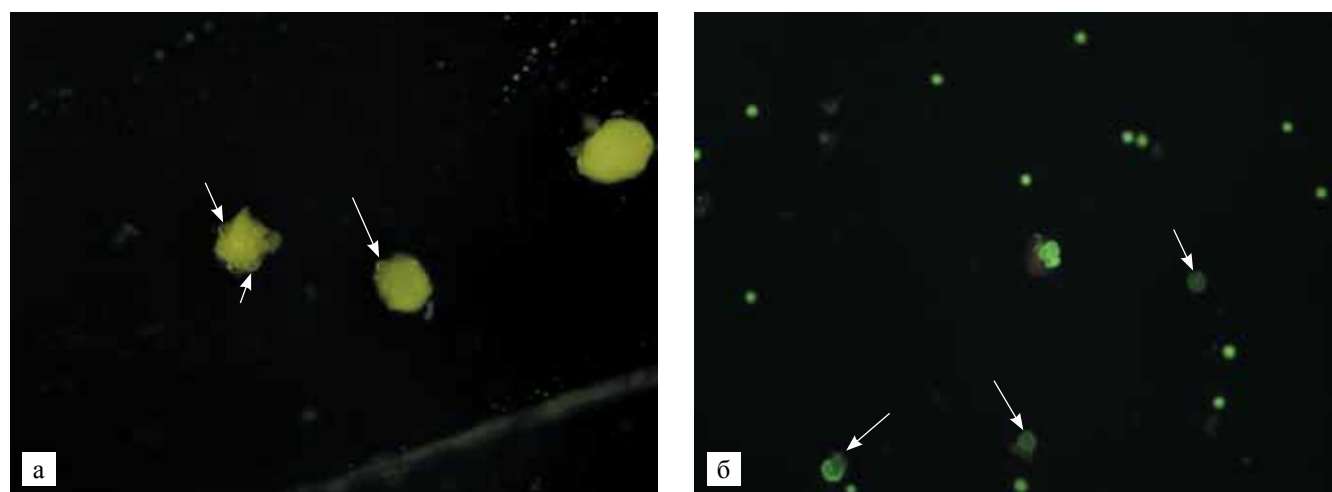


Рис. 7. Иммунофлуоресцентное окрашивание островков, культивированных с МСК КМ. Акридиновый оранжевый и пропидиум-йодид: а – ОЛ с признаками апоптотической гибели клеток, 1 час сокультивирования, $\times 200$; б – сохранившийся ОЛ (в центре) и «тени» островков (указаны стрелками), 4 часа сокультивирования, $\times 100$

Fig. 7. Immunofluorescence of islets cultured with MSC's BM. Acridine orange and propidium-iodide staining: а – apoptosis signs in islet's cells, 1 h incubation, $\times 200$; б – survival islet (in center) and islet's «shadow» (indicated by arrows), 4 h incubation, $\times 100$

суток сокультивирования сохранившиеся островки в культуральном флаконе с монослоем МСК КМ не обнаруживались.

ОЛ, культивированные с БМКГ и МСК КМ крысы

Культивирование ОЛ с БМКГ и МСК КМ (культуральный флакон 4 – опытный) показало, что островки не прикреплялись к поверхности БМКГ с МСК КМ и оставались интактными в течение всего срока наблюдения (7 суток). Уже на третьи сутки инкубации большинство островков приобретало неровные очер-

тания, при этом в отдельных островках отмечались признаки фрагментации, что свидетельствовало о деструктивных изменениях (рис. 7, а). В то же время иммунофлуоресцентное окрашивание акридиновым оранжевым и пропидиум-йодидом демонстрировало частичную сохранность островков (рис. 7, б). На седьмые сутки инкубации ОЛ полностью разрушались, оставляя «детритный скелет». При этом отмечалось, что МСК на гидрогеле частично сохранялись. Возможно, относительно больший срок выживания ОЛ в данном эксперименте по сравнению с результатами, полученными при культивировании ОЛ во флаконе 2 – контроль Па (монодисперсная взвесь МСК КМ

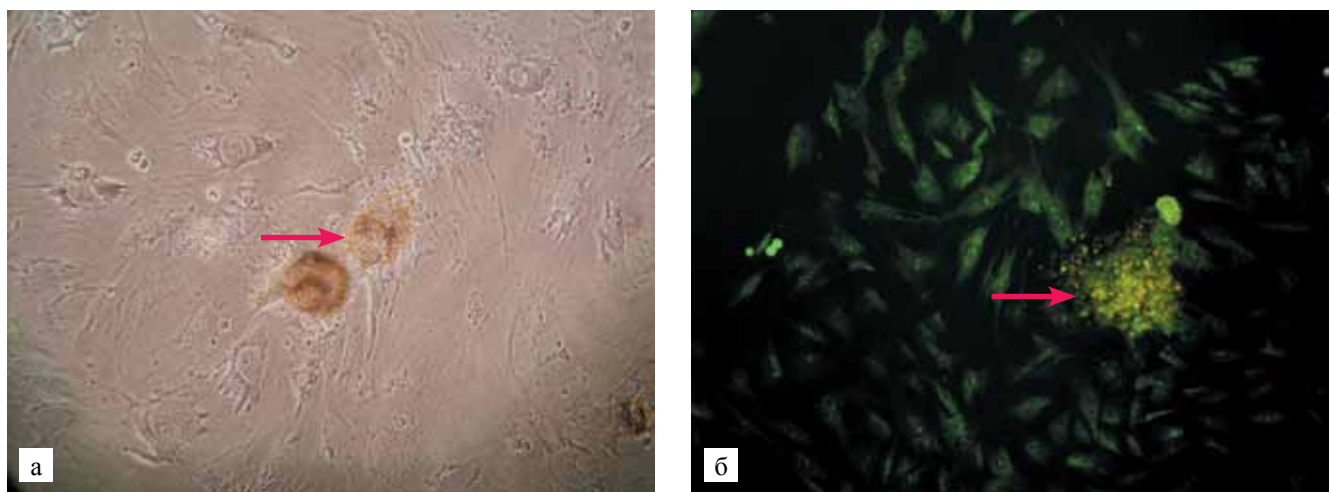


Рис. 8. Разрушение трехмерной структуры островков на поверхности монослоя МСК КМ (указано стрелками): а – инвертированный микроскоп, $\times 200$; б – иммунофлуоресцентное окрашивание, акридиновый оранжевый и пропидиум-йодид, $\times 100$

Fig. 8. Destruction of islet's native architectonic on MSC's BM monolayer (indicated by arrows): а – under inverted microscope, $\times 200$; б – immunofluorescence, acridine orange and propidium-iodide staining, $\times 100$

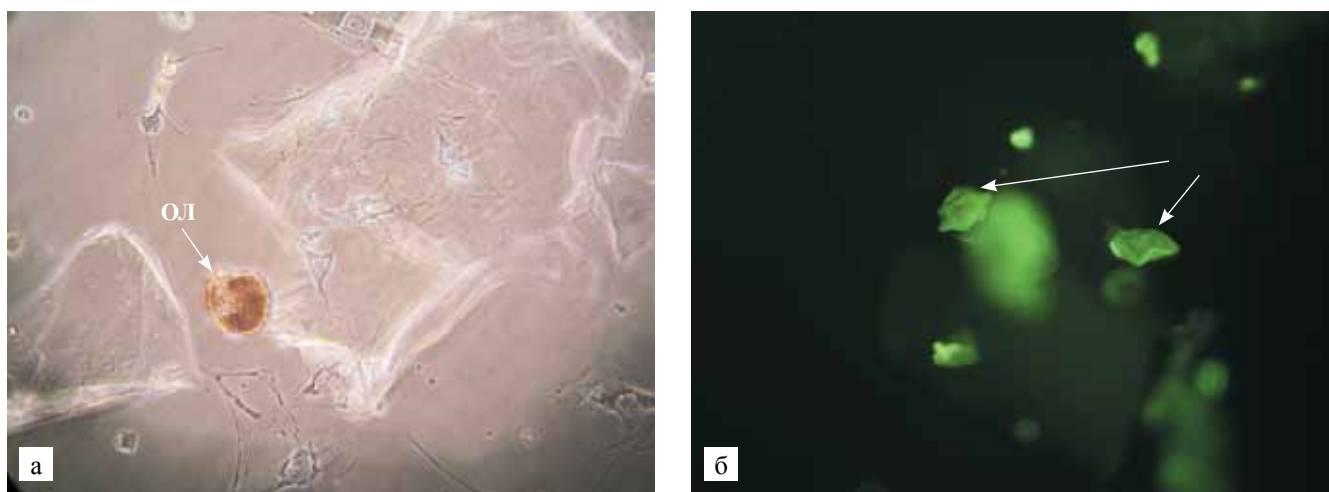


Рис. 9. ОЛ, культивированные с БМКГ и МСК КМ, 3 суток инкубации: а – инвертированный микроскоп; б – иммунофлуоресцентное окрашивание, акридиновый оранжевый и пропидиум-йодид; $\times 200$

Fig. 9. Islets cultured with collagen-containing hydrogel and rat MSC's BM, 3 days incubation: а – under inverted microscope; б – immunofluorescence, acridine orange and propidium-iodide staining; $\times 200$

и ОЛ) и флаконе 3 – контроль Пб (монослой МСК КМ и внесенные ОЛ) можно объяснить позитивным влиянием БМКГ в данном эксперименте.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В процессе сокультивирования изолированных ОЛ с МСК КМ (как с монодисперсной взвесью, так и с монослоем) позитивного влияния МСК на жизнеспособность панкреатических островков нами не отмечалось. Напротив, изолированные ОЛ при сокультивировании с МСК КМ в короткий срок претерпевали деструктивные изменения и погибали. Этот результат для авторов явился неожиданным,

поскольку в литературе имеются сообщения о положительном влиянии МСК на выживаемость изолированных островков. Объяснение наблюдаемого нами феномена, вероятно, требует дополнительного изучения.

Культивирование ОЛ с БМКГ и МСК КМ также не способствовало длительному выживанию островков. Наблюдаемый нами относительно больший срок выживания ОЛ по сравнению с инкубацией только с МСК КМ, возможно, объясняется наличием БМКГ в данной культуральной системе.

В то же время было показано, что культивирование изолированных ОЛ крысы с биополимерным

микрогетерогенным коллагенсодержащим гидрогелем – биомиметиком внеклеточного матрикса способствует сохранению жизнеспособности и характерной структуры ОЛ *in vitro* в течение 14 суток.

Авторы заявляют об отсутствии

конфликта интересов.

The authors declare no conflict of interest.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ / REFERENCES

1. Shapiro AM, Pokrywczynska M, Ricordi C. Clinical pancreatic islet transplantation. *Nat. Rev. Endocrinol.* 2016 Nov 11. DOI: 10.1038/nrendo.2016.178.
2. Karaoz E, Genc ZC, Demircan PC, Aksoy A, Duruksu G. Protection of rat pancreatic islet function and viability by coculture with rat bone marrow-derived mesenchymal stem cells. *Cell Death Dis.* 2010 Apr 22; 1: e36. DOI: 10.1038/cddis.2010.14.
3. Scuteri A, Donzelli E, Rodriguez-Menendez V, Ravasi M, Monfrini M, Bonandrini B et al. A double mechanism for the mesenchymal stem cells' positive effect on pancreatic islets. *PLoS One.* 2014 Jan 8; 9 (1): e84309. DOI: 10.1371/journal.pone.0084309.
4. Matsumoto S. Islet cell transplantation for type 1 diabetes. *J. Diabetes.* 2010 Mar; 2 (1): 16–22. DOI: 10.1111/j.1753-0407.2009.00048.x.
5. Ricordi C, Hering BJ, Shapiro AM. Clinical Islet Transplantation Consortium. Beta-cell transplantation for diabetes therapy. *Lancet.* 2008 Jul 5; 372 (9632): 27–28. DOI: 10.1016/S0140-6736(08)60984-8.
6. 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.
7. Berney T, Molano RD, Cattani P, Pileggi A, Vizzardelli C, Oliver R et al. 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.
8. Zhang Y, Jalili RB, Warnock GL, Ao Z, Marzban L, Ghahary A. Three-dimensional scaffolds reduce islet amyloid and enhance function of cultured human islets. *Am. J. Pathol.* 2012 Oct; 181 (4): 1296–1305. DOI: 10.1016/j.ajpath.2012.06.032.
9. Jalili RB, Moeen Rezakhanlou A, Hosseini-Tabatabaei A, Ao Z, Warnock GL, Ghahary A. Fibroblast populated collagen matrix promotes islet survival and reduces the number of islets required for diabetes reversal. *J. Cell Physiol.* 2011 Jun; 226 (7): 1813–1819. DOI: 10.1002/jcp.22515.
10. Stendahl JC, Kaufman DB, Stupp SI. Extracellular matrix in pancreatic islets: relevance to scaffold design and transplantation. *Cell Transplantation.* 2009; 18 (1): 1–12. PMID: 19476204.
11. 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.2013.0462.
12. Abualhassan N, Sapozhnikov L, Pawlick RL, Kahana M, Pepper AR, Bruni A 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.
13. Coronel M, Stabler C. Engineering a local microenvironment for pancreatic islet replacement. *Curr. Opin. Biotechnol.* 2013; 24: 900–908. DOI: 10.1016/j.copbio.2013.05.004.
14. 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. DOI: 10.1089/ten.tea.2013.0765.
15. 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.
16. Hynes RO. The extracellular matrix: not just pretty fibrils. *Science.* 2009 Nov 27; 326 (5957): 1216–1219. DOI: 10.1126/science.1176009.
17. 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.
18. Ko JH, Kim YH, Jeong SH, Lee S, Park SN, Shim IK, Kim SC. Collagen esterification enhances the function and survival of pancreatic 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.
19. Salvay DM, Rives CB, Zhang X, Chen F, Kaufman DB, Lowe WL Jr, Shea LD. Extracellular matrix protein-coated scaffolds promote the reversal of diabetes after extrahepatic islet transplantation. *Transplantation.* 2008 May 27; 85 (10): 1456–1464. DOI: 10.1097/TP.0b013e31816fc0ea.
20. Hematti P, Kim J, Stein AP, Kaufman D. Potential role of mesenchymal stromal cells in pancreatic islet transplantation. *Transplant. Rev. (Orlando)* 27, 21, 2013. DOI: 10.1016/j.tre.2012.11.003.
21. de Souza BM, Boucas AP, Oliveira FD, Reis KP, Ziegelmann P, Bauer AC, Crispim D. Effect of co-culture of mesenchymal stem/stromal cells with pancreatic islets on viability and function outcomes: a systematic review and meta-analysis. *Islets.* 2017 Mar 4; 9 (2): 30–42. DOI: 10.1080/19382014.2017.1286434.
22. Jung EJ, Kim SC, Wee YM, Kim YH, Choi MY, Jeong SH et al. Bone marrow-derived mesenchymal stromal cells support rat pancreatic islet survival and insulin secretory function *in vitro*. *Cytotherapy.* 2011 Jan; 13 (1): 19–29. DOI: 10.3109/14653249.2010.518608.
23. Hirabaru M, Kuroki T, Adachi T, Kitasato A, Ono S, Tanaka T et al. A method for performing islet transplantation using tissue-engineered sheets of islets and mesenchymal stem cells. *Tissue Eng Part C Methods.* 2015 Dec; 21 (12): 1205–1215. DOI: 10.1089/ten.TEC.2015.0035.
24. Figliuzzi M, Cornolti R, Perico N, Rota C, Morigi M, Remuzzi G et al. Bone marrow-derived mesenchymal stem cells improve islet graft function in diabetic rats. *Transplant. Proc.* 2009 Jun; 41 (5): 1797–1800. DOI: 10.1016/j.transproceed.2008.11.015.

25. Sakata N, Chan NK, Chrisler J, Obenaus A, Hathout E. Bone marrow cell cotransplantation with islets improves their vascularization and function. *Transplantation*. 2010 Mar 27; 89 (6): 686–693. DOI: 10.1097/TP.0b013e3181cb3e8d.
26. Ito T, Itakura S, Todorov I, Rawson J, Asari S, Shintaku J et al. Mesenchymal stem cell and islet co-transplantation promotes graft revascularization and function. *Transplantation*. 2010 Jun 27; 89 (12): 1438–1445. PMID: 20568673.
27. Перова НВ, Севастьянов ВИ. Биополимерный гетерогенный гидрогель Сферо®ГЕЛЬ – инъекционный биodeградируемый имплантат. *Практическая медицина*. 2014; 8 (84): 111–116. Perova NV, Sevastianov VI. Biopolimernyj geterogennyj gidrogel' Sfero®GEL – inyeksionniy biodegradiruyemiy implantat. *Prakticheskaya meditsina*. 2014; 8 (84): 111–116.
28. Баранова НВ, Кирсанова ЛА, Бубенцова ГН, Севастьянов ВИ. Микрогетерогенный коллагенсодержащий гидрогель как матрикс для изолированных островков Лангерганса поджелудочной железы крысы. *Гены и клетки. Материалы III Национального конгресса по регенеративной медицине*. 2017; XII (3): 38–39. Baranova NV, Kirsanova LA, Bubentsova GN, Sevastianov VI. Microstructured collagen-containing hydrogel as matrix for isolated islets of rat pancreas. *Genes and Cells. Materials of the 3rd National congress on regenerative medicine*. 2017; XII (3): 38–39.
29. 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.
30. London NJ, Swift SM, Clayton HA. Isolation, culture and functional evaluation of islets of Langerhans. *Diabetes Metab*. 1998 Jun; 24 (3): 200–207. PMID: 9690051.
31. Kenmochi T, Asano T, Jingu K, Iwashita C, Miyauchi H, Takahashi S et al. Development of a fully automated islet digestion system. *Transplant. Proc*. 2000 Mar; 32 (2): 341–343. PMID: 10715434.
32. Pang X, Xue W, Feng X, Tian X, Teng Y, Ding X et al. Experimental studies on islets isolation, purification and function in rats. *Int. J. Clin. Exp. Med*. 2015 Nov 15; 8 (11): 20932–20938. PMID: 26885021.
33. Готье СВ, Шагидулин МЮ, Онищенко НА, Крашенинников МЕ, Севастьянов ВИ. Способ и трансплантат для лечения печеночной недостаточности. Патент № 2010110063/14 (014141). 03.03.2011. Gautier SV, Shagidulin MY, Onishchenko NA, Krashenninnikov ME, Sevastiyarov VI. The method and graft for treating hepatic insufficiency. Patent number 2010110063/14 (014141). From 03.03.2011 (In Rus).

Статья поступила в редакцию 4.06.2018 г.
The article was submitted to the journal on 4.06.2018