

УДК 616.379:615.38:612.083-018

ПОВЫШЕНИЕ ЭФФЕКТИВНОСТИ ВЫДЕЛЕНИЯ ОСТРОВКОВ ЛАНГЕРГАНСА ИЗ ПОДЖЕЛУДОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ ДОНОРА ДЛЯ ПОЛУЧЕНИЯ БИМЕДИЦИНСКОГО КЛЕТОЧНОГО ПРОДУКТА НА ИХ ОСНОВЕ

Е. А. НАЗАРОВА¹⁾, Е. Г. ПЕТРОВСКАЯ¹⁾, А. А. СЫМАНОВИЧ¹⁾, А. А. ГОМОН¹⁾,
Е. А. ПРИМАКОВА¹⁾, Н. И. ДЕДЮЛЯ¹⁾, Д. А. ФЕДУРУК¹⁾, Н. М. ЯКОВЕЦ¹⁾, С. И. КРИВЕНКО¹⁾

¹⁾Минский научно-практический центр хирургии, трансплантологии и гематологии,
ул. Семашко, 8, 220045, г. Минск, Беларусь

Развитие сахарного диабета I типа вследствие деструкции островков Лангерганса (ОЛ) и последующего прогрессирования инсулиновой недостаточности детерминировано не только генетической предрасположенностью, но и неблагоприятными факторами окружающей среды, ключевыми из которых являются вирусные инфекции, загрязнение воздуха, стойкие органические загрязнители, низкая физическая активность и ожирение. Клинические исследования, проведенные за последние три десятилетия, свидетельствуют, что введение изолированных ОЛ или трансплантация целой поджелудочной железы позволяет восстановить функции β -клеток и достичь физиологического высвобождения эндокринных гормонов в большей степени, чем экзогенный инсулин у пациентов. Количество свежeweделенных ОЛ из одной железы является недостаточным для эффективной клеточной терапии. В настоящем исследовании представлены результаты модификации условий стандартного протокола изоляции ОЛ из поджелудочной железы (ПЖ) для увеличения количества биомедицинского клеточного продукта на их основе для терапии не менее, чем на 40 %,

Образец цитирования:

Назарова ЕА, Петровская ЕГ, Сыманович АА, Гомон АА, Примакова ЕА, Дедюля НИ, Федорук ДА, Яковец НМ, Кривенко СИ. Повышение эффективности выделения островков лангерганса из поджелудочной железы донора для получения биомедицинского клеточного продукта на их основе. *Журнал Белорусского государственного университета. Экология.* 2020;4:70–78. <https://doi.org/10.46646/2521-683X/2020-4-70-78>

For citation:

Nazarova EA, Petrovskaya EG, Symanovich AA, Gomon AA, Primakova EA, Dedyulya NI, Fedoruk DA, Yakovets NM, Krivenko SI. Increasing the efficiency of islets of langerhans' isolation from the donor's pancreas to obtain a biomedical cell product based on them. *Journal of the Belarusian State University. Ecology.* 2020;4:70–78. Russian. <https://doi.org/10.46646/2521-683X/2020-4-70-78>

Авторы:

Назарова Екатерина Александровна – врач лабораторной диагностики лаборатории клеточных биотехнологий.
Петровская Екатерина Геннадьевна – старший научный сотрудник научного отдела.
Гомон Анастасия Алексеевна – биолог лаборатории HLA-типирования.
Примакова Евгения Алексеевна – врач лабораторной диагностики лаборатории клеточных биотехнологий.
Сыманович Алла Александровна – кандидат биологических наук, врач лабораторной диагностики лаборатории клеточных биотехнологий.
Дедюля Наталья Ивановна – кандидат биологических наук, заведующий лабораторией клеточных биотехнологий.
Федорук Дмитрий Алексеевич – врач-хирург отделения трансплантации.
Яковец Николай Михайлович – кандидат медицинских наук, врач-хирург отделения трансплантации.
Кривенко Светлана Ивановна – доктор медицинских наук, доцент; заместитель директора по научной работе.

Authors:

Ekaterina A. Nazarova, laboratory diagnostics doctor of the cell biotechnology laboratory.
k.nazarova-86@mail.ru
Ekaterina G. Petrovskaya, senior researcher of science department.
ekatherina999@mail.ru
Anastasiya A. Gomon, biologist of the HLA typing laboratory.
gomonanastasiya9@gmail.com
Evgeniya A. Primakova, laboratory diagnostics doctor of the cell biotechnology laboratory.
gane_sel@mail.ru
Alla A. Symanovich, PhD (biology); laboratory diagnostics doctor of the cell biotechnology laboratory.
alefityna@tut.by
Nataliya I. Dedyulya, PhD (biology); head of the cell biotechnology laboratory.
nata_2010@tut.by
Dmitrij A. Fedoruk, surgeon of the department of transplantation.
tetrafed@yandex.ru
Nikolaij M. Yakovets, PhD (medicine); surgeon of the department of transplantation.
yanick@tut.by
Svetlana I. Krivenko, doctor of science (medicine), associate professor; deputy director for research.
svtl_kr@tut.by

в условиях ограниченного объема донорского материала и уменьшения повреждающего протеолитического воздействия на выделяемые клетки. Объектом исследования являлись ОЛ, выделенные из ПЖ доноров с констатированной смертью мозга.

Ключевые слова: островки Лангерганса; биомедицинский клеточный продукт; сахарный диабет I типа.

INCREASING THE EFFICIENCY OF ISLETS OF LANGERHANS' ISOLATION FROM THE DONOR'S PANCREAS TO OBTAIN A BIOMEDICAL CELL PRODUCT BASED ON THEM

*E. A. NAZAROVA^a, E. G. PETROVSKAYA^a, A. A. SYMANOVICH^a, A. A. GOMON^a,
E. A. PRIMAKOVA^a, N. I. DEDYULYA^a, D. A. FEDORUK^a, N. M. YAKOVETS^a, S. I. KRIVENKO^a*

*Minsk Scientific and Practical Center for Surgery, Transplantology and Hematology,
8 Siamashka Street, Minsk 220045, Belarus*

Corresponding author: E. A. Nazarova (e-mail: k.nazarova-86@mail.ru)

The progress of type I diabetes mellitus due to the destruction of the islets of Langerhans (IsL) and the subsequent progression of insulin deficiency are determined not only by genetic predisposition, but also by unfavorable environmental factors, the key ones of which are viral infections, air pollution, persistent organic pollutants, low physical activity and obesity. Clinical studies carried out over the past three decades have shown that the administration of isolated IsL or transplantation of the whole pancreas allows the restoration of β -cell function and the achievement of physiological release of endocrine hormones, to a greater extent than exogenous insulin in patients. The amount of freshly isolated IsL from one pancreas is insufficient for effective cell therapy. This study presents the results of modifying the conditions of the standard protocol for the islets of Langerhans' isolating from the pancreas to increase the amount of biomedical cell product of this cells no less than 40%, in conditions of a limited donor's material and to decrease the damaging proteolytic effect on the isolated cells. The object of the study was IsL isolated from the pancreas of donors with confirmed brain death.

Keywords: islets of Langerhans; biomedical cell product; type I diabetes mellitus.

Введение

Распространенная заболеваемость сахарным диабетом (СД) I типа вызывает всеобщую медицинскую и социальную озабоченность. В наше время насчитывается более 382 млн больных СД, и их численность постоянно увеличивается. С ростом заболеваемости во всем мире увеличиваются и государственные затраты на обследование, лечение и реабилитацию больных СД [1].

В развитии СД I типа ключевую роль играет генетическая предрасположенность, обусловленная наличием определенных гаплотипов системы HLA (human leukocytes antigens) и других диабетогенных последовательностей (генов). Во многом влияет также и окружающая среда: вирусы, загрязнители воздуха, стойкие органические загрязнители, низкая физическая активность, ожирение, дефицит витамина D, компоненты коровьего молока и др. Роль факторов окружающей среды становится все более актуальной, о чем свидетельствует заметный недавний рост заболеваемости, который невозможно объяснить только генетическими изменениями, происходящими в организме.

Одним из факторов риска окружающей среды, эпидемиологически ассоциированным с развитием СД I типа, выявленным в нескольких независимых исследованиях на людях и моделях животных, являются вирусные инфекции (энтеровирус, вирус краснухи, эпидемический паротит, ротавирус, Коксаки и цитомегаловирус) [2; 3]. Хорошо изученным фактором окружающей среды, влияющим на развитие СД I типа, является загрязнение воздуха, связанное с дорожным движением (от автомобильного транспорта и выхлопных газов дизельных двигателей), такими химическими веществами, как диоксид серы (SO_2), сульфат (SO_4), оксиды азота (NO_x), оксид углерода (CO), приземный озон (O_3), полициклические ароматические углеводороды (ПАУ), твердыми частицами (TC_{10} и $\text{TC}_{2.5}$). Твердые частицы могут поглощать множество других химических веществ, включая пестициды, антипирены, фталаты и др. Приземный озон является основным компонентом смога. Озон образуется в результате взаимодействия различных загрязнителей воздуха с солнечным светом. Лабораторные исследования на клетках животных свидетельствуют, что воздействие загрязнения воздуха может вызывать биологические эффекты, связанные с диабетом. Подавляющее большинство эпидемиологических исследований на людях показало повышенный риск развития СД I типа при высоком воздействии загрязнения воздуха [4; 5].

Вследствие аутоиммунной деструкции ОЛ поджелудочной железы (ПЖ) (более 90 % от островковой массы) и последующего прогрессирования инсулиновой недостаточности (инсулинопении), а иногда и полного отсутствия секреции инсулина развивается СД I типа. Для него характерно не только нарушение метаболизма глюкозы, но и определенный набор хронических осложнений. Самое грозное осложнение СД и самая частая причина слепоты – это диабетическая ретинопатия, которая развивается у 60–80 % больных СД. От 20 до 85 % больных СД поражает диабетическая нейропатия, которая проявляется сенсорными, двигательными и вегетативными нарушениями. Диабетическая стопа – синдром, обусловленный периферической нейропатией и макроангиопатией, включает поражения костей и сосудов стопы и язвенные поражения стопы. Атеросклероз – типичное макроангиопатическое осложнение СД, повышающее риск инфаркта миокарда и инсульта: распространенность инфаркта миокарда среди больных сахарным диабетом в два раза выше, чем среди общей массы населения. Атеросклеротические поражения артерий ног также способствуют развитию диабетической стопы. У 10–20 % больных СД развивается диабетическая нефропатия. Больные инсулинозависимым СД (I типа) особенно подвержены этому осложнению: у 30–40 % больных через 15–20 лет после клинического проявления болезни развивается терминальная почечная недостаточность [6–9].

Основным способом лечения СД I типа является замещение утраченной инсулинпродуцирующей функции ПЖ экзогенным инсулином. Больные находятся в постоянной зависимости от многократного ежедневного введения инсулина и постоянного гликемического контроля. Однако лечение инсулином не может полностью предотвратить поздние осложнения, связанные с диабетом, и интенсивное лечение инсулином увеличивает риск смертельных гипогликемических эпизодов [10; 11].

В 2000 г. группой ученых во главе с Джеймсом Шапиро (г. Эдмонтон, Канада) был разработан протокол введения ОЛ (Эдмонтонский протокол), который стал ориентиром для ученых всего мира [12]. По литературным данным, за период от начала применения протокола инсулинонезависимость у пациентов через 1 год после клеточной терапии ОЛ была достигнута минимума в 50 % случаев [13–15].

Клинические исследования, проведенные за последние три десятилетия, свидетельствуют, что трансплантация изолированных ОЛ или целой ПЖ позволяет восстановить функции β -клеток и достичь физиологического высвобождения эндокринных гормонов в большей степени, чем экзогенный инсулин у пациентов с диабетом. Были получены положительные результаты влияния терапии ОЛ на прогрессирование осложнений СД: улучшение при макро- и микроангиопатиях (основной причине диабетической нефропатии), стабилизация/снижение прогрессирования ретинопатии и нейропатии [16–25]. У пациентов после введения ОЛ наблюдалось улучшение сердечно-сосудистой и эндотелиальной функции, уменьшение атеротромботического профиля, а также значительное увеличение срока функционирования почечного трансплантата [26–28].

Несмотря на то что в области клеточной терапии ОЛ достигнут значительный прогресс, некоторые сложности по-прежнему препятствуют ее широкому использованию [29; 30]. Количество свежеевыделенных ОЛ из одной ПЖ является недостаточным для эффективной клеточной терапии (минимально 9000 эквивалентов островков на 1 кг веса тела реципиента за одно введение), а одновременное получение двух-трех желез для выделения клеток практически невозможно, необходима модификация известного протокола.

Цель исследования – разработка научно обоснованного алгоритма получения терапевтически эффективных и безопасных биомедицинских клеточных продуктов (БМКП) на основе ОЛ для увеличения количества выделяемого клеточного материала в условиях ограниченного объема донорского материала без увеличения трудозатрат и стоимости процесса.

Материалы и методы исследования

Объектом исследования являлись ОЛ, выделенные из ПЖ доноров с констатированной смертью мозга, соответствующим всем критериям оптимального донора для забора ПЖ с целью выделения ОЛ ($n=8$).

Подготовка и выделение ОЛ из ПЖ осуществлялась по протоколу E. Linetsky «Выделение островков из поджелудочной железы человека» SOP ICPF-001 [31] с некоторыми модификациями [32].

В лабораторных стерильных условиях осуществляли забор образца транспортной среды («Кустодиол», НТК, Германия) для бактериологического контроля стерильности эксплантации ПЖ. Взвешивали ПЖ в стерильном лотке и погружали на несколько секунд последовательно в холодные растворы: цефазолина (1 г/л), раствора бетадина 10 % (если была повреждена 12-перстная кишка), раствор Хенкса (Life Technologies, США).

Предварительно приготовленный теплый (37 °C) рабочий раствор фермента коллагеназы 4 типа вводили под давлением с помощью шприца, объемом 100 мл, избегая образования пузырьков в голову железы, затем в хвост в соотношении 2,3:1,7 от общего объема раствора. Объем рабочего раствора определяли исходя из массы железы по формуле:

Общий рабочий объем раствора фермента ($V_{\text{общ.}}$) = масса ПЖ (г) \times 2 мл/г.

Рабочий объем коллагеназы 4 типа ($V_{\text{раб.}}$) доводили до общего рабочего объема ($V_{\text{общ.}}$) раствором для перфузии (ПР), приготовленным из раствора Хенкса, содержащим 0,35 г/л NaHCO_3 , 25 мМ Hepes, 3,1 мМ CaCl_2 .

ПЖ, обработанную ферментами, фрагментировали стерильным скальпелем на 10–12 частей и вместе со стерильными нитриловыми шариками (6–8 шт.) помещали в камеру Рикорди (Biorep Technologies, США) для изоляции клеток. К порту в крышке камеры одним концом, к нагревающей спирали другим концом подсоединяли стерильную силиконовую трубку, через которую осуществляли подачу перфузирующего раствора (при 37 °С) с помощью перфузионного насоса. Содержимое камеры промывали в течение 5 мин со скоростью перфузии 100–150 мл/мин.

Температуру содержимого камеры измеряли с помощью термодатчика и монитора контроля температуры. По достижении температуры 37 °С начинали встряхивание камеры (15–30 мин). В течение всего процесса изоляции ОЛ каждые 2 мин брали пробы (из бокового порта в камере с помощью шприца) и детектировали свободные островки под микроскопом. Мониторинг продолжали до тех пор, пока не визуализировали 50 % свободных островков.

Сбор клеток клеточной суспензии осуществляли в заранее подготовленную емкость для сбора суспензии клеток со средой, состоящей из 200 мл среды RPMI (Roswell Park Memorial Institute) (4 °С) (Sigma-Aldrich, Германия), 100 мл раствора человеческого альбумина 10 %, 100 ед. инсулина, 5 000 ед. гепарина. После того как визуализировали 50 % свободных ОЛ, начинали подачу холодной (4 °С) среды RPMI (1,5–2 л) с помощью перфузионного насоса со скоростью 100–150 мл/мин при постоянном встряхивании камеры. Температуру содержимого камеры проверяли с помощью термодатчика. Промывку продолжали до тех пор, пока в содержимом, поступающем из камеры, обнаруживались ОЛ.

Содержимое колбы переносили в суспензионные культуральные флаконы, площадью 175 см², с питательной средой для ОЛ (соотношение 2:1). Флаконы помещали в CO_2 -инкубатор (37 °С, 90 % влажности и 5 % CO_2) на 24 ч для пассивного осаждения выделенных клеток.

Содержимое культуральных флаконов переносили в центрифужные пробирки и осаждали выделенные клетки центрифугированием при 450 g (что соответствует 1638 об/мин) в течение 5 мин. Удаляли супернатант с помощью серологических пипеток, оставляя по 5–10 мл клеточного осадка в пробирках, который аккуратно ресуспендировали пипеткой с широким носом. Затем сконцентрировали содержимое пробирок и отмыли центрифугированием при 450 g (что соответствует 1638 об/мин) в течение 5 мин еще 2 раза в среде M199, содержащей раствор человеческого альбумина.

Ресуспендировали осадок пипеткой с широким носом в культуральной среде, доводили культуральной средой объем клеточной суспензии до 50 мл.

Сепарирование ОЛ от экзокринной составляющей осуществляли мануально, путем последовательного насаивания приготовленных градиентов плотности фиколл-урографин в центрифужные пробирки, объемом 50 мл: 1,1 г/л в объеме 10 мл, тяжелого градиента в объеме 11,8 мл, легкого градиента в объеме 12,7 мл [33]. По 15 мл суспензии выделенных клеток насаивали в каждую пробирку, центрифугировали при 2000 об/мин в течение 15 мин. Целевую фракцию собирали в центрифужные пробирки, отмывали в среде CMRL-1066 Medium (Life Technologies, США), содержащей раствор человеческого альбумина, 0,1 % ITS-premix (Becton Dickinson, Германия), 1 % пенициллина-стрептомицина (Life Technologies, США), 1 % 1 M Hepes (Life Technologies, США), центрифугировали при 450 g в течение 5 мин.

Для подсчета количества ОЛ отбирали 1 мл образца клеточной суспензии в культуральной среде и разводили в 10 раз средой M 199, содержащей раствор человеческого альбумина, перемешивали и отбирали 1 мл образца в чашку Петри с сеткой 35 \times 10 мм, смешивали с 1 мл раствора дитизона. Полученное количество умножали на фактор разведения. Посевную концентрацию определяли исходя из общего количества ОЛ. Флаконы помещали в CO_2 – инкубатор (37 °С, 90 % влажности и 5 % CO_2). Смену среды проводили каждые 3–4 дня.

Детектирование ОЛ. К 1 мл клеточной суспензии добавляли 1 мл раствора дитизона DTZ Stain Solution 100x (Millipore S.A.S., Франция), разведенный до рабочей концентрации культуральной средой DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Media) (Life Technologies, США), инкубировали в течение 5 мин при температуре 37 °С. При микроскопировании на универсальном инвертированном микроскопе «Nikon» (Япония) результат учитывали с применением метода фазового контраста (рис. 1).

Статистическую обработку результатов исследования выполняли с помощью пакета прикладных программ для медико-биологических исследований STATISTICA (Version 10, StatSoft Inc.) и Microsoft Excel. Числовые значения представляли в виде медианы [минимум; максимум]. Для анализа сравнения применяли непараметрические методы: для сравнения двух независимых групп по одной количественной переменной использовали тест Манна–Уитни. Различия считали достоверными при значении $p < 0,05$.

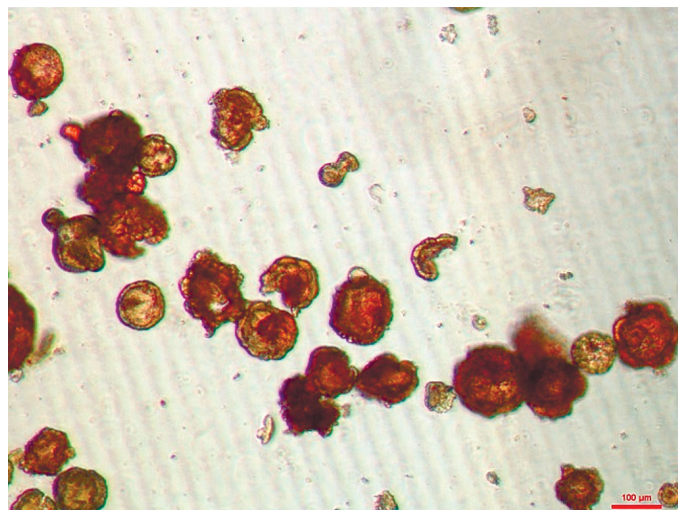


Рис. 1. Островки Лангерганса, окраска дитизином, $\times 100$, ФК [Е. А. Назарова]

Fig. 1. Islets of Langerhans, ditizone staining, $\times 100$, PC [E. A. Nazarova]

Результаты исследования и их обсуждение

После забора и транспортировки в условиях статической холодовой консервации (4°C), в течение 3,5–4 ч ПЖ подвергались дополнительной машинной перфузии консервирующим раствором «Кустодиол НТК» (Германия) с перфтораном для дополнительной оксигенации.

Образцы ПЖ доставлялись в лабораторию после отделения селезенки, 12-перстной кишки, крупных сосудов и жировой ткани от железы и катетеризации главного панкреатического протока в обе стороны (рис. 2).

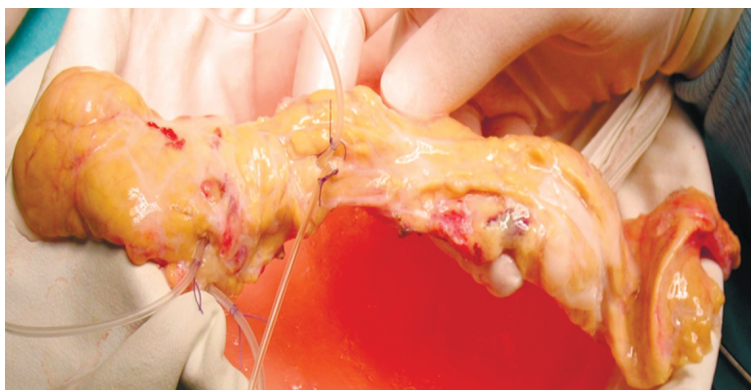


Рис. 2. Канюлирование протоковой системы ПЖ гибкими пластиковыми катетерами [Е. А. Назарова, Н. М. Яковец]

Fig. 2. Cannulation of the pancreatic duct system with flexible plastic catheters [E. A. Nazarova, N. M. Yakovets]

При отработке методики выделение ОЛ из ПЖ на всех этапах, за исключением сепарирования от экзокринной составляющей, осуществляли согласно протоколу «Выделение островков из поджелудочной железы человека» SOP ICPF-001 [31]. Получение чистой фракции эндокринных клеток проводилось мануальным способом, а не автоматическим, как рекомендовано в протоколе.

Согласно цели и поставленным задачам, а также для увеличения количества выделяемых клеток, на данном этапе выполнения исследований была произведена модификация стандартного протокола выделения ОЛ из ПЖ.

Установлено, что рекомендованная в протоколе скорость центрифугирования клеточной суспензии 170 g при продолжительности одного цикла осаждения $t=4$ мин на всех этапах выделения, является недостаточной (по визуальной оценке объема осаждаемого клеточного материала и прозрачности супернатанта в центрифужных пробирках после завершения цикла центрифугирования). Полное осаждение клеток не было достигнуто ни на одном из этапов выделения ОЛ ($n=3$). В дальнейшем данные параметры центрифугирования были постепенно увеличены опытным путем: скорость – до 450 g, продолжительность цикла t – до 5 мин, что обеспечило увеличение осаждаемого клеточного материала не менее, чем на 40 %

(n=4). После определения эффективной скорости и длительности цикла центрифугирования в дальнейшем сравнение объемов осаждаемого клеточного материала не проводили (табл. 1).

Таблица 1

Сравнительная характеристика клеточного осадка, полученного путем центрифугирования при различных скоростях

Table 1

Comparative characteristics of the cell sediment obtained by centrifugation at different speeds

Скорость центрифугирования, g	Объем осаждаемого клеточного материала (от общего объема пробирки 50 мл), мл
170	3 [3; 4] (n=3)
450	7 [5; 8] (n=4)

Примечание. Данные в таблице представлены в виде: медиана [min; max].

Отрабатывая методику [28], отмывание выделенных ОЛ (n=4) после сбора и этапа сепарирования на градиентах плотности проводили средой, содержащей 1,5 % человеческого альбумина, соответствующей данной методике и другим наиболее часто применяемым протоколам [34–36]. В дальнейшем при выделении ОЛ (n=3) из образцов ПЖ концентрация раствора человеческого альбумина в среде была снижена до 0,3 % (в 5 раз) от общего объема. По окончании циклов отмывания визуализировали достаточное осаждение целевой фракции. С целью получения достоверности вывода об эффективности снижения концентрации альбумина, оценивали объем осаждаемого клеточного материала и жизнеспособности ОЛ, отмываемых средами с разными концентрациями раствора человеческого альбумина – 0,3 % и 1,5 %. Опытным путем установлено, что снижение концентрации альбумина в среде для отмывания выделенных клеток с 1,5 до 0,3 % значительного влияния на объем и качество (жизнеспособность) осаждаемого материала при сопоставимой скорости центрифугирования не оказывает, что позволяет снизить затраты на дорогостоящий компонент среды (табл. 2).

Таблица 2

Сравнительная характеристика клеточного материала, полученного путем отмывания в среде с разной концентрацией раствора человеческого альбумина

Table 2

Comparative characteristics of the cell sediment obtained by washing in a medium with different concentrations of human albumin solution

Концентрация раствора человеческого альбумина в среде для отмывания ОЛ, %	Объем осаждаемого клеточного материала (от общего объема пробирки 50 мл), мл	ЖСП ОЛ, %
1,5	5 [3; 8] (n=4)	99,0 [97,5; 99,0] (n=4)
0,3	6 [4; 7] (n=3)	99,0 [97,5; 99,0] (n=3)
Уровень значимости p	1,00	1,00

Примечание. Данные в таблице представлены в виде: медиана [min; max].

Согласно протоколу, ферментативную обработку ПЖ (n=4) при отработке методики [31] проводили смесью ферментов нейтральной протеазы (Neutral Protease NB) и коллагеназы 1 типа (Collagenase NB 1) (Serva, Германия). При уменьшении повреждающего протеолитического воздействия на выделяемые клетки производилась замена рекомендуемой смеси двух ферментов на раствор фермента коллагеназы 4 типа (Life Technologies, США), которая расщепляет полипептидные связи коллагена и эластина, являющихся структурными компонентами соединительной ткани. Данная модификация существенно не отразилась на количестве получаемого клеточного материала и жизнеспособности (табл. 3). Однако стоимость процедуры выделения ОЛ при этом снизилась в 5–6 раз.

В процессе ферментативного расщепления ткани ПЖ высвобождаются не только ОЛ, но и другие экзокринные составляющие структуры. Для получения чистой эндокринной фракции ОЛ от экзокринной составляющей проводят автоматизированное или мануальное разделение клеточной суспензии на фракции путем последовательного добавления трех градиентов плотности в систему. Сепарацию ОЛ проводили мануальным способом.

В связи с применением дополнительной машинной перфузии большей части образцов ПЖ консервирующим раствором «Кустодиол» (НТК) с перфтораном и повышения уровня оксигенации клеток ПЖ до

40 % и, как следствие, снижение их плотности в стандартный протокол выделения были внесены некоторые изменения для исключения потери клеточного материала. Поскольку в результате нескольких циклов центрифугирования при 450 g в течение $t=5$ мин полное осаждение целевой фракции не достигалось, полученную клеточную суспензию в процессе ферментативной обработки и перфузии раствором для нейтрализации переносили в культуральные флаконы с питательной средой и помещали в CO_2 -инкубатор (при температуре 37° C, 5 % CO_2 и 90 % влажности) на 24 ч, после чего проводили осаждение, отмывку, подсчет и сепарирование островковых комплексов от экзокринной составляющей как описано ранее.

Таблица 3

Сравнительная характеристика ОЛ, выделенных с использованием разных ферментов

Table 3

Comparative characteristics of IL isolated using different enzymes

Тип фермента	Количество выделенных ОЛ/1 г ПЖ	ЖСП ОЛ, %
Нейтральная протеаза NB и коллагеназа 1 типа NB (Serva, Германия)	4,1 [0,6; 11,3] (n=4)	99,0 [97,5; 100,0] (n=4)
Коллагеназа 4 типа (Life Technologies, США)	8,0 [2,9; 10,9] (n=4)	99,0 [99,0; 100,0] (n=4)
Уровень значимости p	0,66	0,74

Примечание. Данные в таблице представлены в виде: медиана [min; max].

Заключение

Таким образом, модификация общепринятого протокола [31], заключающаяся в увеличении скорости и продолжительности цикла центрифугирования при отмывании клеточного материала, снижении концентрации раствора человеческого альбумина в среде для отмывания в 5 раз от общего объема, уменьшении повреждающего протеолитического воздействия на выделяемые клетки в результате замены фермента, обеспечила увеличение количества получаемого БМКП на основе ОЛ не менее, чем на 40 % и снижение стоимости процесса в 5–6 раз [32].

Библиографические ссылки

1. International Diabet Federation [Internet]. [Cited 2019 August 04]. Available fom: <https://www.idf.org/aboutdiabetes/type-1-diabetes.html>.
2. Oikarinen S, Hober D, Tauriainen S, et al. Virus antibody survey in different European populations indicates risk association between coxsackievirus B1 and type 1 diabetes. *Diabetes*. 2014;63(2):655–662.
3. Dotta F, Sebastiani G. Enteroviral Infections and Development of Type 1 Diabetes: The Brothers Karamazov Within the CVBs. *Diabetes*. 2014;63(2):384–386.
4. Bowe B, Xie Y, Li T, et al. The 2016 global and national burden of diabetes mellitus attributable to PM 2.5 air pollution. *Lancet Planet Health*. 2018;2(7):301–312.
5. O'Donovan G, Cadena-Gaitán C. Air pollution and diabetes: it's time to get active! *Lancet Planet Health*. 2018;2(7):287–288.
6. Зайчик АШ, Чурилов ЛП. *Основы патохимии*. Санкт-Петербург: ЭЛБИ-СПБ; 2001. 688 с.
7. Пигаревский ПВ, Мальцева СВ, Селивестрова ВГ. Иммунная система, атеросклероз и персистирующая инфекция. *Вестник РАМН*. 2005;2:17–22.
8. Романова ЕА, Чапова ОИ. *Сахарный диабет*. Москва: Эксмо; 2004. 448 с.
9. Лавин Н. *Эндокринология*. Москва: Практика; 1999. 346 с.
10. Gregg EW, LiY, Wang J, et al. Changes in diabetes-related complications in the United States, 1990–2010. *New England Journal of Medicine*. 2014;370:1514–1523.
11. Mannucci E, Monami M, Dicembrini I, et al. Achieving HbA1c targets in clinical trials and in the real world: a systematic review and meta-analysis. *Journal of Endocrinological Investigation*. 2014;37:477–495.
12. Shapiro AM, Lakey JR, Ryan EA, et al. Islet transplantation in seven patients with type 1 diabetes mellitus using a glucocorticoid-free immunosuppressive regimen. *New England Journal of Medicine*. 2000;343:230–238.
13. Ryan EA, Paty BW, Senior PA, et al. Five-year follow-up after clinical islet transplantation. *Diabetes*. 2005;54:2060–2069.
14. Collaborative Islet Transplant Registry Annual Reports. [Internet]. [Cited November 12]. Available from: <https://web.emmes.com/study/isl/reports/reports.htm>.
15. Shapiro AM, Ricordi C, et al. International Trial of the Edmonton Protocol for Islet Transplantation. *New England Journal of Medicine*. 2006;35:1318–1330.
16. Gerber PA, Pavlicek V, Demartines N, et al. Simultaneous islet-kidney vs pancreas-kidney transplantation in type 1 diabetes mellitus: a 5 year single centre follow-up. *Diabetologia*. 2008;51:110–119.
17. Cure P, Pileggi A, Froud T, et al. Improved metabolic control and quality of life in seven patients with type 1 diabetes following islet after kidney transplantation. *Transplantation*. 2008;85:801–812.

18. Leita CB, Cure P, Messinger S, et al. Stable renal function after islet transplantation: importance of patient selection and aggressive clinical management. *Transplantation*. 2009;87:681–688.
19. Thompson DM, Meloche M, Ao Z, et al. Reduced progression of diabetic microvascular complications with islet cell transplantation compared with intensive medical therapy. *Transplantation*. 2011;91:373–378.
20. Fiorina P, Venturini M, Folli F, et al. Natural history of kidney graft survival, hypertrophy, and vascular function in end-stage renal disease type 1 diabetic kidney-transplanted patients: beneficial impact of pancreas and successful islet cotransplantation. *Diabetes Care*. 2005;28:1303–1310.
21. Senior PA, Zeman M, Paty BW, et al. Changes in renal function after clinical islet transplantation: four-year observational study. *American Journal Transplantation*. 2007;7:91–98.
22. Gillard P, Rustandi M, Efendi A, et al. Early Alteration of Kidney Function in Nonuremic Type 1 Diabetic Islet Transplant Recipients Under Tacrolimus-Mycophenolate Therapy. *Transplantation*. 2014;98(4):451–457.
23. Lee TC, Barshes NR, O'Mahony CA, et al. The effect of pancreatic islet transplantation on progression of diabetic retinopathy and neuropathy. *Transplantation Proceedings*. 2005;37:2263–2265.
24. Vantyghem MC, Quintin D, Caiazzo R, et al. Improvement of electrophysiological neuropathy after islet transplantation for type 1 diabetes: a 5-year prospective study. *Diabetes Care*. 2014;37:141–142.
25. D'Addio F, Maffi P, Vezzulli P, et al. Islet transplantation stabilizes hemostatic abnormalities and cerebral metabolism in individuals with type 1 diabetes. *Diabetes Care*. 2014;37:267–276.
26. Danielson KK, Hatipoglu B, Kinzer K, et al. Reduction in carotid intima-media thickness after pancreatic islet transplantation in patients with type 1 diabetes. *Diabetes Care*. 2013;36:450–456.
27. Fiorina P, Folli F, Bertuzzi F., et al. Long-term beneficial effect of islet transplantation on diabetic macro-/microangiopathy in type 1 diabetic kidney-transplanted patients. *Diabetes Care*. 2003;26:1129–1136.
28. Warnock GL, Thompson DM, Meloche RM, et al. A multi-year analysis of islet transplantation compared with intensive medical therapy on progression of complications in type 1 diabetes. *Transplantation*. 2008;86:1762–1766.
29. Mineo D, Pileggi A, Alejandro R, et al. Point: steady progress and current challenges in clinical islet transplantation. *Diabetes Care*. 2009;32:1563–1569.
30. Pellegrini S, Cantarelli E, Sordi V, et al. The state of the art of islet transplantation and cell therapy in type 1 diabetes. *Acta Diabetologica*. 2016;53(5):683–691.
31. Linetsky E. Human pancreatic islet isolation (SOP ICPF-001, attachment I) Origin version 06-95, revision 12, p. 1–43.
32. Назарова ЕА, Кривенко СИ, Федорук АМ, Коритко АА, Гомон АА, Петровская ЕГ. Способ получения островковых комплексов поджелудочной железы человека. Патент ВУ 20789. Опубликовано 09.11.2016 г.
33. Linetsky E. Islet isolation media preparation form (SOP ICPF-002, attachment V) Origin version 06-95, revision 12, p. 1–2.
34. Ricordi C, Lacy PE, Finke EH, et al. Automated method for isolation of human pancreatic islets. *Diabetes*. 1988;37:413–420.
35. Lake SP, Bassett PD, Larkins A, et al. Large-scale purification of human islets utilizing discontinuous albumin gradient on IBM 2991 cell separator. *Diabetes*. 1989;38(1): 143–145.
36. Barbaro B, et al. Improved human pancreatic islet purification with the refined UIC-UB density gradient. *Transplantation*. 2007;84:1200–1203.

References

1. International Diabet Federation [Internet]. [Cited 2019 August 04]. Available fom: <https://www.idf.org/aboutdiabetes/type-1-diabetes.html>.
2. Oikarinen S, Hober D, Tauriainen S, et al. Virus antibody survey in different European populations indicates risk association between coxsackievirus B1 and type 1 diabetes. *Diabetes*. 2014;63(2):655–662.
3. Dotta F, Sebastiani G. Enteroviral Infections and Development of Type 1 Diabetes: The Brothers Karamazov Within the CVBs. *Diabetes*. 2014;63(2):384–386.
4. Bowe B, Xie Y, Li T, et al. The 2016 global and national burden of diabetes mellitus attributable to PM 2.5 air pollution. *Lancet Planet Health*. 2018;2(7):301–312.
5. O'Donovan G, Cadena-Gaitán C. Air pollution and diabetes: it's time to get active! *Lancet Planet Health*. 2018;2(7):287–288.
6. Zajichik ASH, Gurilov LP. *Osnovy patokhimii* [Fundamentals of pathochemistry]. Saint Petersburg: ELBI-SP; 2001. 688 p. Russian.
7. Pigarevskij PV, Malceva SV, Selivestrova VG *Imunnaya sistema, ateroskleruz. i persistiruyushchaya infektsiya* [Immune system, atherosclerosis, and persistent infection]. *Vestnik RAMS*. 2005;2:17–22. Russian.
8. Romanova EA, Chapova OI. *Sakharnyy diabet* [Diabetes]. Moscow: Ecsmo; 2004. 448 p. Russian.
9. Lavin N. *Endukrinologia* [Endocrinology]. Moscow: Practica; 1999. 346 p. Russian.
10. Gregg EW, LiY, Wang J, et al. Changes in diabetes-related complications in the United States, 1990–2010. *New England Journal of Medicine*. 2014;370:1514–1523.
11. Mannucci E, Monami M, Dicembrini I, et al. Achieving HbA1c targets in clinical trials and in the real world: a systematic review and meta-analysis. *Journal of Endocrinological Investigation*. 2014;37:477–495.
12. Shapiro AM, Lakey JR, Ryan EA, et al. Islet transplantation in seven patients with type 1 diabetes mellitus using a glucocorticoid-free immunosuppressive regimen. *New England Journal of Medicine*. 2000;343:230–238.
13. Ryan EA, Paty BW, Senior PA, et al. Five-year follow-up after clinical islet transplantation. *Diabetes*. 2005;54:2060–2069.
14. Collaborative Islet Transplant Registry Annual Reports. [Internet]. [Cited November 12]. Available from: <https://web.emmes.com/study/isl/reports/reports.htm>.
15. Shapiro AM, Ricordi C, et al. International Trial of the Edmonton Protocol for Islet Transplantation. *New England Journal of Medicine*. 2006;35:1318–1330.
16. Gerber PA, Pavlicev V, Demartines N, et al. Simultaneous islet-kidney vs pancreas-kidney transplantation in type 1 diabetes mellitus: a 5 year single centre follow-up. *Diabetologia*. 2008;51:110–119.
17. Cure P, Pileggi A, Froud T, et al. Improved metabolic control and quality of life in seven patients with type 1 diabetes following islet after kidney transplantation. *Transplantation*. 2008;85:801–812.

18. Leita CB, Cure P, Messinger S, et al. Stable renal function after islet transplantation: importance of patient selection and aggressive clinical management. *Transplantation*. 2009;87:681–688.
19. Thompson DM, Meloche M, Ao Z, et al. Reduced progression of diabetic microvascular complications with islet cell transplantation compared with intensive medical therapy. *Transplantation*. 2011;91:373–378.
20. Fiorina P, Venturini M, Folli F, et al. Natural history of kidney graft survival, hypertrophy, and vascular function in end-stage renal disease type 1 diabetic kidney-transplanted patients: beneficial impact of pancreas and successful islet cotransplantation. *Diabetes Care*. 2005;28:1303–1310.
21. Senior PA, Zeman M, Paty BW, et al. Changes in renal function after clinical islet transplantation: four-year observational study. *American Journal Transplantation*. 2007;7:91–98.
22. Gillard P, Rustandi M, Efendi A, et al. Early Alteration of Kidney Function in Nonuremic Type 1 Diabetic Islet Transplant Recipients Under Tacrolimus-Mycophenolate Therapy. *Transplantation*. 2014;98(4):451–457.
23. Lee TC, Barshes NR, O'Mahony CA, et al. The effect of pancreatic islet transplantation on progression of diabetic retinopathy and neuropathy. *Transplantation Proceedings*. 2005;37:2263–2265.
24. Vantyghem MC, Quintin D, Caiazzo R, et al. Improvement of electrophysiological neuropathy after islet transplantation for type 1 diabetes: a 5-year prospective study. *Diabetes Care*. 2014;37:141–142.
25. D'Addio F, Maffi P, Vezzulli P, et al. Islet transplantation stabilizes hemostatic abnormalities and cerebral metabolism in individuals with type 1 diabetes. *Diabetes Care*. 2014;37:267–276.
26. Danielson KK, Hatipoglu B, Kinzer K, et al. Reduction in carotid intima-media thickness after pancreatic islet transplantation in patients with type 1 diabetes. *Diabetes Care*. 2013;36:450–456.
27. Fiorina P, Folli F, Bertuzzi F, et al. Long-term beneficial effect of islet transplantation on diabetic macro-/microangiopathy in type 1 diabetic kidney-transplanted patients. *Diabetes Care*. 2003;26:1129–1136.
28. Warnock GL, Thompson DM, Meloche RM, et al. A multi-year analysis of islet transplantation compared with intensive medical therapy on progression of complications in type 1 diabetes. *Transplantation*. 2008;86:1762–1766.
29. Mineo D, Pileggi A, Alejandro R, et al. Point: steady progress and current challenges in clinical islet transplantation. *Diabetes Care*. 2009;32:1563–1569.
30. Pellegrini S, Cantarelli E, Sordi V, et al. The state of the art of islet transplantation and cell therapy in type 1 diabetes. *Acta Diabetologica*. 2016;53(5):683–691.
31. Linetsky E. Human pancreatic islet isolation (SOP ICPF-001, attachment I) Origin version 06-95, revision 12, p. 1–43.
32. Nazarova EA, Krivenko SI, Fedoruk AM, et al. *Sposob polucheniya ostrovkovykh kompleksov podzhelyudchnoy zhelezy cheloveka* [Method of isolation islet complexes of human pancreas]. Patent BY 20789. Publisher 2016 November 09. Russian.
33. Linetsky E. Islet isolation media preparation form (SOP ICPF-002, attachment V) Origin version 06-95, revision 12, p. 1–2.
34. Ricordi C, Lacy PE, Finke EH, et al. Automated method for isolation of human pancreatic islets. *Diabetes*. 1988;37:413–420.
35. Lake SP, Bassett PD, Larkins A, et al. Large-scale purification of human islets utilizing discontinuous albumin gradient on IBM 2991 cell separator. *Diabetes*. 1989;38(1): 143–145.
36. Barbaro B, et al. Improved human pancreatic islet purification with the refined UIC-UB density gradient. *Transplantation*. 2007;84:1200–1203.

Статья поступила в редколлегию 28.09.2020.
Received by editorial board 28.09.2020.