

УДК 612.34.014.089.6.085.2

Ю.И. Копич, Г.А. Божок*, Е.И. Легач

Экспериментальная трансплантация микрофрагментов поджелудочной железы неонатальных поросят после культивирования или гипотермического хранения в растворе НТК

UDC 612.34.014.089.6.085.2

Yu.I. Kopich, G.A. Bozhok*, E.I. Legach

Experimental Transplantation of Newborn Piglet Pancreatic Microfragments after Culturing or Hypothermal Storage in HTK Solution

Реферат: Подкожная трансплантация микрофрагментов поджелудочной железы (мфПЖ) рассматривается в качестве альтернативного подхода трансплантации островков и используется при невозможности получения «истинных» островков из фетальной ПЖ человека или ткани неонатальных животных (поросята, кролики). В работе исследовали уровень глюкозы у крыс с экспериментальным сахарным диабетом (СД) I типа после трансплантации мфПЖ неонатальных поросят, а также структурную сохранность трансплантата в зависимости от его предварительной обработки путем культивирования или гипотермического хранения (ГХ) в растворе НТК («Custodiol®»). После подкожной трансплантации мфПЖ новорожденных поросят крысам с моделью стрептозотоцинового СД уровень глюкозы нормализовался к 45 суткам. В результате трансплантации мфПЖ, которые были подвергнуты гипотермическому хранению в растворе НТК, наблюдалось ослабление гипергликемии, сходное с тем, что и после использования свежевыделенных мфПЖ. Путем гистологического и морфометрического анализа установлено, что к 15–22 суткам в трансплантате происходит замещение секреторной ткани ПЖ на соединительную, причем этот процесс более интенсивный в культивированных мфПЖ. Поскольку уровень глюкозы у крыс с моделью СД нормализовался на фоне отсутствия инсулинопродуцирующей ткани ПЖ в трансплантате, предполагается существование специфических факторов, приводящих к стимуляции неогенеза β -клеток в собственной железе реципиента.

Ключевые слова: сахарный диабет, поджелудочная железа, гипотермическое хранение, трансплантация, глюкоза.

Реферат: Підшкірна трансплантація мікрофрагментів підшлункової залози (мфПЗ) розглядається в якості альтернативного підходу трансплантації острівців та використовується при неможливості отримання «істинних» острівців із фетальної ПЗ людини або тканини неонатальних тварин (поросята, кролики). У роботі досліджували рівень глюкози у щурів із експериментальним цукровим діабетом (ЦД) I типу після трансплантації мфПЗ неонатальних поросят, а також структурну цілісність трансплантата в залежності від його попередньої обробки шляхом культивування або гіпотермічного зберігання в розчині НТК («Custodiol®»). Після підшкірної трансплантації мфПЗ неонатальних поросят щурам із моделлю стрептозотоцинового ЦД рівень глюкози нормалізувався на 45 добу. У результаті трансплантації мфПЗ, які були піддані гіпотермічному зберігання в розчині НТК, спостерігалось послаблення гіперглікемії, подібне до того, що й після використання свіжовиділених мфПЗ. За допомогою гістологічного та морфометричного аналізу встановлено, що на 15–22 добу в трансплантаті відбувається заміщення секреторної тканини ПЗ на сполучну, причому цей процес більш інтенсивний у культивованих мфПЗ. Оскільки нормалізація рівня глюкози у щурів із моделлю ЦД спостерігалась на тлі відсутності інсулінопродукуючої тканини ПЗ у трансплантаті, передбачається існування специфічних факторів, які призводять до стимуляції неогенезу β -клітин у власній залозі реципієнта.

Ключові слова: цукровий діабет, підшлункова залоза, гіпотермічне зберігання, трансплантація, глюкоза.

Abstract: Subcutaneous transplantation of pancreas microfragments (PMFs) is regarded as an alternative approach for islets transplantation and applied in case of impossibility to derive 'true' islets from human fetal pancreas or tissue of neonatal animals (piglets, rabbits). The research involved the study of glucose level in rats with experimental I type *Diabetes mellitus* (DM) after transplantation of PMFs of neonatal piglets, as well as structural integrity of graft depending on its pre-treatment either by culturing or hypothermal storage (HS) in HTK solution (Custodiol®). After subcutaneous transplantation of PMFs of newborn piglets into rats with streptozotocin-induced DM the glucose level was normalized to the 45th day. After transplantation of PMFs being stored hypothermally in HTK solution a hyperglycemia weakening was observed similar to the one after the applying native PMFs. Using histological and morphometrical analysis a replacement of secretory tissue of pancreas to connective one was revealed in transplant to the 15th–22nd days, moreover the process was more intensive in cultured PMFs. Since glucose level in rats with DM was normalized without insulin-producing tissue of pancreas in transplant, the existence of specific factors resulting in stimulation of β -cell neogenesis in the recipient's own gland was assumed.

Key words: *Diabetes mellitus*, pancreas, hypothermal storage, transplantation, glucose.

Отдел биохимии и фармакологии нейрогуморальных систем, Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, г. Харьков

*Автор, которому необходимо направлять корреспонденцию: ул. Переяславская, 23, г. Харьков, Украина 61015; тел.: (+38 057) 373-30-07, факс: (+38 057) 373-30-84, электронная почта: bozhokgaru@mail.ru

Поступила 27.05.2014
Принята в печать 02.09.2014

Проблемы криобиологии и криомедицины. – 2015. – Т. 25, №1. – С. 45–56.
© 2015 Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины

Department of Biochemistry and Pharmacology of Neurohumoral Systems, Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine of the National Academy of Sciences of Ukraine, Kharkov, Ukraine

*To whom correspondence should be addressed: 23, Pereyaslavskaya str., Kharkov, Ukraine 61015; tel.: +380 57 373 3007, fax: +380 57 373 3084, e-mail: bozhokgaru@mail.ru

Received May, 27, 2014
Accepted September, 02, 2014

Probl. Cryobiol. Cryomed. 2015. 25(1): 45–56.
© 2015 Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine

В современной медицинской практике клеточная терапия является не экспериментальным, а общепринятым методом, что подтверждено законодательной базой [11, 40–44]. В мировой клинической практике он применяется в терапии сахарного диабета I типа (СД I типа) [42], для аллогенной трансплантации островков поджелудочной железы (ПЖ) [19], которая в некоторых случаях позволяет достичь инсулиновой независимости у реципиентов [36, 44], но чаще снизить ежедневную дозу экзогенного инсулина и купировать развития вторичных осложнений СД [17, 37].

В трансплантологии применяют подходы, направленные на максимальное сохранение свойств трансплантата и уменьшение последствий его ишемии. Среди сберегающих технологий основными являются криоконсервирование и гипотермическое хранение. Известно, что гипотермия не полностью ингибирует клеточный метаболизм, поэтому состав растворов для гипотермического хранения должен быть подобран таким образом, чтобы предотвратить повреждение клеток.

В современной трансплантологической практике используют достаточно узкий спектр консервирующих растворов, основными из которых являются UW (США), НТК («Custodiol®», Германия), «Celsior» (США) [14, 16, 34]. Для хранения трансплантатов печени, почек, сердца и других органов широко применяют раствор НТК [5, 21, 28, 30], имеющий низкую вязкость, что способствует быстрому охлаждению органа. В последнее время раствор НТК используют также для хранения ПЖ перед трансплантацией или получением островков [35].

Следует отметить, что современный протокол трансплантации островков ПЖ, принятый в клинической практике, включает забор железы с перфузией органа раствором НТК, хранение в нем не более 12 ч, получение островков с помощью ферментативного метода, их очистку в градиенте плотности и обязательное культивирование в течение 12–72 ч при 22...37°C [18].

Подкожная трансплантация микрофрагментов ПЖ (мфПЖ), как правило, используется при невозможности получения «истинных» островков из фетальной ткани или ткани неонатальных животных (поросята, кролики) [1, 9, 20]. Основными преимуществами данного подхода являются малая инвазивность проводимой процедуры, незначительные материало- и трудозатраты при получении трансплантата, минимальный риск осложнений. В современной научной литературе описаны экспериментальные данные о применении криоконсервированных микрофрагментов ткани ПЖ для снижения уровня гипергликемии [4, 7], однако отсутствуют результаты гипотермического хранения мфПЖ для последующей трансплантации.

Current medical practice utilizes the cell therapy as not experimental method so far, but as conventional one, and this could be confirmed at least by legal framework [2, 40–44]. In clinical practice it is used in treatment of Type I *Diabetes mellitus* (Type I DM) [42], as allogeneic transplantation of pancreatic islets in particular, which in some cases enables to achieve even insulin independence in the recipients [34, 44], and mostly allow to reduce the daily dose of exogenous insulin and to arrest the development of secondary complications of DM [10, 37].

Transplantology utilizes the approaches intended to the highest preservation of transplant properties and reduction of its ischemia outcomes. Cryopreservation and hypothermic storage are the most principal among other preservation technologies. It is well known that hypothermia does not fully inhibit the cell metabolism, so the components for hypothermic storage solutions should be chosen with a purpose to prevent cell damage.

Contemporary transplantology applies quite a narrow range of preservative solutions, *i. e.* the UW, НТК (Custodiol®), Celsior being the basic ones [6, 8, 32]. Storage of liver, kidney, heart transplants as well as other organs involve widely the НТК solution with a low viscosity, enabling the rapid cooling of organ [14, 23, 25, 26]. Recently, НТК solution has been also used for pancreas storage before transplantation or derivation of islets [33].

It should be noted also that contemporary transplantation protocol of pancreas islets, which meant to be appropriate for clinic, should include isolation of gland accompanied with organ perfusion by НТК solution, storage in the solution during up to 12 hrs, derivation of islets with enzyme method, their concentrating in density gradient and obligatory culturing for 12–72 hrs at 18...37°C [11].

Subcutaneous transplantation of pancreatic microfragments (PMFs) is usually used if ‘true’ islets are impossible to derive from either fetal or newborn animal (piglet or rabbit) tissues [5, 13, 35]. Primary advantages of this approach are low invasiveness of performed procedure, low material and labor costs at transplant derivation, and minimal risk of complications. To date there are the reports about application of cryopreserved microfragments of pancreas tissue to decrease the hyperglycemia level [21, 29], however, no reports about hypothermic storage of PMFs for further transplantation are known so far.

It has been known that a short-term culture of pancreatic islets before transplantation results in the reduced immunogenic properties and prolonged survival of transplant in recipient’s organism [4]. It is of interest to elucidate whether culturing of PMFs would lead to the same result or not.

The research aim was to study glucose level in rats with experimental Type I DM following the transplan-



Известно, что при краткосрочном культивировании островков ПЖ перед трансплантацией снижается иммуногенность и пролонгируется выживаемость трансплантата в организме реципиента [13]. Важно выяснить, приведет ли культивирование мфПЖ к подобному результату.

Цель данной работы – исследование уровня глюкозы у крыс с экспериментальным СД I типа после трансплантации ткани ПЖ неонатальных поросят, а также структурной сохранности трансплантата в зависимости от предварительной обработки путем культивирования или гипотермического хранения.

Материалы и методы

Эксперименты проводили в соответствии с «Общими принципами экспериментов на животных», одобренными V Национальным конгрессом по биоэтике (Киев, 2013) и согласованными с положениями «Европейской конвенции о защите позвоночных животных, используемых для экспериментальных и других научных целей» (Страсбург, 1986).

Работу выполняли на ПЖ новорожденных поросят ($n = 24$), предоставленных агрокомплексом «Слобожанский» (Харьковская область). В качестве реципиентов для трансплантации использовали белых беспородных крыс ($n = 48$).

Наркотизированных животных декапитировали, ПЖ извлекали в стерильных условиях и помещали в охлажденную стерильную питательную среду 199 («Sigma», США) с антибиотиками (пенициллин – 200 ЕД/мл и канамицин – 150 мкг/мл), в которой ткань измельчали на фрагменты размером 0,5–1,0 мм³. Отмывали 3–4 раза от крови средой 199 с антибиотиками.

Часть полученных мфПЖ культивировали по методу, описанному в работе И.С. Турчина и соавт. [2] в питательной среде 199 с добавлением 10% теплоинактивированной фетальной телячьей сыворотки (ФТС, «Sigma»), антибиотиков (пенициллин – 100 МЕ/мл и канамицин – 75 мкг/мл) в течение 24 ч в атмосфере 5% CO₂ при 37°C в соотношении: фрагменты из одной железы в 2 мл среды.

Другую часть мфПЖ помещали в условия гипотермического хранения (ГХ) в раствор НТК («Dr. F. Kohler Chemie GmbH», Германия) на 24 ч при 4°C. В связи с тем, что НТК относится к маннитол-содержащим растворам, в качестве раствора для сравнения и возможной альтернативы в экспериментах также использовали маннитол-содержащий раствор «Турусол» («Юрия-Фарм», Украина).

У 3–4-месячных крыс СД I типа вызывали путем одноразовой внутрибрюшинной инъекции стрептозотоцина (СТЗ, «Sigma») в дозе 55 мг/кг массы животного.

tation of pancreatic tissue of newborn piglets, as well as structural integrity of transplant depending on pre-treatment by terms of culturing or hypothermic storage.

Materials and methods

The experiments in animals were performed according to the General Ethical Principles of Experiments in Animals, approved by the 5th National Congress for Bioethics (Kiev, 2013) and agreed with the statements of the European Convention for the Protection of Vertebrate Animals Used for Experimental and Other Scientific Purposes (Strasbourg, 1986).

The research was performed in pancreas of newborn piglets ($n = 24$) provided by Slobozhanskiy agricultural company (Ukraine). White breedless rats were used as recipients for transplantation ($n = 48$).

Anesthetized animals were decapitated, pancreas were derived aseptically and placed into cooled sterile nutrient medium 199 (Sigma, USA) with antibiotics (200 IU/ml penicillin and 150 µg/ml kanamycin), and thereafter the tissue was fragmented by 0.5–1.0 mm³. Then the product was washed 3–4 times free of blood with medium 199 supplemented with antibiotics.

A part of derived PMFs was cultured according to Turchin I.S. *et al.* [9] in nutrient medium 199 supplemented with 10% thermoinactivated fetal bovine serum (FBS, Sigma), antibiotics (100 IU/ml penicillin and 75 µg/ml kanamycin) for 24 hrs in atmosphere with 5% CO₂ at 37°C in the ratio: fragments of one gland in 2 ml of medium.

Another part of PMFs was kept under hypothermic storage (HS) conditions in HTK solution (Dr. F. Kohler Chemie GmbH, Germany) for 24 hrs at 4°C. Due to the fact that HTK is mannitol-containing solution, we have chosen Turusol (Yuriya-Pharm, Ukraine), a mannitol-containing solution for comparative assessments and a possible alternative solution.

Type I DM was induced in 3–4 month-old mice by single intraperitoneal injection of Streptozotocin (STZ, Sigma) in a doze of 55 mg/kg of animal mass.

Glucose level in blood was controlled with Gemoqlan indicator strips (Ukraine) and glucometer Glucofot-II (Norma, Ukraine). Taking into account a possibility of spontaneous remission of experimental streptozotocin-induced *Diabetes mellitus* [30], only the animals with glucose level not lower than 15 µmol/l were selected for transplantation.

A week following STZ injection, the PMFs were transplanted with Dufaut's needle into adipose tissue of withers region of the rats with DM. Single rat was injected with endocrine material obtained from single pancreas. Transplantation area was marked with a stained suture.

The experimental animals were divided into the following groups: the 1st group – transplantation of freshly isolated PMFs; the 2nd one – transplantation of PMFs



Уровень глюкозы в крови контролировали с помощью индикаторных пластинок «Гемоглан» (Украина) на глюкометре «Глюкофот-II» (ППП «Норма», Украина). Учитывая возможность спонтанной ремиссии экспериментального стрептозотоцинового диабета [32], для трансплантации отбирали животных, у которых уровень глюкозы был не ниже 15 ммоль/л.

Крысам с СД через неделю после инъекции СТЗ выполняли трансплантацию мфПЖ в подкожно-жировую клетчатку в области холки с помощью иглы Дюфо. Одной крысе вводили эндокринный материал, полученный из одной ПЖ. Место трансплантации отмечали с помощью окрашенного шовного материала.

Экспериментальные животные были разделены на следующие группы: 1 – трансплантация свежесодержанных мфПЖ; 2 – трансплантация мфПЖ после ГХ в растворе НТК; 3 – трансплантация мфПЖ после ГХ в растворе «Турусол»; 4 – трансплантация мфПЖ после культивирования; 5 – без трансплантации.

Еженедельно у крыс проводили забор крови для измерения уровня глюкозы. Экспериментальных животных забивали на 3-и, 8-, 15-, 22- и 45-е сутки.

Для гистологических исследований трансплантаты, взятые на разных сутках после трансплантации, фиксировали в 10%-м формалине и заливали в парафин. Серийные срезы толщиной 5 мкм окрашивали гематоксилином и эозином. Для микроскопических образцов использовали микроскоп «Olympus IX-71» (Япония). Фотографии анализировали с помощью программы для обработки изображений «AxioVision Rel 4.7» (Германия).

При морфометрическом исследовании серийных срезов трансплантатов оценивали следующие показатели: общую площадь трансплантата; площадь трансплантата, сохраняющего альвеолярно-трубчатое строение, характерное для ПЖ; площадь очагов аутолиза; площадь зон с инфильтрацией; площадь соединительной ткани.

Для статистической обработки результатов использовали методы описательной статистики [3]. Различия между показателями независимых групп оценивали с помощью непараметрического критерия Манна-Уитни, между показателями зависимых групп – парного теста Вилкоксона.

Результаты и обсуждение

При изучении гликемического показателя установлено, что у животных с моделью СД I типа без трансплантации высокий уровень глюкозы сохранялся на протяжении всего срока наблюдения (рис. 1). У животных всех экспериментальных групп с трансплантацией на 8-е сутки наблюдалось

after HS in HTK solution; the 3rd – transplantation of PMFs after HS in Turusol solution; the 4th – transplantation of PMFs after culturing; 5 – no transplantation.

Every week a blood sampling was performed in rats to measure glucose level. Experimental animals were sacrificed to the 3rd, 8th, 15th, 22nd and 45th days.

To perform histological analysis the transplants derived on different days following transplantation were fixed in 10% formalin and embedded to paraffin. Serial sections of 5 μm were stained with hematoxylin and eosin. Microscope Olympus IX-71 (Japan) was used for photomicrography of the samples. Images were studied using image-processing AxioVision Rel 4.7 software (Germany).

Morphometric study of serial sections of transplants involved the evaluation of the following parameters: total area of transplant; area of transplant with preserved alveolar and tubular structure characteristic for pancreas; area of autolysis loci; area of zones with infiltration; area occupied by connective tissue.

The methods of descriptive statistics were used for statistical processing of the results [20]. The differences between the indices of independent groups were assessed using nonparametric Mann-Whitney criterion, the data of dependent groups were compared with paired Wilcoxon test.

Results and discussion

Assessment of glycemic index revealed that animals with Type I DM without transplantation had a high glucose level through all the observation period (Fig. 1). The animals of all the experimental groups with transplantation had a reduction of glucose level to the 8th day, which progressively decreased thereafter. By the 45th day this index was within the physiological norm limits. No statistically significant differences in the dynamics of glycemia depending on the type of transplant were revealed.

To assess the state of transplanted pancreatic tissue histological and morphometric studies were conducted on different days following transplantation. Transplants of fresh isolated PMFs had a well-preserved sections of pancreatic tissue to the 3rd day after procedure; which kept their characteristic alveolar and tubular structure (Fig. 2A), and besides that there were large areas of tissue underwent autolytic changes such as decoupling of the acini, obliteration of their structure, karyopyknosis of nuclei and disappearance of cell contours (Fig. 2B). An infiltration by polymorphonuclear cells and macrophages was observed on periphery of PMFs, which had large phagocytosed fragments in their cytoplasm (Fig. 2C).

Visual examination of transplant site to the 8th and 15th day in subcutaneous adipose tissue revealed a demarcation inflammation around preserved PMFs.



уменьшение уровня глюкозы, который прогрессивно снижался в дальнейшем. К 45-м суткам данный показатель был в пределах физиологической нормы. Статистически значимых отличий в динамике гликемии в зависимости от вида трансплантата выявлено не было.

Для оценки состояния трансплантированной ткани ПЖ были проведены гистологический и морфометрический анализы в разные сутки после трансплантации. В трансплантатах свежeweделенных мфПЖ на 3-и сутки после операции выявлялись участки хорошо сохранившейся ткани ПЖ с характерным альвеолярно-трубчатый строением (рис. 2, А) и обширные участки ткани, подвергшейся аутолитическим изменениям в виде дискомплексации ацинусов, стирания их структуры, кариопикноза ядер и исчезновения контуров клеток (рис. 2, В). На периферии мфПЖ обнаружена инфильтрация полиморфно-ядерными клетками и макрофагами, в цитоплазме которых определялись крупные фагоцитированные фрагменты (рис. 2, С).

При визуальном осмотре места трансплантации на 8- и 15-е сутки в подкожной жировой клетчатке было обнаружено демаркационное воспаление вокруг сохранившихся мфПЖ. Гистологический анализ выявил остатки ацинарных структур в центральной части трансплантатов. В целом в трансплантатах была ярко выражена инфильтрация лейкоцитами и гистиоцитами. Присутствовали обширные участки соединительной ткани (рис. 2, D).

К 22-м суткам после трансплантации процесс продуктивного воспаления был практически завершен, и в области трансплантации наблюдались сформировавшиеся соединительнотканые рубцы.

Описанная гистологическая картина была характерна для трансплантатов всех четырех экспериментальных групп.

Результаты морфометрического анализа состояния трансплантатов мфПЖ в разные сроки после трансплантации представлены в таблице. Заметно, что в мфПЖ, культивированных перед трансплантацией, на 3-и сутки площадь сохранившейся ткани ПЖ значимо меньше, чем в других группах. На 8-е сутки в зоне трансплантации не обнаружено ткани с характерным для ПЖ строением, при этом площадь участков с инфильтрацией в этих трансплантатах не отличалась от свежeweделенных. Однако на 15-е сутки они были значимо меньше. С 8-х суток наблюдения площадь, занимаемая соединительной тканью в трансплантатах культивированных мфПЖ, значимо увеличена по сравнению с образцами других групп.

В трансплантатах мфПЖ, хранившихся в гипотермических условиях в растворе НТК, не наблюдалось значимых отличий в динамике замещения

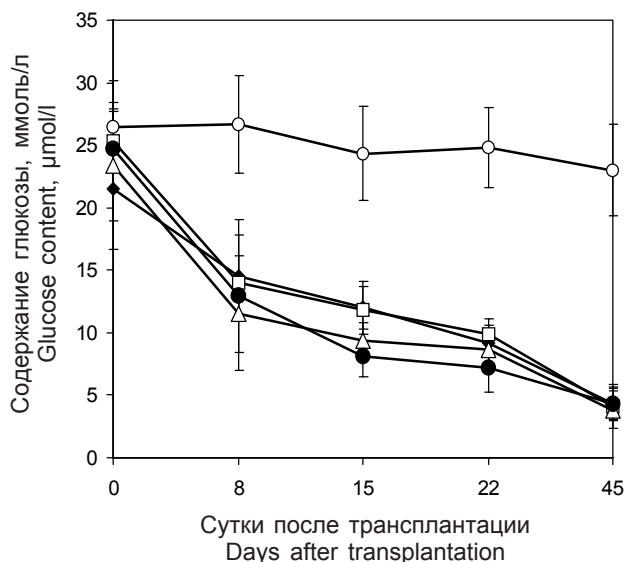


Рис. 1. Содержание глюкозы в крови крыс с СД I типа без трансплантации (○) и после трансплантации: ◆ – свежeweделенные мфПЖ; □ – мфПЖ после ГХ в растворе НТК; △ – мфПЖ после ГХ в «Турусоле»; ● – мфПЖ после культивирования. Уровень глюкозы у intactных крыс находился в пределах 2–5 нмоль/л.

Fig. 1. Glucose content in blood of rats with Type I DM without transplantation (○) and after transplantation of: ◆ – fresh PMFs; □ – PMFs after HS in NTK solution; △ – PMFs after HS in Turusol solution; ● – PMFs after culturing. Glucose level of intact animals was 2–5 nmol/l.

Histological analysis found the remnants of acinar structures in the central part of the transplant. In general, the transplant had strongly marked infiltration with leukocytes and histiocytes; large areas of connective tissue were present (Fig. 2, D).

By the 22nd day following transplantation a productive inflammation was almost completed, and the formed connective tissue cicatrices were observed in transplantation zone.

Described histologic pattern was characteristic for transplants of all four experimental groups.

The results of morphometric analysis of PMF transplants state in various terms after transplantation are shown in the Table. It is obvious that PMFs cultured prior to transplantation had a significantly smaller surface of preserved pancreatic tissue to the 3rd day if compared with other groups. To the 8th day, no tissue with structure typical for pancreas was found in transplantation site, at the same time the areas with infiltration in these transplants were the same as in case of fresh samples. However, to the 15th day they have been already significantly smaller. Starting from the 8th observation day the area occupied by connective tissue within the transplants of cultured PMFs was significantly increased if compared to the samples of other groups.



ткани ПЖ соединительной тканью по сравнению с свежевыделенными мфПЖ. К 22-м суткам в образцах после ГХ в растворе «Турусол» установлено ускоренное замещение трансплантата соединительной тканью.

Одним из основных морфологических признаков трансплантатов мфПЖ является формирование обширных участков аутолиза уже на 3-и сутки после трансплантации. Известно, что в физиологических условиях липолитические ферменты фосфолипаза А и липаза выделяются железой в активном состоянии, при этом протеолитические ферменты неактивны и запасаются в гранулах [8]. Освобождение липаз при повреждении ткани активирует расщепление липидов клеточных мембран и ускоряет деструктивные процессы. В результате накопления в поврежденных участках продуктов липолиза и распада клеток наблюдается сдвиг рН в кислую сторону, что стимулирует переход внутриклеточного трипсиногена в трипсин, который, в свою очередь, активирует лизосомальные ферменты и протеиназы, что приводит к ферментативному аутолизу ткани ПЖ.

Инфильтрация трансплантата иммунокомпетентными клетками свидетельствует о запуске процессов распознавания и отторжения чужеродной ткани в организме реципиента. Влияет ли соотношение площади сохраненных и аутолитических участков ткани ПЖ на активность иммунного ответа и скорость отторжения трансплантата? Исходя из данных морфометрического исследования такая зависимость четко не установлена. Однако на скорость замещения ткани ПЖ соединительной тканью этот показатель несомненно влияет. Так, в трансплантатах культивированных мфПЖ, которые изначально характеризовались высоким уровнем аутолиза ткани, около 87% площади было замещено соединительной тканью уже к 15-м суткам после трансплантации. Указанные признаки свидетельствуют о том, что в процессе культивирования наблюдаются перестройки, связанные с изменением нативной структуры ткани, уменьшением ее иммуногенности и фактически формированием биологи-

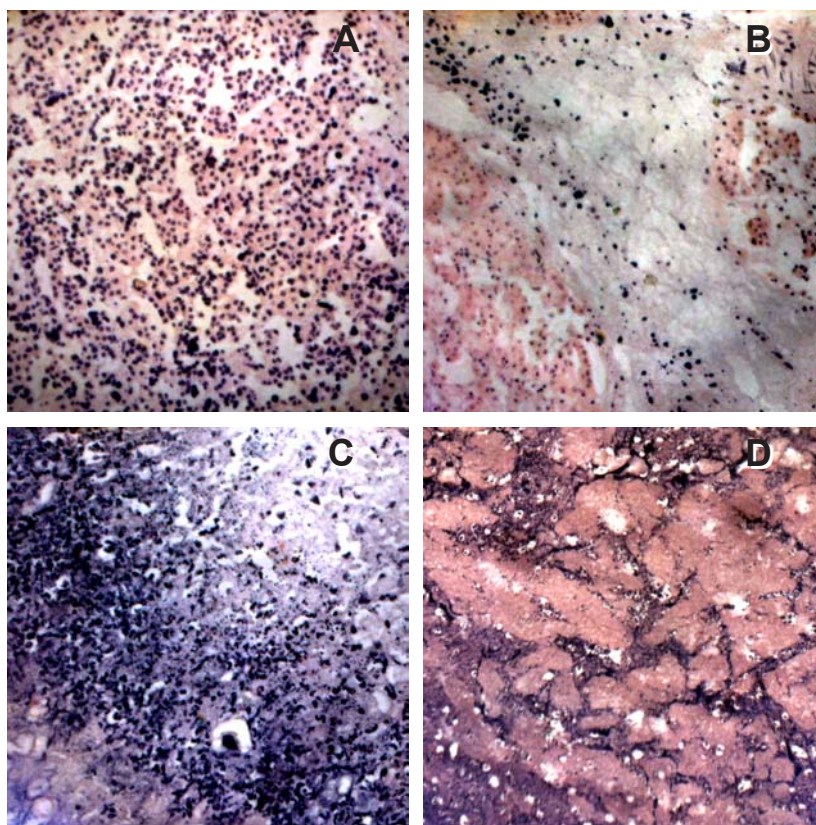


Рис. 2. Трансплантат свежевыделенных фрагментов ПЖ на 3-и и 15-е сутки после трансплантации: **А** – участок сохранившейся ткани ПЖ (3-и сутки, $\times 400$); **В** – участок аутолиза ткани ПЖ (3-и сутки, $\times 200$); **С** – инфильтрация трансплантата (3-и сутки, $\times 200$); **Д** – формирование соединительной ткани (15-е сутки, $\times 200$). Гистологический препарат, окраска гематоксилином и эозином.

Fig. 2. Transplant of fresh pancreatic tissue fragments to the 3rd and 15th day after transplantation: **A** – area of preserved pancreatic tissue (day 3, $\times 400$); **B** – area of pancreatic tissue with autolysis (day 3, $\times 200$); **C** – transplant infiltration (day 3, $\times 200$); **D** – formation of connective tissue (day 15, $\times 200$). Histological sections, hematoxylin and eosin staining.

Transplants of PMFs stored hypothermally in HTK solution did not exhibit any significant differences in the dynamics of replacement of pancreatic tissue by connective one if compared with case of fresh PMFs. The samples after HS in Turusol solution showed a rapid replacement of transplant by connective tissue by the 22nd day of grafting.

Formation of large areas of autolysis to the 3rd day after transplantation was one of the main morphological features of transplanted PMFs. It is known that under physiological conditions lipolytic enzymes such as type A phospholipase and lipase are secreted by pancreas in an active state, at the same time the proteolytic enzymes are inactive and accumulated in granules [36]. Release of lipases in case of tissue damage activates a breakdown of cell membrane lipids and accelerates destructive processes. As a result of accumulation of lipolysis and cytotoxic products in damaged areas an acid shift of pH occurs, stimulating the transition of



**Морфометрический анализ состояния трансплантатов мфПЖ
(% от общей площади трансплантата) на разные сутки после трансплантации
Morphometric analysis of PMF transplants state (% of total area of transplant)
on different days after transplantation**

| Сутки Days post- trasplantation | Состояние трансплантата Transplant state | Свежевыделенные мфПЖ Fresh PMFs | ГХ в растворе НТК HS in HTK solution | ГХ в растворе «Турусол» HS in Turusol solution | Культированные мфПЖ Cultured PMFs |
|---------------------------------------|--|---------------------------------------|---|---|---|
| 3 | Ткань ПЖ Pancreatic tissue | 40,3 ± 11,2 | 36,2 ± 9,5 | 42,8 ± 8,8 | 15,1 ± 6,9* |
| | Аутолиз Autolysis areas | 37,2 ± 9,5 | 37,8 ± 5,5 | 27,5 ± 8,6 | 56,8 ± 10,5* |
| | Инфильтрация Infiltration areas | 21,2 ± 8,7 | 20,1 ± 12,6 | 26,1 ± 9,1 | 21,7 ± 9,3 |
| | Соединительная ткань Connective tissue | 1,3 ± 1,1 | 5,9 ± 3,4 | 3,6 ± 1,8 | 6,4 ± 7,1 |
| 8 | Ткань ПЖ Pancreatic tissue | 28,0 ± 4,1 | 8,6 ± 7,0* | 5,0 ± 4,1* | – |
| | Аутолиз Autolysis areas | 12,5 ± 7,9 | 11,2 ± 5,4 | 18,2 ± 6,5 | 15,4 ± 9,8 |
| | Инфильтрация Infiltration areas | 41,9 ± 6,6 | 54,8 ± 7,9 | 42,8 ± 10,0 | 48,1 ± 8,4 |
| | Соединительная ткань Connective tissue | 17,6 ± 8,2 | 25,4 ± 8,4 | 34,0 ± 7,6 | 36,5 ± 13,04* |
| 15 | Ткань ПЖ Pancreatic tissue | – | – | – | – |
| | Аутолиз Autolysis areas | 7,1 ± 4,2 | – | – | – |
| | Инфильтрация Infiltration areas | 58,5 ± 8,3 | 42,2 ± 11,7 | 17,7 ± 12,3* | 12,6 ± 6,2* |
| | Соединительная ткань Connective tissue | 34,4 ± 12,0 | 57,8 ± 10,5 | 82,3 ± 8,4* | 87,4 ± 9,1* |
| 22 | Ткань ПЖ Pancreatic tissue | – | – | – | – |
| | Аутолиз Autolysis areas | – | – | – | – |
| | Инфильтрация Infiltration areas | 3,9 ± 2,3 | 5,6 ± 3,8 | – | – |
| | Соединительная ткань Connective tissue | 96,1 ± 4,8 | 94,4 ± 6,1 | 100 | 100 |

Примечание: * – отличия статистически значимы по сравнению с трансплантацией свежевыделенных мфПЖ, $p \leq 0,05$.

Note: * – the differences are statistically significant if compared with transplantation of fresh PMFs, $p \leq 0.05$.

ческого «скаффолда», который активно заселяется соединительно-тканевыми элементами после трансплантации.

Предтрансплантационная обработка ткани является необходимым этапом любого протокола клеточно-тканевой трансплантации. Для получения трансплантата, как правило, используют технологии забора, подготовки и хранения ткани, которые в дальнейшем могут влиять на его иммунологические свойства. Подготовительные этапы могут инициировать как иммуномодулирующие, так и некротические процессы в пересаживаемой

intracellular trypsinogen into trypsin, which in turn activates lysosomal enzymes, proteases, that finally leads to enzymatic autolysis of pancreatic tissue.

Transplant infiltration by immunocompetent cells testifies to an initiation of the recognition process and further rejection of foreign tissue in a recipient's organism. Does the ratio of intact vs. autolytic sections of surfaces in pancreas tissue affect the activity of immune response and rate of transplant rejection? Based on the data of our morphometric study, this dependence was not clearly established. However, this index affected undoubtedly the rate of replacement of

ткани, что неизбежно отразится на сохранности трансплантата.

Из результатов представленных исследований следует, что ГХ мфПЖ новорожденных поросят в растворе НТК значительно не влияет на основные характеристики ткани и позволяет снизить гипергликемию до показателей, которые были получены после пересадки свежeweделенных микрофрагментов. Таким образом, маннитол-содержащие растворы НТК и «Турусол» могут использоваться при разработке технологических условий получения мфПЖ для трансплантации. Описанный способ хранения ткани ПЖ может быть апробирован на генномодифицированных свиньях, которые имеют пониженную экспрессию главного ксеноантигена Gal- α -1,3-Gal, за счет чего их органы не вызывают гиперострого отторжения и могут быть применены для трансплантации.

Обобщая полученные результаты, можно сделать вывод о том, что после подкожной трансплантации мфПЖ неонатальных поросят постепенно снижается уровень глюкозы в крови крыс с моделью СД I типа с достижением нормогликемии к 45-м суткам. При этом наблюдаются структурные перестройки ткани трансплантата, зависящие от предобработки, активности процесса отторжения и скорости замещения соединительной тканью. Ввиду отсутствия секреторной ткани ПЖ на сроках более 15 суток после трансплантации можно заключить, что достижение нормогликемии к 45-м суткам происходит не вследствие секреции инсулина клетками пересаженной ткани, а в результате регенерационно-восстановительных процессов, происходящих в собственной ПЖ крыс под влиянием трансплантата.

В свете современных представлений действие гормонально активных клеточных препаратов связывают не только с их гормонозаместительной функцией, но и с возможностью стимуляции регенеративных процессов в поврежденной болезнью железе [44]. Известно, что скорость обновления популяции β -клеток в поджелудочной железе в течение жизни не высока, однако существует вероятность неогенеза β -клеток из клеток протоков [15, 24].

Показано, что после субтотальной панкреатэктомии у крыс объем β -клеточной массы активно увеличивается за счет неогенеза β -клеток из прогениторных клеток, локализованных в стенках протоков желез или внутри оставшихся островков [15, 24]. Процесс регенерации занимает до 40 суток и реализуется путем формирования так называемых «фокальных зон» мест активной клеточной пролиферации, которые дифференцируются в островки Лангерганса или ацинусы.

pancreas tissue by connective one. In particular, the cultured PMFs transplants which were initially characterized by a high level of tissue autolysis, had about 87% of tissue replaced by connective one to the 15th day after transplantation. These features show that culture is accompanied with some rearrangements associated with changes in tissue native structure, decreasing its immunogenicity and, actually, forming of biological 'scaffold', actively populated with connective-tissue elements following transplantation.

Pre-transplantation treatment of tissue is a mandatory step in any protocol of cell-tissue transplantation. To get a transplant one usually applies the technologies of isolation, preparation and storage of tissue which later may affect its immunobiological properties. Preparatory stages may initiate both immunomodulatory and necrotic processes in the grafted tissue, inevitably affecting transplant integrity.

The results of presented study show that HS of PMFs of newborn piglets in HTK solution did not significantly affect the basic characteristics of tissue and allowed to weaken hyperglycemia down to the same indices which were obtained after transplantation of fresh microfragments. Thus, the mannitol-containing HTK and Turusol solutions could be used in developing the technological requirements for deriving the PMFs for transplantation. The described method of pancreatic tissue storage could be tested in genetically modified pigs, having reduced expression of main xenoantigen Gal- α -1,3-Gal, that results in absence of hyperacute rejection of their organs and possible application for transplantation.

Summarizing these results, we may conclude that subcutaneous transplantation of PMFs of newborn piglets results in a gradual decrease of blood glucose level in rats with Type I *Diabetes mellitus*, and, moreover, reaching normoglycemia to the 45th day post-transplantation. At the same time, the structural changes of transplant tissue depend on pre-treatment, activity of rejection and the rate of replacement by connective tissue. Due to the absence of pancreatic secretory tissue already after 15 days post-transplantation, the normoglycemia found to the 45th day could be associated not with insulin secretion by cells of transplanted tissue, but rather resulted from regeneration and recovery processes in rats own pancreas influenced by the transplant.

In the light of current concepts the effect of hormone-active cell preparations is associated not only with their hormone function, but also with their ability to stimulate regeneration in the diseased gland [44]. It is known that turnover rate of β -cell population in pancreas during life is not high, but there is a possibility of β -cells neogenesis from ductal cells [7, 17].



Одной из биологических особенностей свиней является способность к быстрому росту и увеличению живой массы. Поросята рождаются с некоторой анатомической и функциональной незрелостью органов пищеварительного аппарата, в том числе и поджелудочной железы [38]. В первые недели жизни наблюдается интенсивный прирост β -клеточной массы в ПЖ за счет дифференцировки из клеток-предшественников, пролиферации β -клеток и увеличения их размеров [10]. Островки ПЖ новорожденных поросят содержат значительное количество клеток-предшественников, которые могут дифференцироваться в зрелые клетки островков [12, 29, 33]. G.S. Korbitt и соавт. показали в условиях *in vitro*, что в первую неделю после рождения количество эндокринных клеток в островках ПЖ поросят увеличивается с 7 до 35% [26]. В других исследованиях [31, 39] после трансплантации островков ПЖ неонатальных поросят через шесть недель наблюдалось увеличение количества β -клеток на 30%, относительной площади β -клеток в трансплантате на 60%, содержания инсулина в 12 раз.

Таким образом, пересаженные мфПЖ новорожденных поросят могут быть источником ростовых и дифференцировочных факторов, тканеспецифических для данного органа. Регенерация β -клеточной массы, вероятно, происходит в результате активной секреции или пассивной диффузии факторов из трансплантата ПЖ неонатальных поросят [23]. Подобная стимуляция неогенеза β -клеток ПЖ крыс была описана в работе А.А. Hardikar и соавт. [22], хотя в условиях эксперимента использовался не трансплантат, а экстракт, полученный из регенерирующей железы. В пользу данного предположения также свидетельствует тот факт, что экстракты, изготовленные из ПЖ неонатальных поросят, способствуют индукции дифференцировки мезенхимальных стромальных клеток жировой ткани человека в инсулинпродуцирующие клетки [6]. Поиск биологически активных факторов, присутствующих в ПЖ неонатальных поросят и способствующих регенерации β -клеток, может стать предметом дальнейшего перспективного направления в терапии СД I типа.

Выводы

После подкожной трансплантации мфПЖ новорожденных поросят крысам с моделью стрептозотоцинового диабета наблюдается нормализация уровня глюкозы к 45-м суткам. После трансплантации мфПЖ, которые были подвергнуты гипотермическому хранению в растворе НТК, гипергликемия снизилась до показателей, полученных при использовании свежeweделенных мфПЖ. Установлено,

It is shown that after subtotal pancreatectomy in rats a volume of β -cell mass actively increases due to β -cell neogenesis from progenitor cells located in the walls of ducts or glands inside the remaining islets [7, 17]. The regeneration process takes up to 40 days and is implemented by forming so-called 'focal zones', *i. e.* active sites of cell proliferation, which differentiate into Langerhans islets or acini.

Ability of rapid growth and increasing body weight is one of biological peculiarities of pigs. Piglets are born with a certain anatomical and functional immaturity of the digestive system organs, including pancreas [38]. In the first weeks of life a high increase of β -cell mass in pancreas occurs due to the differentiation of progenitor cells, proliferation of β -cells and increase of their dimensions [1]. Pancreatic islets of newborn piglets contain a significant number of progenitor cells that can differentiate into mature islet cells [3, 24, 31]. G.S. Korbitt *et al.* demonstrated that under *in vitro* conditions, a number of endocrine cells in pancreatic islets of pigs in the first postnatal week increased from 7 to 35% [19]. Other reports [27, 39] showed an increase in the number of β -cells by 30%, relative area of β -cells in transplant by 60%, and insulin content in 12 times after six weeks following transplantation of pancreatic islets of newborn piglets.

Thus, the transplanted PMFs of newborn piglets can be a source of growth and differentiation factors, being tissue-specific for a given organ. Regeneration of β -cell mass likely occurs as a result of either active secretion or passive diffusion of the factors from newborn piglet pancreas transplant [16]. Such a stimulation of β -cell neogenesis in rat pancreas was reported by A.A. Hardikar *et al.* [15], although their experiments were not done with transplants, but rather with an extract derived from regenerating gland. This assumption could be also evidenced by the fact that the extracts prepared from pancreas of newborn piglets, promote the induction of differentiation of mesenchymal stromal cells of human adipose tissue into insulin-producing cells [28]. Screening of bioactive factors in the pancreas of newborn piglets which could promote the regeneration of β -cells, may be the subject of further perspective direction in treatment of the Type I *Diabetes mellitus*.

Conclusions

Subcutaneous transplantation of PMFs of newborn piglets to the rats with streptozotocin-induced *Diabetes mellitus* resulted in a normalization of blood glucose level to the 45th day. Transplantation of PMFs which were hypothermically stored in HTK solution led to a decrease of hyperglycemia to the same indices as were obtained using fresh PMFs. It was established that

что в трансплантате замещение секреторной ткани ПЖ соединительной наблюдается уже к 15–22 суткам, причем этот процесс более интенсивный в культивированных микрофрагментах. Нормализация уровня глюкозы у крыс с моделью диабета наблюдается на фоне отсутствия инсулин-продуцирующей ткани ПЖ в трансплантате, что предполагает существование индуцирующих факторов трансплантации, стимулирующих неогенез островков в собственной железе реципиента.

the transplants had their secretory tissue replaced by a connective one to the 15th–22nd days, and this process was more intensive in case of cultured microfragments. Normalization of glucose level in rats with experimental *Diabetes mellitus* was observed even in the absence of insulin-producing pancreatic tissue in transplant site, that suggested the existence of some inducing factors introduced by transplantation, which could stimulate islet neogenesis in a recipient own gland.

Литература

1. Беникова Е.А., Турчин И.С., Белякова Л.С. и др. Опыт лечения детей, страдающих сахарным диабетом, при помощи алло- и ксенотрансплантации культуры островковых клеток поджелудочной железы // Проблемы эндокринологии. – 1987. – №2. – С. 19–22.
2. Данилова А.И., Зубкова С.Т., Ефимов А.С. и др. Влияние трансплантации культуры островковых клеток поджелудочной железы на состояние диабетических ангиопатий // Проблемы эндокринологии. – 1989. – Т. 35, №2. – С. 9–14.
3. Ланг Т.А., Сесик М. Как описывать статистику в медицине. Руководство для авторов, редакторов и рецензентов. М.: Практическая медицина, 2011. 480 с.
4. Легач Є.І., Божок Г.А., Турчин І.С., Бондаренко Т.П. Показники вуглеводного обміну у щурів зі стрептозотоциновим діабетом після комбінованої ксенотрансплантації // Клінічна ендокринологія та ендокринна хірургія. – 2006. – Т.16, №2. – С. 64–68.
5. Никоненко А.С., Ступаков В.И., Собокаръ В.А. Опыт применения кардиоплегического раствора «Кустодиол»: Тезисы и сообщения III Всероссийского съезда сердечно-сосудистых хирургов // Грудная и сердечно-сосудистая хирургия. – 1996. – №6. – С. 275–276.
6. Петренко Ю.А., Мазур С.П., Грищук В.Л. и др. Выбор условий индукции дифференцировки мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток жировой ткани человека в инсулинпродуцирующие клетки in vitro // Клеточная трансплантология и тканевая инженерия. – 2011. – Т. 6, №1. – С. 1–7.
7. Побеленский О. Н. Экспериментальная модель и её обоснование в целесообразности клинического применения криоконсервированных культур микрофрагментов островковых клеток поджелудочной железы при сахарном диабете // Медицина сегодня и завтра. – 2004. – №2. – С. 66–69.
8. Теппермен Д., Теппермен Х. Физиология обмена веществ и эндокринной системы. – М.: Мир, 1989. – 653 с.
9. Шумаков В.И., Блюмкин В.Н., Игнатенко С.Н. и др. Результаты трансплантации культур островковых клеток поджелудочной железы больным сахарным диабетом // Проблемы эндокринологии. – 1985. – №5. – С. 67–70.
10. Ackermann A.M., Gannon M. Molecular regulation of pancreatic β -cell mass development, maintenance, and expansion // J. Mol. Endocrinol. – 2007. – Vol. 38, №1–2. – P. 193–206.
11. Agarwal A., Brayman K.L. Update on islet cell transplantation for type 1 diabetes // Semin. Intervent. Radiol. – 2012. – Vol. 29, № 2. – P. 90–98.
12. Basta G., Racanicchi L., Mancuso F. et al. Transdifferentiation molecular pathways of neonatal pig pancreatic duct cells into endocrine cell phenotypes // Transplant. Proc. – 2004. – Vol. 36, №9. – P. 2857–2863.

References

1. Ackermann A.M., Gannon M. Molecular regulation of pancreatic β -cell mass development, maintenance, and expansion. Journ Mol Endocrinol 2007; 38(1–2): 193–206.
2. Agarwal A., Brayman K.L. Update on islet cell transplantation for type 1 diabetes. Semin Intervent Radiol 2012; 29 (2): 90–98.
3. Basta G., Racanicchi L., Mancuso F. et al. Transdifferentiation molecular pathways of neonatal pig pancreatic duct cells into endocrine cell phenotypes. Transplant Proc 2004; 36 (9): 2857–2863.
4. Benhamou P.Y., Mullen Y. Immunomodulation of pancreatic islets by culture. In: Lanza R.P., Chick W.L., editors. Pancreatic islet transplantation, Boca Raton, FL: CRC Press; 1994; 2: 99–109.
5. Benikova E.A., Turchin I.S., Belyakova L.S. et al. Experience with the treatment of children with Diabetes mellitus using allo- and xenografts of cultures of pancreatic islet cells. Probl Endocrinol (Mosk) 1987; 33 (2): 19–22.
6. Blankensteijn J.D., Terpstra O.T. Liver preservation: the past and the future. Hepatology 1991; 13 (6): 1235–1250.
7. Bonner-Weir S. Life and death of the pancreatic beta cells. Trends Endocrinol Metab 2000; 11(9): 375–378.
8. Cavallari A., Cillo U., Nardo B. et al. A multicenter pilot prospective study comparing Celsior and University of Wisconsin preservative solutions for use in liver transplantation. Liver Transpl 2003; 9 (8): 814–821.
9. Danilova A.I., Zubkova S.T., Efimov A.S. et al. Effect of the transplantation of cultured pancreatic islet cell on the status of diabetic microangiopathy. Probl Endocrinol (Mosk) 1989; 35 (2): 9–14.
10. 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 (4): 1129–1136.
11. Gaba R.C., Garcia-Roca R., Oberholzer J.J. Pancreatic islet cell transplantation: an update for interventional radiologists. Vasc Interv Radiol 2012; 23 (5): 583–594.
12. Girman P., Saudek F. The IKEM pancreas and islet transplant program as part of healthcare for type 1 diabetes patients: retrospective analysis of outcome from 1983 to 2010. Rev Diabet Stud 2011; 8(1): 35–43.
13. Groth C.G., Korsgren O., Tibell A. et al. Transplantation of porcine fetal pancreas to diabetic patients. Lancet 1994; 344 (8934): 1402–1404.
14. Gutierrez J., Guzman C., Correa G. et al. Liver transplantation in Medellin, Colombia: initial experience. Transplant Proc 2004; 36(6): 1677–1680.
15. Hardikar A.A., Bhone R.R. Modulating experimental diabetes by treatment with cytosolic extract from the regenerating pancreas. Diabetes Res Clin Pract 1999; 46(3): 203–211.
16. Hsu B.R., Hsu S., Fu S.H. et al. Neonatal pig pancreatic cell cluster accelerates regeneration of mouse pancreatic beta cells. Transplant Proc 2003; 35(1): 492.



13. Benhamou P.Y., Mullen Y. Immunomodulation of pancreatic islets by culture. In: Lanza R.P., Chick W.L. (Eds.), *Pancreatic islet transplantation*. – Boca Raton FL: CRC Press, 1994. – Vol. 2. – P. 99–109.
14. Blankensteijn J.D., Terpstra O.T. Liver preservation: the past and the future // *Hepatology*. – 1991. – Vol. 13, № 6. – P. 1235–1250.
15. Bonner-Weir S. Life and death of the pancreatic beta cells // *Trends Endocrinol. Metab.* – 2000. – Vol. 11, №9. – P. 375–378.
16. Cavallari A., Cillo U., Nardo B. et al. A multicenter pilot prospective study comparing Celsior and University of Wisconsin preserving solutions for use in liver transplantation // *Liver Transpl.* – 2003. – Vol. 9, №8. – P. 814–821.
17. 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. – Vol. 26, №4. – P. 1129–1136.
18. Gaba R.C., Garcia-Roca R., Oberholzer J.J. Pancreatic islet cell transplantation: an update for interventional radiologists // *Vasc. Interv. Radiol.* – 2012. – Vol. 23, №5. – P. 583–594.
19. Girman P., Saudek F. The IKEM pancreas and islet transplant program as part of healthcare for type 1 diabetes patients: retrospective analysis of outcome from 1983 to 2010 // *Rev. Diabet Stud.* – 2011. – Vol. 8, №1. – P. 35–43.
20. Groth C.G., Korsgren O., Tibell A. et al. Transplantation of porcine fetal pancreas to diabetic patients // *Lancet*. – 1994. – Vol. 344, №8934. – P. 1402–1404.
21. Gutierrez J., Guzman C., Correa G. et al. Liver transplantation in Medellin, Colombia: initial experience // *Transplant. Proc.* – 2004. – Vol. 36, №6. – P. 1677–1680.
22. Hardikar A.A., Bhone R.R. Modulating experimental diabetes by treatment with cytosolic extract from the regenerating pancreas // *Diabetes Res. Clin. Pract.* – 1999. – Vol. 46, №3. – P. 203–211.
23. Hsu B.R., Hsu S., Fu S.H. et al. Neonatal pig pancreatic cell cluster accelerates regeneration of mouse pancreatic beta cells // *Transplant Proc.* – 2003. – Vol. 35, №1. – P. 492.
24. Inada A., Nienaber C., Katsuta H. Carbonic anhydrase II-positive pancreatic cells are progenitors for both endocrine and exocrine pancreas after birth // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* – 2008. – Vol. 105, №50. – P. 19915–19919.
25. Kin T. Islet isolation for clinical transplantation // *Adv. Exp. Med. Biol.* – 2010. – Vol. 654. – P. 683–710.
26. Korbitt G.S., Elliott J.F., Ao Ziliang et al. Large scale isolation, growth, and function of porcine neonatal islet cells // *J. Clin. Invest.* – 1996. – Vol. 97, №9. – P. 2119–2129.
27. Limbert C., Path G., Jakob F., Seufert J. Beta-cell replacement and regeneration: Strategies of cell-based therapy for type 1 diabetes mellitus // *Diabetes Res. Clin. Pract.* – 2008. – Vol. 79, №3. – P. 389–399.
28. Loganathan S., Radovits T., Hirschberg K. et al. Effects of Custodiol-N, a novel organ preservation solution, on ischemia/reperfusion injury // *J. Thorac. Cardiovasc. Surg.* – 2010. – Vol. 139, №4. – P. 1048–1056.
29. Luca G., Nastruzzi C., Calvitti M. et al. Accelerated functional maturation of isolated neonatal porcine cell clusters: in vitro and in vivo results in NOD mice // *Cell Transplant.* – 2005. – Vol. 4, №5. – P. 249–261.
30. Maglione M., Oberhuber R., Cardini B. et al. Donor pretreatment with tetrahydrobiopterin saves pancreatic isografts from ischemia reperfusion injury in a mouse model // *Am. J. Transplant.* – 2010. – Vol. 10, №10. – P. 2231–2240.
31. Omer A., Duvivier-Kali V.F., Trivedi N. et al. Survival and maturation of microencapsulated porcine neonatal pancreatic cell clusters transplanted into immunocompetent diabetic mice // *Diabetes*. – 2003. – Vol. 52, №1. – P. 69–75.
32. Portha B., Kergoat M. Dynamics of glucose-induced insulin release during the spontaneous remission of streptozotocin diabetes induced in the newborn rat // *Diabetes*. – 1985. – Vol. 34, №6. – P. 574–579.
33. Inada A., Nienaber C., Katsuta H. Carbonic anhydrase II-positive pancreatic cells are progenitors for both endocrine and exocrine pancreas after birth. *Proc Natl Acad Sci USA* 2008; 105(50): 19915–19919.
34. Kin T. Islet isolation for clinical transplantation. *Adv Exp Med Biol* 2010; 654: 683–710.
35. Korbitt G.S., Elliott J.F., Ao Ziliang et al. Large scale isolation, growth, and function of porcine neonatal islet cells. *J Clin Invest* 1996; 97(9): 2119–2129.
36. Lang T.A., Secic M. *How to Report Statistics in Medicine: Annotated Guidelines for Authors, Editors, and Reviewers*. Moscow: Prakticheskaya Meditsina; 2011.
37. Lehach E.I., Bozhok G.A., Turchin I.S., Bondarenko T.P. Indices of sugar metabolism in rats with streptozotocin induced diabetes after combined xenotransplantation. *Klinichna endokrinologiya ta endokrinna hirurgiya* 2006; 16 (2): 64–68.
38. Limbert C., Path G., Jakob F., Seufert J. Beta-cell replacement and regeneration: Strategies of cell-based therapy for type 1 Diabetes mellitus. *Diabetes Res Clin Pract* 2008; 79(3): 389–399.
39. Loganathan S., Radovits T., Hirschberg K. et al. Effects of Custodiol-N, a novel organ preservation solution, on ischemia/reperfusion injury. *J Thorac Cardiovasc Surg* 2010; 139(4): 1048–1056.
40. Luca G., Nastruzzi C., Calvitti M. et al. Accelerated functional maturation of isolated neonatal porcine cell clusters: in vitro and in vivo results in NOD mice. *Cell Transplant* 2005; 4(5): 249–261.
41. Maglione M., Oberhuber R., Cardini B. et al. Donor pretreatment with tetrahydrobiopterin saves pancreatic isografts from ischemia reperfusion injury in a mouse model. *Am J Transplant* 2010; 10(10): 2231–2240.
42. Nikonenko A.S., Stupakov V.I., Sobokar V.A. Experience in the use of cardioplegic solution "Custodiol": Abstracts of III All-Russian Congress of Cardiovascular Surgeons. *Grudnaya i serdechno-sosudistaya hirurgiya* 1996; (6): 275–276.
43. Omer A., Duvivier-Kali V.F., Trivedi N. et al. Survival and maturation of microencapsulated porcine neonatal pancreatic cell clusters transplanted into immunocompetent diabetic mice. *Diabetes* 2003; 52(1): 69–75.
44. Petrenko Y.A., Mazur S.P., Grischuk V.L. et al. The choice of induction factors for differentiation of multipotent mesenchymal stromal cells from human adipose tissue to insulin-producing cells in vitro. *Kletochnaya Transplantologiya i Tkanevaya Inzheneriya* 2011; 6 (1): 1–7.
45. Pobelensky O.N. Experimental model and its basis in the expediency for clinical application of cryopreserved cultures of the microfragments of islet cells at Diabetes mellitus. *Meditsina Syogodni i Zavtra* 2004; (2): 66–69.
46. Portha B., Kergoat M. Dynamics of glucose-induced insulin release during the spontaneous remission of streptozotocin diabetes induced in the newborn rat // *Diabetes* 1985; 34(6): 574–579.
47. Rayat G.R., Rajotte R.V., Hering B.J. et al. In vitro and in vivo expression of Galalpha-(1,3)Gal on porcine islet cells is age dependent // *J Endocrinol* 2003; 177(1): 127–135.
48. Ringe B., Braun F., Moritz M. et al. Safety and efficacy of living donor liver preservation with HTK solution // *Transplant Proc* 2005; 37(1): 316.
49. Salehi P., Hansen M.A., Avila J.G. et al. Human islet isolation outcomes from pancreata preserved with histidine-tryptophan ketoglutarate versus University of Wisconsin solution. *Transplantation* 2006; 82(7): 983–985.
50. Shapiro A.M., Lakey J.R., Ryan E.A. et al. Islet transplantation in seven patients with type 1 diabetes mellitus using a glucocorticoid-free immunosuppressive regimen. *N Engl J Med* 2000; 343(4): 230–238.
51. Shumakov V.I., Bliumkin V.N., Ignatenko S.N. et al. Results of transplantation of pancreatic islet cell cultures to patients with Diabetes mellitus. *Probl Endokrinol (Mosk)* 1985; 31(5): 67–70.



33. Rayat G.R., Rajotte R.V., Hering B.J. et al. In vitro and in vivo expression of Galalpha-(1,3)Gal on porcine islet cells is age dependent // *J. Endocrinol.* – 2003. – Vol. 177, №1. – P. 127–135.
34. Ringe B., Braun F., Moritz M. et al. Safety and efficacy of living donor liver preservation with HTK solution // *Transplant. Proc.* – 2005. – Vol. 37, №1. – P. n316.
35. Salehi P., Hansen M.A., Avila J.G. et al. Human islet isolation outcomes from pancreata preserved with histidine-tryptophan ketoglutarate versus University of Wisconsin solution // *Transplantation.* – 2006. – Vol. 82, №7. – P. 983–985.
36. Shapiro A.M., Lakey J.R., Ryan E.A. et al. Islet transplantation in seven patients with type 1 diabetes mellitus using a glucocorticoid-free immunosuppressive regimen // *N. Engl. J. Med.* – 2000. – Vol. 343, №4. – P. 230–238.
37. Thompson D.M., Begg I.S., Harris C. et al. Reduced progression of diabetic retinopathy after islet cell transplantation compared with intensive medical therapy // *Transplantation.* – 2008. – Vol. 85, №10. – P. 1400–1405.
38. Trahair J.F., Sangild P.T. Systemic and luminal influences on the perinatal development of the gut // *Equine Vet. J. Suppl.* – 1997. – №24. – P. 40–50.
39. Trivedi N., Hollister-Lock J., Lopez-Avalos M. D. et al. Increase in β -cell mass in transplanted porcine neonatal pancreatic cell clusters is due to proliferation of β -cells and differentiation of duct cells // *Endocrinology.* – 2001. – Vol. 142, №5. – P. 2115–2122.
40. Weber D.J., McFarland R.D., Irony I. Selected Food and Drug Administration review issues for regulation of allogeneic islets of Langerhans as somatic cell therapy // *Transplantation.* – 2002. – Vol. 74, №12. – P. 1816–1820.
41. Weber D.J. FDA regulation of allogeneic islets as a biological product // *Cell Biochem. Biophys.* – 2004, Suppl. 3. – Vol. 40. – P. 19–22.
42. Weir G.C., Cavelti-Weder C., Bonner-Weir S. Stem cell approaches for diabetes: towards beta cell replacement // *Genome Med.* – 2011. – Vol. 3, №9. – P. 61.
43. Yamamoto T., Horiguchi A., Ito M. et al. Quality control for clinical islet transplantation: organ procurement and preservation, the islet processing facility, isolation, and potency tests // *J. Hepatobiliary Pancreat. Surg.* – 2009. – Vol. 16, №2. – P. 131–136.
44. Yamaoka T. Regeneration therapy of pancreatic beta cells: towards a cure for diabetes? // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* – 2002. – Vol. 296, №5. – P. 1039–4103.
36. Teppermer D., Teppermer H. Physiology of metabolism and the endocrine system. Moscow: Mir; 1989.
37. Thompson D.M., Begg I.S., Harris C. et al. Reduced progression of diabetic retinopathy after islet cell transplantation compared with intensive medical therapy. *Transplantation* 2008; 85(10): 1400–1405.
38. Trahair J.F., Sangild P.T. Systemic and luminal influences on the perinatal development of the gut. *Equine Vet J Suppl* 1997; (24): 40–50.
39. Trivedi N., Hollister-Lock J., Lopez-Avalos M. D. et al. Increase in β -cell mass in transplanted porcine neonatal pancreatic cell clusters is due to proliferation of β -cells and differentiation of duct cells. *Endocrinology* 2001; 142(5): 2115–2122.
40. Weber D.J., McFarland R.D., Irony I. Selected Food and Drug Administration review issues for regulation of allogeneic islets of Langerhans as somatic cell therapy. *Transplantation* 2002; 74(12): 1816–1820.
41. Weber D.J. FDA regulation of allogeneic islets as a biological product. *Cell Biochem Biophys* 2004; 40(3Suppl): 19–22.
42. Weir G.C., Cavelti-Weder C., Bonner-Weir S. Stem cell approaches for diabetes: towards beta cell replacement. *Genome Med* 2011; 3(9): 61.
43. Yamamoto T., Horiguchi A., Ito M. et al. Quality control for clinical islet transplantation: organ procurement and preservation, the islet processing facility, isolation, and potency tests. *J Hepatobiliary Pancreat Surg* 2009; 16(2): 131–136.
44. Yamaoka T. Regeneration therapy of pancreatic beta cells: towards a cure for diabetes? *Biochem Biophys Res Commun* 2002; 296(5): 1039–4103.

