

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ
УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ «ПРИВОЛЖСКИЙ
ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ МЕДИЦИНСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ»
МИНИСТЕРСТВА ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

На правах рукописи



Ермакова Полина Сергеевна

**Микрокапсулы «альгинат-ПМЭТАХ-альгинат» с островками Лангерганса
для компенсации инсулин-дефицитных состояний**

1.1.10. Биомеханика и биоинженерия

1.5.22. Клеточная биология

Диссертация

на соискание ученой степени

кандидата биологических наук

Научный руководитель:

доктор медицинских наук, доцент,
член-корреспондент РАН
Загайнова Елена Вадимовна

Научный руководитель:

кандидат биологических наук
Кашина Александра Викторовна

Нижний Новгород – 2026

ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ	5
ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ	14
1.1. Проблема инсулин-дефицитных состояний	14
1.2. Ограничения современной терапии (инсулинотерапии)	18
1.3. Трансплантация островков Лангерганса	22
1.4. Основные типы капсул	29
1.4.1. Наноинкапсуляция	29
1.4.2. Макроинкапсуляция.....	30
1.4.3. Микроинкапсуляци	32
1.5. Клинические исследования	37
1.6. Поли-[2(метакрилоилоксиэтил)триметиламмония хлорид как перспективный полимер для биоинженерии.....	41
ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ	45
2.1. Синтез микрокапсул	45
2.2. Определение проницаемости микрокапсул.....	45
2.3. Определение стабильности микрокапсул.....	47
2.3.1. Оценка механической стабильности при осмотическом стрессе.....	47
2.3.2. Оценка термической стабильности	48
2.3.3. Оценка стабильности в условиях культивирования клеток	48
2.3.4. Оценка стабильности микрокапсул при воздействии физиологического раствора.....	49
2.4. Определение ультраструктуры микрокапсул.....	50
2.5. Использование лабораторных животных	50
2.6. Методика изоляции островков Лангерганса	51
2.7. Оценка жизнеспособности и функциональной активности свободных и инкапсулированных островков Лангерганса.....	54

2.8. Моделирование и валидация экспериментального сахарного диабета 1 типа	55
2.9. Хирургическая методика трансплантации	56
2.10. Оценка функциональной активности трансплантированных островков Лангерганса <i>in vivo</i>	57
2.11. Оценка биодegradации и реакции окружающих тканей на трансплантат	58
2.12. Гистологический и иммуногистохимический анализ	60
2.13. Статистический анализ	61
ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ.....	62
3.1. Структура и физико-механические свойства микрокапсул «альгинат-ПМЭТАХ-альгинат»	62
3.1.1. Проницаемость	62
3.1.2. Стабильность	64
3.1.2.1. Механическая стабильность при осмотическом стрессе	65
3.1.2.2. Термостабильность	68
3.1.2.3. Стабильность в условиях культивирования клеток	71
3.1.2.4. Стабильность при многократном воздействии физиологического раствора	72
3.1.3. Выбор наиболее перспективной микрокапсулы для проведения дальнейших испытаний	75
3.1.4. Ультрaструктура.....	76
3.2. Влияние инкапсуляции в микрокапсулы «альгинат-ПМЭТАХ-альгинат» на жизнеспособность и функциональную активность островков Лангерганса <i>in vitro</i>	77
3.2.1. Изоляция островков Лангерганса крыс и кроликов	78
3.2.2. Оптимизация концентрации островков Лангерганса для повышения эффективности инкапсуляции	79
3.3. Жизнеспособность и функциональная активность островков Лангерганса до и после инкапсуляции	82

3.4. Влияние микрокапсул «альгинат-ПМЭТАХ-альгинат» на компенсацию инсулин-дефицитных состояний при трансплантации островков Лангерганса в экспериментальных моделях диабета I типа у крыс <i>in vivo</i>	84
3.4.1. Формирование диабета и подтверждение его стабильности.....	85
3.4.2. Определение оптимального места для трансплантации	89
3.4.3. Трансплантация инкапсулированных и свободных островков Лангерганса в сальник крысам с экспериментальным диабетом I типа.....	92
3.5. Биосовместимость микрокапсул «альгинат-ПМЭТАХ-альгинат» в экспериментальных моделях диабета I типа у крыс <i>in vivo</i>	94
ГЛАВА 4. ОБСУЖДЕНИЕ.....	100
4.1. Обоснование выбора материалов и стратегии инкапсуляции. Новизна подхода	100
4.2. Ключевые эксплуатационные свойства микрокапсул «альгинат-ПМЭТАХ-альгинат»: селективная проницаемость и структурно-механическая стабильность.....	102
4.3. Оценка влияния инкапсуляции на жизнеспособность и функциональную активность	104
4.4. Обоснование и анализ методик для оценки влияния микрокапсул для компенсации инсулинодефицита <i>in vivo</i>	105
4.5. Оценка влияния микрокапсул на компенсацию дефицита инсулина в экспериментальных моделях диабета I типа	109
4.6. Оценка биосовместимости и биодegradации микрокапсул «альгинат-ПМЭТАХ-альгинат»	110
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	116
ВЫВОДЫ	118
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ.....	119
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....	121

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность темы исследования

Абсолютные инсулин-дефицитные состояния, в первую очередь сахарный диабет 1 типа, являются заболеваниями, при которых разрушаются инсулинпродуцирующие клетки островков Лангерганса (ОЛ), что приводит к повышению уровня глюкозы в крови. Подобные метаболические нарушения сопряжены с высоким риском острых угрожающих состояний (тяжелая гипо- и гипергликемия), а также с развитием отсроченных сосудистых осложнений. Инсулинотерапия не обеспечивает полноценной защиты от гипергликемии и осложнений. В качестве альтернативы рассматривается трансплантация ОЛ, которая, даже без полной инсулиновой независимости, значительно снижает риск резких гликемических скачков и улучшает качество жизни. Тем не менее широкое внедрение этого подхода сдерживается тремя основными проблемами: необходимостью длительной иммуносупрессии, риском тромботических осложнений и значительной гибелью трансплантированных клеток в раннем посттрансплантационном периоде.

Перспективным направлением является трансплантация инкапсулированных ОЛ. Клетки помещают в биосовместимую полупроницаемую мембрану, которая пропускает кислород, инсулин и питательные вещества, но блокирует иммунные клетки и антитела. Это позволяет избежать отторжения без иммуносупрессии и защищает клетки после трансплантации.

Трансплантацию проводят в брюшную полость, сальник или подкожно, что повышает её безопасность. Однако проведенные клинические исследования не показали долгосрочной эффективности из-за перикапсулярного фиброза.

Таким образом, ключевая задача - разработка новой микрокапсулы. Она должна быть полупроницаемой, биосовместимой, нетоксичной и повышать эффективность доставки, приживления и функциональной активности ОЛ.

Степень разработанности темы исследования

Технология инкапсуляции используется во всем мире [1]. Существует несколько подходов: микро-, макро- и наноинкапсуляция [2]. Наиболее популярна микроинкапсуляция. Микрокапсулы, в отличие от макрокапсул, обладают оптимальным соотношением площади поверхности к объёму, что оптимизирует диффузию веществ [3]. В микрокапсулах ОЛ менее подвержены иммунной атаке, чем в нанокапсулах, из-за меньшего риска расположения на границе капсулы [4].

Классический метод создания микрокапсул включает синтез альгинатной сердцевинки, покрытие её полимером для увеличения стабильности, создания иммунологического барьера и нанесение третьего слоя альгината для увеличения биосовместимости [5]. Наиболее изучены альгинат-поли(L-лизин)-альгинатные (АПА) микрокапсулы [6], но они недостаточно прочны и вызывают иммунную реакцию на инородное тело [3]. Изучались и другие системы: на основе альгината сверхвысокой вязкости [7], альгинат-хитозан-ПЭГ [8], альгинат-хитозан-дексаметазон [9] и другие. Проблемы остаются: иммунное отторжение, гибель ОЛ, вызванная недостатком питательных веществ и гибель ОЛ из-за гипоксии после трансплантации и потери стабильности микрокапсулы [5]. Выживаемость после трансплантации можно повысить за счет совершенствования технологий инкапсуляции и поиска новых биосовместимых материалов и их комбинаций [10].

Перспективным материалом является полимер ПМЭТАХ, который является структурным аналогом поли-L-лизина (ПЛЛ). Он катионный, биосовместимый и подходит для покрытия медицинских изделий [11]. ПМЭТАХ не проявляет цитотоксичности для клеточных линий мышей (J774A.1, BV2) и человека (PBMCs) [12]. Его использование снижает адсорбцию фибриногена и обрастание имплантата [13]. В комплексе с другими полимерами и факторами роста он способствует регенерации нервной ткани [14,15].

Ранее ПМЭТАХ использовался как стабилизирующий компонент альгинатных микрокапсул для миобластов C2C12. Проницаемость капсул соответствовала 70 кДа, что подходит для инкапсуляции ОЛ [16].

Таким образом, биоинженерный трансплантат, совмещающий ОЛ и микрокапсулы на основе простой комбинации альгината и ПМЭТАХ, уникален по двум ключевым аспектам. Во-первых, полимер ПМЭТАХ ранее не использовался для инкапсуляции ОЛ. Во-вторых, в отличие от предыдущих методов, где ПМЭТАХ сочетали с сополимерами, мы использовали ПМЭТАХ самостоятельно, создавая более простую и эффективную микрокапсулу. Перспективность применения такой микрокапсулы для инкапсуляции ОЛ обусловлена высокой биосовместимостью и стабильностью, что является ключевым фактором для увеличения срока службы трансплантата.

Цель и задачи исследования

Целью работы являлось изучение структуры, физико-механических и биологических свойств микрокапсул «альгинат-ПМЭТАХ-альгинат», оценка возможности их применения для продления срока функционирования островков Лангерганса (ОЛ) при трансплантации.

Для достижения цели были поставлены следующие задачи:

1. Охарактеризовать структуру и физико-механические свойства микрокапсул «альгинат-ПМЭТАХ-альгинат» с различными концентрациями ПМЭТАХ. На основании полученных данных выбрать наиболее перспективную микрокапсулу для проведения дальнейших испытаний.
2. Изучить влияние инкапсуляции в микрокапсулы «альгинат-ПМЭТАХ-альгинат» на жизнеспособность и функциональную активность ОЛ *in vitro*.
3. Оценить способность микрокапсул «альгинат-ПМЭТАХ-альгинат» пропускать инсулин, защищать от воздействия иммунной системы и продлевать срок функционирования ОЛ в экспериментальных моделях диабета 1 типа у крыс *in vivo*.
4. Исследовать биосовместимость микрокапсул «альгинат-ПМЭТАХ-альгинат» по уровню биодegradации микрокапсулы, воспалительной реакции и окружающего фиброза в экспериментальных моделях диабета 1 типа у крыс *in vivo*.

Научная новизна

Ключевой новизной разработанных микрокапсул «альгинат-ПМЭТАХ-альгинат» является применение нового полимерного покрытия для инкапсуляции ОЛ. Мы выявили оптимальную концентрацию ПМЭТАХ для формирования трехслойной, стабильной и полупроницаемой микрокапсулы. Была охарактеризована структура и физико-механические свойства микрокапсул «альгинат-ПМЭТАХ-альгинат». Впервые было показано, что микрокапсулы «альгинат-ПМЭТАХ-альгинат» не являются цитотоксичными для ОЛ. Впервые было продемонстрировано, что микрокапсулы «альгинат-ПМЭТАХ-альгинат» с ОЛ способны компенсировать инсулинодефицит, продлевая срок функционирования клеток и снижая уровень глюкозы в крови у крыс с диабетом I типа. При этом выявлена высокая биосовместимость микрокапсул «альгинат-ПМЭТАХ-альгинат» с ОЛ, не обнаружено выраженного фиброза и воспаления при трансплантации.

Теоретическая и практическая значимость работы

Разработанный биоинженерный трансплантат на основе микрокапсул «альгинат-ПМЭТАХ-альгинат» с ОЛ демонстрирует новый подход к клеточной терапии. Полученные данные расширяют представление о применении новой комбинации альгината и ПМЭТАХ в составе микрокапсулы «альгинат-ПМЭТАХ-альгинат» для инкапсуляции ОЛ. Данный задел можно использовать для дальнейшей разработки технологии трансплантации инкапсулированных ОЛ в микрокапсулах на основе альгината и полимера ПМЭТАХ. Полученные данные о проницаемости созданных микрокапсул, отсутствии цитотоксического эффекта и биосовместимости микрокапсул «альгинат-ПМЭТАХ-альгинат» подтверждают потенциал полимера ПМЭТАХ в качестве стабилизирующего компонента новой микрокапсулы. В будущем создание технологии трансплантации инкапсулированных ОЛ откроет большие перспективы лечения пациентов с СД1.

Методология и методы исследования

В ходе исследования применены комплексные методы оценки структурных и физико-механических свойств микрокапсул «альгинат-ПМЭТАХ-альгинат». Устойчивость к деформации и упругие свойства оценивали с помощью теста осмотического стресса. Также исследована стабильность микрокапсул к вымыванию сшивающих ионов альгината и замещению их ионами натрия. Ультраструктуру изучали методом трансмиссионной электронной микроскопии. Были осуществлены методы выделения и культивирования первичных клеточных культур ОЛ крыс и кроликов. Флуоресцентная и сканирующая лазерная конфокальная микроскопия (ЛСКМ) применялась для оценки проницаемости микрокапсул с ОЛ совместно с окрашиванием FITC-мечеными лектинами. Также ЛСКМ использовалась для оценки жизнеспособности ОЛ, окрашенных набором Live/Dead assay. Функциональную активность ОЛ определяли методом ИФА (иммуноферментный анализ), измеряя секрецию инсулина. Экспериментальную модель диабета 1 типа индуцировали стрептозотоцином (СТЗ) у крыс. Способность микрокапсул пропускать инсулин, защищать ОЛ от иммунного ответа и продлевать их функционирование *in vivo* оценивали по динамике снижения уровня глюкозы в крови после трансплантации. Биосовместимость изучали гистологическими и иммуногистохимическими методами. Статистическая обработка результатов проводилась с использованием программного обеспечения GraphPad Prism 9.6.0 и Microsoft Office Excel.

Положения, выносимые на защиту

1. Микрокапсулы «альгинат-ПМЭТАХ-альгинат» с концентрацией ПМЭТАХ 0,4%, обладают характерной трехслойной структурой, необходимой проницаемостью, устойчивы к деформации осмотическим давлением и стабильны при промывании физиологическими средами.

2. В экспериментах *in vitro* подтверждено, что после инкапсуляции в микрокапсулу «альгинат-ПМЭТАХ-альгинат» ОЛ сохраняют жизнеспособность и функциональную активность (синтез инсулина).

3. Трансплантация микрокапсул «альгинат-ПМЭТАХ-альгинат» с ОЛ крысам с диабетом I типа способна компенсировать инсулинодефицит, снижать уровень глюкозы в крови. При этом микрокапсулы «альгинат-ПМЭТАХ-альгинат» способны продлевать функциональную активность ОЛ.

4. Подтверждена высокая биосовместимость микрокапсул «альгинат-ПМЭТАХ-альгинат» с ОЛ, не обнаружено формирования выраженного фиброза и воспаления при трансплантации крысам с диабетом. Также показано, что ОЛ могут оставаться функционально активными до 3-х месяцев.

Внедрение результатов исследования

Результаты исследования были внедрены в учебный процесс НИИ Экспериментальной онкологии и биомедицинских технологий ФГБОУ ВО «ПИМУ» Минздрава России при изучении дисциплины «Основы регенеративной медицины», читаемой студентам по направлению подготовки 06.04.01 «Биология» по профилю «Экспериментальная медицина».

Личный вклад автора

Личный вклад состоит в непосредственном участии во всех этапах диссертационной работы. Автор самостоятельно проводил анализ имеющейся литературы, планировал и проводил описанные эксперименты. Синтез микрокапсул и их промывка выполнены совместно с ИМХ РАН, электронная микроскопия – с ЦНИЛ ФГБОУ ВО «ПИМУ». Автор самостоятельно представлял результаты исследований на конференциях и непосредственно осуществлял публикацию результатов. Имена всех соавторов, а также их вклад, указаны в опубликованных работах.

Соответствие диссертации паспорту научной специальности

Диссертация соответствует паспорту научной специальности 1.1.10. Биомеханика и биоинженерия, направлениям исследований согласно пунктам: 10 (Создание заменителей органов и тканей); 11 (Разработка инженерных принципов и развитие концепции инженерного подхода в биологии для создания искусственных органов); 14 (Применение клеточной терапии в регенеративной медицине, восстановление поврежденных тканей с помощью активации эндогенных стволовых клеток или с помощью трансплантации клеток); 18 (Выращивание методами регенеративной медицины органов и тканей для компенсации утраченных или компенсации их пониженных физиологических функций). Диссертация соответствует паспорту научной специальности 1.5.22. Клеточная биология, направлениям исследований согласно пунктам: 11 (Изучение закономерностей изменения структурной и цитохимической организации клеток при культивировании их вне организма); 12 (3D-культуры); 14 (Исследование адаптации клеток и тканей к действию различных факторов внешней среды); 19 (Клеточные технологии как основа для разработки терапевтических подходов для лечения различных патологий).

Степень достоверности и апробация результатов

Достоверность данных была подтверждена их воспроизводимостью при проведении нескольких (минимум трех) независимых экспериментов для каждого полученного образца, а также статистической обработкой полученных результатов.

Результаты диссертационной работы были представлены в виде устных докладов на 24 конференциях: TERMIS EU 25 (Фрайберг (Германия), 2025), 17th International conference on Laser Applications in Life Sciences (Мугла (Турция) 2023), International Conference on Advanced Laser Technologies (ALT) (Владивосток, 2024; Москва 2022), IV Балтийский симпозиум по иммунологии, молекулярной и регенеративной медицине с международным участием (Калининград, 2024), VI

Национальный конгресс по регенеративной медицине, (Москва, 2022), Ломоносов 2022 (Москва, 2022), XXIV Международная медико-биологическая конференция молодых исследователей «Фундаментальная наука и клиническая медицина – человек и его здоровье», (Санкт-Петербург, 2021), VII Всероссийская научно-практическая конференция «3D-технологии в медицине» (Нижний Новгород, 2023), Международный молодежный форум «Неделя науки – 2021» (Ставрополь, 2021), Биосистемы: организация, поведение, управление (Нижний Новгород, 2025; 2024; 2023), X Всероссийская научно-практическая конференция молодых ученых и студентов с международным участием "VolgaMedScience» (Нижний Новгород, 2024; 2023; 2022; 2021), 26 Нижегородская сессия молодых ученых (технические, естественные науки) (Нижний Новгород, 2021, 2020).

Работа была отмечена как лучшая в рамках конкурса молодых ученых на VI Национальном конгрессе по регенеративной медицине (Санкт-Петербург, 2024) и 6-ой Российской конференции по медицинской химии (Нижний Новгород, 2024).

Работа получила диплом 1 степени на XXXIV международной зимней молодежной научной школе "Перспективные направления физико-химической биологии и биотехнологии» (Москва, 2022) и 75-ой Всероссийской с международным участием школе-конференции молодых ученых «Биосистемы: организация, поведение, управление» (Нижний Новгород, 2022).

Работа вышла в финал VII Всероссийского конкурса научно-исследовательских работ студентов и аспирантов «наука будущего – наука молодых».

Публикации по теме диссертации

По теме диссертации опубликовано 27 работ, в том числе:

7 статей в изданиях, индексируемых в международной базе Scopus, 5 – иные публикации, 14 – публикаций в сборниках материалов международных и всероссийских научных конференций, 1 – патент.

Структура и объем диссертации

Диссертация состоит из списка основных сокращений, введения, обзора литературы, экспериментальной части (раздел «Материалы и методы», «Результаты», «Обсуждение»), заключения, выводов, списка сокращений и условных обозначений, списка литературы. Материал изложен на 144 страницах машинописного текста, содержит 3 таблицы и 22 рисунка. Список литературы включает 217 источников, в том числе 208 работ иностранных авторов и 9 русскоязычных.

ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1. Проблема инсулин-дефицитных состояний

Инсулин представляет собой полипептидный гормон, синтезируемый β -клетками островков Лангерганса (ОЛ) поджелудочной железы (ПЖ). Он выполняет центральную роль в регуляции клеточного метаболизма многих тканей [17]. Его функциональная недостаточность подразделяется на две основные формы [18]. Относительный дефицит, лежащий в основе сахарного диабета 2 типа (СД2), связан с инсулинорезистентностью, то есть нарушением восприятия сигнала клетками-мишенями при сохранённой секреции гормона [19]. Абсолютный дефицит представляет собой истинное отсутствие инсулина вследствие утраты секреторной функции β -клеток [20]. Таким образом, относительный дефицит является проблемой восприятия сигнала, тогда как абсолютный дефицит является проблемой отсутствия источника сигнала. Данная работа сфокусирована на абсолютной недостаточности, поскольку её коррекция требует не преодоления резистентности, а замещения утраченной эндокринной функции.

Наиболее частой причиной абсолютного инсулинодефицита выступает сахарный диабет 1 типа (СД1), который имеет аутоиммунную природу [21]. При СД 1 как правило выявляют аутоантитела к глутаматдекарбоксилазе (GAD65), инсулинома-ассоциированному антигену-2 (IA2), транспортеру цинка 8 (ZnT8) и инсулину (IAA) [22,23]. Описаны и другие аутоантигены (например, тетраспанин), но их распространённость значительно ниже [24]. Появление аутоантител как правило происходит за много месяцев или лет до появления симптомов. Проведённые проспективные исследования с участием более 13 000 человек показали, что наличие двух и более из четырех перечисленных аутоантител в детстве практически гарантирует (вероятность ~100%) развитие клинического СД1 со временем [25]. Этот ключевой вывод лёг в основу классификации пресимптоматических стадий СД1 [24,26], которая включает стадии:

- стадия 1 (преддиабет): наличие ≥ 2 аутоантител при нормогликемии.

- стадия 2: наличие ≥ 2 аутоантител на фоне нарушения гликемии.
- стадия 3: манифестация гипергликемии с симптомами, требующая инсулинотерапии.

Первые две стадии являются преддиабетом [26]. Некоторые источники дополнительно выделяют стадию 4, соответствующую длительному течению СД1 с развитием осложнений и низким уровнем С-пептида [27]. Важно отметить, что у части пациентов с клинической картиной СД1 аутоантитела могут не обнаруживаться; в таких случаях заболевание классифицируется как идиопатический СД, этиология которого остаётся невыясненной [21,28].

На данный момент единственным методом отсрочить манифестацию СД1 у пациентов на 1 – 2 стадии является Теплизумаб. Этот препарат был одобрен FDA (Food and Drug Administration (Управление по санитарному надзору за качеством пищевых продуктов и медикаментов США) в 2022 году по результатам клинических исследований NCT04270942 и NCT01030861. Он представляет собой моноклональное антитело против CD3. Он модулирует иммунный ответ, вызывая анергию и апоптоз эффекторных Т-клеток, что сохраняет функцию β -клеток [29,30]. Однако его применение ограничено из-за высокой стоимости (~190 000 долл. США), необходимости внутривенных инфузий в специализированных клиниках, побочных эффектов (лимфопения, сыпь, реактивация вируса Эпштейна-Барр) [31]. Более того Теплизумаб задерживает болезнь только на ~2 - 3 года [32], таким образом предотвращать наступление СД1 после появления аутоантител практически невозможно.

Причина появления первых аутоантител к β -клеткам остаётся не до конца ясной [20,33]. Риск определяется сочетанием генетической предрасположенности (30 – 50% связаны с генами HLA (Human Leukocyte Antigens (человеческие лейкоцитарные антигены)), особенно гаплотипами DR3-DQ2 и DR4-DQ8) и факторов внешней среды [34]. Считается, что большую роль играют внешние факторы, так как клиническая картина СД1 развивается лишь у ~10% носителей этих генов риска [23]. К этим факторам относятся избыточный вес [35], инфекции

(например энтеровирус [36], вирус Коксаки В1 [37], SARS-CoV-2 [38], гельминты, введение злаков в рацион до достижения трёхмесячного возраста, география (заболеваемость выше по мере удаления от экватора), возраст матери старше 35 лет [39]. Таким образом, патогенез, зависящий как от генетической предрасположенности, так и от множества внешних факторов, обуславливает сложность прогнозирования и предотвращения заболевания.

Более того, СД1 становится все более распространённым, о чём говорят данные статистики. Количество пациентов во всем мире увеличилось с 8,4 млн в 2021 году до 9,5 млн к 2025 году (+13%), более того по прогнозам к 2040 году может достичь 14,7 млн человек [40]. Аналогичная динамика наблюдается в Российской Федерации, где за период 2021 - 2024 гг. численность пациентов с СД1 возросла с 265,4 тыс. до 349 тыс. человек (прирост ~7%) [41].

Другой причиной абсолютного инсулинодефицита является панкреатогенный диабет. В настоящее время Всемирная организация здравоохранения ВОЗ относит его к вторичному диабету, вызванному заболеваниями поджелудочной железы, а Американская диабетическая ассоциация называет его диабетом 3с типа. Он возникает вследствие повреждения экзокринной части ПЖ [42]. Основной причиной (около 80% случаев) является хронический панкреатит. Среди других причин рак поджелудочной железы (8%), гемохроматоз (7%), муковисцидоз (4%) и операции на поджелудочной железе (2%) [42–44]. Истинная распространенность диабета типа 3с неизвестна из-за сложностей диагностики и нехватки данных. Согласно оценкам, на его долю приходится 1 - 9% всех случаев диабета, что составляет примерно от 220 000 до 2-х миллионов пациентов в США [42].

Другими, но более редкими причинами абсолютного инсулинодефицита являются моногенные формы диабета, такие как неонатальный диабет, вызванный мутациями в генах KCNJ11, ABCC8, INS и других, приводящими к дисфункции β -клеток и требующим инсулинотерапии [45]. Во всех этих случаях абсолютный инсулинодефицит требует терапии и вызывает гипергликемические состояния.

Повышения и колебания уровня глюкозы в крови крайне опасны для жизни. Анализ смертности выявил, что наличие СД1 увеличивает риск летального исхода

в 2 – 5 раз по сравнению со здоровой популяцией [46]. Наиболее серьёзными острыми осложнениями гипергликемии являются диабетический кетоацидоз (ДКА) и гипергликемическое гиперосмолярное состояние (ГГС) [47]. ДКА характеризуется триадой: гипергликемия, кетоз и метаболический ацидоз, а при ГГС наблюдается тяжёлая гипергликемия, гиперосмолярность и незначительный кетоз. ГГС чаще возникает при относительном дефиците инсулина, поскольку остаточная секреция инсулина подавляет кетоз, но не контролирует гликемию [48]. Однако оба состояния возможны как при относительном, так и при абсолютном дефиците инсулина [47]. Эти осложнения приводят к госпитализации 5 из 100 пациентов в год и, в конечном итоге, к смерти 4 - 10% из них [33]. Смертность, связанная с острыми осложнениями, подчёркивает необходимость разработки эффективных терапевтических стратегий [27].

Хроническая гипергликемия приводит как к микрососудистым, так и к макрососудистым осложнениям. При СД1 микрососудистые осложнения встречаются часто: ретинопатия – у 17,6% пациентов, нейропатия – у 8,2%, гипертензия – у 28,8% [49]. Риск ретинопатии растёт на 12,8% с каждым годом болезни, а риск нефропатии – на 10,8% с годом возраста при диагнозе и на 17,6% с годом длительности диабета [49]. При этом, если у пациента уже есть макрососудистое заболевание (поражение периферических артерий), то риск развития микрососудистых осложнений увеличивается в 3 раза [50]. Это показывает, что микро- и макрососудистые повреждения крайне распространены и усиливают друг друга.

При диабете 3с осложнения развиваются с похожей или даже большей частотой: ретинопатия – у 37%, нефропатия – у 29%, поражение периферических сосудов – у 26% [42]. Однако данных о долгосрочных рисках при этом типе диабета пока мало. Таким образом, абсолютный дефицит инсулина вызывает высокий риск сосудистых осложнений, которые снижают качество жизни пациентов и могут провоцировать летальные исходы. Ключевыми факторами риска являются длительность болезни, возраст и наличие макрососудистых заболеваний.

Более того, у людей с абсолютным инсулинодефицитом в виде СД1 многократно повышен риск других аутоиммунных болезней. Сильнее всего (в 10 - 20 раз) риск целиакии, болезней щитовидной железы, болезни Аддисона и атрофического гастрита. Умеренно (в 2 - 5 раз) повышен риск витилиго, болезней печени, ревматических болезней суставов и увеита. Риск псориаза и рассеянного склероза повышен незначительно, а риск воспалительных заболеваний кишечника и системных болезней соединительной ткани не отличается от общего [51].

1.2. Ограничения современной терапии (инсулинотерапии)

Коррекция абсолютного инсулинодефицита на протяжении более столетия основывается на сочетании диетотерапии с пожизненным ежедневным введением экзогенного инсулина, что является основным методом предотвратить гипергликемические состояния и осложнения [52].

Современная инсулинотерапия сформировалась в результате длительного биоинженерного развития, начавшегося с применения экстрактов животного инсулина в 1920-е годы [38]. Ключевым этапом стало внедрение рекомбинантного человеческого инсулина в конце 1970-х годов [53] и выпуск первого коммерческого препарата «Хумулин» в 1982 году [54]. Это позволило перейти к созданию аналогов инсулина с заданной фармакокинетикой, обеспечивающих более точный контроль начала действия, пика и продолжительности эффекта [55,56].

Базальный контроль гликемии достигается с помощью пролонгированных аналогов без выраженного пика (гларгин [57], деглудек [58]), тогда как ультракороткие аналоги применяются для коррекции постпрандиальной гликемии [55,59]. Такой подход на данный момент является традиционным. Однако, современное состояние инсулинотерапии все еще остается не идеальной, на момент 2025 года в Российской Федерации только 29% пациентов с СД1 достигают целевого уровня гликированного гемоглобина ($HbA1c < 7\%$) [40].

Для совершенствования терапии активно разрабатываются неинъекционные методы доставки инсулина [60,61]. Например, пероральный путь введения. Одним из наиболее перспективных направлений является пероральный путь введения. Примером такой разработки служит препарат ORMD-0801 [62]. Однако его клиническому внедрению препятствуют низкая биодоступность и высокая стоимость производства [61].

Альтернативным неинъекционным методом является ингаляционный путь. Уже существует единственный одобренный FDA препарат этой категории «Afrezza». Он обеспечивает более быстрое всасывание и сниженный риск гипогликемии по сравнению с подкожными инъекциями, но его применение ограничивают сохраняющиеся опасения относительно лёгочных эффектов [63].

Другим перспективным направлением считается разработка «умных» инсулинов, активируемых при повышении концентрации глюкозы. Наиболее изучены системы на основе фенилборной кислоты, интегрированные в полимерные гели, мицеллы и инъекционные гидрогели [64]. Эти соединения интегрированы в различные платформы: синтетические полимерные гели, чувствительные мицеллы и инъекционные гидрогели. Молекулярные модификации, например, введение фторированных фенильных колец, позволяют повысить стабильность систем, сохранив их глюкозочувствительность. Другое направление – гепатопреферентные инсулины (например, пеглиспро), которые за счет преимущественного поглощения печенью лучше имитируют естественное распределение гормона. Тем не менее, ключевые проблемы клинической трансляции, такие как обеспечение стабильной биодоступности, долговременной стабильности действующих компонентов и биосовместимости, еще предстоит решить [61].

Значительным шагом в оптимизации терапии стало внедрение автоматизированных систем доставки инсулина (AID-систем (Automated Insulin Delivery (автоматизированная доставка инсулина)), или «гибридной искусственной поджелудочной железы») [65]. В мировой практике наибольшее распространение получили семь коммерческих систем: MiniMed 780G (Medtronic, Нортридж, Калифорния, США), MiniMed 670G (Medtronic, Нортридж, Калифорния, США),

CamAPS Fx (CamDiab Ltd., Кембридж, Великобритания), DBLG1 (Diabeloop, Гренобль, Франция), iLet Bionic Pancreas (iLet BP) (Beta Bionics, Ирвайн, Калифорния, США), T:slim X2 с технологией Control-IQ (Control IQ) (Tandem Diabetes Care, Сан-Диего, Калифорния, США), Omnipod 5 (Insulet Corporation, Актон, Массачусетс, США).

Каждая система оснащена уникальными алгоритмами расчёта доз и настраиваемыми параметрами, которые напрямую определяют клинические результаты. Данные контролируемых рандомизированных исследований подтверждают улучшение гликемического контроля при переходе с традиционной терапии (многократные инъекции или неавтоматизированные инсулиновые помпы) на AID-системы. Время нахождения уровня глюкозы в целевом диапазоне (3,9 - 10 ммоль/л) увеличивается: у пациентов младше 18 лет - с 59,3% до 68% (наилучшие показатели у Control-IQ), а у взрослых – с 63,1% до 74,4% (лидер - MiniMed 780G) [66].

Считается, что важным барьером в распространение таких систем является высокая стоимость. Например, стоимость этой системы MiniMed 780G в 2024 году в Сингапуре 7,5 тыс. SGD (сингапурских долларов)/год, это вдвое выше, чем стандартная инсулинотерапия (3,8 тыс. SGD/год). Однако такая система окупаема в долгосрочной перспективе, так как на 50% уменьшает частоту госпитализаций из-за тяжёлых гликемических состояний и кетоацидоза (экономя до 11,4 тыс. SGD за эпизод). Долгосрочно технология предотвращает затратные осложнения: почечную недостаточность (~59,7 тыс. SGD/год), сердечно-сосудистые события (~27,1 тыс. SGD) и ретинопатию (~2,4 тыс. SGD). Анализ экономической эффективности показал, что совокупная экономия (~25,5 тыс. SGD/пациента), а ICER (33,8 тыс. SGD/QALY (~25 тыс. USD (доллары США)/QALY**)) [67]. Таким образом, такая система является выгодной в долгосрочной перспективе.

(ICER (Incremental Cost-Effectiveness Ratio – Инкрементальное соотношение «затраты-эффективность») – это показатель фармакоэкономики, который показывает, сколько дополнительных денег нужно заплатить, чтобы получить одну

дополнительную единицу пользы (чаще всего – 1 QALY) при переходе от стандартной терапии к новой.

QALY (Quality-Adjusted Life Year, Год жизни с поправкой на качество) – это показатель фармакоэкономики и оценке технологий здравоохранения, который объединяет количество и качество жизни в одну метрику. 1 год жизни в состоянии полного здоровья = 1 QALY).

Однако, несмотря на значимый прогресс, современные технологии не обеспечивают идеального контроля. Даже новейшие системы остаются гибридными, то есть пользователь должен самостоятельно рассчитывать и вводить инсулин перед едой [68]. Более того, такие системы могут давать сбои и быть неточными из-за ограничений их компонентов и сложности интеграции с живым организмом. Сенсоры теряют точность из-за биозагрязнения и обрастания фиброзной тканью. Алгоритмы управления не всегда компенсируют задержки между измерением уровнем глюкозы и действием вводимого инсулина. Сами устройства доставки (помпы) не могут идеально воспроизвести естественную физиологическую регуляцию и подвержены механическому отказам. Дополнительные проблемы создают разрывы беспроводной связи, ограниченный ресурс батарей. Переход к тканеинженерным системам на основе клеток предлагает принципиально иной, биомиметический подход. Такие клетки способны автономно измерять глюкозу и секретировать инсулин в рамках единой биологической единицы, потенциально устраняя необходимость в сложной электронике, внешних источниках энергии и ручном управлении. Это открывает путь к созданию полностью автономного, естественно интегрированного в организм и лишённого ключевых недостатков современных гибридных устройств [69].

1.3. Трансплантация островков Лангерганса

Альтернативным и перспективным методом лечения является трансплантация островков Лангерганса (ОЛ), содержащих инсулин-продуцирующие β -клетки [70]. Эта процедура включает естественные механизмы обратной связи, обеспечивая более физиологический и стабильный контроль гликемии по сравнению с любыми внешними системами доставки инсулина [69,71].

Ключевым преимуществом трансплантации ОЛ перед пересадкой целой поджелудочной железы является минимальная инвазивность процедуры [72]. Введение ОЛ осуществляется в воротную вену печени чрескожно с использованием УЗИ. Таким образом, благодаря низкому операционному риску, этот метод можно применять на более ранних стадиях диабета, когда масштабная операция ещё не показана [73].

Ключевые ранние этапы развития трансплантации ОЛ включают успешную экспериментальную трансплантацию ОЛ у грызунов (Баллинджер и Лейси, 1972), разработку автоматизированного метода выделения человеческих ОЛ (Рикорди, 1989) и первый клинический случай достижения инсулиновой независимости у пациента (Шарп и соавт., 1990) [74]. Однако ранние попытки трансплантации ОЛ были неудачными. Только у 12,5% сохранялся нормальный уровень глюкозы в крови более одной недели [75]. Прорыв произошел в 2000 году с публикацией Эдмонтонского протокола, в котором сообщалось, что все 7 пациентов, прошедших трансплантацию по новому методу, сохраняли полную инсулиновую независимость в течение 6 - 12 месяцев. Это стало возможно благодаря отказу от глюкокортикоидов, использованию более современных иммуносупрессантов (на основе сиролимуса, такролимуса и даклизумаба) и улучшению техник изоляции ОЛ [76]. Успех стимулировал международные исследования, которые подтвердили его способность восстанавливать секрецию инсулина и стабильность уровня глюкозы, но выявили проблему недолговременной инсулиновой независимости, что указало на необходимость дальнейших улучшений методик [74]. Данные

реестра CITR (Collaborative Islet Transplant Registry (Совместный реестр трансплантации островковых клеток)): анализ 677 случаев показал, что уровень трехгодичной инсулиновой независимости улучшился с 27% (1999 - 2002; n = 214) до 37% (2003 - 2006; n = 255) и 44% (2007 - 2010; n = 208) [77]. Однако данные об эффективности терапии могут варьироваться, например в медицинском справочнике Endotext, обновлённом 15 сентября 2025 года, говорится о том, что эффективность аллотрансплантации при СД1 менее высокая, инсулиновая независимость достигается у 40 - 60% пациентов через 1 год и примерно у 25% через 5 лет, однако защита от тяжелой гипогликемии сохраняются у более чем 90% пациентов в долгосрочной перспективе. А в случае ауто трансплантации у 80 - 90% пациентов сохраняется определяемая секреция С-пептида в долгосрочной перспективе, что снижает бремя нестабильного послеоперационного диабета даже при необходимости применения экзогенного инсулина [78].

Даже при отсутствии полной инсулиновой независимости трансплантация ОЛ достоверно снижает риск развития осложнений. Систематический обзор 25 исследований показывает, что частично функционирующий трансплантат приводит к стабилизации почечной функции, замедляет прогрессирование нейропатии и ретинопатии, что связано с улучшением гликемического контроля и восстановлением секреции С-пептида, обеспечивающего прямую органопroteкцию [79]. Более того, ауто трансплантация ОЛ значительно повышает выживаемость пациентов. Комбинированная трансплантация почки и ОЛ у пациентов с терминальной почечной недостаточностью на фоне СД1 увеличивает 10-летнюю выживаемость более чем на 17% (с ~73% до >90%) и снижает комбинированный риск смерти на 12% (с 45% до 33%) по сравнению с изолированной пересадкой почки без ОЛ [46].

Трансплантация ОЛ также демонстрирует выраженную клинико-экономическую выгоду. Несмотря на высокие первоначальные затраты, она становится экономически выгодной через 9 - 10 лет, сокращая совокупные 20-летние расходы на пациента до 519 тыс. USD против 663 тыс. USD при стандартной инсулинотерапии. Трансплантация ОЛ показывает лучшую клиническую

эффективность (10,9 QALY против 9,3) и более высокую экономическую эффективность (ICER = 47,8 тыс. USD/QALY), что ниже порога приемлемости для США (100 тыс. USD/QALY) и выгоднее, чем интенсивная инсулинотерапия (71 тыс. USD/QALY), преимущественно за счёт предотвращения осложнений и устранения эпизодов тяжёлых гликемических состояний [80].

Эти результаты стимулировали широкое клиническое внедрение трансплантации ОЛ по всему миру. К 2020 году было создано 94 специализированных центра, которые выполнили более 4300 аллотрансплантаций для лечения СД1, а также накопили опыт проведения свыше 1200 аутологичных трансплантаций после тотальной панкреатэктомии [81].

Накопленный опыт и данные клинических исследований в 2023 году привели к одобрению FDA препарата для аллогенной трансплантации ОЛ – Лантидры. По данным клинических исследований с участием 30 пациентов, 70% достигли полной инсулиновой независимости минимум на год, причём 36,7% сохраняли её от одного до 5-и лет, максимальный срок 12,9 лет. Даже при неполном (частичном) ответе на терапию, наблюдается значимое улучшение контроля гликемии, снижение HbA1c и резкое сокращение тяжёлых гипогликемий. Тем самым создается основа для профилактики поздних сосудистых осложнений диабета [82].

Вместе с тем, у трансплантации островков Лангерганса имеется ряд серьезных ограничений. К ним относятся: необходимость пожизненной иммуносупрессии, хирургические риски (в первую очередь тромбоз воротной вены и послеоперационное кровотечение), а также недостаточная долгосрочная эффективность метода, из-за которой части пациентов требуется возобновление инсулинотерапии или повторные трансплантации. Причины такой неэффективности двояки: с одной стороны, недостаточное количество трансплантированных ОЛ; с другой – дефицит донорского материала [30, 83].

Таким образом, технология остается несовершенной. Основные усилия по улучшению направлены на три направления: совершенствование иммуносупрессии, борьбу с ранней потерей функции трансплантата и поиск альтернативных источников клеток [76].

Отдельное направление связано с индукцией специфической иммунологической толерантности. В качестве инструментов для этого в экспериментальном порядке рассматриваются: регуляторные Т-клетки (PolyTreg), регуляторные В-клетки (Breg), подходы прямого ингибирования Т-клеточного звена; дополнительно изучается роль дендритных клеток (DC), моноцитарно-дендритных супрессорных клеток (MDSC), а также стромальных компонентов микроокружения [84]. Однако до клинических испытаний дошли только две стратегии [85].

Стратегия PolyTreg пока демонстрирует ограниченную эффективность. Исследование NCT02691247 у детей с СД1 не выявило положительного влияния на сохранение С-пептида [86]. Более сложный протокол с IL-2 (NCT02772679) продлил персистенцию Treg, но также не привело к сохранению продукции инсулина [87]. Тем не менее, направление развивается: в исследованиях NCT03444064 и NCT05349591 PolyTreg изучаются как адъювантная терапия для предотвращения отторжения трансплантированных ОЛ [85].

Другой клинически испытанный подход использует толерогенные дендритные клетки (DC). В работе NCT00445913 у некоторых пациентов появился определяемый С-пептид, но без значимого влияния на гликемический контроль [88]. В более позднем исследовании NCT03895996 лечение продуктом AVT001 на основе аутологичных DC привело к статистически значимому, но небольшому сохранению выработки С-пептида (разница 0,15 нмоль/л) через год, без существенных изменений HbA1c или дозы инсулина [89].

Совместная трансплантация с мезенхимальными стромальными клетками (МСК) исследуется благодаря их иммуномодулирующим свойствам. В ранних исследованиях не было показано значимых клинических улучшений при трансплантации МСК вместе с ОЛ [90]. Однако в исследовании NCT03406585 продукт ProTrans продемонстрировал потенциал в замедлении снижения функции β -клеток и отсутствие HLA-иммунизации. Через год уровень С-пептида в группе плацебо снизился на 47%, а в группе терапии ProTrans - всего на 10% [91]. Также изучаются комбинированные стратегии, например, совместное применение Treg и

МСК (NCT05973734), что может усилить индукцию толерантности инсулина. Завершение этого исследования планируется в 2028 году [83,92]

Таким образом, текущие исследования демонстрируют безопасность и некоторые биологические эффекты (сохранение функции β -клеток, иммуномодуляция), но не приводят к кардинальному улучшению гликемического контроля.

Для борьбы с ранней потерей трансплантата стремятся подавить мгновенный воспалительный ответ крови (IBMIR - instant blood-mediated inflammatory reaction), который вызывает потерю до 70% пересаженных ОЛ. Тестируются различные цитопротективные стратегии. Например, применение ингибитора комплемента экулизумаба (NCT02727608) или блокатора фактора некроза опухоли этанерцепта направлено на подавление системного воспаления. Параллельно исследуется предварительная обработка ОЛ антиоксидантом VMX-010 (NCT02457858) и ингибитором каспаз IDN-6556 (NCT01653899) для повышения их устойчивости к стрессу [93]. На данный момент полностью решить проблему IBMIR не удалось, но ведутся активные исследования, направленные на её смягчение [94].

Наиболее революционным направлением является создание альтернативных источников β -клеток из стволовых клеток для преодоления дефицита донорских органов. В основе технологий лежат два типа плюрипотентных клеток: эмбриональные стволовые клетки (ЭСК) и индуцированные плюрипотентные стволовые клетки (ИПСК).

Пионером в этой области стала компания ViaCyte [95]. Её клеточная линия PEC-01, полученная из ЭСК, представляла собой клетки-предшественники поджелудочной железы. Ранние клинические исследования по трансплантации этих клеток в иммуноизолирующих макрокапсулах (VC-01, NCT02239354) показали их способность выживать и созревать, но через 12 недель большая часть клеток погибала из-за фиброза и гипоксии, что не обеспечивало устойчивого терапевтического эффекта [61,96].

Другую компанию выбрала компания Vertex Pharmaceuticals, купившая компанию ViaCyte в 2022. Основным продуктом стала клеточная линия VX-880

(зимисел, Zimislecel), представляющая собой полностью дифференцированные инсулинпродуцирующие клетки, полученные из ЭСК, которые вводили пациенту в воротную вену.

Позднее компания Vertex Pharmaceuticals, которая приобрела ViaCyte в 2022 году, сфокусировалась на терапии клетками VX-880. Это полностью дифференцированные островковые клетки из ЭСК, которые вводятся пациенту инфузией в воротную вену печени. Первые результаты исследования NCT04786262 показали, что у трех из шести пациентов была достигнута независимость от инсулина в течение 180 - 270 дней. В 2024 году исследование было временно приостановлено на полгода из-за смертей, не связанных с терапией. Обновленные данные по 12 пациентам продемонстрировали, что они проводят более 70% времени в целевом диапазоне глюкозы, уровень HbA1c ниже 7% и значительное снижение потребности в экзогенном инсулине [97]. В настоящее время исследование перешло в фазу 3 [98]. Также было начато исследование по трансплантации этих клеток в макрокапсулах (см. пункт 1.4.2), однако оно не показало эффективности и было прекращено в 2025 году.

Следующим шагом стало создание клеток с «иммунной привилегией» с помощью генного редактирования. Компания Vertex Pharmaceuticals уже показала безопасность клеточной линии VCTX210 (нокаут B2M (Beta-2-microglobulin (бета-2-микроглобулин)), экспрессия PD-L1 (Programmed Death-Ligand 1 (лиганд программируемой клеточной гибели 1) и HLA-E; NCT05210530) и сейчас тестируется её усовершенствованная версия VCTX211 (с дополнительными генами A20 и MANF; NCT05565248) [99]. Параллельно компания Sana Biotechnology добилась прогресса с линией HIP (UP421), созданной на основе нокаута генов B2M/СИТА и сверхэкспрессии CD47. В первом испытании на человеке (NCT06239636) трансплантация этих клеток без сопутствующей иммуносупрессии продемонстрировала их выживаемость и функциональную активность в течение 6 месяцев наблюдения [100].

Компания CRISPR Therapeutics разработала CTX-211 – клетки-предшественники поджелудочной железы (PEC211), полученные из ЭСК и

отредактированные с помощью CRISPR-Cas9 для уклонения от иммунного ответа. Клиническое исследование фазы 1/2 (NCT05565248) началось в 2023 году, его результаты ожидаются [101].

Параллельно с использованием ЭСК активное развитие получили подходы, основанные на применении ИПСК. Первая трансплантация аутологичных клеток, полученных из ИПСК, была осуществлена в 2023 году в рамках клинического исследования ChiCTR2300072200 на базе Первой центральной больницы Тяньцзиня (Китай). В данном протоколе использовался запатентованный метод химического перепрограммирования соматических клеток в ИПСК (CiPSC). Полученные линии клеток впоследствии подвергались направленной дифференцировке в инсулин-продуцирующие клетки для последующей трансплантации. У пациентки значительно улучшился гликемический контроль. Инсулиновая независимость была достигнута через 75 дней после трансплантации и сохранялась в течение года. Время пребывания в целевом диапазоне глюкозы увеличилось с 43,18% до 96,21% [102].

В другом исследовании (NCT05294822), которое было проведено в Шанхайской больнице Чанчжэн была проведена аутооттрансплантация клеток, подобных островкам поджелудочной железы (Е-островков), полученных из ИПСК. После трансплантации пациент достиг независимости от инсулина через 11 недель. Однако для каждой аутологичной трансплантации ИПСК требуются доклинические тесты безопасности и процедуры, необходимые для создания и дифференцировки отдельных ИПСК, которые влекут за собой значительные финансовые и временные затраты для каждого пациента. Для решения этой проблемы применяют подход трансплантации аллогенных ИПСК, которые имеют установленный профиль безопасности, одновременно назначая иммуносупрессивные препараты для предотвращения отторжения [103]. Подобное клиническое исследование (jRCT2053240146) фазы 1/1b началось в 2025 году в больнице Киотского университета (Япония). В исследовании будет проведена трансплантация препарата OZTx-410 компании Orizuru Therapeutics. OztX-410 представляет собой имплантируемый слой из островковых клеток, полученных из

ИПСК, предоставленных фондом CiRA (Киото, Япония). Данные об эффективности пока не представлены [104].

Несмотря на существующие успехи, инкапсуляция призвана улучшить технологию, так как создаваемый барьер защищает клетки от иммунного отторжения, исключая необходимость иммуносупрессии. Введение не в воротную вену предотвращает опасный воспалительный ответ (IBMIR), а сама капсула обеспечивает клеткам защищённое микроокружение для долгосрочного выживания и функции. Этот подход также позволяет использовать в качестве источника универсальные клетки, полученные из стволовых.

1.4. Основные типы капсул

При инкапсуляции клетки помещают в биосовместимую полупроницаемую капсулу. Такая капсула пропускает кислород, глюкозу, инсулин и питательные вещества, но препятствует контакту с иммунными клетками и антителами. Благодаря этому удаётся замедлить или предотвратить отторжение трансплантата.

В зависимости от размера различают три типа инкапсуляции: нано-, микро- и макроинкапсуляцию [105].

1.4.1. Наноинкапсуляция

Наноинкапсуляция представляет собой технологию формирования ультратонких полимерных покрытий поверхности клеток. Такие тонкие оболочки от нескольких нанометров до 150 нм снижают общий объём трансплантата и минимизируют диффузионные ограничения [4]. Наиболее распространённым методом является послойное нанесение (layer-by-layer). Он основан на последовательной адсорбции противоположно заряженных полиэлектролитов (например, хитозана и альгината) за счёт электростатических взаимодействий [106]. Этот подход позволяет точно контролировать толщину и проницаемость

покрытия, однако требует многократных циклов осаждения, что может снижать жизнеспособность клеток из-за продолжительного воздействия внешних условий. Для повышения стабильности применяется ковалентное LbL-нанесение с ферментативным сшиванием или дендримерными системами [107]. Альтернативным методом является одностадийная сборка биомиметической клеточной стенки (BCW), где на поверхности клеток инициируется гибридационная цепная реакция с участием ДНК-альгинатных конъюгатов с последующим полиэлектролитным комплексообразованием с PLL, что позволяет создать стабильное нанопокрывание за один шаг [108]. Также применяются методы прямой конъюгации, при которых полимеры, такие как полиэтиленгликоль (ПЭГ) ковалентно связываются с поверхностными аминогруппами клеток для маскировки антигенов [109].

Преимущества включают минимальный объем трансплантата, улучшенную диффузию молекул, функционализацию поверхности и высокую эффективность покрытия [106,108].

Однако технология ограничена недостаточной механической защитой из-за деградации тонкого покрытия *in vivo*. Многие методы требуют нефизиологических условий, которые повреждают клетки (низкий pH, органические растворители, свободные радикалы). Сами материалы для наноинкапсуляции часто являются цитотоксичными. Продолжительность нормогликемии у животных при трансплантации обычно не превышает одного месяца, что указывает на недостаточную долгосрочную защиту. Более того сложности масштабирования и возможность проникновения иммунных клеток через дефекты покрытия препятствуют клиническому внедрению [4].

1.4.2. Макроинкапсуляция

Макроинкапсуляция, напротив, является стратегией инкапсуляции множества ОЛ в одно устройство, размеры которого могут варьироваться до нескольких

сантиметров [110,111]. Макрокапсулы могут отличаться размерами и формой, а технологии макроинкапсуляции делятся на несколько типов. Они бывают внутрисосудистыми и внесосудистыми. Внутрисосудистые устройства интегрируются в кровеносную систему через сосудистый шунт. Они лучше обеспечивают ОЛ питательными веществами и кислородом. Однако их установка сопряжена с хирургическими рисками из-за тромбоза, несмотря на ежедневное применение антикоагулянтов [112]. Поэтому такой подход используется редко. Внесосудистая локализация (например, подкожно) менее инвазивна. Также ее преимуществом считается возможность извлечения устройства с минимальным риском. Но эффективность трансплантата зависит от скорости и качества неоваскуляризации.

Также макрокапсулы бывают открытого и закрытого типов. Открытые системы позволяют кровеносным сосудам врастать внутрь, но требуют иммуносупрессии. В закрытых системах клетки изолированы от иммунной системы полупроницаемыми мембранами, однако транспорт веществ лимитируется пассивной диффузией [113]. Основным ограничением таких устройств является соотношение поверхности к объему, что затрудняет диффузию кислорода, питательных веществ и инсулина. Более того, фиброзная реакция на поверхности создаёт дополнительный барьер для диффузии и ухудшает васкуляризацию [112]. В итоге в центральных областях устройства возникает гипоксия, приводящая к гибели клеток. Это особенно критично пока не завершится реваскуляризация трансплантата. Для решения проблемы гипоксии разрабатываются несколько стратегий, каждая из которых имеет свои преимущества и ограничения:

- Внешняя подача кислорода

Такой способ ухода от гипоксии применяется в устройства типа β Air, где используется перезаправляемая кислородная камера, которая обеспечивает регулярную доставку кислорода к клеткам. Несмотря на доказанную эффективность в моделях на животных, ежедневное пополнение камеры создаёт

значительную нагрузку на пациента и ограничивает удобство долгосрочного использования [114].

- Электрохимическая генерация кислорода

Перспективным направлением является интеграция в устройство миниатюрного электрохимического генератора кислорода, работающего на принципе электролиза воды. Примером такого подхода служит O₂-Macrodevice, который позволяет генерировать кислород непосредственно в месте имплантации. Хотя эта технология обеспечивает стабильную и контролируемую оксигенацию, её реализация связана со сложностями миниатюризации и энергоснабжения [115].

- Материалы, генерирующие кислород

Включение кислородгенерирующих соединений, таких как пероксид кальция, в полимерную матрицу устройства позволяет обеспечить локальное высвобождение кислорода. Однако продолжительность генерации обычно ограничена (часы – несколько дней), а побочные продукты реакции могут создавать цитотоксические эффекты, что требует тщательного подбора состава [116].

- Инженерные решения для улучшения транспорта кислорода.

В основном такие решения связаны с геометрией макрокапсул. Одним из примеров такого подхода является устройство SONIC, в котором используется высокопористый полимерный каркас, имитирующий трахейную систему насекомых [117].

Каждая из этих стратегий направлена на преодоление диффузионных ограничений, но их клиническая трансляция требует дальнейшей оптимизации в отношении безопасности, долговечности и практичности применения [118].

1.4.3. Микроинкапсуляции

Микрокапсуляция является методом инкапсуляции отдельных или малых групп ОЛ в капсулы размером 300 - 1500 мкм [111,113]. Микрокапсулы, в отличие от макрокапсул, характеризуются высоким отношением площади поверхности к

объёму, что способствует эффективной диффузии кислорода и питательных веществ [3]. При этом они обеспечивают более надёжную иммунную защиту ОЛ по сравнению с нанокapsулами, поскольку риск непосредственного контакта клеток с внешней средой на границе капсулы в них значительно ниже [4]. Однако ключевым недостатком микроинкапсуляции является сложность удаления микрокапсул из места трансплантации [10].

Метод микроинкапсуляции впервые был применён Лимом и Суном в 1980 году. Они использовали метод жидкостной экструзии: ОЛ суспендировали в альгинате, полученные капли помещали в раствор CaCl_2 для гелеобразования, а затем покрывали микросферы последовательными слоями PLL и альгината, формируя стабильные капсулы [6]. С тех пор были исследованы различные гидрогели: коллаген [119], агароза [120], полиэтиленгликоль (ПЭГ) [121] и хитозан [122] и т.д. Однако наиболее широкое применение получил альгинат [123]. Он занимает особое место среди материалов для биомедицинского применения благодаря своему уникальному набору характеристик, который выгодно отличает его от других перспективных биополимеров и синтетических систем.

Сравнивая альгинат с другими природными полимерами, можно сказать что, коллаген и желатин выгодно отличаются наличием RGD-последовательностей (короткий пептидный мотив аргинил-глицил-аспарагиновая кислота, отвечающий за прикрепление клеток), благодаря чему обеспечивается естественная адгезия. Однако альгинат превосходит их по двум параметрам: во-первых, он позволяет лучше контролировать механические свойства получаемого геля, во-вторых, демонстрирует большую стабильность в физиологических условиях.

Что касается гиалуроновой кислоты, её структура близка к нативному внеклеточному матриксу, однако данный полимер значительно дороже альгината и к тому же образует менее стабильные гели, склонные к более быстрой деградации.

Хитозан обладает выраженными антимикробными свойствами, но при этом уступает альгинату с точки зрения технологичности, поскольку его

гелеобразование и обработка осложняются из-за ограниченной растворимости при нейтральном рН.

Синтетические полимеры (например, ПЛГА или ПЭГ) обладают несомненными достоинствами: высокая механическая прочность и возможность управлять кинетикой биодegradации. Тем не менее в вопросах биосовместимости и безопасности они уступают альгинату. Дело в том, что их degradation может сопровождаться образованием токсичных продуктов, а для придания биоактивности зачастую требуются сложные химические модификации [124,125].

Под термином «альгинат» (безводная форма альгиновой кислоты) понимают целое семейство полисахаридов, которые синтезируются морскими водорослями и некоторыми бактериями. По химическому строению это сополимер, состоящий из двух типов звеньев: α -L-гулуруновой (G) и β -D-маннуруновой (M) кислот [126, 127]. Гелеобразование запускается при взаимодействии G-блоков с двухвалентными катионами (например, Ca^{2+}), при этом формируется характерная структура, известная в литературе как «яичная коробка» (egg-box) [4].

Механические свойства альгинатных гелей, такие как пористость и жесткость, зависят от соотношения G/M, концентрации полимера, выбора и концентрации сшивающего катиона [128]. Например, высокое содержание G-блоков обеспечивает более жесткую и прочную структуру, тогда как преобладание M-блоков приводит к образованию более мягкого геля [129]. Ранее предполагалось, что M-блоки повышают иммуногенность, однако было доказано, что иммунный ответ связан не с типом звеньев, а с примесями, такими как эндотоксины, тяжёлые металлы и белки [130].

Выбор сшивающего катиона также критически важен. Как правило для микроинкапсулирования клеток используются двухвалентные катионы, такие как кальций (Ca^{2+}), стронций (Sr^{2+}) и барий (Ba^{2+}). Ba^{2+} благодаря наибольшему ионному радиусу и высокой аффинности к карбоксильным группам альгината формирует наиболее плотные и прочные гели с повышенной устойчивостью к набуханию и degradation, что делает его предпочтительным для приложений, требующих длительной механической стабильности. Sr^{2+} обеспечивает гели с

меньшей механической и химической стабильностью, но также обладает остеогенной активностью. Кальциевые гели, хотя и наиболее биосовместимы, уступают по прочности и долговечности [131].

Альгинат широко изучается не только для инкапсуляции ОЛ, но и для иммобилизации других клеток, белков, пептидов, а также в качестве каркасов для тканевой инженерии [132]. Это обусловлено его гидрофильностью, минимальной токсичностью, биосовместимостью, относительно низкой стоимостью и подходящими реологическими свойствами для доставки лекарств и клеточной терапии [133]. Его ключевое преимущество заключается в способности формировать гидрогель в мягких условиях: водный раствор альгината переходит в состояние геля при ионном сшивании двухвалентными катионами [134].

Однако альгинатные микрокапсулы демонстрируют ограниченную эффективность из-за биодegradации. Несмотря на отсутствие ферментов альгиназы (альгинатлиазы) у млекопитающих, растворение альгината происходит в основном за счет ионного обмена, при котором двухвалентные катионы заменяются одновалентными ионами натрия (Na^+) (Varaprasad 2026) [124]. В физиологических условиях замещение ионов приводит к осмотическому набуханию микрокапсул, дестабилизации и разрушению геля [135].

Дegradацию альгината можно контролировать путем модификации его химической структуры, изменения молекулярной массы и сшивания с поликатионами [133]. Наиболее часто используемая стратегия состоит в формировании микрокапсул альгината-поликатиона-альгината [112]. Покрытие поликатионом обеспечивает дополнительный контроль над селективной проницаемостью и увеличивает стабильность микрокапсул [112]. Слой поликатиона образуется из-за электростатического притяжения между отрицательно заряженными карбоксилатными группами альгината и положительно заряженными аминогруппами поликатионов [136]. Наиболее изученными и применяемыми поликатионами в системах микроинкапсуляции являются полиаминокислоты. Исторически первыми были разработаны альгинатные

микрокапсулы, покрытые поли-L-лизином (ПЛЛ). Однако в дальнейшем для улучшения ключевых характеристик ПЛЛ стал заменяться другими полиаминокислотами, например, поли-L-орнитином (ПЛО). Было продемонстрировано, что такая замена способствует повышению стабильности капсулы [137] и улучшает её биосовместимость [138], что подтверждает существенное влияние выбора поликатиона на свойства микрокапсулы. В поисках оптимальных решений исследовались и другие поликатионы, такие как хитозан, полиэтиленгликоль и поли-D-лизин, с целью повышения биосовместимости системы [10,133].

Однако, использование поликатионов приводит к формированию положительного заряда на поверхности микрокапсул, что в свою очередь приводит к абсорбции белка и иммунным реакциям [139]. Для минимизации заряда капсулы используются следующие стратегии:

- Улучшение связывания с альгинатной основой: Использование альгината с высокой молекулярной массой для более прочного связывания поликатиона.
- Отказ от поликатиона: Стабилизация гелевого ядра другими методами, чтобы уменьшить или полностью исключить необходимость в поликатионе и, соответственно, его положительный заряд.
- Нанесение защитного слоя: Покрытие слоя поликатиона внешним слоем геля или полианиона (например, альгината) для маскировки положительного заряда.

Последний вариант, а именно использование третьего слоя альгината является наиболее распространенным [112].

Несмотря на значительный прогресс, ряд проблем продолжает ограничивать эффективность трансплантации микроинкапсулированных ОЛ. К ключевым вызовам относятся иммунное отторжение, гибель клеток из-за недостатка питательных веществ и гипоксии в постимплантационный период, а также потеря стабильности самой микрокапсулы. Повышение выживаемости трансплантата требует дальнейшего совершенствования технологий инкапсуляции и поиска

новых, более совершенных биосовместимых материалов и их комбинаций. Идеальная микрокапсула должна сочетать в себе хорошую биосовместимость, стабильные структурно-механические свойства и селективную проницаемость: быть проницаемой для низкомолекулярных питательных веществ, кислорода и гормонов (например, инсулина), но непроницаемой для высокомолекулярных соединений, иммунных клеток и молекул, что обеспечивает надежную иммунную защиту трансплантированных ОЛ.

1.5. Клинические исследования

В настоящее время в клинических исследованиях применяются как микрокапсулы (Таблица 1), так и макроинкапсуляционные устройства (Таблица 2), содержащие аллогенные или ксеногенные ОЛ, а также инсулин-продуцирующие клетки, полученные из стволовых клеток [112,113].

Наиболее продвинутым микрокапсульным продуктом является платформа DIABECCELL, основанная на альгинатных микрокапсулах с неонатальными свиными ОЛ. В клинических исследованиях фаз I/II, трансплантация 5 000 - 20 000 IEQ/кг приводила к снижению частоты тяжёлых гипогликемических состояний и появлению измеряемого С-пептида у большинства пациентов при отсутствии иммуносупрессии веществ [140 –142]. Однако ни в одном из исследований не была достигнута устойчивая инсулин-независимость, а эффект оставался частичным и временным, что связывается с развитием фиброза вокруг микрокапсул и ухудшением транспорта кислорода и питательных веществ [113]. Тем не менее в 2025 году компания объявила о наборе новых пациентов для клинического исследования NCT06575426, в котором будет проводиться трансплантация системы OPF-310 с ксеногенными ОЛ. Подробный состав и структура системы пока скрыты.

Компания ViaCyte является лидером в разработке макрокапсул. Первое клиническое исследование иммуноизолирующей макрокапсулы PEC-Encap подтвердило её безопасность. Однако быстрая потеря клеточной жизнеспособности (уже через 12 недель) вследствие фиброзной реакции и

гипоксии остаётся ключевой проблемой [61,143]. Модифицированная версия VC01-103 (NCT04678557), также не привела к клинически значимому эффекту [144].

Альтернативный подход реализован в устройстве PEC-Direct (VC-02), допускающем прямую васкуляризацию трансплантированных клеток. В клиническом исследовании (NCT03163511) показано появление функциональной активности клеток, однако для предотвращения отторжения требовалась системная иммуносупрессия, что ограничивает долгосрочную применимость. Таким образом, компания вернулась к идее иммуноизолированных макрокапсул в клиническом исследовании NCT05791201. Однако они не показали эффективности и исследование было закрыто в 2025 [145].

Дополнительные клинические данные получены для устройств с активным обеспечением кислорода, таких как β Air. В исследовании NCT02064309 была подтверждена безопасность имплантации устройства с аллогенными ОЛ, однако устойчивого улучшения гликемического контроля и выраженного снижения потребности в экзогенном инсулине достигнуто не было. Более обнадеживающие результаты показали васкуляризируемые платформы, такие как Cell Pouch. Благодаря предварительной васкуляризации имплантата (интервал от 22 до 130 дней) у части пациентов удалось зафиксировать продукцию С-пептида и уменьшение объёмов вводимого инсулина. Однако сложно говорить об успехе терапии, так как исследования проводились на малых выборках пациентов [114].

В целом, клинические исследования подтверждают актуальность и реализуемость инкапсулированной клеточной терапии диабета, однако также выявляют системные ограничения, связанные с фиброзом и снижением функциональной массы трансплантированных клеток со временем. Современные клинические стратегии направлены на оптимизацию архитектуры капсул, улучшение васкуляризации и комбинирование инкапсуляции с дополнительными биологическими и инженерными подходами, что рассматривается как необходимое условие для достижения устойчивого клинического эффекта [112,113].

Таблица 1 – Список клинических исследований инкапсуляции инсулин-продуцирующих клеток в микрокапсулы

№ исследования	Годы	Спонсор	Фаза	Тип капсулы	Клетки	Результаты (эффективность / ограничения)	Ссылки
Микроинкапсуляция							
NCT00260234	2005–2007	Novocell	I/II	Альгинат+PEG-инкапсуляция	Аллогенные ОЛ	Исследование прекращено на раннем этапе из-за недостаточной клинической эффективности; клинически значимая и устойчивая секреция инсулина не достигнута, что позднее было связано с иммунной реактивностью к PEG-покрытиям.	[146]
NCT00940173 NCT01736228 NCT01739829	2009–2014	Living Cell Technologies / Diatranz Otsuka	I/II	Diabecell (Альгинат - поли-Л-орнитин - альгинат)	Ксеногенные свиные ОЛ	Частичное клиническое улучшение (снижение гипогликемий, транзиторный С-пептид), однако уровень секреции инсулина оставался недостаточным для отмены экзогенного инсулина; отмечено прогрессирование фиброза вокруг капсул.	[113,141,147]
NCT06575426	2025-...	Diatranz Otsuka	I/II	OPF-310	Не указано	Идет набор пациентов	[148]
NCT00790257	2008–2015	Больница Сент-Луиса (Бельгия)	I/II	Альгинат	Аллогенные ОЛ	Исследование не начато.	[149]
NCT01379729	2011–2013	AZ-VUB	I/II	Альгинат	Не указано	Результаты не опубликованы.	[150]

Таблица 2 – Список клинических исследований инкапсуляции инсулин-продуцирующих клеток в макрокапсу

№ исследования	Годы	Спонсор	Фаза	Тип капсулы	Клетки	Результаты (эффективность / ограничения)	Ссылки
Макроинкапсуляция							
NCT02239354 NCT02939118 NCT04678557	2014– 2017	ViaCyte	I/II	PEC-Encap (VC-01), иммунобарьерная мембрана	PEC-01 (ЭСК производные)	Подкожная имплантация показала безопасность и отсутствие иммунного отторжения. Однако у значительной части устройств при эксплантации выявлялась низкая выживаемость клеток через 12 недель вследствие гипоксии и выраженного фиброза.	[143]
NCT04678557	2019– 2023	ViaCyte	I/II	PEC-Encap (VC01-103)	PEC-01 (ЭСК производные)	Исследование прекращено из-за крайне низкой функциональной активности трансплантата; детектируемый С-пептид отмечался лишь в единичных случаях, что связывается с гипоксией и фиброзной реакцией на устройство.	[144]
NCT03162926 NCT03163511	2017– 2023	ViaCyte	I/II	PEC-Direct (VC-02), перфорированное устройство + иммуносупрессия	PEC-01 (ЭСК производные)	Прямая васкуляризация трансплантата обеспечивала приживание клеток и экспрессию инсулина у части пациентов через 3 – 12 месяцев, однако терапевтически значимой секреции инсулина достигнуто не было. В среднем через год уровень С-пептида у большинства пациентов составлял 1% от нормального. ограничениями оставались недостаточная масса β-клеток и необходимость системной иммуносупрессии.	[145]
NCT05791201	2023 – 2025	ViaCyte	I/II	VX-264 иммуноизолирующая капсула	VX-880 (Дифференцированные клетки, полученные из ЭСК)	Исследование прекращено в марте 2025 из-за недостаточной эффективности.	[103,145]
NCT02064309	2014– 2020	Uppsala Univ. / Beta-O2	I	βAir: PTFE-мембраны + камера кислорода	Аллогенные человеческие ОЛ	Безопасность имплантации подтверждена; у 3 из 4 пациентов С-пептид отсутствовал или был минимальным, клинически значимого улучшения гликемического контроля не достигнуто. Эксплантация выявила выраженный фиброз, воспалительную инфильтрацию и отсутствие адекватной васкуляризации.	[114]

1.6. Поли-[2(метакрилоилоксиэтил)триметиламмония хлорид как перспективный полимер для биоинженерии

Несмотря на то, что технология микроинкапсуляции исследуется во всем мире различными академическими институтами и биотехнологическими компаниями, ее еще предстоит усовершенствовать. Поиск, разработка и тестирование новых материалов для микроинкапсуляции являются важной задачей для улучшения свойств капсул [151].

Поли-[2(метакрилоилоксиэтил)триметиламмония хлорид (ПМЭТАХ) может стать одним из перспективных для создания новых микрокапсул. Этот полимер является одним из структурных аналогов PLL. Оба полимера имеют одинаковые по длине фрагменты между полимерной цепью и атомом азота. Важным является то, что оба полимера являются катионными, что является необходимым условием для формирования слоя на поверхности альгинатной капсулы (Рисунок 1).

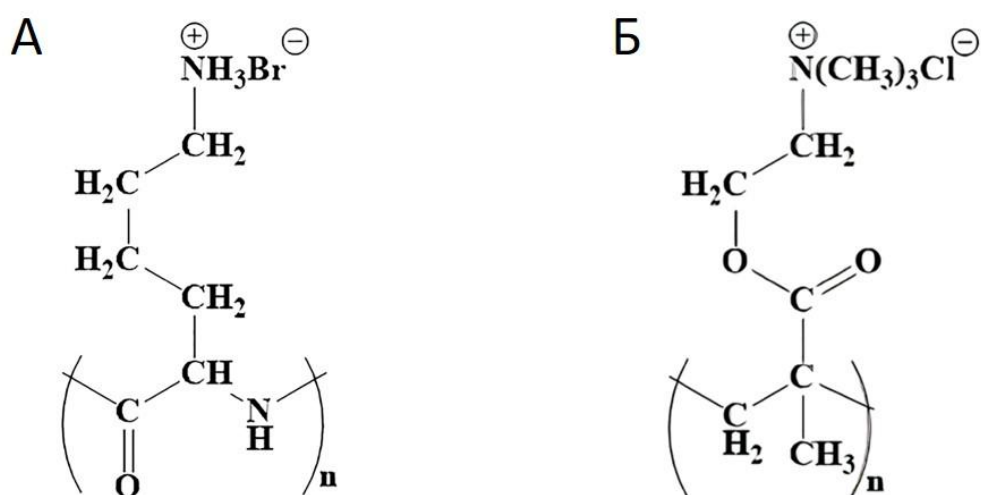


Рисунок – 1 Сходства в структуре полимерных молекул. А – поли-L-лизин (ПЛЛ), Б – поли-[2-(метакрилоилокси)этил]триметиламмония хлорид (ПМЭТАХ). Оба полимера имеют одинаковую длину фрагментов между полимерной цепью и атомом азота и являются катионными. Схематическое изображение

Помимо структурного сходства с PLL, важным преимуществом ПМЭТАХ является его нетоксичность. В частности, ПМЭТАХ-модифицированные

нанокристаллы целлюлозы показали очень низкую цитотоксичность во всех проведённых тестах (МТТ, нейтральный красный, LIVE/DEAD®) на различных типах клеток, включая линии мышинных макрофагов (J774A.1, BV2) и мононуклеарные клетки периферической крови человека (PBMC) [12].

Несмотря на катионную природу, ПМЭТАХ создает на поверхности гидратированную щётку и формирует слой «смазки» со сверхнизким коэффициентом трения. Исследования на примере полиэфирэфиркетона (PEEK) показывают, что слои ПМЭТАХ обладают сверхнизким коэффициентом трения в водной среде (до 0,003) и выраженной гидрофильностью [13]. Гидрофильные поверхности снижают адсорбцию белков по сравнению с гидрофобными, уменьшают прямое распознавание материала иммунными клетками через Toll-подобные рецепторы (TLR), которые часто активируются гидрофобными участками. Дополнительно материал с низким коэффициентом трения минимизирует механическое раздражение тканей, что в совокупности создаёт предпосылки для снижения хронического воспаления [152].

Было показано, что, несмотря на свой положительный заряд ПМЭТАХ может уменьшать фиброзное обрастание. Экспериментальные исследования продемонстрировали, что при культивировании первичных клеток спирального ганглия (включающих нейроны, глиальные клетки и фибробласты) на ультратонких плёнках ПМЭТАХ наблюдалось преимущественное прикрепление глиальных клеток (~65% от общего числа клеток) при значительном подавлении адгезии фибробластов (~35%) [153]. Таким образом, ПМЭТАХ обладает свойством подавлять адгезию фибробластов, ключевых клеток, ответственных за формирование фиброзной ткани вокруг имплантатов.

Более того, при использовании в качестве компонента полиамфолитных гидрогелей, ПМЭТАХ в комбинации с отрицательно заряженными мономерами (например, винилсульфоновой кислотой, VSA) способен формировать гидратированные поверхности, близкие к нейтральному заряду. Как показано в исследовании Zhang et al. (2018), такие сбалансированные полиамфолитные покрытия эффективно снижают адгезию модельных белков (включая бычий

сывороточный альбумин, BSA) [154], что является ключевым фактором в предотвращении реакции на инородное тело и последующего фиброза [152]. Принцип создания нейтральной поверхности за счет компенсации положительного заряда ПМЭТАХ отрицательными группами можно экстраполировать на системы с альгинатом, где последний выступает в роли анионного компонента, минимизируя суммарный поверхностный заряд и снижая неспецифическую адгезию белков.

ПМЭТАХ является многообещающим полимером для применения в биомедицинских технологиях и демонстрирует высокий профиль биосовместимости. Было показано, что мочевые катетеры с покрытием ПМЭТАХ продемонстрировали значительное снижение адгезии бактерий, при этом покрытие способствовало адгезии и пролиферации клеток человека без признаков цитотоксичности [11]. В другом исследовании включение ПМЭТАХ в комплекс с поли(2-гидроксиэтилметакрилатом) и фактором роста фибробластов способствовало регенерации нервной ткани и восстановлению функций после травмы спинного мозга у крыс [14]. Более того, имплантат на основе комплекса НЕМА-ПМЭТАХ, соинкапсулированный с нейтральными предшественниками из ИПСК, успешно интегрировался в поврежденный спинной мозг, уменьшал образование полостей и поддерживал выживаемость трансплантированных клеток [15]. Эти данные, подтверждают, что ПМЭТАХ является перспективным биосовместимым покрытием.

Важной характеристикой для иммуноизоляции является избирательная проницаемость капсул. При использовании ПМЭТАХ в качестве сополимера с гидрохлорид -2-аминоэтилметакрилата для покрытия альгинатных микрокапсул для клеток C2C12 было установлено пороговое значение проницаемости около 70 кДа, что теоретически подходит для защиты ОЛ [15]. Хотя ранее отмечалась возможность образования комплекса ПМЭТАХ с отрицательно заряженными белками (например, альбумином), было показано, что простая замена культуральной среды на бессывороточную после изготовления капсул позволяет нивелировать этот эффект [15]. Несмотря на известные свойства ПМЭТАХ, его

применение именно для инкапсуляции ОЛ с целью коррекции инсулинодефицитных состояний ранее не описывалось.

Таким образом, ПМЭТАХ представляет собой стабильную и эффективную альтернативу таким традиционным полимерам, как ПЛЛ, для создания защитных покрытий микрокапсул. Мы предлагаем его в качестве основы для новой системы инкапсуляции ОЛ. Впервые проведено комплексное исследование стабильности (осмотической, термической и в условиях длительного культивирования) и цитотоксичности новой трехслойной системы «альгинат- ПМЭТАХ-альгинат», что закладывает основу для её потенциального будущего применения в клинике для лечения заболеваний, связанных с дефицитом инсулина.

ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

2.1. Синтез микрокапсул

Трехслойные микрокапсулы «альгинат-ПМЭТАХ-альгинат» были синтезированы в лаборатории фотополимеризации и полимерных материалов ИМХ имени Г.А. Разуваева РАН в рамках выполнения ГЗ № АААА-А20-120022590096-6. Альгинатную основу микрокапсул получали с использованием микрофлюидной установки, принцип работы которой основан на использовании двухфазных систем. В качестве дисперсной фазы (материала будущих микрокапсул) используется смесь раствора альгината натрия (2 %) (Sigma, A1112, США) с высокомолекулярным декстраном 20 000 Да (15 мас. %) (АО «Вектор», Россия). Эта смесь подается в поток непрерывной фазы, представляющей собой водный раствор высокомолекулярного полиэтиленгликоля 8000 Да (ПЭГ-8000) (30 мас. %) (Нижекамскнефтехим, Россия). Образование микрокапель заданного размера происходит за счет контролируемого внешнего воздействия на поток непрерывной фазы. Сразу после образования микрокапли помещаются в раствор BaCl_2 , который сшивал альгинат, обеспечивая формирование гидрогелевой основы. Поверх нее наносился слой катионного полимера ПМЭТАХ (поли-[2-(метакрилоилокси)этил]триметиламмоний хлорид), синтезированного в ИМХ имени Г.А. Разуваева РАН. Завершающий внешний слой также представлен альгинатом [155].

2.2. Определение проницаемости микрокапсул

Селективная проницаемость микрокапсул, являющаяся фундаментальным требованием для эффективной иммуноизоляции. Микрокапсула создает иммуноизоляционный барьер если она проницаема для небольших молекул таких как глюкоза (180 Да) и инсулина (мономер/гексамер: 5,8/34,2 кДа), но не проницаема для более крупных молекул, ответственными за иммунное отторжение,

такими как иммуноглобулин G (IgG: 150 кДа), комплемент C1q (410 кДа), иммуноглобулин M (IgM: 910 кДа) [156].

Проницаемость была охарактеризована *in vitro* с использованием флуоресцентных молекулярных зондов различной молекулярной массы. Принцип метода основан на способности лектинов, избирательно связываться с углеводными компонентами на поверхности клеток. Лектины конъюгированы с изотиоцианатом флуоресцеина (FITC) для их детекции. Общий объем инкубационной смеси составлял 0,5 мл, а концентрация лектинов – 5 мкг/мл в соответствии с инструкцией производителя. Выбор лектинов и условия инкубации проводились после литературного анализа.

Изначально сравнивались два режима инкубации при 4°C в течение 48 часов [137,157–159] и при 37°C в течение 18 часов [160].

Использовали следующие лектины:

- FITC-конъюгированный лектин зародышей пшеницы (FITC-Triticum Vulgare, (FITC-WGA), молекулярная масса 36 кДа);
- FITC-конъюгированный лектин маакии амурской (FITC-Maackia amurensis (FITC-MAL), молекулярная масса 75 кДа);
- FITC-конъюгированный лектин клещевины (FITC-Ricinus communis, (RCA-I), молекулярная масса 120 кДа);
- FITC-конъюгированный лектин бузины черной (FITC-Sambuca nigra, (FITC-SNA), молекулярная масса 150 кДа).

Контрольные группы включали неинкапсулированные (свободные) ОЛ и пустые микрокапсулы. Опытные группы включали микрокапсулы, порытые ПМЭТАХ в концентрации 0,01%; 0,1%; 0,4%; 0,5%; 1% с ОЛ. После инкубации образцы тщательно отмывали от избытка красителя раствором Хэнкса и анализировали с помощью конфокального флуоресцентного микроскопа LSM 880 (CarlZeiss, Германия) при возбуждении 488 нм и эмиссии 493 - 624 нм. Количественную оценку проницаемости проводили путём подсчёта числа флуоресцентных сигналов, проникших внутрь капсул, на фиксированной площади

(10 000 пикселей²) в наиболее яркой области изображения. Данный подход позволил экспериментально определить молекулярно-массовый порог отсечки (MWCO) полученных оболочек и подтвердить их способность обеспечивать свободную диффузию низкомолекулярных соединений (глюкоза, инсулин) при эффективном блокировании проникновения крупных иммунных медиаторов, таких как иммуноглобулины [161]. Анализ проводили с использованием программного обеспечения ImageJ 1.43u.

2.3. Определение стабильности микрокапсул

Для прогнозирования поведения микрокапсул в условиях *in vivo* был проведен комплексный анализ их структурной и механической стабильности в различных модельных средах. Главным критерием во всех тестах была динамика изменения среднего диаметра капсул так как он отражает такие процессы как набухание, уплотнение, деградацию (или, в ряде случаев, релаксация полимерной сети). Используя эту методику, можно количественно определить, насколько оболочка способна сохранять заданную геометрию и соответственно и свои барьерные свойства под воздействием стрессоров.

2.3.1. Оценка механической стабильности при осмотическом стрессе

Механическая стабильность и вязкоупругие свойства микрокапсул, определяющие их способность противостоять объёмной деформации в условиях осмотического стресса, были исследованы в рамках стандартного теста [162]. Суть метода заключалась в последовательном создании контролируемых условий, вызывающих механическое напряжение в оболочке капсул. Для этого образцы сначала подвергали воздействию гипотонической среды путём инкубации в дистиллированной воде с нулевой осмолярностью в течение двух часов, что приводило к активному поступлению воды внутрь капсул и их набуханию. Затем микрокапсулы переносили в изотонический раствор Хэнкса (270 - 305 мОсм/кг) для

снятия осмотического стресса, где их выдерживали в течение 15 минут, 24 и 72 часов для регистрации отклика материала. Основными измеряемыми биомеханическими характеристиками выступали максимальная достигнутая деформация набухания, количественно отражающая сопротивление оболочки растяжению, и динамика восстановления исходного диаметра, позволяющая оценить долю упругой (обратимой) и вязкой (необратимой) деформации. Быстрое восстановление размеров в первые 15 минут после нормализации осмотического давления свидетельствовало об упругом поведении полимерной мембраны, в то время как дальнейшие изменения в течение последующих суток характеризовали её вязкоупругие свойства, связанные с релаксацией напряжений и перераспределением нагрузки внутри полимерной сети. Для комплексного анализа кинетики изменения механических свойств микрокапсул во времени испытания проводили на 2-е и 7-е сутки после их получения. Такой подход дал возможность оценить не только изначальные механические свойства, но и после продолжительного взаимодействия с физиологической средой [161].

2.3.2. Оценка термической стабильности

Термическую стабильность микрокапсул оценивали путем измерения изменения их диаметра при инкубации в растворе Хэнкса при 37°C и 40°C в течение 3 и 7 суток с ежесуточной сменой среды. Анализ был направлен на оценку температурной зависимости свойств материала, включая возможные изменения, а также определение способности микрокапсул сохранять свойства при физиологической и повышенной температуре [161].

2.3.3. Оценка стабильности в условиях культивирования клеток

Устойчивость микрокапсул в условиях, максимально приближенных к физиологическим, оценивали путем их инкубации в полноценной питательной среде RPMI (Gibco, Великобритания), содержащей 10% эмбриональной телячьей

сыворотки (FBS, Gibco, Великобритания), L-глутамином в концентрации 0,58 мг/мл (PanEco, Россия) и антибиотико-антимикотическим коктейлем (Antibiotic-Antimycotic 100X, ThermoScientific, США). Культивирование проводили в течение 7 суток при стандартных условиях (37°C, 5% CO₂, высокая влажность). Данный тест позволил смоделировать и оценить структурную стабильность микрокапсул в условиях взаимодействия с биологической средой, приближенной к физиологическим условиям и содержащей комплекс различных солей, аминокислот, витаминов и белки [161].

2.3.4. Оценка стабильности микрокапсул при воздействии физиологического раствора

Устойчивость альгинатных микрокапсул к механическому стрессу и ионному обмену оценивали с помощью теста многократного промывания изотоническим раствором натрия хлорида (0,9%). Данный тест выполнялся совместно с ИМХ имени Г.А. Разуваева РАН. В основу метода легло моделирование процесса постепенного замещения ионов бария, ответственных за поперечные сшивки альгинатной матрицы, на ионы натрия, присутствующие в физиологическом растворе. Для этого в шприц объемом 2 мл помещали 4500 микрокапсул, после осаждения фиксировали занимаемый ими объем, удаляли избыток жидкости и добавляли физиологический раствор до метки 2 мл. Суспензию тщательно перемешивали и инкубировали в течение 5 минут. Цикл осаждения, замера объема и замены раствора повторяли многократно. Критерием стабильности служило количество промываний, предшествующих видимой дезинтеграции, растворению или критическому изменению объема капсул. Данная методика позволила количественно оценить прочность ионных связей в гелевой матрице, а также устойчивость полимерной оболочки к механической нагрузке, возникающей при циклическом сдвиге в суспензии, что является важным параметром для оценки выживаемости капсул в условиях транспортировки и введения в организм [161].

2.4. Определение ультраструктуры микрокапсул

Анализ ультраструктуры микрокапсул проводился с использованием трансмиссионной электронной микроскопии совместно с Центральной научно-исследовательской лабораторией ЦНИЛ ФГБОУ ВО «ПИМУ» Минздрава России.

Фиксация образцов выполнялась стандартным методом с использованием глутарового альдегида 2,5% в фосфатном буфере. После чего образцы промывались фосфатным буфером и фиксировались OsO_4 . Обезвоживание препаратов проводилось по восходящей концентрации спиртов, заливали эпоксидной смолой. Анализ проводился с использованием микроскопа Morgagni 268 D; морфометрию образцов выполняли с помощью программы AnalySIS [163].

2.5. Использование лабораторных животных

Все эксперименты с участием животных одобрены локальным этическим комитетом ФГБОУ ВО «ПИМУ» Минздрава России (протокол № 6 от 16 апреля 2023 г. и протокол № 1 от 23 января 2026 г.).

В работе использовали два вида лабораторных животных:

1. Кролики породы Серый великан ($n = 20$), возраст 1 - 2 месяца, масса тела 2,0 - 3,0 кг. Животных использовали в качестве доноров ОЛ для *in vitro* и *in vivo* экспериментов.

2. Крысы линии Wistar ($n = 120$), возраст 2 - 4 месяца, масса тела 200 - 300 г. Животных распределили по экспериментальным группам следующим образом:

- Доноры ОЛ для *in vitro* исследований ($n = 30$) – животные использованы для отработки протокола инкапсуляции, подбора оптимальной концентрации клеток и оценки влияния процедуры инкапсуляции на жизнеспособность и функциональную активность ОЛ.

- Моделирование экспериментального сахарного СД1 и оценка стабильности модели ($n = 60$) – индукция СД1 проводилась стрептозотоцином (СТЗ) в двух

экспериментальных дозировках: СТЗ 45 мг/кг (без лечения (n = 15) и с инсулинотерапией (n = 15)); СТЗ 65 мг/кг (без лечения (n = 15) и с инсулинотерапией (n = 15)).

- Определение оптимального места трансплантации (n = 10) – животным трансплантировали пустые микрокапсулы в брюшину (n = 5) и сальник (n = 5) для сравнительной оценки извлекаемости и тканевой реакции.

- Оценка биосовместимости микрокапсул и влияния их на компенсацию СД1 (n = 10) – животным с индуцированным СД1 (СТЗ 45 мг/кг) трансплантировали инкапсулированные кроличьи ОЛ для анализа динамики гликемии и гистологической оценки реакции окружающих тканей.

- Контрольная группа (свободные ОЛ) (n = 10) – животным с индуцированным СД1 (СТЗ 45 мг/кг) трансплантировали неинкапсулированные (свободные) кроличьи ОЛ для оценки продолжительности их функционирования и сравнения выраженности иммунного ответа с группой инкапсулированных ОЛ.

Животных содержали в стандартных условиях вивария при контролируемом температурном режиме (20 - 22°C), влажности (50 - 60%) и 12-часовом световом цикле со свободным доступом к воде и гранулированному корму. Все хирургические вмешательства, забор крови и эвтаназию проводили под общей анестезией (золетил (Virbac NZ) 20 мг/кг + ксилазин (Bayer) 6 мг/кг, внутримышечно). Эвтаназию животных осуществляли путем декапитации.

2.6. Методика изоляции островков Лангерганса

Методика выделения основывалась на стандартном подходе ферментативного расщепления с применением коллагеназы, с последующей градиентной очисткой. Дополнительно в протокол были внесены несколько авторских модификаций, направленных на упрощение процедуры при сохранении выхода ОЛ и их жизнеспособность [164].

Модификации включали отказ от перфузии общего жёлчного протока с заменой на механическую фрагментацию ПЖ, что заметно упрощает ход работы. А также использование повторной ферментации после охлаждения. Такой протокол способствует сохранению целостности ОЛ и улучшает качество очистки.

Для оптимизации процесса инкапсуляции, включая подбор концентрации клеток и оценку цитотоксичности капсул на малом количестве материала, на начальном этапе *in vitro* исследований в качестве модельного объекта использовались ОЛ крыс. После верификации протокола финальную оценку жизнеспособности и функциональной активности дополнительно проводили на кроличьих ОЛ, предназначенных для последующей трансплантации *in vivo*, что обеспечило методологическую преемственность и достоверность результатов.

Панкреатэктомию проводили с использованием анестезии (см. раздел 2.5). Поджелудочную железу извлекали с помощью быстрого хирургического забора (<10 мин) и помещали в органосохраняющий раствор (раствор Хенкса и 10% раствор бычьего сывороточного альбумина (БСА) (Gibco, Великобритания)). Вырезанную поджелудочную железу помещали в охлажденный до температуры +4 °С раствор Хенкса, содержащий 5% БСА. В стерильных условиях удаляли жировую ткань и сосуды. Ткань поджелудочной железы фрагментировали на куски 1 - 2 мм. Помещали в холодный раствор Хенкса и центрифугировали на скорости 300 g в течение 3 мин при температуре +4 °С. После чего удаляли супернатант и всплывшую жировую ткань. Ферментативное расщепление осуществляли коллагеназой V 0,1 % (Sigma, США) в растворе Хенкса. Инкубацию осуществляли на термошейкере при постоянной температуре 37°С в течение 11 - 15 минут. Прекращение ферментативной обработки определяли по визуальным критериям – полному размягчению и фрагментации паренхимы поджелудочной железы.

Для инактивации коллагеназы в суспензию добавляли равный объем раствора Хенкса с добавлением 5% БСА. После центрифугирования при 200×g в течение 3 мин удалили супернатант, а осадок анализировали с использованием микроскопии и окрашиванием дитизоном. Если количество свободных от ткани ОЛ не достигало 50%, то проводили повторную ферментацию коллагеназой в течение 2 - 4 мин в

комнатной температуре, с последующей инактивацией коллагеназы и очисткой от супернатанта.

Далее проводили очистку ОЛ от ацинарной ткани путем последовательной фильтрации через металлическое сито с диаметром пор 0,5 мм. Крупные непереваренные фрагменты удаляли.

Очищенную клеточную суспензию центрифугировали при $200\times g$ в течение 3 мин. После удаления супернатанта осадок ресуспендировали и подвергали центрифугированию в ступенчатом градиенте плотности Ficoll DL-400 (Sigma, США) с плотностями 1,048, 1,072, 1,084 и 1,095 г/мл. Центрифугирование проводили при $800\times g$ в течение 15 минут. Фракция с ОЛ находилась между плотностью 1,048 и 1,072 или между 1,072 и 1,084. Эту фракцию отбирали, тщательно отмывали раствором Хенкса и переносили в условия культивирования.

Культивирование выделенных ОЛ осуществляли в полной питательной среде RPMI (Gibco, Великобритания) с низким содержанием глюкозы (1г/л), дополненной 10% эмбриональной бычьей сывороткой (FBS, Gibco, Великобритания), L-глутамином в концентрации 0,58 мг/мл (PanEco, Россия) и антибиотико-антимикотическим коктейлем (Antibiotic-Antimycotic 100X, ThermoScientific, США). Инкубацию вели в стандартных условиях: при температуре 37°C в атмосфере 5% CO_2 [165–167].

Контроль качества и идентификацию ОЛ на всех этапах работы проводили с помощью окрашивания дитизоном. Этот краситель образует хелатный комплекс с ионами цинка, входящими в состав секреторных гранул β -клеток, что визуально проявляется в появлении характерного красно-оранжевого окрашивания телец Лангерганса. Микроскопический анализ и документацию результатов проводили с использованием микроскопа Leica DM2500 (Leica, Германия).

2.7. Оценка жизнеспособности и функциональной активности свободных и инкапсулированных островков Лангерганса

Комплексная оценка жизнеспособности и функциональной активности ОЛ до и после инкапсуляции проводилась с использованием методов цитологического окрашивания и иммуноферментного анализа.

Морфологическую целостность и сохранение инсулин-продуцирующей функции ОЛ визуализировали методом окрашивания дитизоном (DTZ), который специфически образует комплекс с ионами цинка, входящими в состав секреторных гранул β -клеток.

Для количественного определения доли живых и погибших клеток через 24 часа после выделения и после инкапсуляции использовали набор для двойного окрашивания Live/Dead Cell Double Staining Kit (Sigma-Aldrich, Saint Louis, MI, США) в соответствии с инструкцией производителя. Суспензию ОЛ объемом 500 мкл инкубировали в течение 15 минут при комнатной температуре в смеси, содержащей 2 мкл кальцеина-АМ (маркер живых клеток, зелёная флуоресценция) и 1 мкл этидия-1 (маркер мёртвых клеток, красная флуоресценция). Визуализацию проводили на конфокальном лазерном сканирующем микроскопе LSM 880 (CarlZeiss, Германия) с последующей обработкой изображений в программе ImageJ ImageJ 1.43u для расчёта отношения площади, занятой жизнеспособными и мертвыми клетками.

Функциональную активность ОЛ оценивали по их способности к базальной секреции инсулина. Для этого образцы, содержащие по 350 ОЛ на мл, инкубировали в течение 24 часов в стандартных культуральных условиях. После инкубации супернатант собирали и хранили при -20°C до проведения анализа. Концентрацию секретированного инсулина определяли методом ИФА с использованием коммерческого набора реагентов (Cloud-clonecorp, Houston, TX, США). Оптическую плотность измеряли на планшетном спектрофотометре при длине волны 450 нм, а концентрацию инсулина выражали в мкЕд/мл [168].

2.8. Моделирование и валидация экспериментального сахарного диабета 1 типа

Экспериментальный СД1 индуцировали у крыс линии Wistar массой 200 - 300 г. путем однократного внутривенного введения стрептозотоцина (СТЗ, Sigma, США). Для определения оптимального режима в предварительной серии экспериментов использовали две дозы СТЗ: 65 мг/кг и 45 мг/кг. Препарат растворяли непосредственно перед введением в стерильном цитратном буфере (0,1 М, рН 4,5) и вводили животным после 12-часового ночного голодания [169,170].

Уровень глюкозы крови контролировали 1 раз в 2 дня на протяжении всего экспериментального периода (90 суток) с использованием портативного глюкометра Accu-Chek Active (Roche Diagnostics, Германия). Забор крови осуществляли из хвостовой вены. Критерием успешной индукции СД1 считали стойкое повышение уровня гликемии выше 16 ммоль/л, зафиксированное на 7-е сутки после введения СТЗ.

Для подтверждения стабильности модели экспериментального СД1 в условиях устранения глюкозотоксичности отдельным группам животных с индуцированным СД1 (СТЗ 65 мг/кг и 45 мг/кг назначали заместительную инсулинотерапию. Препарат инсулина пролонгированного действия Хумулин НПХ (Lilly France, Франция) вводили подкожно дважды в сутки. Дозу инсулина титровали индивидуально, ориентируясь на показатели гликемии, с целью ее стабилизации и предотвращения тяжелых метаболических нарушений.

Успешность индукции СД1 и эффективность его лечения оценивалась с помощью мониторинга уровня глюкозы в крови и гистологического и иммуногистохимического анализа (на инсулин и глюкагон) тканей поджелудочной железы.

2.9. Хирургическая методика трансплантации

Все хирургические вмешательства проводили с использованием анестезии, как было описано выше.

Для изучения влияния микрокапсул на компенсацию инсулин-дефицитных состояний на первом этапе работы подбиралось оптимальное место трансплантации. На основании литературных данных были выбраны два сайта: брюшина и сальник [171]. Таким образом в пилотных исследованиях пустые микрокапсулы трансплантировали здоровым крысам в брюшину и сальник сроком на 1 неделю для оценки раннего иммунного ответа. В обоих случаях 1 мл пустых микрокапсул помещали в физиологический раствор (общий объем 2 мл) и вводили иглой G22 (рисунок 2).



Рисунок 2 – Микрокапсулы в шприце перед трансплантацией

Хирургический доступ к брюшной полости обеспечивали через разрез длиной от 0,5 до 0,7 сантиметра, выполненный по средней линии. При трансплантации в брюшину, после рассечения кожи и подлежащего апоневроза (белой линии живота), формировали карман между внутренней (задней) поверхностью прямой мышцы живота и париетальной брюшиной (тонкой фасциально-брюшинной прослойкой). После этого осторожно извлекали большой сальник и вводили в него трансплантат. Далее сальник размещали в анатомическое положение внутри

брюшной полости. Операционную рану ушивали послойно. В послеоперационном периоде в течение 3 - 5 дней всем животным проводили антибиотикотерапию препаратом аугментин (Glaxo Wellcome Production (Франция)), добавляя его в воду в дозе 1 г/л для профилактики инфекционных осложнений [172].

Для тестирования терапевтического влияния микрокапсулированных ОЛ в основной серии эксперимента использовали крыс с моделью экспериментального СД1. Важно отметить, что в качестве доноров ОЛ были выбраны кролики, поскольку ксеногенный материал усиливает иммунный ответ, что делает его более подходящим для изучения иммунных реакций на чужеродные клетки. Выбор ксеноматериала для оценки капсул также используется другими исследователями [173–175]. Для опытной группы использовали 2000 инкапсулированных ОЛ (ориентировочно 1 мл), а для группы контроля использовали суспензию такого же количества свободных, (неинкапсулированных ОЛ) в том же объеме физиологического раствора. Трансплантацию проводили по методике, описанной выше. Микрокапсулы трансплантировались сроком на 2 недели, 1 и 3 месяца. Для оценки этапов острого воспаления и его переход с хроническое воспаление с последующим ремоделированием матрикса с фиброзированием и неоваскуляризацией.

2.10. Оценка функциональной активности трансплантированных островков Лангерганса *in vivo*

Функциональную активность трансплантированных ОЛ оценивали комплексно, используя долгосрочный мониторинг гликемического профиля и функциональные тесты. Основным показателем служила динамика уровня глюкозы в крови, которую измеряли ежедневно до потери функциональной активности ОЛ или в течение 90 дней. Критерием функциональной активности трансплантата считали устойчивое снижение уровня гликемии ниже порогового значения в 27 ммоль/л. Этот уровень был установлен на основании значений

стабильной гипергликемии в группе крыс с индуцированным СД1, не получавших лечения (контрольная группа).

Для подтверждения глюкозозависимой секреторной функции именно трансплантированных, а не восстановленных эндогенных β -клеток, проводили тест толерантности к глюкозе (ТТГ). Животному с функционирующим трансплантатом внутрибрюшинно вводили раствор глюкозы из расчета 0,5 г/кг массы тела. Забор крови из хвостовой вены осуществляли до нагрузки глюкозой (точка 0) и через 15, 30 и 60 минут после неё. В полученных образцах сыворотки методом иммуноферментного анализа с использованием видоспецифичных наборов реагентов отдельно определяли концентрацию инсулина реципиента (крысиного) (Cloud-clonecorp, США, SEA448Ra) и инсулина донора (кроличьего) (Cloud-clonecorp, США, SEA448Rb)).

Дополнительным подтверждением послужило присутствие ОЛ в ткани сальника. После извлечения тканей сальника проводили витальное окрашивание дитизоном, визуализирующее жизнеспособные ОЛ по наличию цинксодержащих инсулиновых гранул [172].

Также подтверждением служил иммуногистохимический анализ, который продемонстрировал отсутствие восстановления эндогенных ОЛ в поджелудочной железе и присутствие трансплантированных ОЛ в сальнике.

2.11. Оценка биодegradации и реакции окружающих тканей на трансплантат

Для оценки биодegradации и реакции окружающих тканей на трансплантат микрокапсулы с клетками и без клеток вымывались и оценивались с использованием микроскопического анализа. Проводился подсчет количества вымытых микрокапсул, а также оценка уровня разрушения микрокапсул и уровня адгезии клеток реципиента к стенке микрокапсулы.

Вымытые микрокапсулы оценивались по нескольким параметрам:

- Количество. Оценивалось подсчетом после промывания.

• Поврежденность / стабильность. Микрокапсулы были разделены на 2 группы – целые и разрушенные. При этом целыми считались как ровные микрокапсулы, так и деформированные без видимых повреждений оболочки. Разрушенными микрокапсулами считались как микрокапсулы с дефектами или разрывами оболочки, так и обломки микрокапсул (рисунок 3).



Рисунок 3 – Микрофотографии микрокапсул «альгинат-ПМЭТАХ-альгинат» после извлечения из тканей (вымывания). Представлены морфологические варианты состояния капсул: сохраненные (целые) с ровной поверхностью (слева), деформированные без нарушения целостности оболочки (в центре) и разрушенные с видимыми разрывами полимерного слоя и фрагментацией (справа). Световая микроскопия. Масштабная линейка, 100 мкм

• Уровень адгезии тканей и клеток: микрокапсулы были разделены на 4 группы по уровню адгезии тканей и клеток – без адгезии, <50%, > 50%, 100% (рисунок 4).

• Вымывание капсул и оценка с использованием деления на группы по уровню адгезии тканей и разрушения применяется и другими исследователями [138,176].

• Оставшиеся в ткани микрокапсулы после вымывания забирались на гистологический и иммуногистохимический анализ.

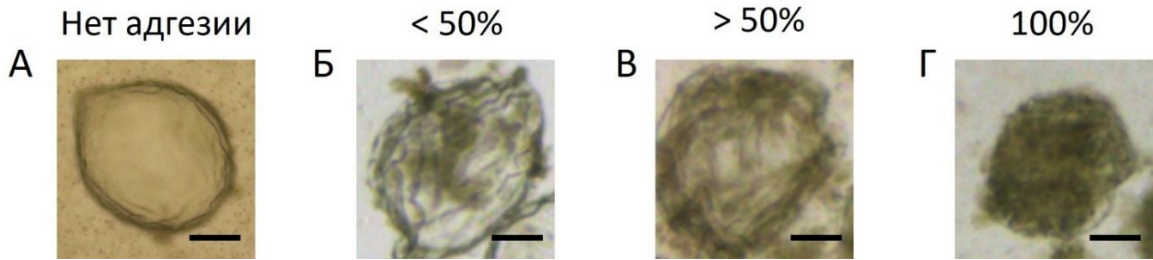


Рисунок 4 – Микрофотографии, иллюстрирующие степень адгезии клеток и тканей реципиента к поверхности микрокапсул «альгинат-ПМЭТАХ-альгинат» после эксплантации. Классификация по занимаемой площади поверхности: А – отсутствие адгезии (чистая поверхность); Б – частичная адгезия (менее 50% площади); В – выраженная адгезия (более 50% площади); Г – полное покрытие поверхности капсулы клетками (100% площади). Световая микроскопия. Масштабная линейка, 100 мкм

2.12. Гистологический и иммуногистохимический анализ

Для гистологического и иммуногистохимического анализа образцы:

- поджелудочных желез для подтверждения стабильности модели СД1 после введения СТЗ (в дозах 65 и 45 мг/кг с инсулинотерапией и без неё);
- сальников для оценки биodeградации и реакции окружающих тканей на трансплантат микрокапсул с клетками и без них.

Образцы помещали в 10% раствор нейтрального формалина. Фиксированные формалином образцы ткани обезвоживали по восходящей концентрации спиртов, заливали парафином, готовили срезы толщиной 5 - 7 мкм с полученных парафиновых блоков с использованием роторного микротомы Leica 450RM (Leica Microsystems, Германия). Полученные срезы окрашивались по стандартной методике гематоксилином и эозином. Также проводилось двойное иммунофлуоресцентное окрашивание с использованием первичных антител: моноклональных антител к глюкагону (1:10; Invitrogen, Carlsbad, CA, США) и моноклональных антител к инсулину (1:100; Invitrogen, Carlsbad, CA, США) в течение ночи при 4 °С. Образцы дополнительно окрашивали DAPI (1:1000;

BioLegend, San Diego, CA, США) в соответствии с протоколом производителя. Срезы тканей исследовали с помощью микроскопа Leica DM2500 (Leica, Япония).

2.13. Статистический анализ

Необходимый размер выборки животных рассчитывали с помощью калькулятора размера выборки Sealed Envelope Ltd. 2012 [177]. Для статистического анализа и построения графиков использовалась программа GraphPad Prism 9.6.0 (GraphPad Software, США).

Перед проведением статистического анализа распределение всех количественных данных проверяли на соответствие нормальному закону с помощью критериев Шапиро-Уилка и Колмогорова-Смирнова. В зависимости от результата проверки нормальности для сравнения двух независимых групп использовали параметрический t-критерий Стьюдента (для данных с нормальным распределением) или непараметрический U-критерий Манна-Уитни (для данных, распределение которых отличалось от нормального). Статистически значимыми считали различия при достижении уровня значимости $p < 0,05$.

Результаты на графиках представлены в виде, соответствующем типу распределения данных. Для параметрических данных указывали среднее арифметическое \pm стандартное отклонение. Для непараметрических данных приводили медиану \pm межквартильный размах в формате: медиана [25-й процентиль; 75-й процентиль].

Также использовали диаграммы типа «ящик с усами». На таких диаграммах границы прямоугольника («ящика») соответствуют первому (25-й процентиль) и третьему (75-й процентиль) квартилям; горизонтальная линия внутри ящика обозначает медиану (50-й процентиль). «Усы» (вертикальные линии) простираются от краёв ящика до минимального и максимального значений. Отдельные точки за пределами усов отображены как потенциальные выбросы.

ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ

3.1. Структура и физико-механические свойства микрокапсул «альгинат-ПМЭТАХ-альгинат»

Для разработки эффективной системы иммуноизоляции ОЛ ключевым этапом являлся подбор оптимальной концентрации катионного полимера ПМЭТАХ. Создание оптимальной капсулы требует баланса между механической стабильностью, обеспечивающей целостность трансплантата *in vivo*, и селективной проницаемостью, необходимой для питания клеток и выхода инсулина при одновременном ограничении контакта иммунных факторов с инкапсулированными клетками. С этой целью был проведён сравнительный анализ серии микрокапсул, сформированных с использованием растворов ПМЭТАХ в диапазоне концентраций от 0,01% до 1,0%.

3.1.1. Проницаемость

Критическим параметром, определяющим эффективность микрокапсул как системы иммуноизоляции, является их селективная проницаемость. Мембрана капсулы должна обеспечивать свободную диффузию низкомолекулярных соединений, таких как глюкоза (180 Да) и инсулина (мономер/гексамер: 5,8/34,2 кДа), необходимых для метаболизма и функционирования инкапсулированных клеток. Одновременно создавая барьер для высокомолекулярных медиаторов иммунного ответа таких как иммуноглобулин G (IgG: 150 кДа), комплемент C1q (410 кДа), иммуноглобулин M (IgM: 910 кДа) [156].

Для количественной оценки данного параметра был применен *in vitro* тест с использованием флуоресцентно-меченых лектинов с известной молекулярной массой в качестве модельных молекул. В исследовании использовали следующие лектины: FITC-WGA (36 кДа), FITC-MAL-I (75 кДа), FITC-RCA-I (120 кДа) и FITC-SNA (150 кДа) (рисунок 5). Пороговому значению, выше которого микрокапсула

считалась проницаемой, соответствовало максимальному уровню фоновой флуоресценции, зарегистрированному в контрольных пустых микрокапсулах, и составило 5 сигналов/10 000 пикс².

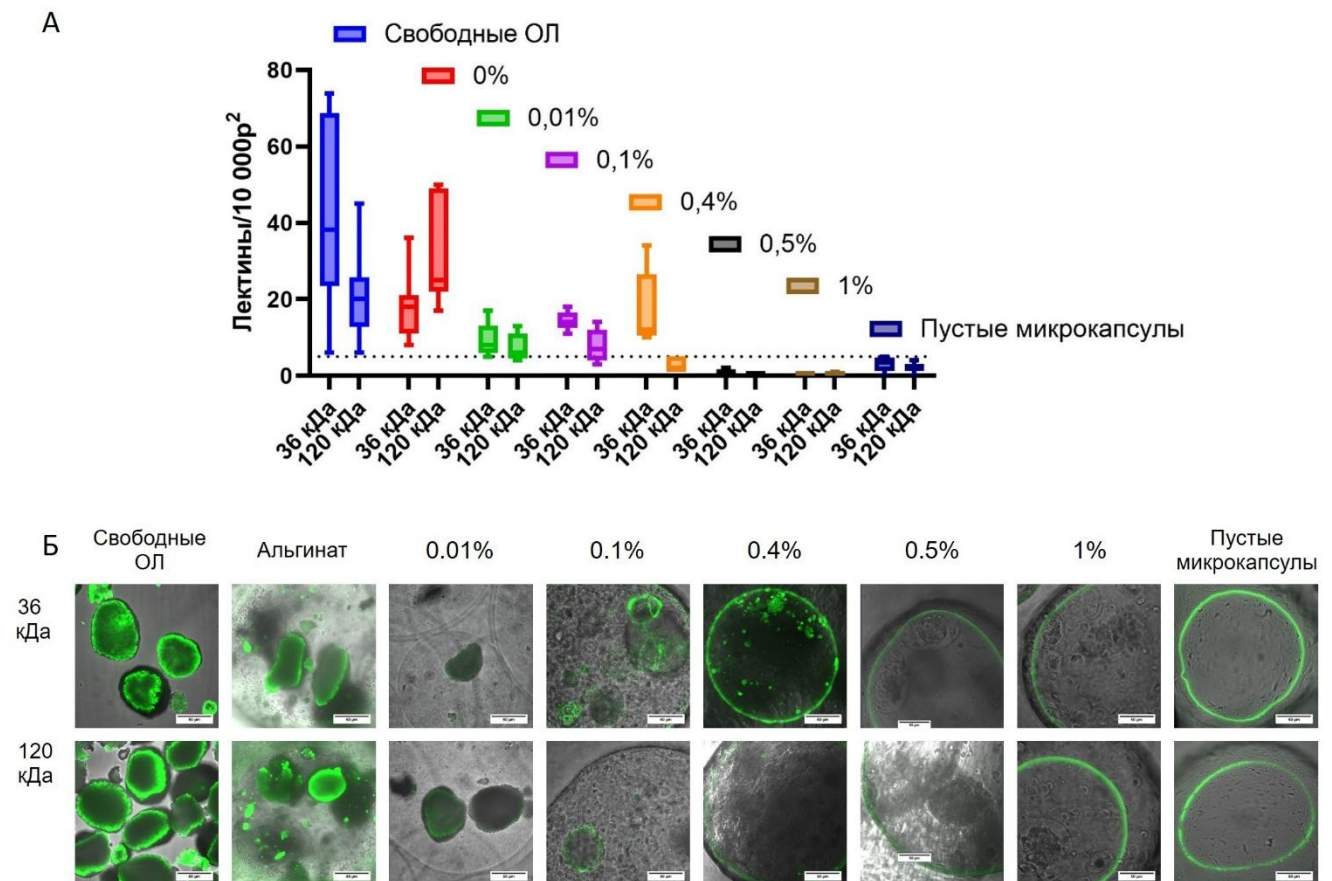


Рисунок 5 – Анализ селективной проницаемости микрокапсул «альгинат-ПМЭТАХ-альгинат» в зависимости от концентрации ПМЭТАХ. А – Количественная оценка проницаемости для FITC-меченых лектинов с молекулярной массой 36 кДа и 120 кДа. По оси ординат – количество флуоресцентных сигналов на 10 000 пикс². Пунктирная линия – порог фоновой флуоресценции (5 сигналов). Б – Визуализация пространственного распределения FITC-лектина (зеленая флуоресценция) внутри микрокапсулы. Лазерная сканирующая конфокальная микроскопия (ЛСКМ). Масштабная линейка, 50 мкм

В результате анализа была выявлена четкая зависимость проницаемости микрокапсул от концентрации полимерного покрытия ПМЭТАХ. Микрокапсулы, покрытые 1,0% и 0,5% раствором ПМЭТАХ, продемонстрировали непроницаемость даже для низкомолекулярного лектина FITC-WGA (36 кДа). Такие барьерные свойства делают данные варианты неподходящими для

инкапсуляции клеток, так как будет затруднена диффузия питательных веществ и секретируемого инсулина.

Напротив, непокрытые альгинатные микрокапсулы, а также капсулы с покрытием 0,01% и 0,1% ПМЭТАХ оказались проницаемыми для высокомолекулярного лектина FITC-RCA-I (120 кДа). Подобная степень проницаемости недостаточна для эффективной иммуноизоляции.

Оптимальные и селективные барьерные свойства были зафиксированы у микрокапсул, сформированных с использованием 0,4% раствора ПМЭТАХ. Данные капсулы сохраняли проницаемость для низкомолекулярных соединений (лектин 36 кДа), но становились полностью непроницаемыми для высокомолекулярных соединений (лектины 120 кДа и 150 кДа). Таким образом, установленный для данного типа капсул молекулярно-массовый порог отсечки (MWCО) составил менее 120 кДа, что теоретически позволяет обеспечить свободный транспорт инсулина (в форме мономера или гексамера, 5,8 - 34,2 кДа) и глюкозы (180 Да), блокируя при этом проникновение основных иммуноглобулинов и компонентов системы комплемента [156].

Следовательно, на основании комплексного анализа проницаемости, микрокапсулы «альгинат-ПМЭТАХ-альгинат» с концентрацией полимерного покрытия 0,4% представляют собой наиболее перспективный вариант, сочетающий необходимую для клеточного питания и гормональной секреции проницаемость с барьерной функцией, достаточной для иммуноизоляции [161].

3.1.2. Стабильность

Способность микрокапсул обеспечивать иммунозащиту напрямую зависит от их механической стабильности. Чтобы гарантировать выживаемость инкапсулированных ОЛ, капсулы должны обладать достаточной прочностью, чтобы противостоять механическим стрессам на всех этапах: от самой трансплантации до длительного пребывания в агрессивном микроокружении реципиента.

3.1.2.1. Механическая стабильность при осмотическом стрессе

Тест на осмотическую стабильность представляет собой стандартный метод оценки микрокапсул. Суть его заключается в воздействии гипотоническим раствором, который вызывает растяжение оболочки. Возникающее при этом объёмное растяжение служит удобной моделью механической нагрузки и позволяет выявлять даже скрытые дефекты материала.

Несмотря на то, что в организме нет резких осмотических скачков, тест сохраняет свою практическую ценность. В работе Van Raamsdonk и Chang (2001) была проведена его валидация и подтверждена прогностическая значимость. Авторы показали прямую корреляцию: капсулы, более устойчивые к осмотическому стрессу *in vitro*, после имплантации *in vivo* выживали значительно дольше по сравнению с менее стабильными аналогами [178]. Кроме того, установлено, что данный тест позволяет оценить вязкоупругие свойства капсул, такие как эластичность и склонность к пластической деформации [162].

Анализ поведения капсул в осмотическом тесте опирается на реологические модели, одной из наиболее подходящих считается модель Бюргерса [162]. Эта модель разделяет общую деформацию на три составляющие, каждая из которых соответствует определённой фазе эксперимента:

Первая – упругая деформация. Она наблюдается в виде набухания после помещения капсул в гипотоническую среду и связана с растяжением полимерной сети.

Вторая – упругое восстановление. Его измеряют после снятия нагрузки; этот параметр характеризует способность материала обратимо возвращать запасённую энергию.

Третья – остаточная вязкая деформация. Её определяют по долговременному отклонению от исходного размера; такая деформация возникает вследствие необратимого вязкого течения и структурной перестройки материала под нагрузкой.

Использование этой концептуальной схемы позволяет перейти от описания изменения диаметра к анализу фундаментальных реологических свойств оболочки.

При анализе капсул с покрытием ПМЭТАХ была выявлена зависимость их механореологического поведения от концентрации полимера (рисунок 6А). Рассмотрим полученные результаты последовательно (рисунок 6А).

Без покрытия (0% ПМЭТАХ). Альгинатные капсулы показали наибольшую амплитуду деформации: под действием гипотонического стресса их диаметр увеличился в среднем на 21% (с ~465 до ~563 мкм). После 15-минутного восстановления в изотонической среде остаточная деформация составила около 10% (диаметр ~511 мкм против исходных ~465 мкм). Такое поведение характерно для вязкоупругой жидкости с выраженным пластическим течением.

Концентрация 0,01% ПМЭТАХ. В этом случае также наблюдается заметное набухание – прирост диаметра составил около 10% от исходного размера. Остаточная деформация через 15 минут достигла примерно 5%. Однако долгосрочный мониторинг выявил критическую слабость: к 48 часам средний диаметр капсул снизился ниже исходного уровня, что свидетельствует о дезинтеграции тонкой оболочки.

Концентрация 0,1% ПМЭТАХ. Здесь получены лучшие результаты. Капсулы продемонстрировали высокую упругость: набухание под осмотическим стрессом составило лишь около 4%, а полное восстановление исходного размера произошло в течение 15 минут (отклонение ~0,3%).

Концентрация 0,4% ПМЭТАХ. Данные капсулы показали отличную стабильность: их диаметр практически не изменился под действием гипотонического стресса (изменение ~0,2%), а упругое восстановление было мгновенным и полным. Такое поведение свойственно упругому твёрдому телу и подтверждает, что формируется эффективный каркас, подавляющий как набухание, так и пластическую деформацию ионной матрицы.

Концентрация 1% ПМЭТАХ. Капсулы с этим покрытием продемонстрировали устойчивость к набуханию, сходную с образцами 0,4%, что дополнительно подтверждает роль полимерной сети в ограничении объёмной деформации.

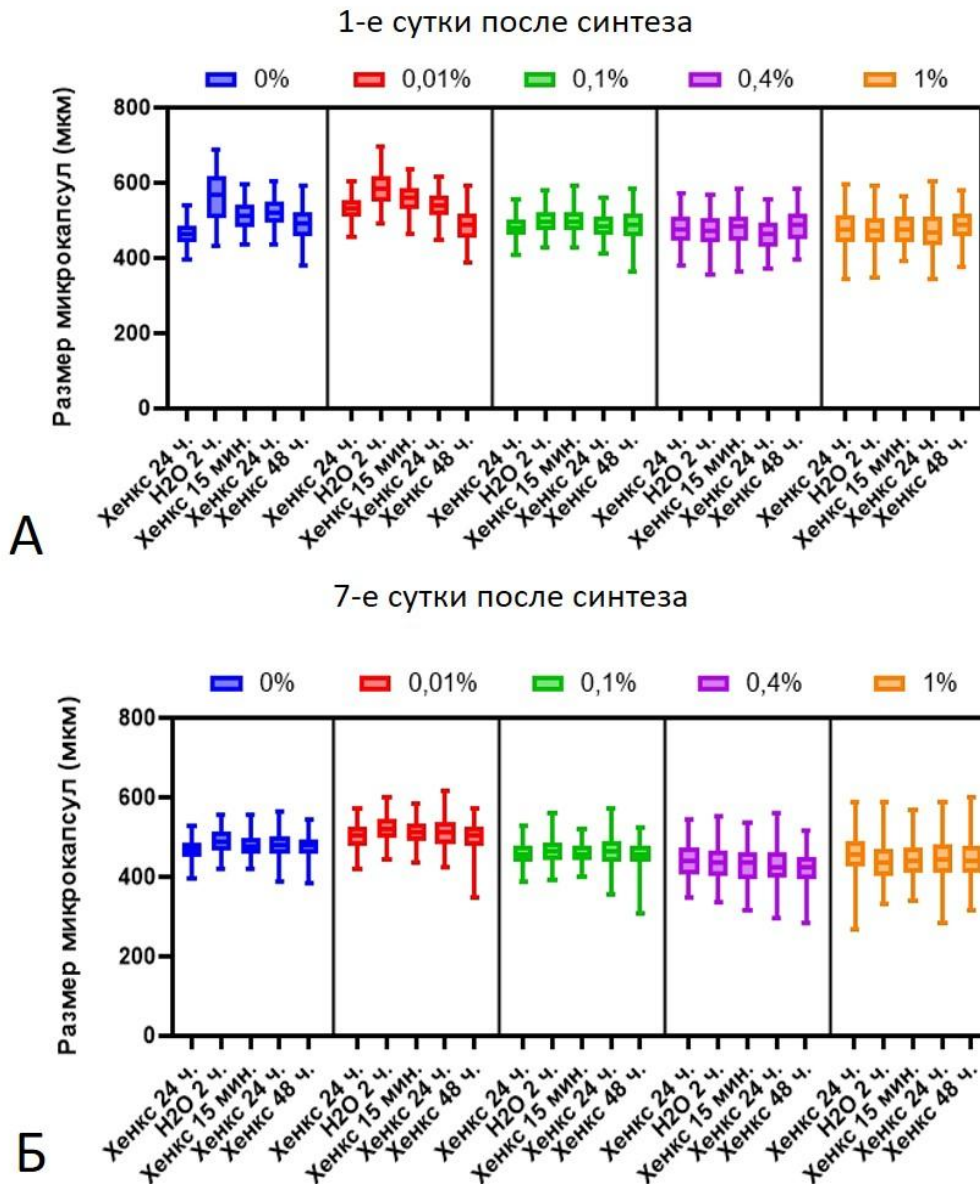


Рисунок 6 – Оценка осмотической стабильности микрокапсул «альгинат-ПМЭТАХ-альгинат» с разной концентрацией полимера. А – Изменение диаметра микрокапсул в ходе осмотического стресс-теста, проведённого на 1-е сутки после их синтеза. Б – Результаты аналогичного теста, проведённого на 7-е сутки после синтеза. По оси ординат отмечен диаметр микрокапсул (мкм). Диаграммы иллюстрируют распределение данных на ключевых этапах теста: инкубация в изотонической среде (Хенкс 24 ч), набухание в гипотонической среде (H₂O 2ч) и последующее восстановление в изотонической среде через 15 мин, 24 ч и 48 ч соответственно

Дополнительно было проведено тестирование на 7-е сутки после синтеза микрокапсул, оно позволяет оценить долговременную стабильность материала (рисунок 6Б). Интересно, что в результате все микрокапсулы продемонстрировали улучшенные механические свойства при тестировании через 7 дней. Это повышение эластичности было отмечено ранее и может быть связано со спонтанными, термодинамически выгодными перестройками цепей альгината или секвестрацией дополнительного кальция [162].

Таким образом, микрокапсулы, покрытые полимером ПМЭТАХ в концентрации более 0,1%, показали оптимальную осмостабильность: минимальное набухание под нагрузкой и полное эластическое восстановление, что говорит о пригодности их для дальнейшего тестирования.

3.1.2.2. Термостабильность

Одним из ключевых требований к микрокапсулам, предназначенным для трансплантации инсулинпродуцирующих клеток, является сохранение их структурной и функциональной целостности при длительном воздействии температур, соответствующих физиологическим условиям организма реципиента при 37°C и кратковременно до 40°C (рисунок 7). После синтеза при комнатной температуре (24°C) микрокапсулы инкубировали в различных температурных режимах в течение 7 суток для оценки их термической стабильности.

Непокрытые полимером альгинатные микрокапсулы (0% ПМЭТАХ) демонстрировали тенденцию к сохранению или незначительному изменению диаметра. В свою очередь, микрокапсулы с покрытием ПМЭТАХ проявили чёткую концентрационную зависимость изменения размеров.

Наибольшее относительное сокращение диаметра наблюдалось у микрокапсул с низкими концентрациями полимера. Так микрокапсулы, покрытые 0,01% ПМЭТАХ, продемонстрировали среднее отношение конечного диаметра к начальному: 37 °C, 0,91, $p = 0,0000$, 40 °C, 0,89, $p = 0,0000$. С увеличением концентрации полимера растёт стабильность. Микрокапсулы с самым плотным

покрытием (1% ПМЭТАХ) показали значительно меньшую усадку, среднее отношение конечного диаметра к начальному: 37 °С, 0,97, $p = 0,0000$, 40 °С, 0,95, $p = 0,0000$. Капсулы с 0,4% ПМЭТАХ продемонстрировали умеренное сокращение, подтвердив свою сбалансированность. Критически важным является вывод о том, что наблюдаемые сокращения размеров не приведут к качественному нарушению функциональных свойств микрокапсул.

Объяснение наблюдаемого изменения размеров, вероятно, следует искать в температурной зависимости вязкости альгината явлении, хорошо описанном в литературе. При нагревании вязкость альгинатного ядра снижается, что на начальном этапе вызывает его набухание [179]. Однако по мере последующей постепенной диффузии полимерных цепей через поры покрытия вся конструкция в конечном счёте даёт заметную усадку.

При нанесении тонкого полимерного слоя (концентрации 0,01% и 0,1% ПМЭТАХ) формируется оболочка лишь с ограниченной барьерной функцией. При плотном же покрытии создаётся барьер, способный блокировать выход альгината из объёма капсулы.

Предложенный механизм хорошо объясняет экспериментальные данные, в которых образцы демонстрировали принципиально разное поведение в зависимости от толщины и плотности полимерной оболочки.

Что касается термической стабильности, то микрокапсулы со всеми исследованными концентрациями ПМЭТАХ показали вполне удовлетворительные результаты.

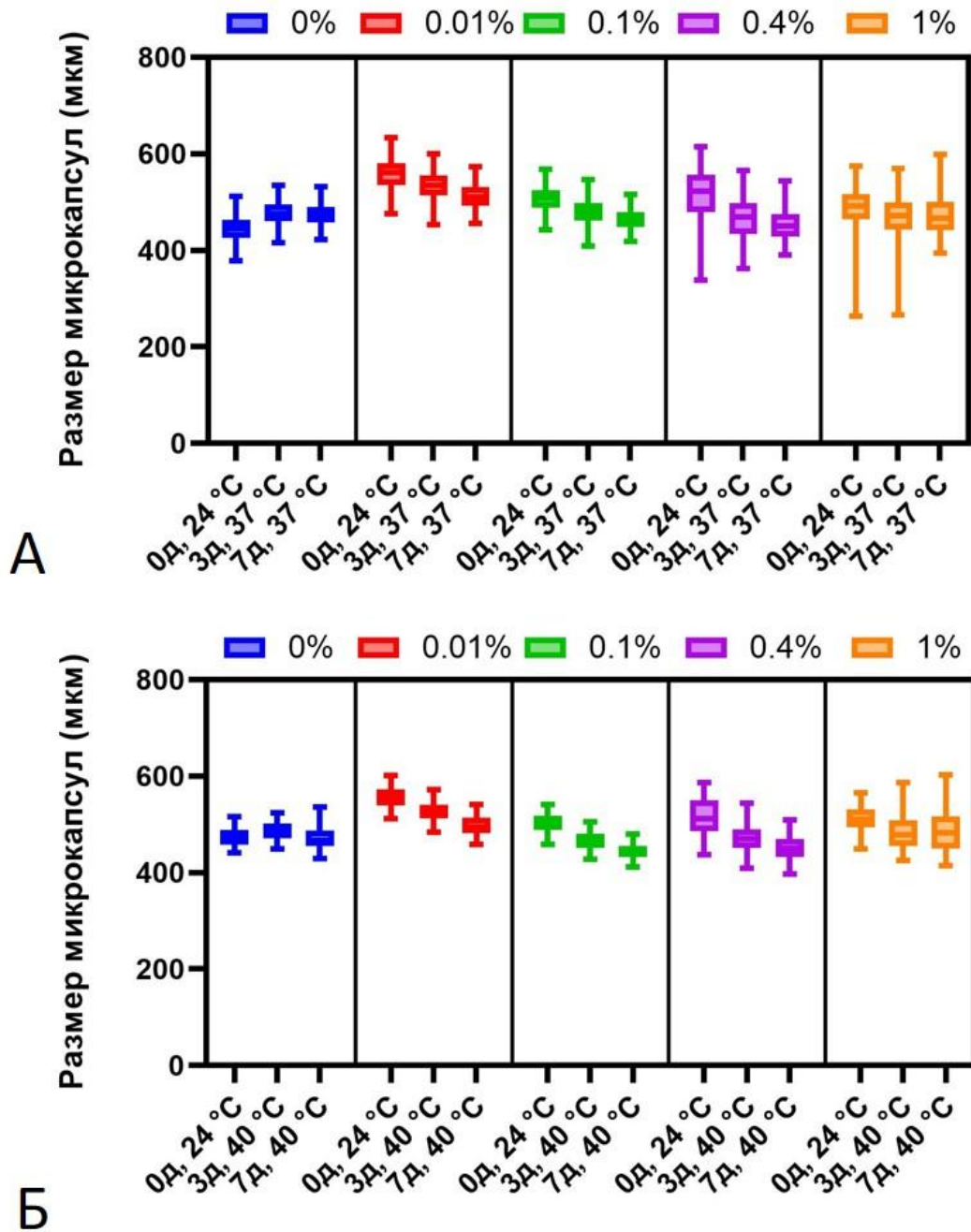


Рисунок 7 – Оценка термической стабильности микрокапсул «альгинат-ПМЭТАХ-альгинат». Анализ изменения диаметра капсул после 7 суток инкубации. А – при температуре 37°C. Б – при температуре 40°C. По оси ординат отмечен диаметр микрокапсул (мкм)

3.1.2.3. Стабильность в условиях культивирования клеток

Оценка стабильности микрокапсул в условиях, моделирующих среду культивирования клеток перед трансплантацией, представляет собой критически важный параметр, во многом определяющий технологическую пригодность. Помимо этого, указанный тест позволяет оценить реакцию микрокапсул на сложный состав питательных сред, содержащих соли, микроэлементы, витамины и белки.

В ходе экспериментов была выявлена тенденция, сходная с наблюдавшейся в тесте на термическую стабильность: диаметр всех типов капсул уменьшался. При этом установлена чёткая обратная зависимость между степенью усадки и концентрацией полимера в покрытии – чем выше содержание ПМЭТАХ, тем в меньшей степени изменялись размеры капсул (рисунок 8).

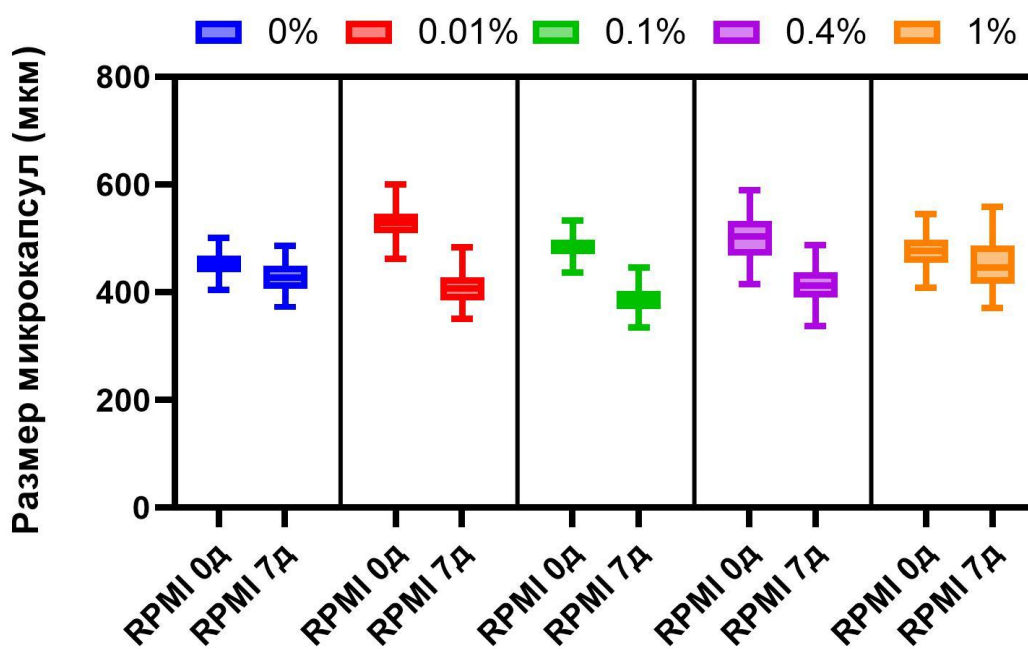


Рисунок 8 – Анализ стабильности микрокапсул «альгинат-ПМЭТАХ-альгинат» в условиях культивирования клеток. Оценка изменения диаметра капсул с различной концентрацией ПМЭТАХ после 7 суток инкубации в среде RPMI-1640. По оси ординат отмечен диаметр микрокапсул (мкм)

Наименьшую усадку продемонстрировали микрокапсулы с покрытием 1% ПМЭТАХ: среднее отношение конечного диаметра к начальному составило 0,937 ($p \leq 0,001$). Оптимальные по проницаемости капсулы с 0,4% ПМЭТАХ также показали высокую стабильность – среднее отношение конечного диаметра к начальному достигло 0,821 ($p \leq 0,001$). Данный факт подтверждает их пригодность для длительного поддержания в культуральных условиях. В противоположность этому, образцы с низкими концентрациями полимера (0,1% и 0,01%) подверглись значительно более выраженной усадке.

Важным выводом является то, что наблюдаемое изменение размеров носило умеренный характер. Не наблюдалось разрушения или изначальной деформации микрокапсул. Таким образом, все протестированные микрокапсулы сохраняют структурную целостность и функциональную пригодность в стандартных условиях клеточного культивирования, что является обязательным требованием для их последующего использования.

3.1.2.4. Стабильность при многократном воздействии физиологического раствора

Важным критерием механической прочности разработанных микрокапсул является их устойчивость к многократному промыванию изотоническим раствором хлорида натрия. Данный тест моделирует потенциальное долговременное воздействие ионных компонентов биологических жидкостей *in vivo*, способных вызывать дестабилизацию альгинатной матрицы. Дестабилизирующий механизм основан на ионном обмене: в альгинатных гелях, сшитых двухвалентными катионами, такими как барий (Ba^{2+}), моновалентные ионы натрия (Na^+) из физиологического раствора могут замещать сшивающие ионы в полимерной сети. Этот процесс обратим и приводит к снижению степени поперечной сшивки, увеличению набухания и, в конечном итоге, к растворению геля. Устойчивость к этому процессу определяется прочностью ионных связей и наличием защитного барьера [180].

В результате выявлена зависимость механической стабильности капсул от концентрации полимерного покрытия (рисунок 9). Контрольные альгинатные микрокапсулы без покрытия (0% ПМЭТАХ) показали низкую устойчивость: уже после пятого цикла промывки фиксировалось их значительное набухание, а к двадцатому циклу наступало полное растворение

У образцов с минимальным покрытием (0,01% ПМЭТАХ) характеристики оказались улучшенными, однако всё ещё недостаточными. После шестой промывки целостность оболочки нарушалась, что сопровождалось резким уменьшением объёма. Такое поведение, по-видимому, связано с тем, что тонкий слой полимера лишь замедляет ионный обмен и сопутствующее набухание, но не способен предотвратить их полностью.

Значительное повышение стабильности зафиксировано у капсул с концентрацией ПМЭТАХ 0,4% и 1%. Микрокапсулы, обработанные 0,4% раствором полимера, сохраняли около 70% исходного объёма даже после ста циклов промывки. Наиболее стабильными оказались образцы с 1% покрытием – их внешний вид практически не менялся, а конечный объём после ста промывок составлял приблизительно 80% от начального. В данном случае плотное полимерное покрытие выполняет роль эффективного физико-химического барьера, который значительно затрудняет доступ ионов натрия к сайтам сшивки и, соответственно, тормозит ионообменный процесс.

Таким образом, покрытие ПМЭТАХ эффективно стабилизирует альгинатные микрокапсулы, защищая их ядро от деструктивного ионного обмена с натрием. Устойчивость к промыванию напрямую зависит от концентрации полимера, определяющей плотность и толщину барьерной оболочки. Капсулы с покрытием 0,4% и 1% ПМЭТАХ демонстрируют необходимую механическую прочность для клинического применения и долговременной устойчивости в физиологической среде.

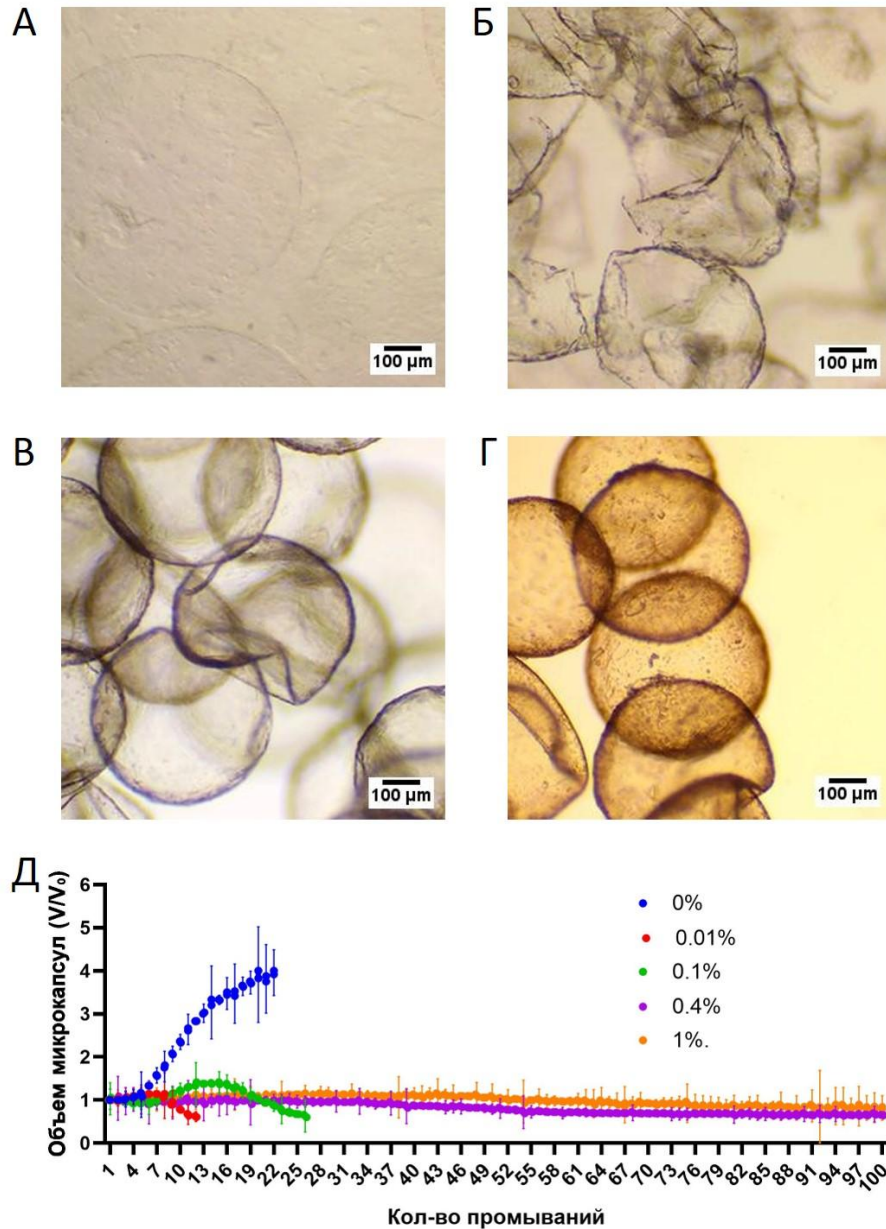


Рисунок 9 – Оценка устойчивости микрокапсул «альгинат-ПМЭТАХ-альгинат» к многократному промыванию физиологическим раствором. А - Г – Визуализация микрокапсул после серии промывок в зависимости от концентрации ПМЭТАХ: А (0,01%), Б (0,1%), В (0,4%), Г (1%). Световая микроскопия. Масштабная линейка, 100 мкм. Д – Количественный анализ изменения относительного объема (V/V_0) в зависимости от количества циклов промывки. Данные представлены как среднее арифметическое \pm стандартное отклонение

3.1.3. Выбор наиболее перспективной микрокапсулы для проведения дальнейших испытаний

Проведённый анализ физико-механических свойств альгинатных микрокапсул, модифицированных полимерным покрытием на основе ПМЭТАХ, позволил оценить ключевые параметры, определяющие их применимость и стабильность в физиологических условиях (Таблица 3). Была выявлена чёткая концентрационная зависимость: увеличение доли полимера в покрытии закономерно улучшало барьерные функции и структурную устойчивость капсул к различным видам нагрузок. Оптимальным для иммуноизоляции ОЛ выбран состав с 0,4% ПМЭТАХ, обеспечивающий необходимый баланс между селективной проницаемостью, осмотической и термической стабильностью, а также устойчивостью к ионному обмену в физиологической среде. Этот вариант является наиболее перспективным для проведения дальнейших доклинических испытаний [161].

Таблица 3 – Результаты тестирования микрокапсул с различной концентрацией ПМЭТАХ

Свойство \ Концентрация ПМЭТАХ	0% (контроль)	0,01%	0,1%	0,4%	1%
Селективная проницаемость	–	–	–	+	–
Осмотическая стабильность	–	–	+	+	+
Термическая стабильность	+	+	+	+	+
Стабильность в культуральной среде	+	+	+	+	+
Устойчивость к промыванию	–	–	–	+	+
Условные обозначения: + – тест пройден, свойство удовлетворительное; – – тест не пройден, свойство неудовлетворительное					

3.1.4. Ультраструктура

Исследование ультраструктуры микрокапсул «альгинат-ПМЭТАХ-альгинат» с использованием трансмиссионной электронной микроскопии подтвердило их многослойную организацию (рисунок 10). Эта структура аналогична наблюдаемой в классических альгинатных микрокапсулах, покрытых ПЛЛ, описанных в литературе. На микрофотографиях чётко визуализируется трёхслойная архитектура:

- внутренняя сердцевина: рыхлая, пористая структура из альгината.
- промежуточный слой: плотный, компактный слой ПМЭТАХ, который образуется за счёт электростатического взаимодействия между отрицательно заряженными карбоксильными группами альгината и положительно заряженными аминогруппами поликатиона. Этот слой является ключевым для обеспечения механической стабильности капсулы и контроля её проницаемости, выступая в роли основного барьера для диффузии молекул. Аналогичный эффект упрочнения и регулирования пористости описан для систем с ПЛЛ и хитозаном [181].
- внешний слой: тонкий наружный слой альгината, нанесённый поверх поликатионного покрытия. Этот слой нейтрализует избыточный положительный заряд поверхности, что улучшает биосовместимость системы и снижает неспецифические взаимодействия.

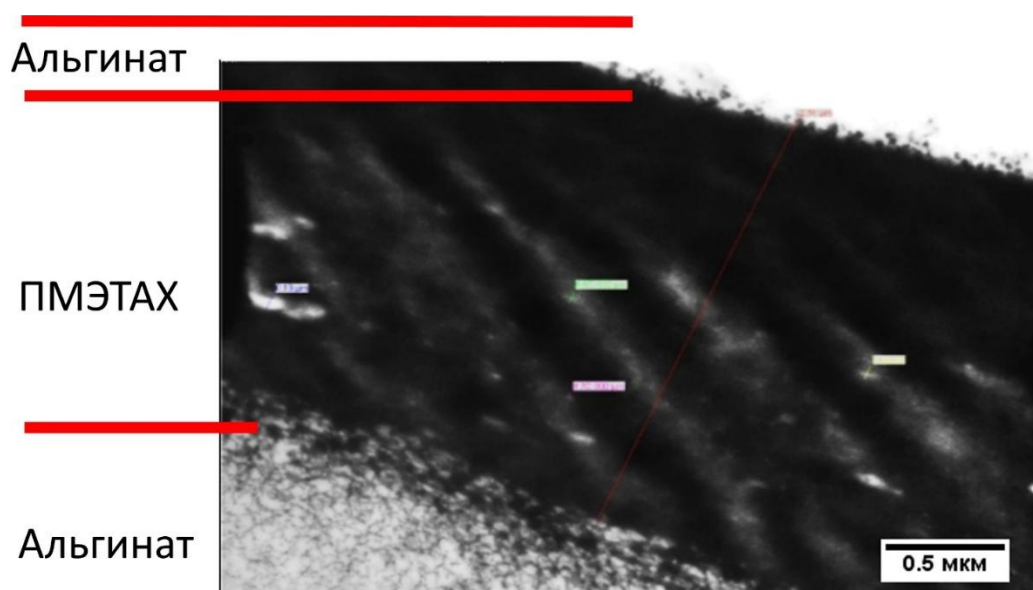


Рисунок 10 – Анализ ультраструктуры микрокапсулы «альгинат-ПМЭТАХ-альгинат». Визуализация трехслойной архитектуры на поперечном срезе оболочки: внутренний рыхлый слой альгинатного ядра, промежуточный плотный слой ПМЭТАХ и внешний тонкий слой альгината. Трансмиссионная электронная микроскопия (ТЭМ). Масштабная линейка, 0,5 мкм

3.2. Влияние инкапсуляции в микрокапсулы «альгинат-ПМЭТАХ-альгинат» на жизнеспособность и функциональную активность островков Лангерганса *in vitro*

Успешная реализация трансплантации инкапсулированных клеток зависит от качества и жизнеспособности исходного клеточного материала, а также от эффективности и воспроизводимости самой технологии инкапсуляции. В рамках данного исследования был разработан и оптимизирован протокол изоляции ОЛ из ПЖ крыс и кроликов. Параллельно была отработана методика микроинкапсуляции ОЛ, включающая определение оптимальных параметров для загрузки ОЛ в полимерную матрицу с целью обеспечения их равномерного распределения и максимальной сохранности. Ключевым этапом работы стала комплексная сравнительная оценка жизнеспособности и функциональной активности полученных ОЛ до и после процедуры инкапсуляции. Это позволило убедиться в том, что сама технология не оказывает цитотоксического воздействия и сохраняет биологическую полноценность клеток, что является обязательным условием для их

последующего успешного применения в экспериментах по оценке компенсации СД1.

3.2.1. Изоляция островков Лангерганса крыс и кроликов

Для выделения ОЛ грызунов были использованы крысы породы Wistar и кролики породы Серый Великан. Выделение выполнялось стандартным протоколом с авторскими модификациями. Эффективность выделения оценивали с учетом чистоты выделенных ОЛ, их жизнеспособности и функциональной активности, а также количества полученных ОЛ из одного животного [165–167].

Оценку чистоты выделенных ОЛ проводили с использованием окрашивания специфическим красителем дитизоном (окрашивание в красно-розовый цвет) (рисунок 11).

Разработанный протокол продемонстрировал высокую воспроизводимость и продуктивность. Выход ОЛ от одной крысы линии Wistar составил в среднем 400 ± 100 ОЛ, а от одного кролика породы Серый Великан 3000 ± 500 ОЛ [164].

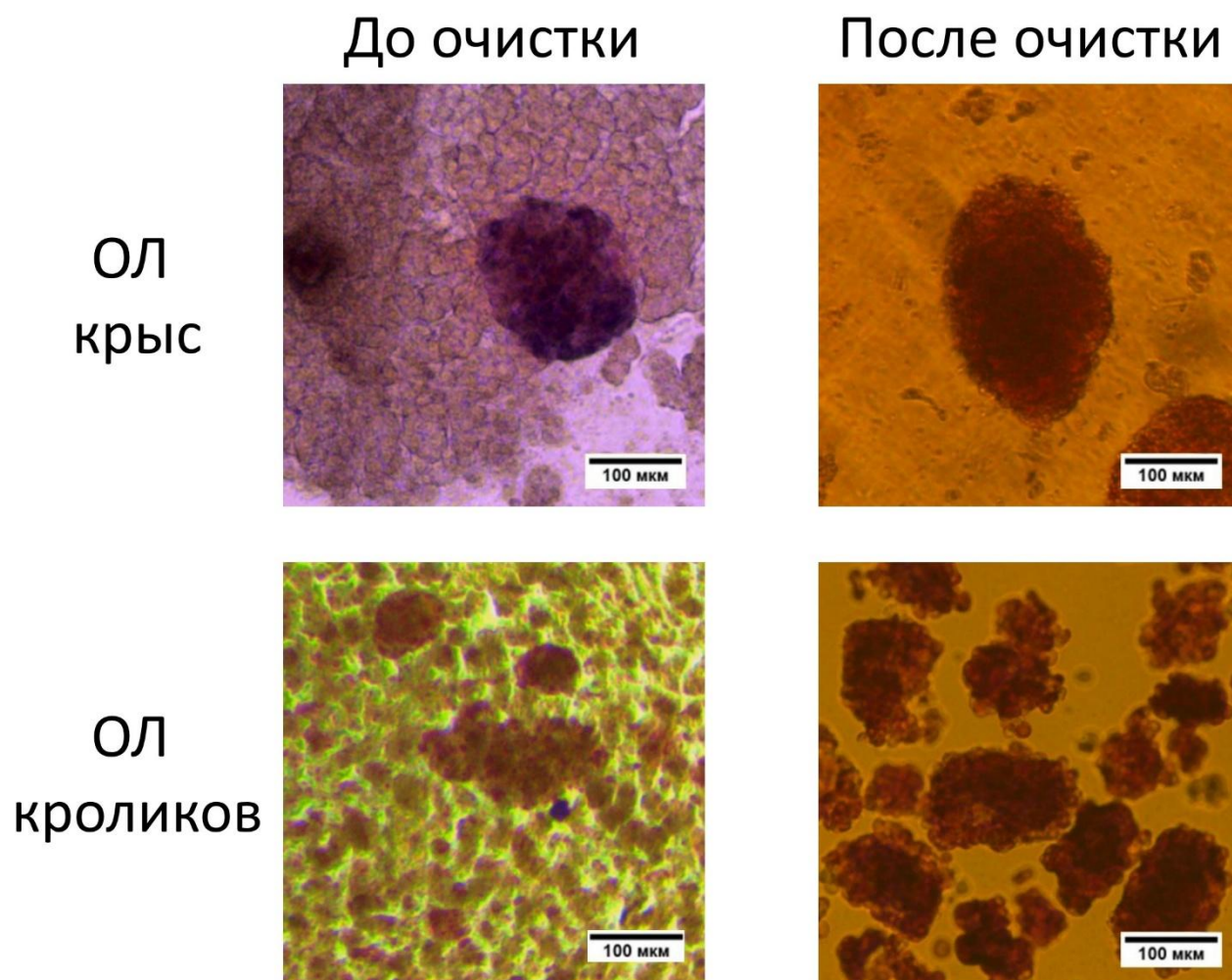


Рисунок 11 – Оценка принадлежности выделенных клеток к ОЛ. Окрашивание: дитизон. Краситель образует хелатный комплекс с ионами цинка в секреторных гранулах β -клеток, что проявляется в виде специфического красно-розового окрашивания. Световая микроскопия. Масштабная линейка, 100 мкм

3.2.2. Оптимизация концентрации островков Лангерганса для повышения эффективности инкапсуляции

Процесс инкапсуляции ОЛ включает несколько ключевых этапов. Сначала ОЛ суспендируют в альгинатном композите, который служит основой для формирования микрокапсул на микрофлюидной установке. Полученные микросферы последовательно покрываются полимерным слоем для повышения стабильности, а затем внешним слоем альгината для увеличения биосовместимости. Для оптимизации протокола была изучена зависимость между

начальной концентрацией ОЛ в альгинате (от 500 до 5000 ОЛ/мл) и количеством ОЛ, попадающих в отдельные микрокапсулы (рисунок 12).

При использовании концентрации 500 ОЛ/мл эффективность инкапсуляции была низкой: среднее количество ОЛ на капсулу составило $0,16 \pm 0,37$, медиана равнялась 0, что указывает на преобладание пустых микрокапсул и неэффективность протокола (рисунок 12А, Д).

Увеличение концентрации до 1000 ОЛ/мл привело к росту средней нагрузки до $1,13 \pm 0,99$ ОЛ на капсулу (медиана = 1) (рисунок 12Б, Д). Доля пустых капсул снизилась до 30%, а максимальная загрузка не превышала 4 ОЛ на микрокапсулу (1,5% от общего числа).

При концентрации 2000 ОЛ/мл среднее значение достигло $1,80 \pm 1,39$ ОЛ на капсулу (медиана = 2) (рисунок 12В, Д). Количество пустых капсул сократилось до 18%, а доля капсул с 4 и более ОЛ составила 8%.

Использование концентрации 5000 ОЛ/мл обеспечило максимальную среднюю нагрузку $2,68 \pm 1,49$ ОЛ на капсулу (медиана = 3) и снизило долю пустых капсул до 8%. Однако при этом наблюдалось увеличение доли капсул с высокой нагрузкой (до 8 ОЛ) (рисунок 12Г, Д). Высокая плотность ОЛ повышает риск попадания клеток на границу микрокапсулы, что может увеличить вероятность иммунного распознавания и негативно повлиять на метаболизм клеток.

Таким образом, оптимальный баланс между эффективностью загрузки, и биологической безопасностью обеспечивают концентрации от 1000 до 2000 ОЛ/мл.

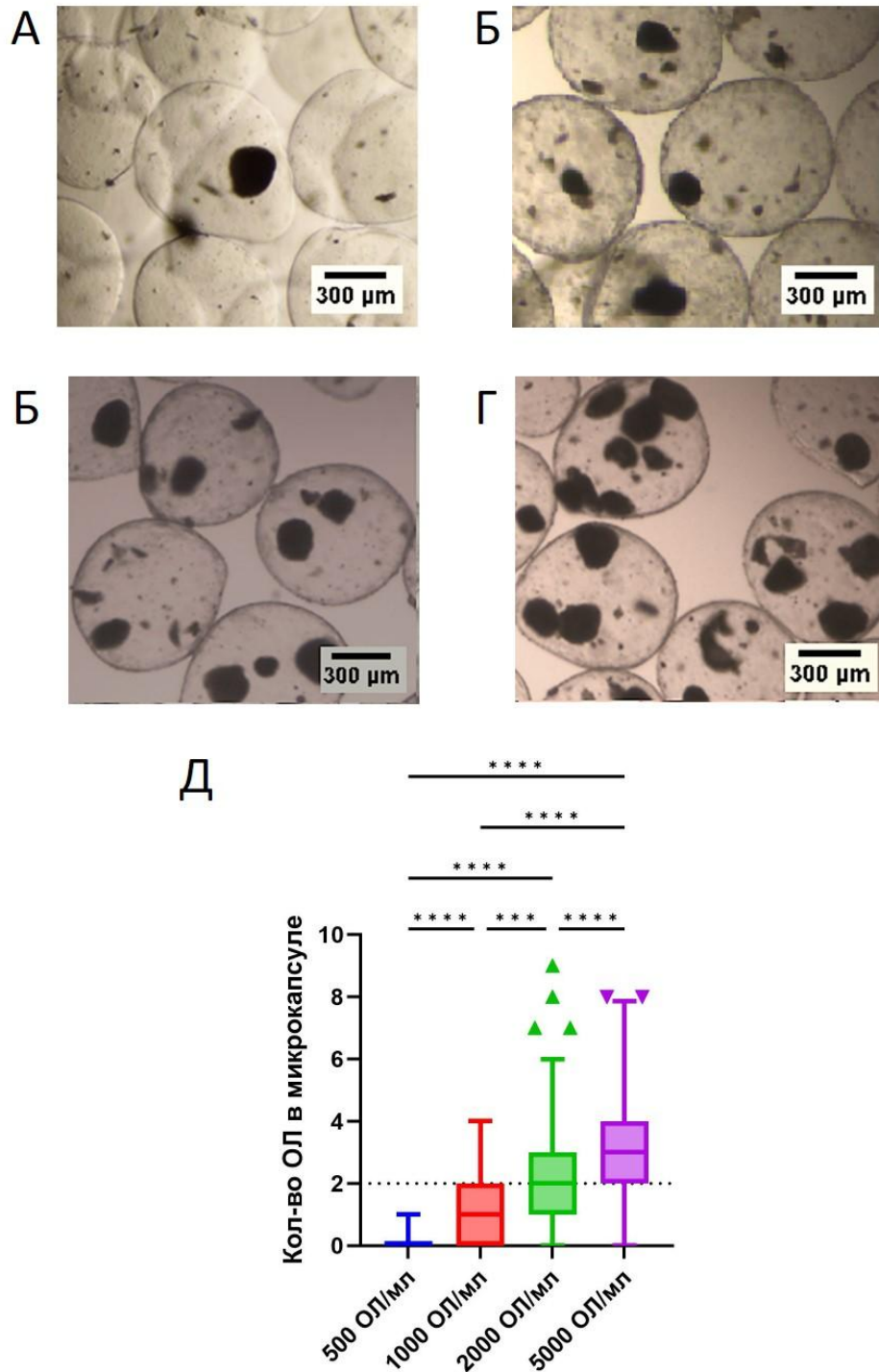


Рисунок 12 – Анализ распределения островков Лангерганса (ОЛ) в микрокапсулах «альгинат-ПМЭТАХ-альгинат». А – Г – Визуализация микрокапсул с разной исходной концентрацией ОЛ: А (500 ОЛ/мл), Б (1000 ОЛ/мл), В (2000 ОЛ/мл), Г (5000 ОЛ/мл). Световая микроскопия. Масштабная линейка, 300 мкм. Д – Количественная оценка доли капсул с соответствующим количеством ОЛ. * – $p < 0,05$; ** – $p < 0,01$; *** – $p < 0,001$; **** – $p < 0,0001$

3.3. Жизнеспособность и функциональная активность островков

Лангерганса до и после инкапсуляции

После выделения жизнеспособными остаются $91,7 \pm 7$ % клеток ОЛ крыс и $95,7 \pm 4$ % клеток ОЛ кроликов (рисунок 13). Результаты оценки жизнеспособности клеток ОЛ показали, что после инкапсуляции не было обнаружено статистически значимой разницы в количестве жизнеспособных клеток как в случае ОЛ крыс (после инкапсуляции $90,1 \pm 8$ %, $p = 0,59$), так и в случае ОЛ кроликов ($93,1 \pm 4$ %, $p = 0,07$).

Для определения функциональной активности был проведен ИФА анализ среды на наличие инсулина после суточной инкубации ОЛ до и после инкапсуляции в нагрузке 300 ОЛ/мл (рисунок 14). Также не было обнаружено статистически значимой разницы между неинкапсулированными ОЛ и инкапсулированными ОЛ крыс (46 ± 11 пг/мл и 41 ± 12 пг/мл, $p = 0,52$) и кроликов (50 ± 4 пг/мл и 48 ± 5 пг/мл, $p = 0,54$).

Таким образом, можно заключить, что ОЛ получают все необходимые им вещества, остаются жизнеспособными и синтезируют инсулин как до, так и после инкапсуляции [161,172].

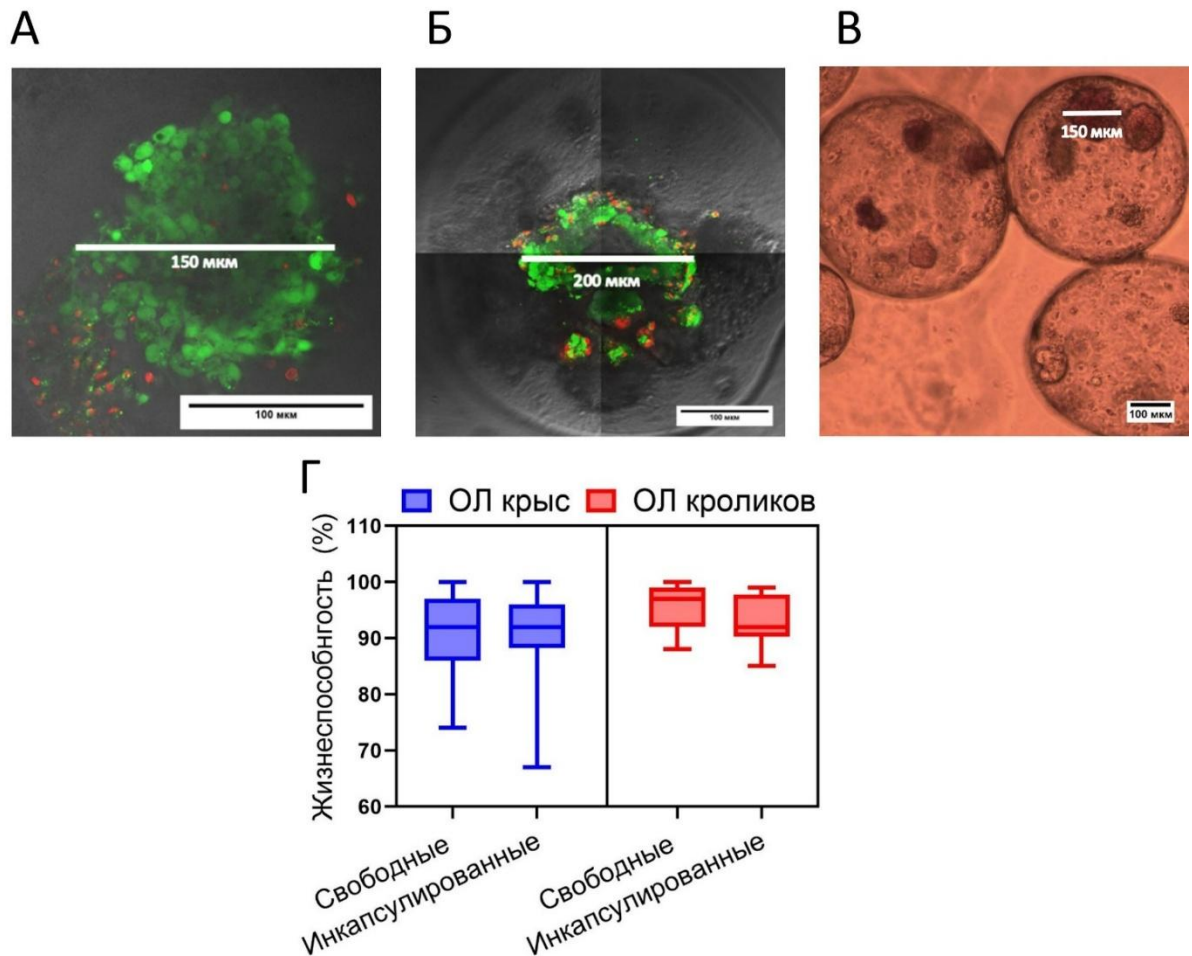


Рисунок 13 – Оценка жизнеспособности островков Лангерганса (ОЛ) до и после инкапсуляции в микрокапсулы «альгинат-ПМЭТАХ-альгинат». А, Б – Визуализация ОЛ, окрашенных набором Live/Dead: зеленый – живые клетки, красный – мертвые. А (свободные ОЛ), Б (инкапсулированные ОЛ). Лазерная сканирующая конфокальная микроскопия. Масштабная линейка: 100 мкм. В – Инкапсулированные ОЛ. Окрашивание: дитизон. Краситель образует хелатный комплекс с ионами цинка в секреторных гранулах β -клеток, что проявляется в виде специфического красно-розового окрашивания. Световая микроскопия. Масштабная линейка: 100 мкм. Г – Количественная оценка жизнеспособности. Статистически значимых различий между группами не выявлено ($p > 0,05$)

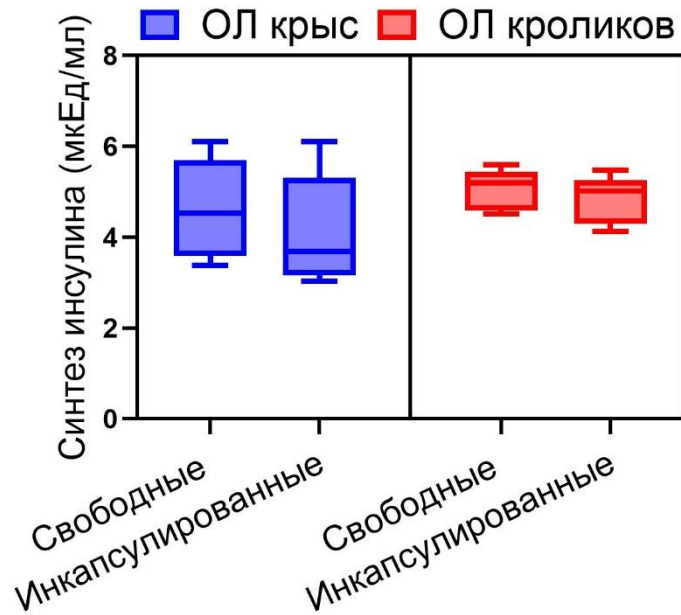


Рисунок 14 – Оценка функциональной активности островков Лангерганса (ОЛ) до и после инкапсуляции в микрокапсулы «альгинат-ПМЭТАХ-альгинат». Анализ базальной секреции инсулина через 24 часа культивирования методом иммуноферментного анализа (ИФА). Статистически значимых различий между свободными и инкапсулированными ОЛ не выявлено ($p > 0,05$)

3.4. Влияние микрокапсул «альгинат-ПМЭТАХ-альгинат» на компенсацию инсулин-дефицитных состояний при трансплантации островков Лангерганса в экспериментальных моделях диабета I типа у крыс *in vivo*

Переход от доказательства эффективности инкапсуляции *in vitro* к подтверждению терапевтической функции в живом организме является критическим этапом в разработке клеточных технологий. Для оценки способности инкапсулированных ОЛ обеспечивать долгосрочную коррекцию гипергликемии в условиях активного иммунного ответа реципиента было проведено исследование на стандартных экспериментальных моделях СД1.

3.4.1. Формирование диабета и подтверждение его стабильности

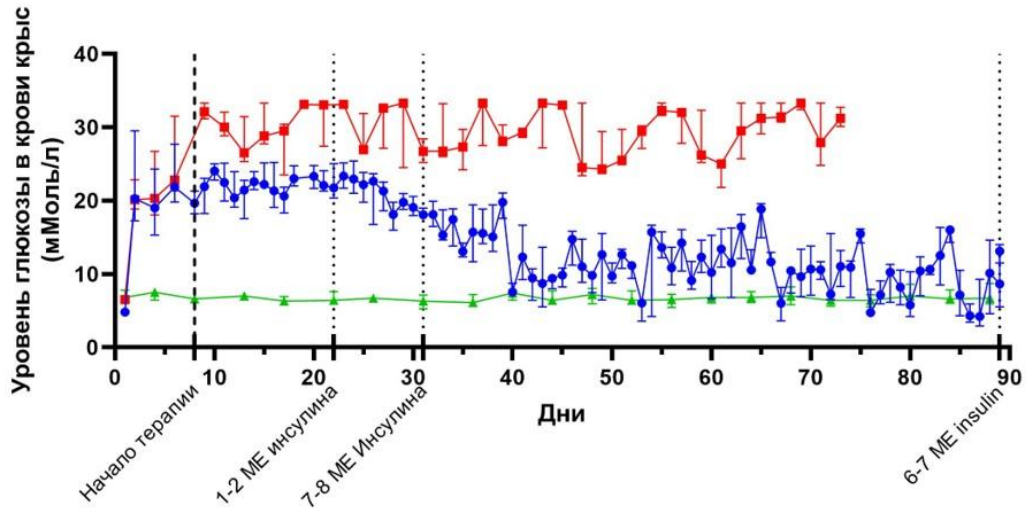
Для дальнейшего тестирования эффективности трансплантата инкапсулированных и неинкапсулированных ОЛ был разработан протокол экспериментального СТЗ-индуцированного СД1 у крыс [169,170,172]. Следует отметить, что, несмотря на широкое распространение данного подхода на грызунах, методология стрептозотоцин-индуцированного диабета успешно адаптирована и для крупных животных, в частности для свиней [182], что подтверждает универсальность и воспроизводимость данной модели в доклинических исследованиях различного масштаба.

Средний уровень глюкозы в крови нормальных животных составил $6,7 \pm 0,3$ ммоль/л, в то время как у крыс с СД1 при дозе СТЗ 65 мг/кг этот показатель составил $28,5 \pm 5,4$ ммоль/л, а при дозе СТЗ 45 мг/кг - $28,8 \pm 4,0$ ммоль/л на протяжении 3-х месяцев (рисунок 15).

Для доказательства стабильности СД1 при снятии глюкозотоксичности была разработана схема инсулинотерапии СД1. Крысам с СД1, индуцированным дозой 65 мг/кг стрептозотоцина, в первые 14 дней после формирования СД1 вводился инсулин в дозах 1 - 3 МЕ в день, при этом уровень глюкозы составил $21,9 \pm 4,9$ ммоль/л. Из-за высокой инсулинорезистентности у крыс доза инсулина была увеличена до 7 - 8 МЕ в день, средний уровень глюкозы составил $20,6 \pm 3,4$ ммоль/л, к 25 дню терапии уровень глюкозы снизился до $10,0 \pm 4,7$ ммоль/л. В дальнейшем, в зависимости от уровня гликемии, доза инсулина была изменена до 6 - 7 МЕ в день. Средний уровень глюкозы в течение 58 дней терапии составил $11,2 \pm 5,2$ ммоль/л. Таким образом, показано, что развитие СД1 при дозе 65 мг/кг характеризуется высоким уровнем глюкозы в крови, а значительная инсулинорезистентность крыс ограничивает контроль гликемии с помощью инсулина (рисунок 15). Для крыс с СД1, индуцированным дозой 45 мг/кг инсулинотерапия проводилась инсулином в дозах 6 - 8 МЕ в день (2 - 3 МЕ утром и 4 - 5 МЕ вечером). Уровень глюкозы крови на протяжении всей терапии составил $11,2 \pm 3,7$ ммоль/л.

— Норма — СТЗ-индуцированный диабет — СТЗ-индуцированный диабет + инсулинотерапия

А Доза СТЗ 65 мг/кг



Б Доза СТЗ 45 мг/кг

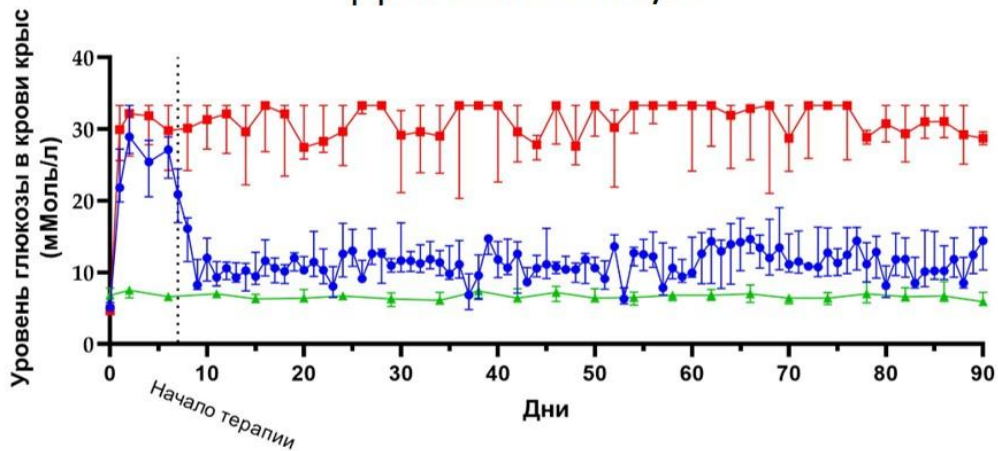


Рисунок 15 – Анализ динамики концентрации глюкозы в крови при экспериментальном сахарном диабете 1 типа. Оценка гликемии у экспериментальных животных: зеленая кривая – норма, красная кривая – СД1 без лечения, синяя кривая – СД1 с инсулинотерапией. А – дозировка СТЗ 65 мг/кг, Б – дозировка СТЗ 45 мг/кг. Данные представлены в виде медианы и квартилей 25–75

Для дальнейшего исследования была выбрана дозировка СТЗ 45 мг/кг, так как она обеспечивает более стабильный и контролируемый уровень глюкозы в крови по сравнению с инсулинотерапией СД1, индуцированного дозой 65 мг/кг.

ИГХ (иммуногистохимический) анализ показал, что у крыс с СД1 без лечения, а также при инсулинотерапии после применения дозировок СТЗ 65 мг/кг и 45 мг/кг восстановление β -клеток не происходило на протяжении всего эксперимента (рисунок 16). Это говорит о том, что снятие глюкозотоксичности не приводило к восстановлению эндокринной функции поджелудочной железы через 3 месяца. Снижение уровня глюкозы у животных с СД1 было связано исключительно с инсулинотерапией, а не с восстановлением собственных β -клеток.

Таким образом, при использовании дозировки 45 мг/кг СТЗ развивается СД1, который стабилен на протяжении трех месяцев как без лечения, так и при снятии глюкозотоксичности.

3.4.2. Определение оптимального места для трансплантации

На основе литературных данных были выбраны два места трансплантации: брюшина, как наиболее часто используемое, и сальник, как наиболее перспективный. Таким образом, 1000 микрокапсул были трансплантированы крысам в брюшину и сальник сроком на 1 неделю.

Для оценки степени интеграции микрокапсул с тканью хозяина был применен тест на вымывание, широко используемый в подобных исследованиях [138,176]. Этот тест показывает, насколько легко капсулы отделяются от окружающих тканей, и является косвенным показателем минимальной адгезии. Через неделю микрокапсулы вымывались, и оценивалось их количество.

Вымывание микрокапсул из брюшины было затруднено. Это связано с активным врастанием в окружающие ткани и сложностью точной визуализации места трансплантации. Напротив, из сальника удалось извлечь статистически большее количество микрокапсул ($p = 0,06$) (рисунок 17В). Данный факт позволяет предположить менее плотную интеграцию капсул с тканью сальника по сравнению с брюшиной.

При последующем анализе извлечённых капсул статистически значимых различий в степени их разрушения между двумя группами выявлено не было ($p = 0,8$; рисунок 17А). Качественная оценка адгезии также не показала явных различий между сальником и брюшиной (рисунок 17Б).

Резюмируя полученные данные, можно сказать, что микрокапсулы, трансплантированные в сальник, демонстрируют лучшую извлекаемость по сравнению с брюшной полостью при сопоставимой сохранности структуры. Основное практическое преимущество сальника заключается в технической простоте его повторной имплантации.

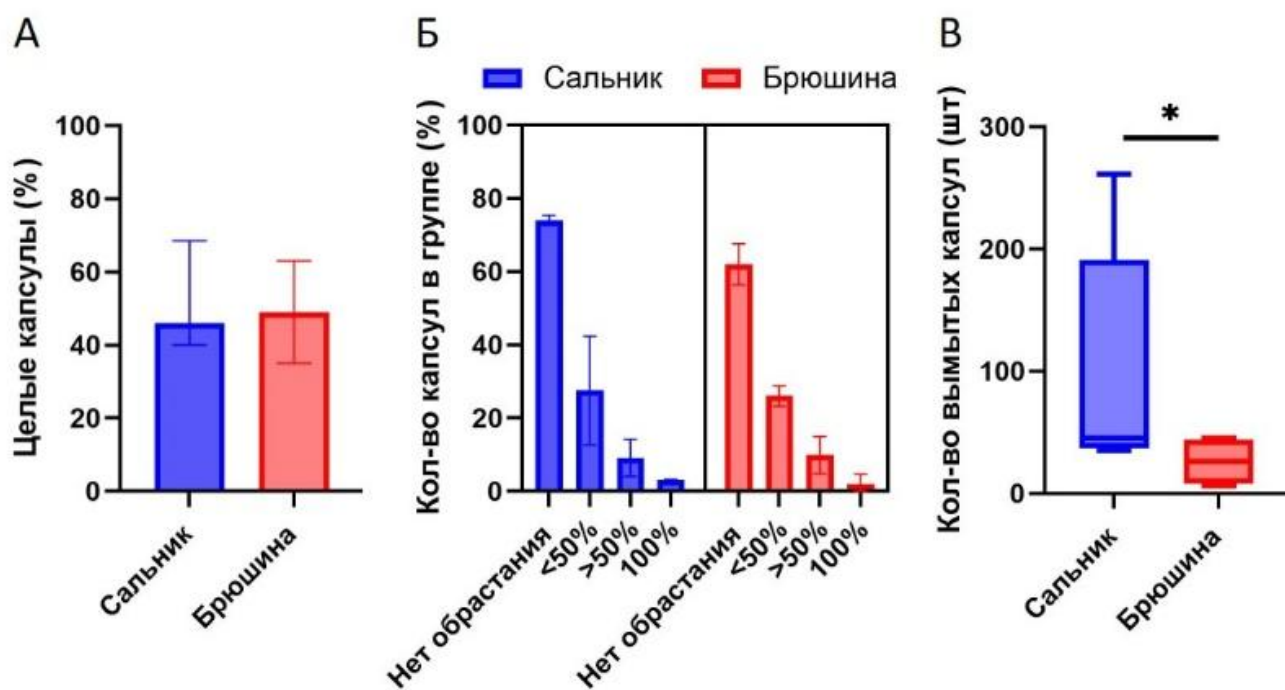


Рисунок 17 – Сравнительный анализ состояния микрокапсул «альгинат-ПМЭТАХ-альгинат» через 7 дней после трансплантации в брюшину и сальник. А – Уровень разрушения микрокапсул (медиана \pm квантили 25 – 75). Б – Уровень адгезии клеток к микрокапсулам (медиана \pm квантили 25 – 75). В – Количество извлеченных микрокапсул. Статистически значимое различие между указанными группами: * – $p < 0,05$

Несмотря на то, что тест на вымывание является полезным инструментом для оценки адгезии, современная парадигма в разработке биоматериалов сместилась от стремления к полной инертности к управлению иммунным ответом (рисунок 18). Ранние стратегии были направлены на предотвращение адгезии белков и активации иммунных клеток, однако сейчас считается, что более важна интеграция в ткани и контролируемая воспалительная реакция для минимизации последующего фиброзного разрастания, изолирующего трансплантат [183,184]. Поэтому для всесторонней оценки биосовместимости и тканевой интеграции наиболее показательным и информативным методом является гистологический анализ, позволяющий визуализировать формирующееся вокруг капсулы ткани.

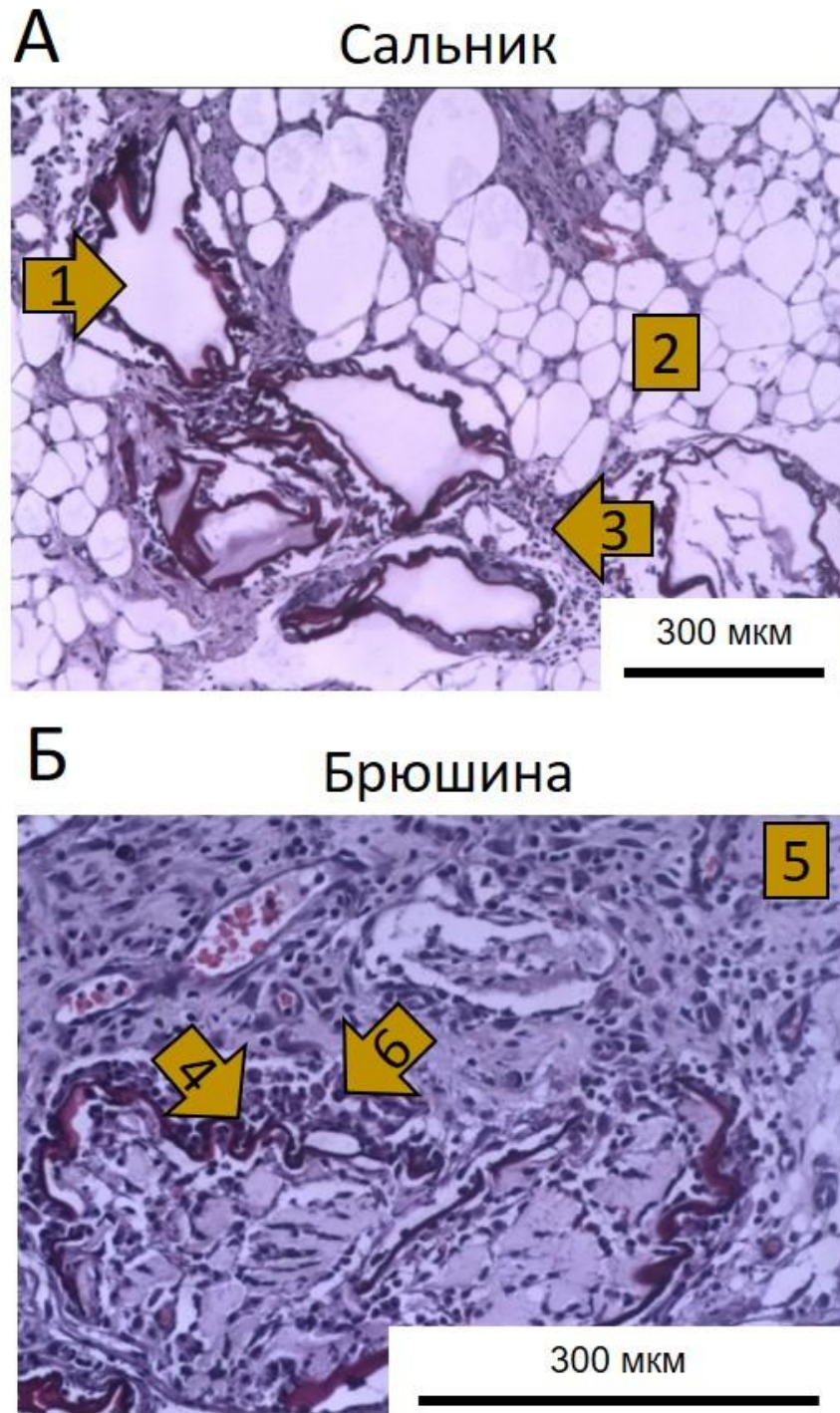


Рисунок 18 – Гистологический анализ тканевой реакции на трансплантацию пустых микрокапсул «альгинат-ПМЭТАХ-альгинат» на 7-е сутки. Визуализация срезов тканей в области трансплантации: А – сальник, Б – брюшина. Окраска: гематоксилин и эозин. Обозначения: 1 – сохранная микрокапсула, 2 – жировая ткань сальника, 3 – лимфоцитарная инфильтрация, 4 – разрушенная микрокапсула, 5 – соединительная ткань брюшины, 6 – воспалительная инфильтрация. Масштабная линейка: 300 мкм

Гистологический анализ выявил существенные различия в тканевой реакции (рисунок 18). В сальнике наблюдалась минимальная лимфоцитарная инфильтрация и частичное покрытие микрокапсул тонкими прослойками соединительной ткани. В брюшине же была отмечена выраженная воспалительная инфильтрация с лимфоцитами, плазматическими клетками и макрофагами, активное образование молодой соединительной ткани и потеря целостности микрокапсул. Таким образом, гистологическая картина однозначно свидетельствует о том, что в сальнике тканевая реакция протекает более благоприятно.

На основании полученных результатов для последующих исследований был выбран сальник как оптимальный участок, обеспечивающий лучшую извлекаемость микрокапсул и менее выраженную воспалительную реакцию. Более того, сальник – это хорошо васкуляризованная ткань, секретирующая факторы роста (CXCR4 (CXC-chemokine receptor type 4 (рецептор хемокина типа 4)), VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor (фактор роста эндотелия сосудов), SDF-1 (Stromal cell-Derived Factor 1 (фактор-1, происходящий из стромальных клеток)), которые способствуют выживанию и васкуляризации трансплантата [100,111]. Сальник подходит для трансплантации как инкапсулированных, так и свободных ОЛ, что подтверждается клиническими данными (NCT02213003).

3.4.3. Трансплантация инкапсулированных и свободных островков Лангерганса в сальник крысам с экспериментальным диабетом 1 типа

Оценка *in vivo* работоспособности инкапсулированных и свободных ОЛ кроликов проводилась на модели крыс с СД1 путем мониторинга динамики гликемии после трансплантации. Критерием работоспособности трансплантата считалось устойчивое снижение концентрации глюкозы в крови ниже порогового значения 27 мМ. Данный порог был выбран, поскольку он соответствовал состоянию выраженной гипергликемии, развившейся у контрольной группы животных с индуцированным СД1 без лечения.

Пересадка свободных ОЛ привела к снижению уровня глюкозы до $23,2 \pm 8,5$ мМ. Данный показатель был достоверно ниже, чем у животных без лечения ($p = 0,03$), что подтвердило гипогликемический эффект процедуры (рисунок 19). Однако продолжительность функционирования таких ксеногенных ОЛ была недолгой и не превышала семи суток. По истечении этого срока гликемия у всех животных возвращалась к значениям, превышающим 27 ммоль/л ($p = 0,17$), что свидетельствовало о прекращении активности трансплантированных клеток.

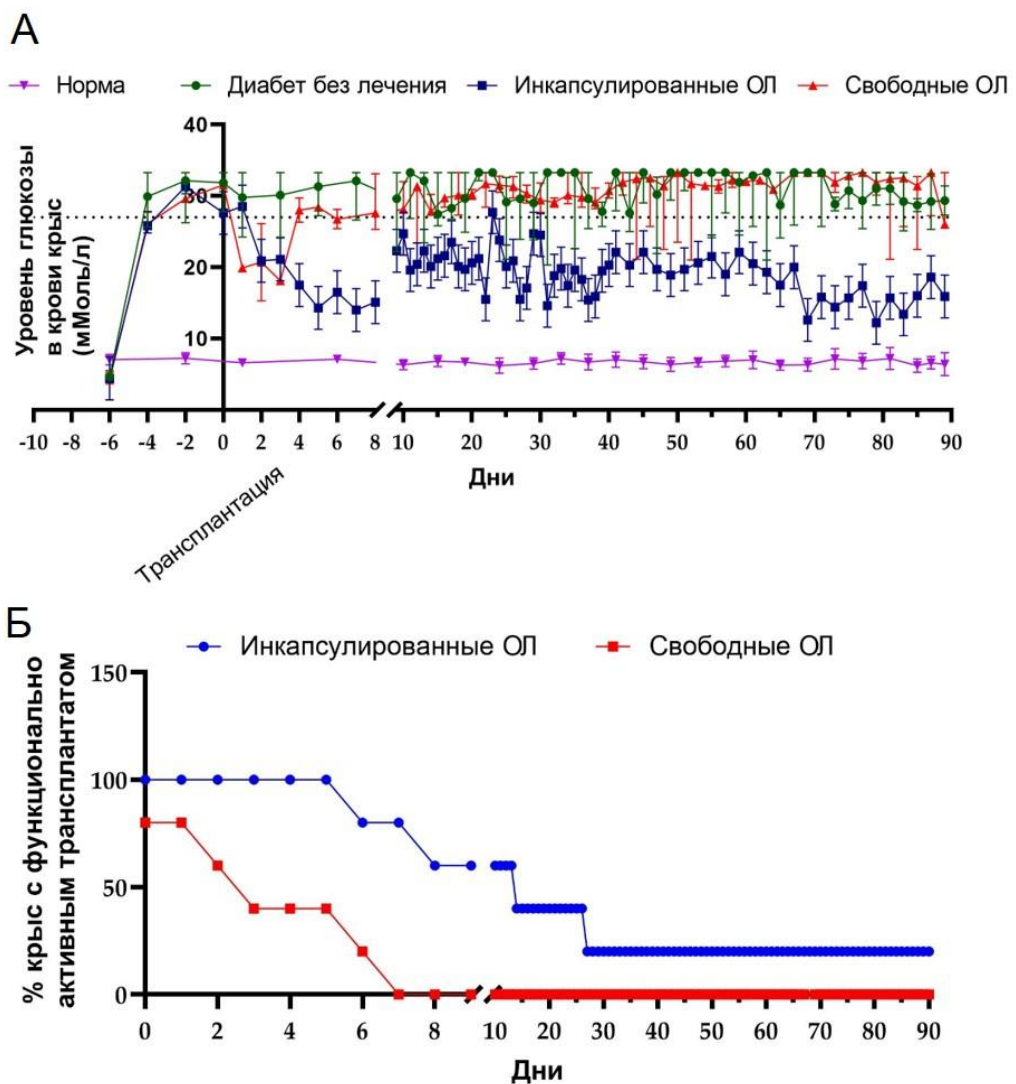


Рисунок 19 – Оценка компенсации экспериментального сахарного диабета 1 типа после трансплантации инкапсулированных и свободных ОЛ. А – Анализ динамики уровня глюкозы в крови (медиана и квартили 25 - 75). Б – Оценка продолжительности функционирования трансплантата. Критерий эффективности – снижение уровня глюкозы ниже порогового значения 27 мМ

Основной опытной группе животных трансплантировали инкапсулированные ОЛ. После трансплантации уровень их гликемии снизился до $23,5 \pm 4,3$ ммоль/л в начальные 72 часа, а в дальнейшем стабилизировался на отметке $19,3 \pm 4,4$ мМ, которая у 20% животных сохранялась на протяжении 90 дней. Таким образом, к концу исследования концентрация глюкозы в крови у этих животных была на треть ниже ($p < 0,0001$), чем у нелеченых крыс. Это указывало на длительное сохранение функций ОЛ.

Однако важно отметить, что динамика ответа была неоднородной: у более половины животных функция инкапсулированных ОЛ утрачивалась в течение первых двух недель. Тем не менее, у 20% крыс трансплантат оставался работоспособным все 90 дней. Полученные данные позволяют сделать вывод о способности микрокапсул продлевать жизнеспособность и функциональную активность ОЛ. Кроме того, учитывая, что для инкапсуляции применялись ксеногенные клетки, обычно провоцирующие иммунный ответ, результаты также подтверждают эффективность капсул в качестве барьера, защищающего трансплантат от атаки иммунной системы реципиента.

3.5. Биосовместимость микрокапсул «альгинат-ПМЭТАХ-альгинат» в экспериментальных моделях диабета I типа у крыс *in vivo*

Для оценки биосовместимости микрокапсул была проведена сравнительная оценка реакции тканей реципиента на трансплантацию свободных и инкапсулированных ОЛ. Анализ выполнялся после потери работоспособности трансплантата, за исключением группы с инкапсулированными ОЛ, исследованной через 3 месяца после трансплантации, которая выполнялась при сохранении активности трансплантата.

Через 2 недели после трансплантации микрокапсулы с ОЛ демонстрировали признаки интеграции в ткань сальника. Так, при попытке промывания тканей было извлечено крайне малое количество микрокапсул (в среднем 10 штук из одной крысы). При этом извлечённые микрокапсулы сохраняли целостность. Вокруг

части микрокапсул идентифицировались сосуда (рисунок 20). Свободные (неинкапсулированные) ОЛ идентифицировать не удалось.

Важно отметить, что несмотря на то, что традиционно считалось, что материал трансплантата должен быть максимально инертным и минимизировать взаимодействие с организмом хозяина, в современных подходах акцент смещается в сторону контролируемой интеграции. Новый подход отдаёт приоритет не изоляции биоматериала, а созданию совместимой среды, которая способствует формированию стабильных, функциональных отношений между трансплантатом и тканью реципиента [183,184]. Таким образом, плохая вымываемость капсул не является критическим показателем.

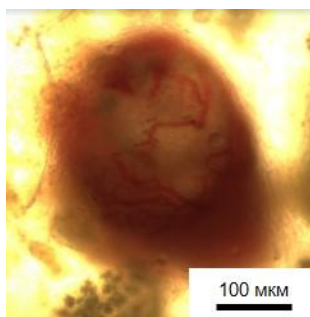


Рисунок 20 – Микрофотография области трансплантации микрокапсул «альгинат-ПМЭТАХ-альгинат» с инкапсулированными островками Лангерганса (ОЛ) в ткань сальника крысы через 2 недели после операции. Визуализируется процесс неоваскуляризации: формирование кровеносных сосудов в непосредственной близости от поверхности микрокапсулы. Световая микроскопия. Масштабная линейка, 100 мкм

Гистологический анализ тканей сальника через 2 недели после трансплантации свободных ОЛ показал развитие выраженной воспалительной реакции (рисунок 21А). В зоне трансплантации наблюдалась массивная лимфогистоцитарная инфильтрация, среди которой не удавалось идентифицировать клетки ОЛ. В случае инкапсулированных ОЛ воспалительный ответ был значительно менее выражен (рисунок 21Б). При этом 30 - 40% микрокапсул сохраняли структурную целостность, а в их полости визуализировались клетки ОЛ. Вокруг микрокапсул формировался слой молодой соединительной ткани, содержащей макрофаги (~47%), фибробласты (~28%),

лимфоциты (~22%), а также единичные гранулоциты и тучные клетки. Часть капсул, утративших целостность, была заполнена воспалительными клетками, а содержащиеся в них ОЛ подвергались дегенерации.

К концу первого месяца в области трансплантации свободных ОЛ отмечались умеренные остаточные признаки воспаления и активное формирование соединительной ткани (рисунок 21В). В центре зоны имплантации наблюдались многоядерные гигантские клетки. В группе с инкапсулированными ОЛ отмечались признаки прогрессирующей биодеградации полимерного материала капсул. Большинство микрокапсул теряли первоначальную структуру и целостность (рисунок 21Г). На поверхности 50 - 60% капсул выявлялись гигантские многоядерные клетки инородных тел. Воспалительный инфильтрат вокруг капсул характеризовался усилением макрофагальной реакции.

Через три месяца в области трансплантации свободных ОЛ формировалась характерная зона фиброза, при этом сохранные ОЛ отсутствовали. Толщина капсулы, представленной циркулярными пучками коллагеновых волокон, составила 153 ± 51 мкм (рисунок 21Д). Напротив, в области трансплантации инкапсулированных ОЛ, сохранивших функциональную активность, воспалительная реакция была минимальной. При этом толщина окружающего фиброзного слоя была достоверно меньше и составляла 45 ± 16 мкм, что примерно в 3,5 раза уступало показателю в группе свободных ОЛ (рисунок 21Е). Однако процесс биодеградации полимерного материала продолжался, о чём свидетельствовало наличие фрагментов капсул в цитоплазме макрофагов.

Несмотря на разрушение микрокапсул, внутри некоторых сохраняются скопления жизнеспособных ОЛ, что было подтверждено иммуногистохимическим окрашиванием на инсулин (рисунок 21Ж, 3).

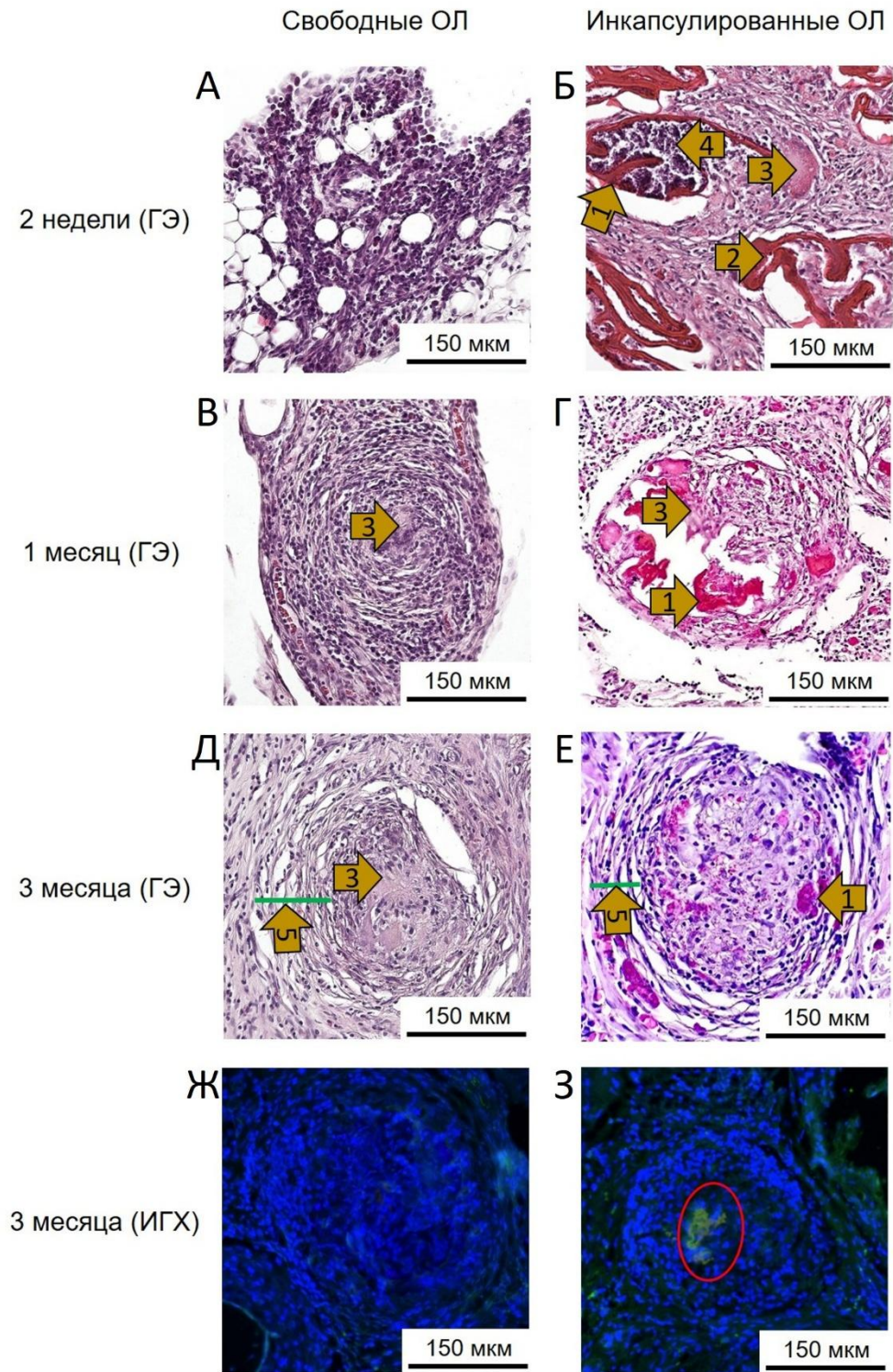


Рисунок 21 – Динамика тканевой реакции реципиента на трансплантацию инкапсулированных и свободных (неинкапсулированных) островков Лангерганса (ОЛ) в сальник на разных сроках. А - Е – Визуализация срезов тканей. Окраска: гематоксилин и эозин. Обозначения: 1 – полимерный материал микрокапсулы, 2 – целая микрокапсула с ОЛ, 3 – гигантские многоядерные клетки, 4 – погибшие ОЛ, 5 – фиброз (зеленой линией отмечена толщина обрастания). Масштабная линейка, 150 мкм. Ж, З – Иммуногистохимическое окрашивание на инсулин (зеленый сигнал), ядра докрашены DAPI (синий). Красный овал – клетки ОЛ. Лазерная сканирующая конфокальная микроскопия. Масштабная линейка, 150 мкм

Помимо иммуногистохимического окрашивания тканей сальника, для подтверждения долгосрочной жизнеспособности и функциональной активности трансплантированных инкапсулированных ОЛ был применён комплексный подход, включавший функциональные тесты, гистохимический анализ и оценку гликемического контроля (рисунок 22).

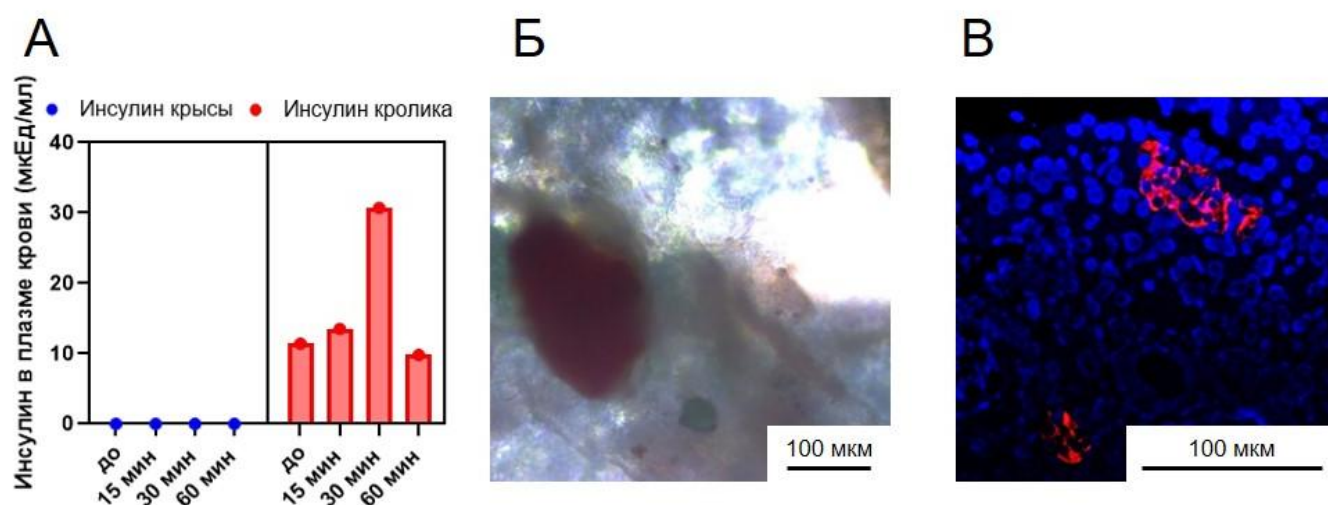


Рисунок 22 – Оценка долгосрочной функциональной активности и жизнеспособности ксеногенных островков Лангерганса (ОЛ) после трансплантации в микрокапсулах «альгинат-ПМЭТАХ-альгинат». А – Анализ динамики концентрации кроличьего и крысиного инсулина в крови крыс-реципиентов при проведении теста толерантности к глюкозе (ТТГ) через 3 месяца после трансплантации. Б – Визуализация жизнеспособных ОЛ в ткани сальника через 3 месяца после трансплантации. Окрашивание: дитизон. Краситель образует хелатный комплекс с ионами цинка в секреторных гранулах β -клеток, что проявляется в виде специфического красно-розового окрашивания. Световая микроскопия. Масштабная линейка, 100 мкм. В – Иммуногистохимический анализ среза поджелудочной железы крысы-реципиента: красный – глюкагон (α -клетки), зеленый – инсулин (β -клетки), синий – DAPI (ядра). Масштабная линейка, 100 мкм

Ключевым доказательством сохранённой физиологической функции инкапсулированных ксеногенных (кроличьих) ОЛ стали результаты теста толерантности к глюкозе (рисунок 22А). В крови крыс-реципиентов с экспериментальным СД1 после трансплантации детектировался исключительно инсулин кролика, в то время как эндогенный инсулин крысы отсутствовал. Более того через 30 минут после нагрузки глюкозой наблюдалось достоверное повышение уровня кроличьего инсулина с 11,4 до 30,7 мкЕд/мл, что указывает на сохранение трансплантатом способности к специфической, глюкозозависимой секреции гормона *in vivo*.

Прямым морфофункциональным подтверждением жизнеспособности ОЛ является окрашивание дитизоном, который селективно связывается с цинком инсулиновых гранул в β -клетках, в тканях сальника наблюдались участки с характерным красным окрашиванием (рисунок 22Б). Этот результат свидетельствует не только о присутствии трансплантированных ОЛ, но и о сохранении в них функциональной активности.

Также доказательством функциональности ОЛ стало снижение гликемии. Введение инкапсулированных ОЛ у 20% крыс привело к статистически значимому и продолжительному снижению уровня глюкозы в крови животных с СД1 на протяжении 90 дней наблюдения.

Таким образом, совокупность полученных данных доказывает, что разработанные микрокапсулы «альгинат-ПМЭТАХ-альгинат» обеспечивают иммуноизоляцию и создают условия для сохранения жизнеспособности и полноценной физиологической функции инкапсулированных ОЛ в долгосрочной перспективе *in vivo*. Сохранения активности трансплантата после деградации капсулы указывает на перспективность стратегий, комбинирующих физическую защиту с методами модуляции иммуногенности клеток.

ГЛАВА 4. ОБСУЖДЕНИЕ

4.1. Обоснование выбора материалов и стратегии инкапсуляции. Новизна подхода

Разработка эффективной системы иммуноизоляции ОЛ для клеточной терапии СД1 остается актуальной задачей регенеративной медицины. Основной целью является создание биосовместимого барьера, который обеспечивал бы долгосрочное выживание и функцию трансплантата, предотвращая его иммунное отторжение без необходимости системной иммуносупрессии [1]. Несмотря на десятилетия исследований, идеальная микрокапсула, сочетающая надежную иммунную защиту, оптимальную проницаемость для метаболитов и инсулина, высокую механическую стабильность *in vivo* и отсутствие провоспалительного и профибротического действия, до сих пор не создана [3,112]. Существующие подходы, такие как классические системы альгинат-поли-L-лизин-альгинат (АПА), сталкиваются с проблемами недостаточной прочности, иммунной реакции на инородное тело и последующего фиброзного обрастания, ведущего к гипоксии и гибели клеток [10]. Эти ограничения актуализируют необходимость поиска новых материалов и стратегий инкапсуляции.

В качестве основы для формирования ядра микрокапсул был выбран альгинат. Этот природный полисахарид является «золотым стандартом» в технологиях клеточной инкапсуляции благодаря уникальному сочетанию свойств: высокой биосовместимости, способности к мягкому ионно-опосредованному гелеобразованию в физиологических условиях, что минимизирует стресс для инкапсулируемых клеток, а также хорошей диффузионной проницаемости для кислорода, питательных веществ и низкомолекулярных гормонов, таких как инсулин [1,126,133,181]. Его относительно низкая стоимость и широко изученные свойства делают альгинат оптимальной платформой для нанесения новых функциональных покрытий, таких как слой ПМЭТАХ, целью которого является улучшение механической стабильности и иммуноизолирующей функции капсулы.

В данном исследовании был предложен подход, основанный на применении нового полимера. Выбор ПМЭТАХ был обоснован рядом его характеристик, описанных в литературе: структурное сходство с поли-L-лизинном, обеспечивающее возможность электростатического связывания с альгинатом, подтвержденная биосовместимость и отсутствие цитотоксичности, а также потенциал к снижению адгезии белков и клеток [11–13]. Ранее ПМЭТАХ использовался преимущественно в составе сложных сополимеров [15], однако его потенциал в качестве самостоятельного иммуноизолирующего покрытия для ОЛ изучен не был.

Принципиальная новизна нашего подхода заключается в следующем:

- пионерское применение ПМЭТАХ для инкапсуляции ОЛ. Впервые полимер ПМЭТАХ был использован в качестве основного и единственного поликатионного компонента для создания трехслойной иммуноизолирующей системы «альгинат-ПМЭТАХ-альгинат», предназначенной именно для трансплантации инсулин-продуцирующих клеток.

- разработка и оптимизация упрощенной системы. Предложенная архитектура капсулы целенаправленно упрощена по сравнению со сложными сополимерными композициями. Это снижает количество технологических переменных, что важно для воспроизводимости, стандартизации и потенциального масштабирования технологии.

Полученные данные формируют основу для дальнейших исследований, направленных на преодоление существующих ограничений клеточной терапии СД1 и приближающих создание клинически применимой технологии.

4.2. Ключевые эксплуатационные свойства микрокапсул «альгинат-ПМЭТАХ-альгинат»: селективная проницаемость и структурно-механическая стабильность

Функциональная эффективность иммуноизолирующих микрокапсул определяется двумя ключевыми параметрами: селективной проницаемостью и механической стабильностью. Капсула должна создавать надежный барьер для компонентов иммунной системы, оставаясь при этом проницаемой для низкомолекулярных метаболитов, кислорода и секретируемых гормонов, например инсулина. Согласно имеющимся данным, барьерные свойства капсулы зависят от ряда факторов. К ним относятся условия синтеза, молекулярные характеристики компонентов, а также параметры нанесения поликатионного слоя (его концентрация и время экспозиции) [185]. Для традиционных полиаминокислот, в частности для поли-L-лизина, установлено, что концентрация около 0,02-0,05% является достаточной для формирования эффективного иммуноизолирующего барьера [6, 186].

В ходе исследования выявлена прямая зависимость между концентрацией полимера ПМЭТАХ в покрывающем растворе и молекулярно-массовым порогом отсечки (MWCO) формируемых альгинатных микрокапсул. Обработка раствором ПМЭТАХ с концентрацией 0,4% в течение 10 минут позволила получить капсулы с оптимальной селективностью. Такие капсулы сохраняют проницаемость для инсулина и одновременно блокируют диффузию молекул массой более 120 кДа, что соответствует ранее установленным критериям для эффективных иммуноизолирующих систем [111].

Наряду с проницаемостью важное значение имеет способность микрокапсул сохранять структурную целостность в условиях физиологического стресса, включая осмотическое давление и механические нагрузки. Для оценки этой способности используется тест на осмотический стресс. Основной причиной осмотического стресса служит перепад давления между внутренним альгинатным ядром и окружающими тканями, что создает механическую нагрузку на оболочку

капсулы. Дополнительное усугубление процесса связано с разжижением ядра, которое приводит к высвобождению несвязанных двухвалентных катионов и последующему набуханию капсулы [187]. Проведенная оценка осмотической стабильности показала, что микрокапсулы с покрытием 0,4% ПМЭТАХ при гипотоническом стрессе увеличивались в объеме не более чем на 20-30%, демонстрируя упругое восстановление. Эти результаты согласуются с данными других работ, где для стабильных капсул характерно изменение размера в аналогичных пределах [111]. Повышение концентрации ПМЭТАХ закономерно усиливало устойчивость капсул к деформации. Сравнительный анализ показал, что осмотическая стабильность исследованных капсул, усиленных ПМЭТАХ, сопоставима с характеристиками микрокапсул, укрепленных полиэтиленгликолем (система MicroMix), которые также продемонстрировали превосходство над чисто альгинатными аналогами [162].

Долговременная стабильность капсул в условиях *in vivo* также зависит от их реакции на температуру тела и среду культивирования. Наши эксперименты с пролонгированной инкубацией выявили умеренную усадку капсул при использовании ПМЭТАХ концентрацией менее 1%. Однако расчетные данные свидетельствуют, что это уменьшение диаметра не приводит к критическому сужению пор, и транспорт таких молекул, как инсулин и питательные вещества, остается неизменным. По совокупности механических свойств в тестах на длительное культивирование микрокапсулы с покрытием 0,4% ПМЭТАХ показали результаты, аналогичные капсулам на основе других современных полимеров, например систем PolyLN-Biodritin и LN-Biodritin [188].

Важным показателем устойчивости к биодegradации *in vivo* служит сопротивление ионному обмену, которое моделируется с помощью теста многократного промывания физиологическим раствором. Капсулы с покрытием из 0,4% ПМЭТАХ сохраняли форму и целостность. Изменение их размера было минимальным и составляло около 5%, что позволяет говорить о потенциальной долговременной стабильности таких конструкций после имплантации.

Полученные данные подтверждают общее правило: начальная прочность капсулы определяется свойствами альгинатного ядра, тогда как долгосрочная стабильность и барьерная функция зависят от характеристик полимерной оболочки [189]. Выявленная в работе закономерность, а именно повышение механической стабильности при увеличении концентрации полимера ценой снижения проницаемости, согласуется с данными, полученными для систем на основе поли-L-лизина. Для них также показано, что увеличение толщины покрытия ведёт к возрастанию механической прочности и одновременному снижению молекулярно-массового порога отсечки (MWCO) [190].

Таким образом, разработанные микрокапсулы типа «альгинат-ПМЭТАХ-альгинат» с концентрацией полимера 0,4% характеризуются сбалансированными физико-механическими свойствами. По ряду параметров они не уступают, а в некоторых случаях превосходят известные аналоги. Данные капсулы сочетают необходимую селективную проницаемость с высокой устойчивостью к осмотическому, термическому и механическому воздействию. Указанные особенности позволяют рассматривать их как перспективную основу для дальнейших доклинических исследований.

4.3. Оценка влияния инкапсуляции на жизнеспособность и функциональную активность

Одним из ключевых критериев оценки любого метода инкапсуляции является его влияние на жизнеспособность и функциональную активность инкапсулируемых клеток. Технологический процесс включает несколько этапов: суспендирование клеток в альгинате, формирование геля в растворе $BaCl_2$ и последующую обработку ПМЭТАХ. Каждый из этих этапов потенциально способен вызывать стресс у островковых клеток.

В ходе работы выполнено прямое сравнение жизнеспособности и секреции инсулина островками Лангерганса крыс и кроликов до и после инкапсуляции. Использовали два метода: флуоресцентный анализ с двойным окрашиванием

(Live/Dead) и иммуноферментное определение уровня инсулина в культуральной среде. Статистически значимых различий между инкапсулированными и свободными островками выявлено не было. Следовательно, разработанный протокол инкапсуляции, включая этап нанесения покрытия ПМЭТАХ, не оказывает выраженного цитотоксического или функционально-супрессивного действия на клетки.

Полученные результаты согласуются с данными других исследований. Например, показано, что инкапсуляция человеческих островков в альгинатные микрогранулы, сшитые ионами $\text{Ca}^{2+}/\text{Ba}^{2+}$, не снижала их жизнеспособность и глюкозостимулированную секрецию инсулина [191]. Более того, некоторые исследования демонстрируют возможность не только сохранения, но и улучшения функциональных свойств островков за счёт биоактивных модификаций капсулы. Так, включение мезенхимальных стромальных клеток (МСК) и RGD-трипептида в альгинатную матрицу повышало жизнеспособность островков почти на 30% и увеличивало их функциональную активность в два раза [192].

Важно отметить, что в сохранение жизнеспособности и функции ОЛ достигнуто в относительно простой системе, без дополнительных биоактивных компонентов. Это указывает на хорошую биосовместимость полимера ПМЭТАХ и соответствие диффузионных характеристик созданной микрокапсулы метаболическим потребностям инкапсулированных клеток. Таким образом, представленные результаты подтверждают, что разработанная система «альгинат-ПМЭТАХ-альгинат» удовлетворяет фундаментальному требованию для клеточных трансплантатов.

4.4. Обоснование и анализ методик для оценки влияния микрокапсул для компенсации инсулинодефицита *in vivo*

Для более точного анализа функциональной активности трансплантированных клеток мы подтверждали стабильность СТЗ-индуцированного СД1. В настоящее время такая модель диабета является наиболее

распространенной, так как она более простая и дешёвая, чем генетически модифицированные модели. Считается, что СТЗ, попадая в поджелудочную железу, избирательно накапливается в β -клетках через транспортер глюкозы GLUT2 (Glucose transporter type 2 (транспортер глюкозы 2 типа)). Перенос метильной группы от СТЗ к молекуле ДНК вызывает её повреждение и фрагментацию. Токсичность β -клеток также может возникнуть в результате действия активных форм кислорода. Наиболее часто используемой дозой СТЗ для крыс считается 65 мг/кг, однако встречаются и другие дозировки: от 40 до 65 мг/кг [193]. Мы начали с дозировки 65 мг/кг, однако из-за нестабильного уровня глюкозы в крови при инсулинотерапии, эксперимент был повторён на крысах с экспериментальным СД1 при использовании дозы СТЗ в 45 мг/кг. В результате именно эта дозировка была выбрана для дальнейшего тестирования капсул.

Для снятия глюкозотоксичности у крыс мы использовали инсулинотерапию большими дозами инсулина (6 - 8 МЕ/день). Если принять, что средний вес крысы составляет 230 грамм, то средняя доза инсулина на крысу составляет 24 МЕ/кг в день. Для сравнения, человеку с СД1обычно требуется 0,5 до 0,8 МЕ/кг в день. Однако другие исследователи также используют высокие дозы инсулина для компенсации СД1 у крыс. В работе Pinheiro et al. (2011) [194] сообщается, что лучшая суточная доза инсулина для крыс составляет 5 МЕ/день. Это связано с высокой инсулинорезистентностью крыс к инсулину свиней и человека. В исследовании Repper et al. (2009) [195] отмечается неспособность свиного (и человеческого) инсулина контролировать уровень глюкозы в крови у грызунов с СД1, поскольку для компенсации инсулинодефицита у грызунов требуется в 20 - 40 раз больше дозы свиного инсулина, чем для людей. Таким образом, использование таких высоких доз инсулина для грызунов оправдано.

Поскольку имеются данные, которые указывают на вероятность восстановления β -клеток при снятии глюкозотоксичности, в эксперимент была добавлена группа крыс с инсулинотерапией. Такие исследования требуют длительных сроков (120 дней) [196]. Наше исследование показало, что при использовании дозировки 45 мг/кг и инсулинотерапии в течение 3-х месяцев β -

клетки не восстанавливаются, что было подтверждено с помощью ИГХ. Таким образом, можно утверждать, что для тестирования функциональной активности трансплантированных ОЛ на срок до 90 дней можно использовать модель, основанную на СТЗ.

Выбор места для трансплантации является нетривиальной задачей. Нам необходимо было выбрать место, пригодное для трансплантации как инкапсулированных, так и неинкапсулированных ОЛ. В настоящее время стандартом считается введение неинкапсулированных ОЛ в воротную вену печени [197]. Однако острая воспалительная реакция, опосредованная кровью (IBMIR), приводит к гибели ОЛ в первые часы после трансплантации. Более того, воротная вена печени не подходит для трансплантации инкапсулированных ОЛ, так как это может вызвать тромбоз из-за размеров капсул. На данный момент обсуждаются разнообразные места для трансплантации, такие как брюшина, брюшная полость, селезенка, почечная субкапсула, поджелудочная железа, желудочно-кишечный тракт и т.д. [171,198]. Нами был выбран сальник, так как он позволяет избежать IBMIR по сравнению с традиционным притоком в воротную вену. Эта обильно васкуляризованная ткань секретирует различные факторы роста (например, CXCR4, VEGF и SDF-1), которые способствуют васкуляризации ОЛ и их выживанию. Сальник имеет достаточно большое пространство для трансплантации капсул, а также подходит для трансплантации неинкапсулированных ОЛ. Трансплантация в сальник неинкапсулированных ОЛ с тромбином была клинически протестирована в США (NCT02213003). Инсулиновая независимость была достигнута к 17 дню после трансплантации, но снизилась примерно через год [197]. Эти данные указывают на то, что сальник может быть выбран как место для трансплантации инкапсулированных и неинкапсулированных ОЛ.

Основной целью работы была оценка иммуноизолирующих свойств микрокапсул на основе новой комбинации ПМЭТАХ и альгината. Несмотря на то, что некоторые исследователи для изучения новых методов и биоматериалов для трансплантации ОЛ намеренно предпочитают использовать доноров и реципиентов одного вида и породы, так как считают, что ксенотрансплантация

добавляет дополнительные осложнения [199], мы выбрали для инкапсуляции именно ксеноматериал для изучения иммунной реакции на чужеродные клетки. Такой протокол также используется другими исследователями [173–175]. Однако в этих работах для оценки функциональной активности трансплантата инкапсулированных ОЛ используют лишь сравнение с животными с индуцированным СД1 без лечения и со здоровыми животными. Такие исследования показывают лишь то, что их трансплантат функционально активен. Мы подтверждали преимущества капсул по отношению к неинкапсулированным ОЛ. Таким образом, в качестве групп сравнения использовался неинкапсулированный ксеноматериал для увеличения иммунологического ответа и доказательства иммунопротекторных свойств капсул.

В качестве ксеноматериала были выбраны ОЛ кроликов. Альтернативными вариантами могли бы быть ОЛ свиней. Однако несмотря на то, что некоторые используют ОЛ свиней для трансплантации крысам [174,175], крысы частично инсулинорезистентны к свиному инсулину [195]. Таким образом, было бы необходимо использовать завышенные дозы ОЛ. Более того, деликатная природа ОЛ свиней создает проблемы в процессе изоляции, поскольку они имеют тенденцию распадаться на отдельные клетки [200,201]. ОЛ мыши также могли бы быть использованы, однако даже при соблюдении современных протоколов количество ОЛ, получаемое с одной мыши, менее 300 [202]. Следовательно, для одной трансплантации крысам необходимо более 7 мышей, что противоречит правилам биоэтики 3R (Replacement, Reduction, Refinement (замена, сокращение, усовершенствование)). Было отдано предпочтение ОЛ кролика, так как выход из одной поджелудочной железы кролика составляет 3000 ± 500 ОЛ. Более того, по сравнению с крысой поджелудочная железа кролика примерно такого же размера, но имеет более плотную структуру ОЛ, что увеличивает выход ОЛ при использовании того же количества дорогостоящего фермента. Таким образом, именно кроличьи ОЛ были выбраны в качестве материала для дальнейшего тестирования капсул и неинкапсулированных ОЛ.

4.5. Оценка влияния микрокапсул на компенсацию дефицита инсулина в экспериментальных моделях диабета 1 типа

Основной задачей *in vivo* этапа исследования была оценка способности разработанных микрокапсул обеспечивать функционирование инкапсулированных ОЛ в условиях экспериментального СД1. Ключевым результатом явилось подтверждение сохранения функциональной активности инкапсулированных ксеногенных (кроличьих) ОЛ после трансплантации в сальник крыс-реципиентов. При этом было зафиксировано достоверное снижение уровня гипергликемии на 33% по сравнению с животными контрольной группы. Этот факт говорит о способности микрокапсул пропускать питательные вещества, так как ОЛ в них остаются жизнеспособными и функционально активными, а также о проницаемости для инсулина, поскольку у животных наблюдается снижение уровня глюкозы.

Несмотря на то, что достижения полной нормогликемии не наблюдалось, полученный гипогликемический эффект является клинически значимым. Согласно литературным данным, даже частичное (22% и более) снижение уровня глюкозы крови считается достаточным для демонстрации функциональной активности трансплантата и может привести к существенному улучшению контроля заболевания и снижению риска осложнений [203,204]. Этот аспект особенно важен, поскольку даже в клинической практике полная и длительная инсулиновая независимость после трансплантации ОЛ достигается лишь у ограниченного процента пациентов [205]. Достижение инсулиннезависимости, согласно современной парадигме, не является самоцелью, важно избежать скачков гипо- и гипергликемии, которые являются пусковым механизмом развития осложнений.

Вероятной причиной отсутствия полной нормализации гликемии в нашем эксперименте могла быть недостаточная трансплантационная доза клеток (2000 ОЛ, или ~8000 IEQ/кг). Данные литературы о необходимом для достижения нормогликемии количестве ОЛ значительно варьируют: от 4000 IEQ/кг (Islet Equivalent (островковые эквиваленты)) при аллотрансплантации у крыс [206] до 10

000 IEQ /кг [199] и даже 50 000 IEQ /кг при ксенотрансплантации на моделях мышей [191]. Таким образом, использованная нами доза, возможно, находилась в нижнем диапазоне терапевтически эффективной.

Важнейшим доказательством эффективности иммуноизоляции стало значительное продление срока функционирования инкапсулированных ОЛ по сравнению со свободными (неинкапсулированными) клетками. Свободные ксеногенные ОЛ утрачивали активность в течение 7 дней, что характерно для феномена сверхострого отторжения, опосредованного комплементом [207,208], в то же время у 50% животных инкапсулированные ОЛ оставались функционально активными 2 недели, а у 20% животных сохраняли способность снижать гликемию в течение всего 90-дневного периода наблюдения. Это согласуется с результатами других исследований, демонстрирующих преимущество инкапсулированных клеток в долгосрочном выживании [204,209], и подтверждает, что слой ПМЭТАХ создает эффективный барьер, защищающий трансплантат от немедленной иммунной атаки и продлевает срок функционирования ОЛ.

4.6. Оценка биосовместимости и биodeградации микрокапсул «альгинат-ПМЭТАХ-альгинат»

Важным аспектом оценки нового материала для инкапсуляции является его взаимодействие с организмом реципиента в долгосрочной перспективе. Особое внимание следует уделять способности материала минимизировать реакцию на инородное тело (Foreign Body Reaction, FBR). Данная реакция представляет собой универсальный защитный ответ организма, который возникает при имплантации практически любых устройств, будь то металлы, керамика или полимеры. Даже те материалы, которые традиционно считаются биосовместимыми, не всегда позволяют избежать FBR. Сообщалось, что даже широко используемые биосовместимые материалы, включая поли(2-гидроксиэтилметакрилат), полиэтиленгликоль и альгинатные гидрогели, вызывают FBR [183]. FBR ведет к фиброзированию, которое физически изолирует трансплантат, нарушая

критически важный обмен кислородом и метаболитами, что в конечном итоге приводит к гипоксии и гибели инкапсулированных клеток [112]. FBR представляет собой сложный процесс обычно описываемый четырьмя стадиями: адсорбция белков, острое воспаление, хроническое воспаление и фиброзирование [183].

В течение нескольких секунд после повреждения, вызванного процедурой трансплантации, белки и клетки крови контактируют с имплантатом. В течение нескольких минут белки из плазмы и интерстициальной жидкости хозяина (альбумин, фибриноген, фибронектин, витронектин, γ -глобулины и др.) быстро и спонтанно адсорбируются на поверхности имплантата. В зависимости от свойств поверхности материала имплантата (энергия, полярность, заряд, химический состав, топография и др.) белки претерпевают конформационные изменения, в результате чего открываются паттерны распознавания белков, привлекающие клетки врожденной иммунной системы: нейтрофилы, моноциты и макрофаги.

В течение нескольких часов начинается острая фаза воспаления. Нейтрофилы выступают в качестве первых клеток, реагирующих на трансплантат, и становятся доминирующим типом клеток в течение первых двух дней [183]. Они привлекаются хемоаттрактантами, высвобождаемыми из активированных тромбоцитов хозяина, эндотелиальных клеток и клеток поврежденной ткани и взаимодействуют с адсорбированными белками через $\beta 2$ -интегрины. Нейтрофилы пытаются разрушить материал посредством фагоцитоза, высвобождения протеолитических ферментов и активных форм кислорода [210]. Острое воспаление длится приблизительно неделю. Именно поэтому мы выбрали этот срок для первых экспериментов по подбору места трансплантации и оценки реакции окружающих тканей на пустой трансплантат. К этому моменту завершается фаза острого воспаления, инициированного хирургической травмой. Нейтрофилы, которые доминировали в первые дни, начинают замещаться макрофагами. Это ключевой момент для оценки биосовместимости материала и анализа того, что микрокапсула сама по себе не вызывает токсической или гиперактивной воспалительной реакции. Если материал токсичен, это проявится именно здесь в виде массивной инфильтрации нейтрофилов и некроза. Если пустые капсулы

вызывают минимальную реакцию, то материал пригоден для дальнейших испытаний.

Макрофаги являются ключевыми клетками-эффекторами в FBR, играя центральную роль в определении судьбы имплантата. Их рекрутирование из периферической крови и окружающих тканей стимулируется хемокинами, высвобождаемыми нейтрофилами другими клетками в зоне повреждения [184,210].

Для макрофагов характерна высокая пластичность, позволяющая им поляризоваться в фенотипы M1 и M2 [210]. Макрофаги M1 секретируют провоспалительные цитокины (включая IL-1, IL-6, IL-8 и фактор некроза опухоли (TNF), макрофагальный воспалительный белок-1 (MIP-1)), тем самым усиливая воспалительный ответ и рекрутируя новые иммунные клетки [183]. Макрофаги M2 активируют противовоспалительный путь и ремоделирование тканей. На начальной стадии иммунной реакции на повреждение тканей преобладает популяция фенотипа M1. По мере разрешения хронического воспаления поляризация макрофагов смещается в сторону фенотипа M2 и естественного процесса заживления ран. Однако в присутствии инородных тел, таких как имплантаты, этот процесс замедляется, и пролиферация провоспалительных макрофагов продолжается. Макрофаги пытаются удалить имплантат путем фагоцитоза, выделяя активные формы кислорода и матриксные металлопротеиназы [211]. Попытки фагоцитировать слишком большой для поглощения объект приводит к еще более интенсивному высвобождению провоспалительных медиаторов и ферментов, что может повреждать окружающие ткани и сам имплантат [184].

Для хронического воспаления характерны длительная активность макрофагов и попытки организма изолировать инородное тело. На этой стадии макрофаги сливаются, образуя гигантские многоядерные клетки, которые служат отличительным признаком реакции на инородное тело (Foreign Body Reaction, FBR). Указанная трансформация позволяет макрофагам увеличить фагоцитарную способность для деградации крупных имплантатов.

Образовавшиеся гигантские клетки прикрепляются к поверхности биоматериала и выделяют агрессивные соединения, включая кислые гидролазы, протеазы и активные формы кислорода. Под воздействием этих факторов возможна деградация имплантата, что, в свою очередь, поддерживает хроническое воспаление. Кроме того, гигантские клетки секретируют цитокины и факторы роста, такие как VEGF, PDGF и TGF- β . Первые два индуцируют ангиогенез. TGF- β привлекает и активирует фибробласты, способствуя замещению временного внеклеточного матрикса плотной коллагеновой тканью.

Продолжительность хронического воспаления обычно составляет от одной недели до одного месяца. Однако фиброзные изменения вокруг имплантата развиваются и в более поздние сроки, причём фибробласты постепенно становятся доминирующим типом клеток. В конечном счёте формируется бессосудистая фиброзная капсула, которая может полностью изолировать имплантат от окружающих тканей хозяина [112].

Классическим исходом каскада FBR считается фиброзное инкапсулирование и последующая изоляция. Такая изоляция препятствует интеграции имплантата, нарушает диффузию питательных веществ и газов, что особенно критично для клеточных трансплантатов.

В нашем исследовании оценка биосовместимости проводилась через 2 недели, 1 месяц и 3 месяца. Данный подход позволил не только зафиксировать конечный результат, но и проследить всю последовательность событий от начала хронического воспаления до ремоделирования соединительной ткани и фиброобразования. Несмотря на то, что оценка на сроках 2 недели и 1 месяц производилась только для микрокапсул, потерявших свою функциональную активность, анализ оказался полезным для демонстрации биodeградации и защитной функции капсулы. Оценка проводилась с использованием гистологического окрашивания на гематоксилин и эозин. Такая окраска также используется и другими исследователями в качестве основного метода анализа реакции тканей реципиента на трансплантат [212].

2 недели были выбраны как маркер перехода от острой фазы воспаления к хронической. Согласно литературным данным, к этому моменту нейтрофилы сменяются макрофагами, и начинается процесс формирования гигантских многоядерных клеток. Наши данные показывают, что на этом сроке вокруг микрокапсул не наблюдается выраженного воспаления и формирования плотного фиброзного барьера.

Анализ на сроке 1 месяц позволил оценить пик классической реакции FBR. В этот период вокруг микрокапсулы частично деградируют. Признаками клеточного ответа явились наличие многоядерных гигантских клеток вокруг капсул, а также фрагментов полимерного материала в ткани, что указывает на его фагоцитоз макрофагами. Тем не менее, даже на этом этапе пикового клеточного ответа фиброзное обрастание оставалось умеренным и не приводило к полной изоляции трансплантата.

3-месячный срок был определен как конечная точка для оценки долгосрочной биосовместимости и исхода ремоделирования тканей. К этому времени острые и хронические воспалительные процессы стихают, и формируется зрелая фиброзная ткань. Тот факт, что толщина фиброзной капсулы вокруг остатков микрокапсул с ксеногенными ОЛ было достоверно менее выраженным (толщина 45 ± 16 мкм), чем в зоне имплантации свободных ОЛ (153 ± 51 мкм) является ключевым доказательством высокой биосовместимости разработанной системы. Это соответствует снижению выраженности фиброза примерно на 70% и сопоставимо с эффективностью некоторых целенаправленно разработанных покрытий, например, на основе цвиттерионных полимеров, которые также способны уменьшать толщину фиброзной капсулы более чем на 50% [213]. Важно отметить успех трансплантации связан не с полным отсутствием ткани вокруг трансплантата, а с отсутствием выраженного плотного фиброза, который изолирует клетки. Например, было показано, что матрицы из коллагена 1 помогают прорасти сосудам и что важно формировать правильное окружение [214]. Наш результат свидетельствует о том, что покрытие ПМЭТАХ обладает свойствами,

модулирующими реакцию на инородное тело в сторону менее выраженного плотного фиброзного обрастания вокруг трансплантата.

Интересным и потенциально значимым наблюдением стало сохранение функциональной активности части ОЛ даже после разрушения целостности микрокапсул. Это может быть связано с изменением иммуногенности ОЛ. Например, в работе Скалецкой Е.И. 2017 [215], успешно проведена трансплантация крысам неонатальных ОЛ кролика в децелюляризованных матриксах, которые обеспечивали лучшую выживаемость ОЛ. Работа была выполнена без иммуносупрессии, это стало возможно благодаря предварительному культивированию, которое привело к значительному снижению иммуногенности. Другими исследователями было отмечено, что при культивировании ОЛ могут уменьшать иммуногенность. Ключевыми механизмами являются элиминация резидентных лейкоцитов из ОЛ и резкое снижение экспрессии ключевых иммуногенных молекул, таких как ICAM-1 [216]. Кроме того, длительное культивирование приводит к снижению экспрессии провоспалительных цитокинов IL-1, TNF- α , что уменьшает иммунную видимость ОЛ [217]. Таким образом, ксеногенные ОЛ в некоторых случаях остались жизнеспособны после разрушения микрокапсул предположительно из-за изменения фенотипа ОЛ.

Таким образом, полученные данные демонстрируют двойственную роль разработанных микрокапсул. С одной стороны, покрытие ПМЭТАХ показало способность существенно подавлять фиброзную реакцию по сравнению с контролем. С другой стороны, наблюдавшаяся биodeградация капсул под действием клеточного иммунного ответа указывает на необходимость дальнейшего повышения их биологической стабильности для гарантированного долгосрочного функционирования трансплантата у всех реципиентов. Тем не менее, факт сохранения функции части ОЛ после деградации капсулы и выраженный антифибротический эффект подтверждают перспективность полимера ПМЭТАХ в качестве основы для дальнейшей оптимизации состава и свойств иммуноизолирующих покрытий.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В результате проведенного диссертационного исследования была разработана и всесторонне охарактеризована новая система микрокапсул «альгинат-ПМЭТАХ-альгинат» для иммуноизоляции и трансплантации островков Лангерганса (ОЛ) с целью компенсации инсулин-дефицитных состояний.

Была установлена оптимальная концентрация полимерного покрытия ПМЭТАХ (0,4%), обеспечивающая сбалансированные функциональные свойства микрокапсул: необходимую селективную проницаемость (молекулярно-массовый порог отсечки менее 120 кДа), высокую механическую стабильность при осмотическом стрессе, термическую устойчивость и резистентность к деградации в физиологической среде. Ультраструктурный анализ подтвердил формирование классической трехслойной архитектуры, аналогичной эффективным системам на основе поли-L-лизина.

Эксперименты *in vitro* продемонстрировали, что разработанный протокол инкапсуляции не оказывает цитотоксического воздействия на ОЛ. Инкапсулированные ОЛ сохраняли жизнеспособность и базальную секреторную активность, сопоставимую со свободными клетками, что подтверждает биосовместимость системы и адекватность диффузионных условий для метаболизма ОЛ.

На экспериментальной модели СТЗ-индуцированного СД1 у крыс было показано, что трансплантация инкапсулированных в микрокапсулы «альгинат-ПМЭТАХ-альгинат» ксеногенных (кроличьих) ОЛ в сальник приводит к статистически значимому и долгосрочному снижению уровня гипергликемии (в среднем на 33%) на протяжении до 90 дней наблюдения. При этом инкапсулированные ОЛ демонстрировали значительно более длительное сохранение функциональной активности по сравнению со свободными (неинкапсулированными) клетками, которые утрачивали её в течение первой недели. Это подтверждает эффективность разработанных микрокапсул в качестве

иммуноизолирующего барьера, защищающего трансплантат от реакции отторжения.

Гистологическая оценка выявила хорошую биосовместимость системы: в месте трансплантации инкапсулированных ОЛ наблюдалась минимальная воспалительная реакция и значительно менее выраженное фиброзное обрастание по сравнению с зоной имплантации свободных ОЛ. При этом, даже на фоне постепенной биodeградации полимерного материала капсулы, часть ОЛ сохраняла жизнеспособность и гормональную активность, что было подтверждено иммуногистохимически и в тесте толерантности к глюкозе.

Таким образом, в работе впервые предложена и экспериментально обоснована новая система микроинкапсуляции ОЛ на основе полимера ПМЭТАХ и альгината. Полученные данные свидетельствуют о перспективности использования микрокапсул «альгинат-ПМЭТАХ-альгинат» для создания биоинженерных трансплантатов, способных обеспечить длительную функциональную компенсацию инсулин-дефицитных состояний без необходимости системной иммуносупрессии. Разработанная платформа открывает возможности для дальнейшей оптимизации клеточной терапии СД1.

ВЫВОДЫ

1. Выявлено, что при использовании ПМЭТАХ в концентрации 0,4%, микрокапсулы имеют характерную трехслойную структуру (рыхлую альгинатную сердцевину, покрытую вторым плотным слоем ПМЭТАХ и третьим тонким слоем альгината), проницаемы для низкомолекулярных соединений (36 кДа), не проницаемы для высокомолекулярных соединений (120 кДа), устойчивы к деформации осмотическим давлением и стабильны при промывании физиологическими средами.

2. Показано, что инкапсуляция ОЛ в микрокапсулы «альгинат-ПМЭТАХ-альгинат» позволяет сохранить их высокую жизнеспособность ($86,7 \pm 1,7\%$) и функциональную активность (синтез инсулина – $4,64 \pm 0,29$ мкЕд/мл). Статистически значимых различий между показателями до и после инкапсуляции не выявлено ($p = 0,08$), что подтверждает биосовместимость.

3. Микрокапсулы «альгинат-ПМЭТАХ-альгинат» проницаемы для инсулина, что подтверждается их способностью снижать уровень глюкозы в крови крыс с диабетом I типа. Микрокапсулы защищают от воздействия иммунной системы и продлевают срок функционирования ОЛ с 7 дней до 3-х месяцев

4. Микрокапсулы «альгинат-ПМЭТАХ-альгинат» с ОЛ биосовместимы. При трансплантации не отмечено выраженного воспаления и некроза тканей. Отмечался незначительный фиброз вокруг микрокапсул на всех сроках трансплантации. Микрокапсулы теряли свою целостность через месяц после трансплантации, однако при этом часть ОЛ сохраняли свою функциональную активность.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ

- АПА – альгинат-поли-L-лизин-альгинат
- БСА – бычий сывороточный альбумин
- ВОЗ – Всемирная организация здравоохранения
- ГЭ – окраска гематоксилином и эозином
- ГГС – гипергликемическое гиперосмолярное состояние
- ДКА – диабетический кетоацидоз
- ДНК – дезоксирибонуклеиновая кислота
- ИГХ – иммуногистохимия
- ИФА – иммуноферментный анализ
- ИПСК – индуцированные плюрипотентные стволовые клетки
- кДа – килодальтон
- ЛСКМ – лазерная сканирующая конфокальная микроскопия
- мкЕд – микроединица
- мкМ – микромоль на литр
- МСК – мезенхимальные стромальные клетки
- ОЛ – островки Лангерганса
- ПЖ – поджелудочная железа
- ПЛЛ – поли-L-лизин
- ПМЭТАХ – поли-[2-(метакрилоилокси)этил]триметиламмония хлорид
- ПЭГ – полиэтиленгликоль
- СД1 – сахарный диабет 1 типа
- СТЗ – стрептозотоцин
- ТТГ – тест толерантности к глюкозе
- ЭСК – эмбриональные стволовые клетки
- AID – Automated insulin delivery (автоматизированная доставка инсулина)
- DTZ – Dithizone (дитизон)
- GLUT2 – Glucose transporter type 2 (транспортер глюкозы 2 типа)
- FBR – Foreign Body Reaction (реакция на инородное тело)

FBS – Fetal bovine serum (эмбриональная бычья сыворотка)

FDA – Food and Drug Administration (Управление по санитарному надзору за качеством пищевых продуктов и медикаментов, США)

FITC – Fluorescein isothiocyanate (изотиоцианат флуоресцеина)

HbA1c – гликированный гемоглобин

HEMA - Hydroxyethyl Methacrylate (гидроксиэтилметакрилат)

HLA – Human Leukocyte Antigens (человеческие лейкоцитарные антигены)

IBMIR – Instant blood-mediated inflammatory reaction (мгновенная воспалительная реакция, опосредованная кровью)

ICER – Incremental Cost-Effectiveness Ratio (Инкрементальное соотношение «затраты-эффективность») – это показатель фармакоэкономики, который показывает, сколько дополнительных денег нужно заплатить, чтобы получить одну дополнительную единицу пользы (чаще всего - 1 QALY) при переходе от стандартной терапии к новой.

IEQ (или IEQ/кг) – Islet Equivalent (островковый эквивалент)

IL (IL-2, IL-1, IL-6, IL-8) – интерлейкины

MWCO – Molecular weight cut-off (молекулярно-массовый порог отсечки)

PDGF – Platelet-Derived Growth Factor (фактор роста тромбоцитов)

PEC (PEC-01, PEC-Encap, PEC-Direct) – коммерческое название клеточных линий и устройств компании ViaCyte.

QALY – Quality-Adjusted Life Year (Год жизни с поправкой на качество) – это показатель фармакоэкономики и оценке технологий здравоохранения, который объединяет количество и качество жизни в одну метрику. 1 год жизни в состоянии полного здоровья = 1 QALY)

RGD – последовательность аминокислот Arg-Gly-Asp (аргинил-глицил-аспарагиновая кислота)

TGF- β – Transforming Growth Factor beta (трансформирующий фактор роста бета)

TNF (или TNF- α) – Tumor Necrosis Factor (фактор некроза опухоли)

Treg – регуляторные Т-клетки

VEGF – Vascular Endothelial Growth Factor (фактор роста эндотелия сосудов)

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Sittadjody, S., Encapsulation Strategies for Pancreatic Islet Transplantation without Immune Suppression / S. Sittadjody, E. C. Opara // *Current Stem Cell Reports*. – 2021. – Vol. 7. – № 2. – P. 49-71.
2. Paving the way for successful islet encapsulation. / N. Dimitrioglou, M. Kanelli, E. Papageorgiou [et al.] // *Drug Discovery Today*. – 2019. – Vol. 24. – № 3. – P. 737-748.
3. Cell microencapsulation technologies for sustained drug delivery: Clinical trials and companies / T. B. Lopez-Mendez, E. Santos-Vizcaino, J. L. Pedraz [et al.] // *Drug Discovery Today*. – 2021. – Vol. 26. – № 3. – P. 852-861.
4. Islet Transplantation: Microencapsulation, Nanoencapsulation, and Hypoimmune Engineering / K. Lee, A. Aviles Vargas, R. Bottino [et al.] // *WIREs Nanomedicine and Nanobiotechnology*. – 2025. – Vol. 17. – № 3. – Art. e70016.
5. Challenges with Cell-based Therapies for Type 1 Diabetes Mellitus / P. Siwakoti, C. Rennie, Y. Huang [et al.] // *Stem Cell Reviews and Reports*. – 2023. – Vol. 19. – № 3. – P. 601-624.
6. Lim, F. Microencapsulated Islets as Bioartificial Endocrine Pancreas / F. Lim, A. M. Sun // *Science*. – 1980. – Vol. 210. – № 4472. – P. 908-910.
7. Viscoelastic properties of ultra-high viscosity alginates / H. Storz, U. Zimmermann, H. Zimmermann [et al.] // *Rheologica Acta*. – 2010. – Vol. 49. – № 2. – P. 155-167.
8. Normal Insulin Secretion from Immune-Protected Islets of Langerhans by PEGylation and Encapsulation in the Alginate-Chitosan-PEG / N. Najafikhah, S. Hashemi-Najafabadi, S. Zahediasl [et al.] // *Iranian Journal of Biotechnology*. – 2018. – Vol. 16. – № 4. – P. e1669.
9. Suppression of Fibrotic Reactions of Chitosan-Alginate Microcapsules Containing Porcine Islets by Dexamethasone Surface Coating / M. J. Kim, H.-S. Park, J.-W. Kim [et al.] // *Endocrinology and Metabolism*. – 2021. – Vol. 36. – № 1. – P. 146-156.

10. Vaithilingam, V. Encapsulated Islet Transplantation: Where Do We Stand? / V. Vaithilingam, S. Bal [et al.] // *The Review of Diabetic Studies*. – 2017. – Vol. 14. – № 1. – P. 51-78.
11. Biocompatible anti-microbial coatings for urinary catheters / V. C. Thompson, P. J. Adamson, J. Dilag [et al.] // *RSC Advances*. – 2016. – Vol. 6. – № 58. – P. 53303-53309.
12. Synthesis and Cytotoxicity Studies of Wood-Based Cationic Cellulose Nanocrystals as Potential Immunomodulators / Y. Imtiaz, B. Tuga, C. W. Smith [et al.] // *Nanomaterials*. – 2020. – Vol. 10. – № 8. – P. 1603.
13. Aqueous lubrication of poly(etheretherketone) via surface-initiated polymerization of electrolyte monomers / P. Chouwatat, T. Hirai, K. Higaki [et al.] // *Polymer*. – 2017. – Vol. 116. – P. 549-555.
14. Repair of spinal cord injury by implantation of bFGF-incorporated HEMA-MOETACL hydrogel in rats / B. Chen, J. He, H. Yang [et al.] // *Scientific Reports*. – 2015. – Vol. 5. – № 1. – P. 9017.
15. The effect of iPS-derived neural progenitors seeded on laminin-coated pHEMA-MOETACL hydrogel with dual porosity in a rat model of chronic spinal cord injury / J. Ruzicka, N. Romanyuk, K. Jirakova [et al.] // *Cell Transplantation*. – 2019. – Vol. 28. – № 4. – P. 400-412.
16. Mechanically enhanced microcapsules for cellular gene therapy / F. Shen, M. A. J. Mazumder, N. A. D. Burke [et al.] // *Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials*. – 2009. – Vol. 90B. – № 1. – P. 350-361.
17. Qaid, M. M. Role of insulin and other related hormones in energy metabolism – A review / M. M. Qaid, M. M. Abdelrahman // *Cogent Food & Agriculture*. – 2016. – Vol. 2. – № 1. – P. 1267691
18. Classification of diabetic retinopathy: Past, present and future / Z. Yang, T.-E. Tan, Y. Shao [et al.] // *Frontiers in Endocrinology*. – 2022. – Vol. 13. – P. 1079217.
19. Type 2 Diabetes Mellitus: New Pathogenetic Mechanisms, Treatment and the Most Important Complications / E. Młynarska, W. Czarnik, N. Dzieża [et al.] // *International Journal of Molecular Sciences*. – 2025. – Vol. 26. – № 3. – P. 1094.

20. The epidemiology of type 1 diabetes mellitus in older adults / D. Tomic, J. L. Harding, A. J. Jenkins [et al.] // *Nature Reviews Endocrinology*. – 2025. – Vol. 21. – № 2. – P. 92-104.
21. American diabetes association professional practice committee. 2. diagnosis and classification of diabetes: standards of care in diabetes / American Diabetes Association Professional Practice Committee // *Diabetes Care*. – 2025. – Vol. 8. – P. S527-S549.
22. Therapies for type 1 diabetes: current scenario and future perspectives / V. Pathak, N. M. Pathak, C. L. O'Neill [et al.] // *Clinical Medicine Insights: Endocrinology and Diabetes*. – 2019. – Vol. 12. – P. 1179551419844521.
23. Type 1 diabetes mellitus: retrospect and prospect / T. A. Addissouky, M. M. A. Ali, I. E. T. El Sayed [et al.] // *Bulletin of the National Research Centre*. – 2024. – Vol. 48. – № 1. – P. 42.
24. Bonifacio, E. Type 1 diabetes risk factors, risk prediction and presymptomatic detection: Evidence and guidance for screening / E. Bonifacio, A. Ziegler // *Diabetes, Obesity and Metabolism*. – 2025. – Vol. 27. – № S6. – P. 28-39.
25. Seroconversion to Multiple Islet Autoantibodies and Risk of Progression to Diabetes in Children / A. G. Ziegler, M. Rewers, O. Simell [et al.] // *JAMA*. – 2013. – Vol. 309. – № 23. – P. 2473.
26. Staging Presymptomatic Type 1 Diabetes: A Scientific Statement of JDRF, the Endocrine Society, and the American Diabetes Association / R. A. Insel, J. L. Dunne, M. A. Atkinson [et al.] // *Diabetes Care*. – 2015. – Vol. 38. – № 10. – P. 1964-1974.
27. Henriques, F. L. Type 1 diabetes mellitus prevention: present and future / F. L. Henriques, I. Buckle, J. M. Forbes // *Nature Reviews Endocrinology*. – 2025. – Vol. 21. – № 10. – P. 608-622.
28. Diabetes mellitus: Classification, mediators, and complications; A gate to identify potential targets for the development of new effective treatments / S. A. Antar, N. A. Ashour, M. Sharaky [et al.] // *Biomedicine & Pharmacotherapy*. – 2023. – Vol. 168. – P. 115734.

29. Assessment of Adverse Events of Teplizumab: A Real-world Pharmacovigilance Study Based on the FDA Adverse Event Reporting System / C. Wang, Y. Wang, W. Zheng [et al.] // *Clinical Therapeutics*. – 2025. – Vol. 47. – № 12. – P. 1143-1148.
30. Hassanein, A. Recent advances in stem cell-based therapies for type 1 diabetes: A glimpse into the future / A. Hassanein, S. Akhtar // *Biomolecules and Biomedicine*. – 2025. – Vol. 26. – № 1. – P. 5-23.
31. Speake, C. Approval of teplizumab: implications for patients / C. Speake, C. J. Greenbaum // *Nature Reviews Endocrinology*. – 2023. – Vol. 19. – № 7. – P. 377-378.
32. Teplizumab improves and stabilizes beta cell function in antibody-positive high-risk individuals / E. K. Sims, B. N. Bundy, K. Stier [et al.] // *Science Translational Medicine*. – 2021. – Vol. 13. – № 583. – P. eabc8980.
33. Rasheed Fetian, I. Type 1 Diabetes: Historical Evolution, Etiological Insights, Pathophysiological Mechanisms, Clinical Manifestations, and Innovative Therapeutic Approaches / I. Rasheed Fetian, S. Zechmann, L. Villiger // *Type 1 Diabetes - Causes, Treatments and Management* / ed. R. Zhao. – IntechOpen, 2025.
34. Diabetic Ketoacidosis at Diagnosis of Type 1 Diabetes in Colorado Children, 2010–2017 / G. T. Alonso, A. Coakley, L. Pyle [et al.] // *Diabetes Care*. – 2020. – Vol. 43. – № 1. – P. 117-121.
35. Islam, S. T. Environmental determinants of type 1 diabetes: A role for overweight and insulin resistance / S. T. Islam, S. Srinivasan, M. E. Craig // *Journal of Paediatrics and Child Health*. – 2014. – Vol. 50. – № 11. – P. 874-879.
36. Yeung, W.- C. G. Enterovirus infection and type 1 diabetes mellitus: systematic review and meta-analysis of observational molecular studies / W.- C. G. Yeung, W. D. Rawlinson, M. E. Craig // *BMJ*. – 2011. – Vol. 342. – feb03 1. – P. d35-d35.
37. Coxsackievirus B1 is associated with induction of b-cell autoimmunity that portends type 1 diabetes / O. H. Laitinen, H. Honkanen, O. Pakkanen [et al.] // *Diabetes*. – 2014. – Vol. 63. – № 2. – P. 446-455.
38. SARS-CoV-2 Infection and Development of Islet Autoimmunity in Early Childhood / M. Lugar, A. Eugster, P. Achenbach [et al.] // *JAMA*. – 2023. – Vol. 330. – № 12. – P. 1151.

39. Stene, L. C. Risk Factors for Type 1 Diabetes / L. C. Stene, J. M. Norris, M. J. Rewers // *Diabetes in America* / ed. by. J. M. Lawrence [et al.]. – Bethesda (MD): National Institute of Diabetes and Digestive and Kidney Diseases (NIDDK), 2023. – URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK597412/> (дата обращения: 05.01.2026).
40. Global type 1 diabetes prevalence, incidence, and mortality estimates 2025: Results from the International diabetes Federation Atlas, 11th Edition, and the T1D Index Version 3.0 / G. D. Ogle, F. Wang, A. Haynes [et al.] // *Diabetes Research and Clinical Practice*. – 2025. – Vol. 225. – P. 112277.
41. Эпидемиология и ключевые клинико-терапевтические показатели сахарного диабета в Российской Федерации в соответствии со стратегическими целями Всемирной организации здравоохранения / И. И. Дедов, М. В. Шестакова, О. К. Викулова [и др.] // *Сахарный диабет*. – 2025. – Т. 28. – № 1. – С. 4-17.
42. Type 3c diabetes associated with chronic pancreatitis: A narrative review / A. Rasheed, S. Galande, S. Farheen [et al.] // *Pancreatology*. – 2025. – Vol. 25. – № 7. – P. 1003-1012.
43. Ewald, N. Diabetes mellitus secondary to pancreatic diseases (Type 3c) – Are we neglecting an important disease? / N. Ewald, R. G. Bretzel // *European Journal of Internal Medicine*. – 2013. – Vol. 24. – № 3. – P. 203-206.
44. Wang, D. Pancreatogenic diabetes: Pathophysiology, diagnosis, and management challenges / D. Wang, Y. Jiao // *World Journal of Gastrointestinal Surgery*. – 2025. – Vol. 17. – № 11. – P. 112204.
45. ISPAD Clinical Practice Consensus Guidelines 2022: The diagnosis and management of monogenic diabetes in children and adolescents / S. A. W. Greeley, M. Polak, P. R. Njølstad [et al.] // *Pediatric Diabetes*. – 2022. – Vol. 23. – № 8. – P. 1188-1211.
46. Isenberg, J. S. Can Islet Transplantation Possibly Reduce Mortality in Type 1 Diabetes / J. S. Isenberg, F. Kandeel // *Cell Transplantation*. – 2025. – Vol. 34. – P. 09636897241312801.

47. Hyperglycemic Crises in Adults with Diabetes: A Consensus Report / G. E. Umpierrez, G. M. Davis, N. A. ElSayed [et al.] // *Diabetes Care*. – 2024. – Vol. 47. – № 8. – P. 1257-1275.
48. Umpierrez, G. Diabetic emergencies – ketoacidosis, hyperglycaemic hyperosmolar state and hypoglycaemia / G. Umpierrez, M. Korytkowski // *Nature Reviews Endocrinology*. – 2016. – Vol. 12. – № 4. – P. 222-232.
49. An analysis of epidemiological characteristics of microvascular complications and comorbidities among type 1 diabetes patients / M. Lewicka, I. Korzeniowska-Dyl, D. Moczulski [et al.] // *Acta Biochimica Polonica*. – 2025. – Vol. 72. – P. 14569.
50. Diabetes-related macrovascular complications are associated with an increased risk of diabetic microvascular complications: A prospective study of 1518 patients with type 1 diabetes and 20 802 patients with type 2 diabetes in the UK biobank / X. Zhang, S. Zhao, Y. Huang [et al.] // *Journal of the American Heart Association*. – 2024. – Vol. 13. – № 11. – P. e032626.
51. Autoimmune comorbidity in type 1 diabetes and its association with metabolic control and mortality risk in young people: a population-based study / J. Samuelsson, R. Bertilsson, E. Bülow [et al.] // *Diabetologia*. – 2024. – Vol. 67. – № 4. – P. 679-689.
52. A critical review on diabetes mellitus type 1 and type 2 management approaches: from lifestyle modification to current and novel targets and therapeutic agents / B. A. Tegegne, A. Adugna, A. Yenets [et al.] // *Frontiers in Endocrinology*. – 2024. – Vol. 15. – P. 1440456.
53. Wright, S. Recombinant DNA Technology and Its Social Transformation, 1972-1982 / S. Wright // *Osiris*. – 1986. – Vol. 2. – № 1. – P. 303-360.
54. Chance, R. E. Research, development, production, and safety of biosynthetic human insulin / R. E. Chance, B. H. Frank // *Diabetes Care*. – 1993. – Vol. 16. – № Supplement_3. – P. 133-142.
55. Hirsch, I. B. Insulin analogues / I. B. Hirsch // *New England Journal of Medicine*. – 2005. – Vol. 352. – № 2. – P. 174-183.
56. Tiwari, D. D. Newer insulin preparations and insulin analogs / D. D. Tiwari, V. M. Thorat, Dr. P. V. Pakale // *Cureus*. – 2024. – Vol. 16. – № 11.

57. Owens, D. R. Insulin glargine (Lantus) / D. R. Owens, S. Griffiths // *International Journal of Clinical Practice*. – 2002. – Vol. 56. – № 6. – P. 460-466.
58. Drab, S. R. A new option for glycemic control: insulin degludec, a new-generation basal insulin with an ultralong duration of action / S. R. Drab, A. Philis-Tsimikas // *Pharmacotherapy: The Journal of Human Pharmacology and Drug Therapy*. – 2014. – Vol. 34. – № 3. – P. 291-302.
59. A practical approach to the initiation, titration and intensification of insulin therapy in adults with diabetes in the indian context: recommendations by association of clinical endocrinologists consensus group / R. S. Erukulapati, M. R. M., L. R. Jakkidi [et al.] // *Clinical Diabetology*. – 2024. – Vol. 1. – № 1. – P. 6-42.
60. Ziegler, A.-G. The future of type 1 diabetes therapy / A.-G. Ziegler, E. Cengiz, T. W. H. Kay // *The Lancet*. – 2025. – Vol. 406. – № 10511. – P. 1520-1534.
61. Pancreatic islet cell hormones: secretion, function, and diabetes therapy / J. Ma, M. Li, L. Yang [et al.] // *MedComm*. – 2025. – Vol. 6. – № 9. – P. e70359.
62. Efficacy and safety of 28-day treatment with oral insulin (ORMD-0801) in patients with type 2 diabetes: A randomized, placebo-controlled trial / R. Eldor, J. Neutel, K. Homer [et al.] // *Diabetes, Obesity and Metabolism*. – 2021. – Vol. 23. – № 11. – P. 2529-2538.
63. A comprehensive review of inhalation insulin: evaluating its efficacy, safety profile, mechanistic insights, clinical applications, and potential to transform diabetes management and patient adherence in the context of evolving therapeutic strategies / A. Devarajan, P. S. Kumar, A. Kumar [et al.] // *World J Pharm Life Sci*. – 2025. – Vol. 11. – № 3. – P. 284-294.
64. Morariu, S. Advances in the design of phenylboronic acid-based glucose-sensitive hydrogels / S. Morariu // *Polymers*. – 2023. – Vol. 15. – № 3. – P. 582.
65. Boughton, C. K. Is an artificial pancreas (closed-loop system) for Type 1 diabetes effective? / C. K. Boughton, R. Hovorka // *Diabetic Medicine*. – 2019. – Vol. 36. – № 3. – P. 279-286.
66. Glycaemic control and variability with different commercially available hybrid closed loop systems in people with type 1 diabetes: A systematic review and meta-

- analysis of randomized controlled trials / S. Di Molfetta, L. Di Gioia, I. Caruso [et al.] // *Diabetes, Obesity and Metabolism*. – 2025. – Vol. 28. – № 1S. – P. 3-12.
67. The cost-effectiveness of an advanced hybrid closed-loop system compared to standard management of type 1 diabetes in a singapore setting / D. Gardner, M. Lakkad, Z. Qiu [et al.] // *Diabetes Technology & Therapeutics*. – 2024. – Vol. 26. – № 5. – P. 324-334.
68. Navigating the unique challenges of automated insulin delivery systems to facilitate effective uptake, onboarding, and continued use / M. L. Tanenbaum, P. V. Commissariat, E. G. Wilmot [et al.] // *Journal of Diabetes Science and Technology*. – 2025. – Vol. 19. – № 1. – P. 47-53.
69. Smart closed-loop drug delivery systems / M. M. Paci, T. Saha, O. Djassemi [et al.] // *Nature Reviews Bioengineering*. – 2025. – Vol. 3. – № 10. – P. 816-834.
70. Rech Tondin, A. Islet cell replacement and regeneration for type 1 diabetes: current developments and future prospects / A. Rech Tondin, G. Lanzoni // *BioDrugs*. – 2025. – Vol. 39. – № 2. – P. 261-280.
71. Новое поколение методов терапии в лечении сахарного диабета 1-го типа / Ю.М. Целоусова, Л.А. Луговая, Д.М. Кучин [и др.] // *Вестник трансплантологии и искусственных органов*. – 2026. – Т. 28. – № 1. – С. 212-226.
72. Daly, B. Interventional procedures in whole organ and islet cell pancreas transplantation / B. Daly, K. O'Kelly, D. Klassen // *Seminars in Interventional Radiology*. – 2005. – Vol. 21. – № 04. – P. 335-343.
73. Wisel, S. A. Current outcomes in islet versus solid organ pancreas transplant for β -cell replacement in type 1 diabetes / S. A. Wisel, H. J. Braun, P. G. Stock // *Current Opinion in Organ Transplantation*. – 2016. – Vol. 21. – № 4. – P. 399-404.
74. Current state and future evolution of pancreatic islet transplantation / T. Anazawa, H. Okajima, T. Masui [et al.] // *Annals of Gastroenterological Surgery*. – 2019. – Vol. 3. – № 1. – P. 34-42.
75. Shapiro, A. M. J. Islet transplantation and beta cell replacement therapy / A. M. J. Shapiro, J. A. M. Shaw // *Hoboken: Taylor and Francis, 2013. – 378 p.*

76. Mbaye, E. H. A. From Edmonton to Lantidra and beyond: immunoengineering islet transplantation to cure type 1 diabetes / E. H. A. Mbaye, E. A. Scott, J. A. Burke // *Frontiers in Transplantation*. – 2025. – Vol. 4. – P. 1514956.
77. Improvement in outcomes of clinical islet transplantation: 1999–2010 / F. B. Barton, M. R. Rickels, R. Alejandro [et al.] // *Diabetes Care*. – 2012. – Vol. 35. – № 7. – P. 1436-1445.
78. Piemonti, L. Islet transplantation / L. Piemonti // *Endotext* [Internet]. – MDText.com, Inc., 2025. – URL: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/books/NBK278966/> (дата обращения: 12.01.2026).
79. Impact of islet transplantation on type 1 diabetes-related complication: A systematic review / K. Gariani, A. Peloso, F. Haidar [et al.] // *Transplant International*. – 2025. – Vol. 38. – P. 15091.
80. A health economic analysis of clinical islet transplantation / J. Beckwith, J. A. Nyman, B. Flanagan [et al.] // *Clinical Transplantation*. – 2012. – Vol. 26. – № 1. – P. 23-33.
81. A worldwide survey of activities and practices in clinical islet of Langerhans transplantation / T. Berney, A. Andres, M. D. Bellin [et al.] // *Transplant International*. – 2022. – Vol. 35. – P. 10507.
82. Lantidra (donislecel) in type 1 diabetes: An in-depth analysis of pharmacology, clinical effectiveness, safety, and the therapeutic role of the first FDA-approved allogeneic islet cell therapy / E. Erbasan, M. Aliciaslan, F. Erendor [et al.] // *Diabetic Medicine*. – 2026. – Vol. 43. – № 1. – P. e70168.
83. Altabas, V. Current Challenges in Pancreas and Islet Transplantation: A Scoping Review / V. Altabas, T. Bulum // *Biomedicines*. – 2024. – Vol. 12. – № 12. – P. 2853.
84. Markmann, J. F. Progress toward islet transplantation tolerance // *Transplantation, Bioengineering, and Regeneration of the Endocrine Pancreas* / J. F. Markmann, C. G. Rickert – Elsevier, 2020. – P. 727-739.

85. Cell therapy for type 1 diabetes mellitus: a review of clinical trials / M. I. Danilevskii, O. V. Zakharova, N. N. Skaletskiy [et al.] // *Bulletin of Experimental Biology and Medicine*. – 2025. – Vol. 179. – № 1. – P. 112-122.
86. A phase 2 randomized trial with autologous polyclonal expanded regulatory T cells in children with new-onset type 1 diabetes / C. Bender, A. E. Wiedeman, A. Hu [et al.] // *Science Translational Medicine*. – 2024. – Vol. 16. – № 746. – P. eadn2404.
87. The effect of low-dose IL-2 and Treg adoptive cell therapy in patients with type 1 diabetes / S. Dong, K. J. Hiam-Galvez, C. T. Mowery [et al.] // *JCI Insight*. – 2021. – Vol. 6. – № 18. – P. e147474.
88. Phase I (safety) study of autologous tolerogenic dendritic cells in type 1 diabetic patients / N. Giannoukakis, B. Phillips, D. Finegold [et al.] // *Diabetes Care*. – 2011. – Vol. 34. – № 9. – P. 2026-2032.
89. Novel autologous dendritic cell therapy AVT001 for type 1 diabetes / J. L. Gaglia, H. L. Daley, N. K. Bryant [et al.] // *NEJM Evidence*. – 2024. – Vol. 3. – № 7.
90. Mesenchymal stem cell transplantation in newly diagnosed type-1 diabetes patients: a phase I/II randomized placebo-controlled clinical trial / M. Izadi, A. Sadr Hashemi Nejad, M. Moazenchi [et al.] // *Stem Cell Research & Therapy*. – 2022. – Vol. 13. – № 1. – P. 264.
91. Umbilical cord-derived mesenchymal stromal cells preserve endogenous insulin production in type 1 diabetes: a Phase I/II randomised double-blind placebo-controlled trial / P.- O. Carlsson, D. Espes, S. Sisay [et al.] // *Diabetologia*. – 2023. – Vol. 66. – № 8. – P. 1431-1441.
92. UCSF islet transplantation trial – islet transplantation with recipient T-Reg cells or deceased donor vertebral bone marrow therapy: clinical trial NCT05973734 / Stanford University // UCSF Clinical Trials: офиц. сайт. – 2023. – URL: <https://clinicaltrials.ucsf.edu/trial/NCT05973734> (дата обращения: 03.02.2026).
93. Chhabra, P. Current assessment of clinical pancreatic islet allotransplantation / P. Chhabra, K. L. Brayman // *OBM Transplantation*. – 2020. – Vol. 04. – № 04. – P. 1-32.
94. Shindo, Y. Regulation of inflammatory response in islet transplantation / Y. Shindo, M. A. Kanak // *OBM Transplantation*. – 2018. – Vol. 2. – № 2. – P. 1-16.

95. Carvalho, A. M. From pluripotent stem cells to bioengineered islets: A challenging journey to diabetes treatment / A. M. Carvalho, R. Nunes, B. Sarmiento // *European Journal of Pharmaceutical Sciences*. – 2022. – Vol. 172. – P. 106148.
96. Immunoprotection strategies in β -cell replacement therapy: a closer look at porcine islet xenotransplantation / S. Grimus, V. Sarangova, P. B. Welzel [et al.] // *Advanced Science*. – 2024. – Vol. 11. – № 31. – P. 2401385.
97. Implanted pluripotent stem-cell-derived pancreatic endoderm cells secrete glucose-responsive C-peptide in patients with type 1 diabetes / A. Ramzy, D. M. Thompson, K. A. Ward-Hartstonge [et al.] // *Cell Stem Cell*. – 2021. – Vol. 28. – № 12. – P. 2047-2061.
98. Vertex Pharmaceuticals Incorporated. A Phase 1/2/3 Study to Evaluate the Safety, Tolerability, and Efficacy of VX-880 in subjects who have type 1 diabetes mellitus with impaired hypoglycemic awareness and severe hypoglycemia: clinical trial NCT04786262 / Vertex Pharmaceuticals Incorporated // *ClinicalTrials.gov* : офиц. сайт. – 2021. – URL: <https://clinicaltrials.gov/study/NCT04786262> (дата обращения: 29.01.2026).
99. de Vries, R. Scaffolds for Encapsulation of Stem Cell-Derived β Cells / R. de Vries, A. A. van Apeldoorn // *Pluripotent Stem Cell Therapy for Diabetes* / ed. by L. Piemonti [et al.]. – Cham: Springer International Publishing, 2023. – P. 123–149.
100. Licht, B. J. M. Engineering hypoimmune stem cell-derived beta cells / B. J. M. Licht, G. P. Duffy, R. E. Levey // *Stem Cell Research & Therapy*. – 2025. – Vol. 16. – № 1. – P. 610.
101. Challenges of CRISPR/Cas-based cell therapy for type 1 diabetes: how not to engineer a "Trojan Horse" / D. S. Karpov, A. O. Sosnovtseva, S. V. Pylina [et al.] // *International Journal of Molecular Sciences*. – 2023. – Vol. 24. – № 24. – P. 17320.
102. Transplantation of chemically induced pluripotent stem-cell-derived islets under abdominal anterior rectus sheath in a type 1 diabetes patient / S. Wang, Y. Du, B. Zhang [et al.] // *Cell*. – 2024. – Vol. 187. – № 22. – P. 6152-6164.e18.
103. Toward a cure for diabetes: iPSC and ESC-derived islet cell transplantation trials / J. Fujikura, T. Anazawa, T. Toyoda [et al.] // *Journal of Diabetes Investigation*. – 2025. – Vol. 16. – № 3. – P. 384-388.

104. Advancements and challenges in stem cell transplantation for regenerative medicine / L. Wei, W. Yan, W. Shah [et al.] // *Heliyon*. – 2024. – Vol. 10. – № 16. – P. e35836.
105. Современные технологии инкапсуляции островков Лангерганса поджелудочной железы для коррекции сахарного диабета 1-го типа / П.С. Ермакова, Е.И. Черкасова, Н.А. Леньшина [и др.] // *Вестник трансплантологии и искусственных органов*. – 2021. – Т. 23. – № 4. – С. 95-109. – DOI: 10.15825/1995-1191-2021-4-95-109.
106. Hammond, P. T. Building biomedical materials layer-by-layer / P.T. Hammond // *Materials Today*. – 2012. – Vol. 15. – № 5. – P. 196-206.
107. Novel enzymatic cross-linking-based hydrogel nanofilm caging system on pancreatic β cell spheroid for long-term blood glucose regulation / M. Kim, H. Kim, Y. Lee [et al.] // *Science advances*. – 2021. – Vol. 7. – № 26. – P. eabf7832.
108. DNA-templated synthesis of biomimetic cell wall for nanoencapsulation and protection of mammalian cells / P. Shi, N. Zhao, J. Coyne [et al.] // *Nature Communications*. – 2019. – Vol. 10. – № 1. – P. 2223.
109. The impact of locally-delivered tacrolimus-releasing microspheres and polyethylene glycol-based islet surface modification on xenogeneic islet survival / T. T. Nguyen, C. D. Phung, J. O. Kim [et al.] // *Journal of Controlled Release*. – 2021. – Vol. 336. – P. 274-284.
110. Desai, T. Advances in islet encapsulation technologies / T. Desai, L. D. Shea // *Nature Reviews Drug Discovery*. – 2017. – Vol. 16. – № 5. – P. 338-350.
111. Engineering strategies to improve islet transplantation for type 1 diabetes therapy / A. M. White, J. G. Shamul, J. Xu [et al.] // *ACS Biomaterials Science & Engineering*. – 2020. – Vol. 6. – № 5. – P. 2543-2562.
112. Encapsulated islet transplantation / S. S. Liu, S. Shim, Y. Kudo [et al.] // *Nature Reviews Bioengineering*. – 2025. – Vol. 3. – № 1. – P. 83-102.
113. Medical devices, smart drug delivery, wearables and technology for the treatment of diabetes mellitus / D. A. Domingo-Lopez, G. Lattanzi, L. H. J. Schreiber [et al.] // *Advanced Drug Delivery Reviews*. – 2022. – Vol. 185. – P. 114280.

114. Transplantation of macroencapsulated human islets within the bioartificial pancreas β Air to patients with type 1 diabetes mellitus / P. Carlsson, D. Espes, A. Sedigh [et al.] // *American Journal of Transplantation*. – 2018. – Vol. 18. – № 7. – P. 1735-1744.
115. A wireless, battery-free device enables oxygen generation and immune protection of therapeutic xenotransplants in vivo / S. R. Krishnan, C. Liu, M. A. Bochenek [et al.] // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. – 2023. – Vol. 120. – № 40. – P. e2311707120.
116. Oxygen generating biomaterial improves the function and efficacy of beta cells within a macroencapsulation device / M. M. Coronel, J.-P. Liang, Y. Li [et al.] // *Biomaterials*. – 2019. – Vol. 210. – P. 1-11.
117. A bioinspired scaffold for rapid oxygenation of cell encapsulation systems / L.-H. Wang, A. U. Ernst, D. An [et al.] // *Nature Communications*. – 2021. – Vol. 12. – № 1. – P. 5846.
118. Ludwig, B. islet macroencapsulation: strategies to boost islet graft oxygenation / B. Ludwig, C. Heller, V. Sarangova // *Pluripotent Stem Cell Therapy for Diabetes* / eds. L. Piemonti [et al.]. – Cham: Springer International Publishing, 2023. – P. 251-280.
119. Microencapsulation of beta cells in collagen micro-disks via circular pneumatically actuated soft micro-mold (cPASMO) device / P.-J. Huang, J. Qu, P. Saha [et al.] // *Biomedical Physics & Engineering Express*. – 2019. – Vol. 5. – № 1. – P. 015004.
120. In vitro study of using calcium phosphate cement as immunoisulative device to enclose insulinoma/agarose microspheres as bioartificial pancreas / Y. Kai-Chiang, Y. Ching-Yao, W. Chang-Chin [et al.] // *Biotechnology and Bioengineering*. – 2007. – Vol. 98. – № 6. – P. 1288-1295.
121. Injectable polyethylene glycol hydrogel for islet encapsulation: an in vitro and in vivo characterization / T. Knobloch, S. E. M. Abadi, J. Bruns [et al.] // *Biomedical Physics & Engineering Express*. – 2017. – Vol. 3. – № 3. – P. 035022.
122. Roshanbinfar, K. Encapsulating Beta Islet Cells in Alginate, Alginate-Chitosan and Alginate-Chitosan-PEG Microcapsules and Investigation of Insulin Secretion / K. Roshanbinfar, S. S. Kordestani // *Journal of Biomaterials and Tissue Engineering*. – 2013. – Vol. 3. – № 2. – P. 185-189.

123. Функционализация альгината для микроинкапсуляции инсулин-продуцирующих клеток / Н.А. Леньшина, А.Н. Конев, М.А. Батенькин [и др.] // *Высокомолекулярные соединения. Б.* – 2021. – Т. 63. – № 6. – С. 383-418.
124. Varaprasad, K. A review of smart alginate-based biomaterials: Innovations and challenges in tissue engineering and regenerative medicine / K. Varaprasad, T. Jayaramudu // *International Journal of Biological Macromolecules.* – 2026. – Vol. 337. – P. 149518.
125. Sharma, S. An overview: non-toxic and eco-friendly polysaccharides—its classification, properties, and diverse applications / S. Sharma, M. Bhende // *Polymer Bulletin.* – 2024. – Vol. 81. – № 14. – P. 12383-12429.
126. Alginate-based microcapsules for immunoisolation of pancreatic islets / P. de Vos, M. M. Faas, B. Strand [et al.] // *Biomaterials.* – 2006. – Vol. 27. – № 32. – P. 5603-5617.
127. Lee, K. Y. Alginate: Properties and biomedical applications / K. Y. Lee, D. J. Mooney // *Progress in Polymer Science.* – 2012. – Vol. 37. – № 1. – P. 106-126.
128. Zhang, H. Preparation of alginate-based biomaterials and their applications in biomedicine / H. Zhang, J. Cheng, Q. Ao // *Marine Drugs.* – 2021. – Vol. 19. – № 5. – P. 264.
129. Structures, properties and applications of alginates / R. Abka-khajouei, L. Tounsi, N. Shahabi [et al.] // *Marine Drugs.* – 2022. – Vol. 20. – № 6. – P. 364.
130. Structures, properties, and bioengineering applications of alginates and hyaluronic acid / S. Zhang, J. Dong, R. Pan [et al.] // *Polymers.* – 2023. – Vol. 15. – № 9. – P. 2149.
131. Progress in research on metal ion crosslinking alginate-based gels / Y. Wang, Z. Shen, H. Wang [et al.] // *Gels.* – 2024. – Vol. 11. – № 1. – P. 16.
132. Sun, J. Alginate-based biomaterials for regenerative medicine applications / J. Sun, H. Tan // *Materials.* – 2013. – Vol. 6. – № 4. – P. 1285-1309.
133. Advances in alginate encapsulation of pancreatic islets for immunoprotection in type 1 diabetes / D. Chaudhary, T. T. Nguyen, S. Yook [et al.] // *Journal of Pharmaceutical Investigation.* – 2023. – Vol. 53. – № 5. – P. 601-626.

134. Alginate-based hydrogels and scaffolds for biomedical applications / S. Lj. Tomić, M. M. Babić Radić, J. S. Vuković [et al.] // *Marine Drugs*. – 2023. – Vol. 21. – № 3. – P. 177.
135. A narrative review of bioactive hydrogel microspheres: ingredients, modifications, fabrications, biological functions, and applications / H. Li, L. Yu, Z. Li [et al.] // *Small*. – 2025. – Vol. 21. – № 25. – P. 2500426.
136. Comparative investigation of the binding characteristics of poly-L-lysine and chitosan on alginate hydrogel / Y. Ren, H. Xie, X. Liu [et al.] // *International Journal of Biological Macromolecules*. – 2016. – Vol. 84. – P. 135-141.
137. Darrabie, M. D. Characteristics of Poly-L-Ornithine-coated alginate microcapsules / M. D. Darrabie, W. F. Kendall, E. C. Opara // *Biomaterials*. – 2005. – Vol. 26. – № 34. – P. 6846-6852.
138. Biocompatibility and physicochemical characteristics of alginate – polycation microcapsules / S. K. Tam, S. Bilodeau, J. Dusseault [et al.] // *Acta Biomaterialia*. – 2011. – Vol. 7. – № 4. – P. 1683-1692.
139. Adsorption of human immunoglobulin to implantable alginate-poly-L-lysine microcapsules: Effect of microcapsule composition / S. K. Tam, B. J. De Haan, M. M. Faas [et al.] // *Journal of Biomedical Materials Research Part A*. – 2009. – Vol. 89A. – № 3. – P. 609-615.
140. Clinical benefit of islet xenotransplantation for the treatment of type 1 diabetes / S. Matsumoto, A. Abalovich, C. Wechsler [et al.] // *EBioMedicine*. – 2016. – Vol. 12. – P. 255-262.
141. Microbiological safety of the first clinical pig islet xenotransplantation trial in New Zealand / S. Wynyard, D. Nathu, O. Garkavenko [et al.] // *Xenotransplantation*. – 2014. – Vol. 21. – № 4. – P. 309-323.
142. Regenerative medicine and endocrinology: advanced cell therapies for diabetes / Z. Ghezelayagh, Y. Tahamtani, M. Valizadeh [et al.] // *Interdisciplinary Advances in Endocrinology*. – Singapore: Springer Nature Singapore, 2025. – P. 55–69.

143. Advancements in human embryonic stem cell research: clinical applications and ethical issues / S. J. Park, Y. Y. Kim, J. Y. Han [et al.] // *Tissue Engineering and Regenerative Medicine*. – 2024. – Vol. 21. – № 3. – P. 379-394.
144. Butler, P. C. Reversing type 1 diabetes with stem cell-derived islets: a step closer to the dream? / P. C. Butler, E. A. M. Gale // *Journal of Clinical Investigation*. – 2022. – Vol. 132. – № 3. – P. e158305.
145. Ma, C. Pluripotent stem cell-derived cell therapy for the treatment of type 1 diabetes / C. Ma, J. Lu // *American Journal of Student Research*. – 2025. – P. 303-310.
146. Novocell. A single-center phase i/ii study of peg-encapsulated islet allografts implanted in patients with type i diabetes: clinical trial registration NCT00260234 / Novocell // *ClinicalTrials.gov: офиц. сайт*. – 2014. – URL: <https://clinicaltrials.gov/study/NCT00260234> (дата обращения: 29.01.2026).
147. No PERV transmission during a clinical trial of pig islet cell transplantation / V. A. Morozov, S. Wynyard, S. Matsumoto [et al.] // *Virus Research*. – 2017. – Vol. 227. – P. 34-40.
148. Otsuka Pharmaceutical Factory, Inc. A phase i/iiia, single site, open-label, ascending dose study to evaluate the safety and efficacy of OPF-310 [encapsulated porcine islet cells for xenotransplantation] in subjects with type 1 diabetes mellitus: clinical trial NCT06575426 / Otsuka Pharmaceutical Factory, Inc. // *ClinicalTrials.gov: офиц. сайт*. – 2025. – URL: <https://clinicaltrials.gov/study/NCT06575426> (дата обращения: 29.01.2026).
149. Cliniques universitaires Saint-Luc – Université Catholique de Louvain. A monocentre phase 1 trial to assess a monolayer cellular device in the treatment of type 1 diabetes: clinical trial NCT00790257 / Cliniques universitaires Saint-Luc – Université Catholique de Louvain // *ClinicalTrials.gov: офиц. сайт*. – 2018. – URL: <https://clinicaltrials.gov/study/NCT00790257> (дата обращения: 29.01.2026).
150. Keymeulen B. Functional survival of beta cell allografts after transplantation in the peritoneal cavity of non-uremic type 1 diabetic patients: clinical trial NCT01379729 / B. Keymeulen // *ClinicalTrials.gov: офиц. сайт*. – 2013. – URL: <https://clinicaltrials.gov/study/NCT01379729> (дата обращения: 29.01.2026).

151. Current challenges in microcapsule designs and microencapsulation processes: a review / B. T. Lobel, D. Baiocco, M. Al-Sharabi [et al.] // *ACS Applied Materials & Interfaces*. – 2024. – Vol. 16. – № 31. – P. 40326-40355.
152. Klopfleisch, R. The pathology of the foreign body reaction against biomaterials / R. Klopfleisch, F. Jung // *Journal of Biomedical Materials Research Part A*. – 2017. – Vol. 105. – № 3. – P. 927-940.
153. Polymer coatings of cochlear implant electrode surface – An Option for Improving Electrode-Nerve-Interface by Blocking Fibroblast Overgrowth / C. Hadler, P. Aliuos, G. Brandes [et al.] // *Plos One*. – 2016. – Vol. 11. – № 7. – P. e0157710.
154. Surface and anti-fouling properties of a polyampholyte hydrogel grafted onto a polyethersulfone membrane / W. Zhang, Z. Yang, Y. Kaufman [et al.] // *Journal of Colloid and Interface Science*. – 2018. – Vol. 517. – P. 155-165.
155. Патент RU 2 822 875 C1 Российская Федерация, МПК А61К 35/39, А61К 47/32, А61К 47/36. Способ приготовления микрокапсул с островками Лангерганса и микрокапсула по предложенному способу: № RU2822875C1. – заявл. 25.12.2023: опубл. 15.07.2024 / Васильчикова Е. А., Ермакова П. С., Чесноков С. А. [и др.] // *patenton*. Google: официальный сайт. URL: <https://patenton.ru/patent/RU2822875C1> (дата обращения: 14.01.2026).
156. Schweicher, J. Membranes to achieve immunoprotection of transplanted islets / J. Schweicher // *Frontiers in Bioscience*. – 2014. – Vol. 19. – № 1. – P. 49.
157. Radiopaque alginate microcapsules for x-ray visualization and immunoprotection of cellular therapeutics / B. P. Barnett, D. L. Kraitchman, C. Lauzon [et al.] // *Molecular Pharmaceutics*. – 2006. – Vol. 3. – № 5. – P. 531-538.
158. Kendall W. F. polymeric materials for perm-selective coating of alginate microbeads / W. F. Kendall, E. C. Opara // *Cell microencapsulation: methods in molecular biology* / ed. E. C. Opara. – New York, NY: Humana Press, 2017. – P. 95-109.
159. In vivo selection of biocompatible alginates for islet encapsulation and subcutaneous transplantation / S. Vériter, J. Mergen, R.-M. Goebbels [et al.] // *Tissue Engineering Part A*. – 2010. – Vol. 16. – № 5. – P. 1503-1513.

160. Design of a vascularized synthetic poly(ethylene glycol) macroencapsulation device for islet transplantation / J. D. Weaver, D. M. Headen, M. D. Hunckler [et al.] // *Biomaterials*. – 2018. – Vol. 172. – P. 54–65.
161. Probing of new polymer-based microcapsules for islet cell immunoisolation / P. Ermakova, E. Vasilchikova, M. Baten'kin [et al.] // *Polymers*. – 2024. – Vol. 16. – № 17. – P. 2479.
162. Characterization of polyethylene glycol--reinforced alginate microcapsules for mechanically stable cell immunoisolation / C. A. Verheyen, L. Morales, J. Sussman [et al.] // *Macromolecular Materials and Engineering*. – 2019. – Vol. 304. – № 4. – P. 1800679.
163. Биоинженерный трансплантат на основе инкапсулированных островков Лангерганса / П.С. Ермакова, Е.А. Васильчикова, М.А. Батенькин [и др.]. // *Сборник тезисов Национального Конгресса по регенеративной медицине. Морфология*. – 2024. – С. 331-332.
164. Fresh look at islet isolation from rabbit pancreases / E. Vasilchikova, P. Ermakova, A. Bogomolova [et al.] // *International Journal of Molecular Sciences*. – 2024. – Vol. 25. – № 19. – P. 10669.
165. In vitro and in vivo testing of decellularized lung and pancreas matrices as potential islet platforms / A. Bogomolova, P. Ermakova, A. Potapov [et al.] // *International Journal of Molecular Sciences*. – 2025. – Vol. 26. – № 14. – P. 6692.
166. Тотальная панкреатэктомия с аутотрансплантацией островков поджелудочной железы (ТРИАТ) как способ лечения хронического идиопатического панкреатита: анализ первого опыта / В.Е. Загайнов, Д.М. Кучин, А.В. Кашина [и др.] // *Современные технологии в медицине*. – 2024. – Т. 16. – № 6. – С. 44-59.
167. Выделение островковых клеток из поджелудочной железы после панкреатэктомии. Показания, методика, оценка результатов / В.Е. Загайнов, Д.М. Кучин, П.С. Ермакова [и др.] // *Анналы хирургической гепатологии*. – 2022. – Т. 27. – № 3. – С. 46-54.

168. Создание микроинкапсулирующей технологии для защиты эндокринных клеток поджелудочной железы при трансплантации / П.С. Ермакова, А.Ю. Богомолова, Н.У. Наралиев [и др.]. // Сборник тезисов Национального Конгресса по регенеративной медицине. Гены и Клетки. – 2022. – Т. 17. – № 3. – С. 85.
169. Contrast-free FLIM reveals metabolic changes in pathological islets of Langerhans / P. Ermakova, A. Kashirina, I. Kornilova [et al.] // International Journal of Molecular Sciences. – 2022. – Vol. 23. – № 22. – P. 13728.
170. The effect of diabetes mellitus type 1 on the energy metabolism of hepatocytes: multiphoton microscopy and fluorescence lifetime imaging / S. Rodimova, N. Bobrov, A. Mozherov [et al.] // International Journal of Molecular Sciences. – 2023. – Vol. 24. – № 23. – P. 17016.
171. Selection of implantation sites for transplantation of encapsulated pancreatic Islets / H. Zhu, W. Li, Z. Liu [et al.] // Tissue Engineering. Part B, Reviews. – 2018. – Vol. 24. – № 3. – P. 191-214.
172. Alginate–Poly [2-(methacryloyloxy) ethyl] trimethylammonium chloride (P3METAC) immunoisolating capsules prolong the viability of pancreatic islets in vivo / P. Ermakova, E. Vasilchikova, A. Potapov [et al.] // Biomedicines. – 2024. – Vol. 12. – № 11. – P. 2573.
173. Long-term efficacy and safety of porcine islet macrobeads in nonimmunosuppressed diabetic cynomolgus macaques / R. W. Holdcraft, M. J. Graham, M. A. Bemrose [et al.] // Xenotransplantation. – 2022. – Vol. 29. – № 3. – P. e12747.
174. Meyer, T. Xenogeneic islet transplantation of microencapsulated porcine islets for therapy of type I diabetes: long-term normoglycemia in STZ-diabetic rats without immunosuppression / T. Meyer, B. Höcht, K. Ulrichs // Pediatric Surgery International. – 2008. – Vol. 24. – № 12. – P. 1375-1378.
175. Peritoneal implantation of macroencapsulated porcine pancreatic islets in diabetic rats ameliorates severe hyperglycemia and prevents retraction and simplification of hippocampal dendrites / A. M. Magariños, K. Jain, E. D. Blount [et al.] // Brain Research. – 2001. – Vol. 902. – № 2. – P. 282-287.

176. Long-Term normoglycemia in rats receiving transplants with encapsulated islets / A. Omer, V. Duvivier-Kali, J. Fernandes [et al.] // *Transplantation*. – 2005. – Vol. 79. – № 1. – P. 52-58.
177. Sealed Envelope Ltd. Power calculator for continuous outcome superiority trial // Sealed Envelope: офиц. сайт. – 2012. – URL: <https://www.sealedenvelope.com/power/continuous-superiority/> (дата обращения: 14.01.2026).
178. Van Raamsdonk, J. M. Osmotic pressure test: A simple, quantitative method to assess the mechanical stability of alginate microcapsules / J. M. Van Raamsdonk, P. L. Chang // *Journal of Biomedical Materials Research*. – 2001. – Vol. 54. – № 2. – P. 264-271.
179. Advances on alginate use for spherification to encapsulate biomolecules / C. Bennacef, S. Desobry-Banon, L. Probst [et al.] // *Food Hydrocolloids*. – 2021. – Vol. 118. – P. 106782.
180. Bajpai, S. K. Investigation of swelling/degradation behaviour of alginate beads crosslinked with Ca²⁺ and Ba²⁺ ions / S. K. Bajpai, S. Sharma // *Reactive and Functional Polymers*. – 2004. – Vol. 59. – № 2. – P. 129-140.
181. Ching, S. H. Alginate gel particles – A review of production techniques and physical properties / S. H. Ching, N. Bansal, B. Bhandari // *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. – 2017. – Vol. 57. – № 6. – P. 1133-1152.
182. Модель формирования стрептозотоцин-индуцированного диабета на крупных животных с оценкой ее эффективности и стабильности / П.С. Ермакова, Л.А. Луговая, Е.А. Васильчикова [и др.] // *Сахарный диабет*. – 2025. – Т. 28. – № 2. – С. 111-123.
183. Materials strategies to overcome the foreign body response / X. Zhou, Y. Wang, J. Ji [et al.] // *Advanced Healthcare Materials*. – 2024. – Vol. 13. – № 18. – P. 2304478.
184. Biomaterials: foreign bodies or tuners for the immune response? / E. Mariani, G. Lisignoli, R. M. Borzì [et al.] // *International Journal of Molecular Sciences*. – 2019. – Vol. 20. – № 3. – P. 636.

185. Ma, X. Generation of alginate-poly-l-lysine-alginate (APA) biomicrocapsules: the relationship between the membrane strength and the reaction conditions / X. Ma, I. Vacek, A. Sun // *Artificial Cells, Blood Substitutes, and Biotechnology*. – 1994. – Vol. 22. – № 1. – P. 43-69.
186. Xenotransplantation of microencapsulated fetal rat islets / M. Krestow, Z. P. Lum, I. T. Tai [et al.] // *Transplantation*. – 1991. – Vol. 51. – № 3. – P. 651-655.
187. Darabbie, M. D. Determination of the mechanical strength of microcapsules / M. D. Darabbie, E. C. Opara // *Cell Microencapsulation: Methods and Protocols* / ed. E. C. Opara. – New York, NY: Springer, 2017. – P. 111-118.
188. Polymerized laminin incorporation into alginate-based microcapsules reduces pericapsular overgrowth and inflammation / C. Leal-Lopes, G. Grazioli, T. R. Mares-Guia [et al.] // *Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine*. – 2019. – Vol. 13. – № 10. – P. 1912-1922.
189. Systematic study of alginate-based microcapsules by micropipette aspiration and confocal fluorescence microscopy / R. M. Kleinberger, N. A. D. Burke, K. Dalnoki-Veress [et al.] // *Materials Science and Engineering: C*. – 2013. – Vol. 33. – № 7. – P. 4295-4304.
190. Quantitative study of the production and properties of alginate/poly-L-lysine microcapsules / R. Gugerli, E. Cantana, C. Heinzen [et al.] // *Journal of Microencapsulation*. – 2002. – Vol. 19. – № 5. – P. 571-590.
191. Encapsulation of human islets in novel inhomogeneous alginate- Ca^{2+} / Ba^{2+} Microbeads: in vitro and in vivo function / M. Qi, B. L. Strand, Y. Mørch [et al.] // *Artificial Cells, Blood Substitutes, and Biotechnology*. – 2008. – Vol. 36. – № 5. – P. 403-420.
192. Improved human islets' viability and functionality with mesenchymal stem cells and arg-gly-asp tripeptides supplementation of alginate micro-encapsulated islets in vitro / C. Laporte, E. Tubbs, M. Pierron [et al.] // *Biochemical and Biophysical Research Communications*. – 2020. – Vol. 528. – № 4. – P. 650-657.

193. Effect of Streptozotocin-Induced Type 1 Diabetes Mellitus on Contraction and Calcium Transport in the Rat Heart / F. C. Howarth, L. AlKury, M. Smail [et al.]. // *JSM Diabetol. Manag.* – 2017. – Vol. 2. – P. 1004.
194. Pinheiro, L. S. Protocol of insulin therapy for streptozotocin-diabetic rats based on a study of food ingestion and glycemic variation / L. S. Pinheiro, A. D. de Melo, A. E. Andreazzi // *Scand. J. Lab. Anim. Sci.* – 2011. – Vol. 38. – № 2.
195. Diabetic rats and mice are resistant to porcine and human insulin: flawed experimental models for testing islet xenografts / A. R. Pepper, C. Gall, D. M. Mazzuca [et al.] // *Xenotransplantation.* – 2009. – Vol. 16. – № 6. – P. 502-510.
196. Recovery of islet β -Cell function in streptozotocin- induced diabetic mice / D. Yin, J. Tao, D. D. Lee [et al.] // *Diabetes.* – 2006. – Vol. 55. – № 12. – P. 3256-3263.
197. Pancreatic islet transplantation: current advances and challenges / Q. Wang, Y. Huang, L. Liu [et al.] // *Frontiers in Immunology.* – 2024. – Vol. 15. – Art. 1391504.
198. Rajab, A. Islet Transplantation: Alternative Sites / A. Rajab // *Current Diabetes Reports.* – 2010. – Vol. 10, № 5. – P. 332–337.
199. Hyaluronic acid/collagen hydrogel as an alternative to alginate for long-term immunoprotected islet transplantation / S. Harrington, J. Williams, S. Rawal [et al.] // *Tissue Engineering Part A.* – 2017. – Vol. 23. – № 19-20. – P. 1088-1099.
200. Improved methods for the isolation and purification of porcine islets / C. J. Swanson, B. J. Olack, D. Goodnight [et al.] // *Human Immunology.* – 2001. – Vol. 62. – № 7. – P. 739-749.
201. From insulin injections to islet transplantation: An overview of the journey / M. B. Paget, H. E. Murray [et al.] // *Diabetes, Obesity and Metabolism.* – 2022. – Vol. 24. – № S1. – P. 5-16.
202. A practical guide to rodent islet isolation and assessment revisited / K. L. Corbin, H. L. West, S. Brodsky [et al.] // *Biological Procedures Online.* – 2021. – Vol. 23. – P. 7.
203. Long-term function of islets encapsulated in a redesigned alginate microcapsule construct in omentum pouches of immune-competent diabetic rats / R. Pareta, J. P. McQuilling, S. Sittadjody [et al.] // *Pancreas.* – 2014. – Vol. 43. – № 4. – P. 605-613.

204. Extracellular matrix inclusion in immunoisolating alginate-based microcapsules promotes longevity, reduces fibrosis, and supports function of islet allografts in vivo / R. Kuwabara, T. Qin, L. Alberto Llacua [et al.] // *Acta Biomaterialia*. – 2023. – Vol. 158. – P. 151-162.
205. Five-year follow-up after clinical islet transplantation / E. A. Ryan, B. W. Paty, P. A. Senior [et al.] // *Diabetes*. – 2005. – Vol. 54, № 7. – P. 2060–2069.
206. Enzymes for pancreatic islet isolation impact chemokine-production and polarization of insulin-producing β -cells with reduced functional survival of immunoisolated rat islet-allografts as a consequence / P. de Vos, A. M. Smink, G. Paredes [et al.] // *PloS One*. – 2016. – Vol. 11, № 1. – Art. e0147992.
207. Damage to porcine islets of Langerhans after exposure to human blood in vitro, or after intraportal transplantation to cynomolgus monkeys: protective effects of sCR1 and heparin / W. Bennet, B. Sundberg, T. Lundgren [et al.] // *Transplantation*. – 2000. – Vol. 69, № 5. – P. 711–719.
208. The interaction between primate blood and mouse islets induces accelerated clotting with islet destruction / L. Badet, T. Titus, E. Metzen [et al.] // *Xenotransplantation*. – 2002. – Vol. 9, № 2. – P. 91–96.
209. Long-term graft function of adult rat and human islets encapsulated in novel alginate-based microcapsules after transplantation in immunocompetent diabetic mice / S. Schneider, P. J. Feilen, F. Brunnenmeier [et al.] // *Diabetes*. – 2005. – Vol. 54, № 3. – P. 687–693.
210. Investigating immunomodulatory biomaterials for preventing the foreign body response / A. Kim, M. A. Downer, C. E. Berry [et al.] // *Bioengineering*. – 2023. – Vol. 10. – № 12. – P. 1411.
211. Advanced strategies to thwart foreign body response to implantable devices / S. Capuani, G. Malgir, C. Y. X. Chua [et al.] // *Bioengineering & Translational Medicine*. – 2022. – Vol. 7, № 3. – Art. e10300.
212. ECM-based bioactive microencapsulation significantly improves islet function and graft performance / S. Krishtul, M. Skitel Moshe, I. Kovrigina [et al.] // *Acta Biomaterialia*. – 2023. – Vol. 171. – P. 249–260.

213. One-Step aminomalononitrile-based coatings containing zwitterionic copolymers for the reduction of biofouling and the foreign body response / W.-H. Chen, T.-Y. Liao, H. Thissen [et al.] // ACS Biomaterials Science & Engineering. – 2019. – Vol. 5, № 12. – P. 6454–6462.
214. Enhancement of subcutaneous islet transplant performance by collagen 1 gel / A. French, J. Hollister-Lock, B. A. Sullivan [et al.] // Cell Transplantation. – 2024. – Vol. 33. – Art. 09636897241283728.
215. Экспериментальная имплантация тканеинженерной конструкции поджелудочной железы / Г. Н. Скалецкая, Н. Н. Скалецкий, Л. А. Кирсанова [и др.] // Вестник трансплантологии и искусственных органов. – 2019. – Т. 21, № 2. – С. 104–111.
216. Kuttler, B. Long-term culture of islets abrogates cytokine-induced or lymphocyte-induced increase of antigen expression on β cells / B. Kuttler, A. Hartmann, H. Wanka // Transplantation. – 2002. – Vol. 74. – № 4. – P. 440-445.
217. Comparative Study on Biologic and Immunologic Characteristics of the Pancreas Islet Cell Between 24°C and 37°C Culture in the Rat / S. C. Kim, D. J. Han, I. H. Kim [et al.] // Transplantation Proceedings. – 2005. – Vol. 37. – № 8. – P. 3472-3475.