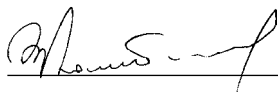


**МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ
РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ**

УТВЕРЖДАЮ

Первый заместитель министра



В.В. Колбанов

25 ноября 2003 г.

Регистрационный № 49–0303

**СПОСОБ ПОВЫШЕНИЯ УСТОЙЧИВОСТИ
КСЕНОГЕННЫХ ОСТРОВКОВЫХ КЛЕТОК
К РЕАКЦИЯМ ОТТОРЖЕНИЯ
В ОРГАНИЗМЕ РЕЦИПИЕНТА**

Инструкция по применению

Учреждение-разработчик: Белорусский государственный медицинский университет

Авторы: проф. С.И. Третьяк, В.А. Горанов, доц. А.В. Прохоров

ПОКАЗАНИЯ К ПРИМЕНЕНИЮ

Показанием к применению описываемого метода являются все случаи трансплантации β -клеток, включающие непосредственный контакт данных клеток с сывороткой крови реципиента (внутрисосудистая трансплантация в макрокапсулах, трансплантация в русло печеночной артерии, трансплантация в приспособления с дополнительной микроваскуляризацией и др.).

Клеточная биомасса, необходимая для трансплантации, может быть получена в на базе специализированных лабораторий по цитотехнологии при высших учебных медицинских учреждениях, имеющих при себе виварии, а также в цитологических лабораториях крупных клинических центров. В ином случае следует направлять заявку по форме № 1 в ЦНИЛ БГМУ для получения соответствующего материала.

ПЕРЕЧЕНЬ НЕОБХОДИМОГО ОБОРУДОВАНИЯ, РЕАКТИВОВ И МАТЕРИАЛОВ

Основные материалы и оборудование

1. Автоклав.
2. Автоматические микропипетки со стерильными наконечниками.
3. Анализатор иммуноферментный АИФ-340 или мультискан.
4. Весы аналитические.
5. Весы торсионные.
6. Вытяжной шкаф с ламинарным потоком для культуры клеток (класса 2).
7. Инструменты лабораторные: пинцеты, ножницы, зажимы.
8. Иономер (рН-121).
9. Микроскоп инвертированный.
10. Пипетки стеклянные на 1, 5, 10 мл.
11. Посуда лабораторная (чашки Петри, бутылки, колбы).
12. Пробирки стерильные центрифужные с крышками.
13. CO₂-инкубатор.
14. Стекла предметные и покровные.
15. Стерильная клейкая лента для заклеивания культуральных панелей.
16. Стерильные плоскодонные 96-луночные пластиковые планшеты.

17. Стерильные стеклянные флаконы для культуры клеток.
18. Термостат регулируемый водяной.
19. Флаконы емкостью 25, 50 мл.
20. Холодильник (-20°C , $+4^{\circ}\text{C}$).
21. Центрифуга на 1–5 тыс. об./мин.
22. Центрифужные пластиковые пробирки объемом 0,5–10,0 мл.
23. Шприцы.
24. Штативы (для фиксации флаконов).

Основные реактивы

1. Нерес (буфер).
2. Альбумин.
3. Антибиотики: гентамицин, пенициллин, стрептомицин.
4. Глюкоза (40% раствор).
5. Коллагеназа (Sigma-1).
6. Нейтральный красный (раствор 0,1%).
7. Нейтральный красный 1%.
8. Перкол (фиколл) — раствор (1020).
9. Раствор дитизона (5%).
10. Раствор Хенкса (pH 7,4).
11. Селективные среды: PPL0, тиогликолевая среда, среда Сабуро.
12. Силиконовое масло.
13. Среда культуральные (RPMI-1640, 199).
14. Сыворотка крови эмбрионов крупного рогатого скота.
15. Трипановый синий.
16. Физиологический раствор.
17. Этиловый спирт (этанол, ГОСТ 5962–67).

ТЕХНОЛОГИЯ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ МЕТОДА

Получение клеточного материала

Новорожденных кроликов забивают путем декапитации. Поджелудочную железу новорожденных кроликов извлекают в стерильных условиях и переносят в стерильную чашку Петри, в раствор с антибиотиками (пенициллин — 100 ЕД/мл, стрептомицин — 100 мкг/мл). Удаляют капсулу, прослойки соединительной ткани с кровеносными сосудами и крупными разветвлениями протоков.

Декапсулированную железу переносят в глубокое часовое стекло и разрезают на фрагменты размером 0,1–2 мм, которые заливают 15% раствором коллагеназы на физиологическом растворе и инкубируют при температуре 37° С в течение 40 мин при периодическом встряхивании (первая фракция). В том случае, если на дне остаются несепарированные фрагменты, их повторно сепарируют с помощью 15% раствора коллагеназы в течение 40 мин при температуре 37° С (Шумаков В.И. и соавт., 1981). Вышеуказанные фракции объединяют, полученную суспензию отмывают стерильной средой 199 дважды и переносят для дальнейшей сепарации в градиент стерильного перкола. Дальнейшее разделение клеток проводят на перколе путем центрифугирования при 1200 g. Клетки собирают на градиенте перкола, отмывают с физиологическим раствором, доводят до конечной концентрации 450–550 тыс. клеток/мл с помощью соответствующего количества среды RPMI-1640 с 10% нативной сыворотки крупного рогатого скота и помещают в культуральные пластиковые флаконы с ростовой средой, которые затем помещают в CO₂-инкубатор (5% CO₂) и инкубируют при 37° С. Через 2 сут после прикрепления клеток следует сменить ростовую среду. В дальнейшем смена среды проводится 1 раз в два дня или при необходимости чаще. Наблюдения до момента использования культуры (14–20-е сутки) для трансплантации должны указывать на то, что культура во флаконах находится в стационарной фазе роста, то есть при наблюдении в течение 3 сут не происходит микроскопически визуализируемого изменения состава клеточных элементов. С этого момента часть культуры может быть отобрана для дальнейших тестов.

Обработка клеток диабетопротекторами

За 6 дней до трансплантации в емкости, где культивируются клетки, вносятся стерильные растворы диабетопротекторов (рабочие разведения 1:100), приготовленных на Нерес-буфере никотинамида (в конечной концентрации 10 ммоль) и сульфата цинка (в конечной концентрации 10 мг/мл). При необходимости смены среды одновременно следует восстанавливать уровни диабетопротекторов в среде культивирования. Следует вносить действующие реагенты в среду только в том случае, если не наблюдается признаков «старения» культуры (открепления от подложки и т.п.), а также,

если культуральная среда не имеет ярко-желтой окраски, связанной с длительной инкубацией и недостаточно частой ее сменой.

Оценка эффективности обработки β -клеток комбинацией диабетопротекторов

Для оценки цитопротекторного эффекта рекомендуется использовать клеточную культуру, обогащенную с помощью проточного цитофлуориметра. Для этого используется культура β -клеток, полученная в стационарной фазе роста, как описано выше.

Приготовление суспензии β -клеток включает их отделение путем центрифугирования фрагментов монослоя в течение 5 мин при 250 g, затем клетки ресуспенсируют в 3 мл фосфатного буфера с pH 7,4 без Ca и Mg, содержащем версен в концентрации 3 ммоль, инкубируют в течение 20 мин. Их сортировку с выделением обогащенной культуры β -клеток осуществляют с применением проточного цитофлуориметра в стерильных условиях с гейтированием пула наиболее активной FAD-флуоресценции (Stassi R. et al., 1995).

Рекомендуется использовать режим раскапки клеток непосредственно в 96-луночный планшет с дальнейшим осаждением и сменной ростовой среды. В этом случае культура клеток готова для тестирования на 2-е сутки после обогащения.

Тест рекомендуется проводить с сывороткой крови потенциального реципиента с помощью метода этидиума бромида в разведении 50 мкг/мл. Тест позволяет прогнозировать выживаемость обработанных диабетопротекторами клеток в организме потенциального реципиента в ранний посттрансплантационный период.

Предварительно должна быть исследована кинетика накопления этидиума бромида в рабочей концентрации 50 мкг/мл в исследуемом материале. При этом для контрольных клеток определяется кривая быстрого накопления (при комнатной температуре) с выходом на плато через 40 с после добавления в среду культивирования. Определение количества этидиум-позитивных клеток осуществляют по методике F.M. Rossi и соавт. (1996), включающей инстилляцию этидиума бромида в среду культивирования клеток до конечной концентрации 0,01%. Уровень спонтанной гибели клеток, который наблюдается в культуре, не должен превышать 2% клеток в популяции за период наблюдения. В качестве позитивного конт-

роля может быть использован стрептозотоцин в нарастающих концентрациях (от 1 до 100 ммоль).

Эффективность применения комбинации диabetопротекторов подтверждается при не менее чем 10% различии между уровнями гибели клеток в обработанной и необработанной диabetопротекторами культурах, проэкспонированных с 25% сыворотки потенциального реципиента в течение не менее 72 ч.

ВОЗМОЖНЫЕ ОШИБКИ ПРИ ВЫПОЛНЕНИИ И ПУТИ ИХ ПРЕДУПРЕЖДЕНИЯ

Возможные ошибки при выполнении могут быть связаны со следующими факторами:

1. Низкое содержание β -клеток в тестируемой смеси.
2. Если используется сыворотка крови пациента с инсулинзависимым сахарным диабетом в период активной иммунологической агрессии к β -клеткам (1–3 года после момента манифестации заболевания). В наших экспериментах при наличии антител ассоциированной цитотоксичности, связанной с повышенным титром антител к тирозинфосфатазе-2, эффективность защиты β -клеток на этапе *in vitro* с помощью указанных диabetопротекторов была незначительна.
3. Если используется сыворотка крови пациента с инсулинзависимым сахарным диабетом в период интеркуррентных заболеваний с выраженными иммунологическими реакциями и при наличии сопутствующих заболеваний аутоиммунной природы (ревматические и др.).

Для предупреждения ошибок, указанных в п. 1 предлагается использовать клеточную культуру, обогащенную с помощью проточного цитофлуориметра до концентрации метаболически активных β -клеток не менее 90%.

Для предупреждения ошибок, указанных в пп. 2 и 3 рекомендуется одновременная постановка тестов с исключением красителя на нескольких сыворотках, полученных от пациентов с диабетом и здоровых лиц. Кроме того, рекомендуется предварительное дообследование реципиентов с тестированием иммунологических маркеров активации (CD25, CD71) и содержания в сыворотке крови антител к β -клеткам (анти ГДК 65, антиинсулярных, антител к тирозинфосфатазе-2).