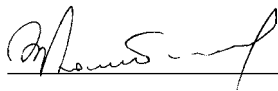


**МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ
РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ**

УТВЕРЖДАЮ

Первый заместитель министра



В.В. Колбанов

25 ноября 2003 г.

Регистрационный № 50-0303

**ПОДГОТОВКА КУЛЬТУРЫ
ОСТРОВКОВЫХ КЛЕТОК
ДЛЯ ТРАНСПЛАНТАЦИИ В КОНТЕЙНЕРАХ
С МИКРОПОРИСТОЙ СТЕНКОЙ**

Инструкция по применению

Учреждение-разработчик: Белорусский государственный медицинский университет

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

Трансплантация культуры β -клеток в сосудистое русло реципиента является методом лечения сахарного диабета и, по результатам клинических наблюдений, позволяет достигать стойкой компенсации диабета и длительно снижать потребность пациента в экзогенном инсулине (Третьяк С.И. и соавт., 2000). Особое внимание в этом случае следует уделять подготовке трансплантируемой культуры клеток и ее адекватной инкапсуляции, так как при помещении значительного количества островково-клеточных эквивалентов в сосудистое русло взаимодействие клеточной биомассы внутри трансплантата и с внутренней средой организма может происходить весьма интенсивно.

1. ПОКАЗАНИЯ К ПРИМЕНЕНИЮ

Показанием к применению описываемого метода является сахарный диабет 1-го типа в случаях возникновения трудно корригируемых состояний, мало поддающихся медикаментозному лечению (частые гипогликемические состояния, гипергликемии, периодически наблюдаемые на протяжении более чем 3 мес. при условии интенсивной инсулинотерапии, прогрессирующие ангио- и нейропатии).

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.

2. ПЕРЕЧЕНЬ НЕОБХОДИМОГО ОБОРУДОВАНИЯ, РЕАКТИВОВ И МАТЕРИАЛОВ

2.1. 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 (класс 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° С, +4° С).
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).

2.2. 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 (рН 7,4).
11. Селективные среды: PPLO, 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).

3. ТЕХНОЛОГИЯ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ МЕТОДА

При работе с культурами клеток следует четко выполнять методические инструкции для предотвращения микробной контаминации клеточных культур и защиты от контаминации культуральными материалами окружающего рабочего пространства¹. Вся работа должна проводиться в специальных стерильных помещениях или ламинарных боксах.

3.1. Получение материала для культивирования

На этапе подготовки животных для забора у них клеточного материала следует проводить тщательное ежедневное наблюдение за состоянием поголовья. Выявление в популяции кроликов животных с подозрением на вирусно-инфекционные заболевания, исключает возможность использования особей из данной популяции для нужд клеточной трансплантации на протяжении 3 мес. после элиминации больных и подозрительных в плане заболеваний животных.

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).

3.2. Выделение клеток

Вышеуказанные фракции объединяют, полученную суспензию отмывают стерильной средой 199 дважды и переносят для даль-

¹Аттестация перевиваемых клеточных линий — субстратов производства и контроля медицинских и иммунобиологических препаратов.— М., 1989. РД 42-28-10-89.

нейшей сепарации в градиент стерильного перкола. Дальнейшее разделение клеток производят 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 RPMI1640 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.

3.3. Культивирование клеток

Через 2 сут после прикрепления клеток следует сменить ростовую среду. В дальнейшем смена среды проводится один раз в два дня или при необходимости чаще. Культура, получаемая из поджелудочной железы новорожденных кроликов, состоит из двух основных фракций: флотирующей и прикрепленной (ко дну культурального флакона). Прикрепленная фракция представляет собой многочисленные очаги прикрепления культивируемых агрегатов клеток, вокруг которых формируются однослойные зоны роста эпителиальных клеток (среди них большинство составляют β -клетки). Флотирующая фракция представлена компактными сферическими образованиями, имеющими соединительнотканную строму и содержащими группы островковых клеток (преимущественно β -клеток) как в центральной, так и в периферической зонах. В процессе культивирования β -клетки, расположенные на периферии флотирующих культур, имеют склонность мигрировать к свободному краю культуры и отделяться от последнего. После оседания на дно культурального флакона вышедшие в среду β -клетки располагаются обычно на сети фибробластов, как на подложке, и начинают кооперироваться друг с другом, образуя дуплеты, триплеты и кластеры, при этом формируется гнездообразный (очаговый) монослой с эксцентрическими зонами роста. В наружной части зоны роста располагаются преимущественно мелкие полигональные клетки, внутреннюю занимают эпителиоподобные клетки более крупной формы с множественными оптически плотными гранулами. К моменту стабилизации монослоя (5–12-е сутки) подобное соотношение морфотипов клеток во многом сохраняется. Кроме

того, наблюдается независимое от их функциональной активности снижение зернистости в отдельных группах клеток. 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 с помощью осторожного пипетирования может быть отобрана для дальнейших тестов.

3.4. Проверка культуры на микробиологическую чистоту

Микробиологический и вирусологический контроль, а также контроль туморогенности проводится согласно методическим рекомендациям «Аттестация перевиваемых клеточных линий — субстратов производства и контроля медицинских и иммунобиологических препаратов» (1989, РД 42–28–10–89) и приказу МЗ РБ № 31. Для этого часть культуры и надосадочной жидкости должны быть отправлены в микробиологическую лабораторию. Кроме обследования, позволяющего исключить наличие в культуре бактериальной флоры, рекомендуется постановка тестов на селективных средах:

1. Контроль культуры β -клеток на цитопатогенные вирусы производится путем внесения пробной суспензии клеток в перевиваемые культуры клеток BGM (клетки почки обезьяны) и HeLa (раковые клетки человеческого происхождения). Необходимо проведение 3 пассажей исследуемого материала на средах для заключения об отсутствии деструкции клеток под действием цитопатогенных вирусов.

2. Контроль культуры на микоплазмы проводится с использованием селективной среды (PPLO) — 0,5% агар, приготовленный на ферментативном переваре сердечной мышцы.

3. Контроль культуры на микотические загрязнения проводят путем посева проб на питательные среды: питательный бульон с 0,3% глюкозой, тиогликолевая среда, среда Сабуро жидкая.

3.5. Тестирование культуры на туморогенность

Часть полученной суспензии клеток отбирают для тестирования на туморопластическую активность, для чего праймированным новорожденным белым мышам вводят циклоспорин подкожно и

внутрибрюшинно по 0,1 мл (в дозе 100 тыс. клеток). Контроль — культура HeLa. Животных наблюдают в течение 15 сут, после чего пунктируют брюшную полость с забором асцитической жидкости (если таковая имеется). Отсутствие узелковых образований в местах введения и отсутствие асцитической жидкости с недифференцированными клеточными элементами свидетельствует об отсутствии туморогенности культуры.

3.6. Оценка структурно-функциональной состоятельности культуры

3.6.1. Идентификация β -клеток

Для дифференцирования β -клеток в тестируемых культурах применяют дитизон (Mislser F., 1989). Для этого 5% раствор реагента (Sigma) вносят непосредственно в емкости с культурой, предназначенные для тестирования (в последующем данные емкости нельзя использовать как источник клеток для трансплантации). В течение 5 мин получают избирательную окраску β -клеток. Краситель специфически окрашивает инсулинсодержащий гранулярный аппарат живых β -клеток, образуя в них дитизонат цинка (красная зернистость), что наиболее выражено в кластероподобных β -клеточных структурах. Однако препарат невозможно сохранить вследствие нарушения пластических процессов в β -клетках и утраты цветности и гранулярности клеток со временем. Для сохранения максимального количества клеток, необходимых для трансплантации, рекомендуется проводить окраску во флаконах, в которых определяется наличие минимального количества клеток, либо в резервных флаконах. Окрашенные клетки представляют собой образования округлой формы с четкими границами и эксцентрично расположенным ядром. Большое увеличение позволяет убедиться в том, что окраску воспринимает гранулярный аппарат клеток и в гораздо меньшей степени — цитоплазма.

3.6.2. Идентификация высокофункциональных β -клеток

Для идентификации и подсчета высокофункциональных β -клеток используют антитела к инсулину, меченые флуоресцентными метками (Rieneck K. et al., 2000). Исследование проводят с помощью конфокального микроскопа с длиной волны возбуждения

488 нм (для FITS-меченых антител). Бета-клетки и клеточные кластеры, иммобилизовавшиеся в процессе культивирования на покровных стеклах, бережно отмывают от среды. Затем стекла помещают в раствор Перес-буфера (рН 7,4), содержащего 6,5 ммоль глюкозы и меченые антитела в концентрациях, рекомендованных фирмой-изготовителем (для антител фирмы Sigma I2018 рекомендованная концентрация составляет $8,8 \times 10^9$ моль⁻¹ (в рабочем разведении 1:1000), для конъюгирующих антител F1641 — 1:32) на срок не более 30 мин. После чего образцы вновь бережно отмывают от реагента со средой и сразу же исследуют с помощью микроскопа. В сбалансированной культуре количество клеток, воспринимающих зонд, составляет в среднем 30%.

3.6.3. Оценка метаболической активности β-клеток

Для тестирования клеток на проточном цитофлуориметре по методике R. Stassi et al. (1995) часть сепарированной культуры направляют в специализированную лабораторию. Тестирование позволяет идентифицировать метаболически активные β-клетки в случае, если их доля в суспензии составляет не менее 75%. Наблюдение ведется в режиме гейтирования субпопуляций, обладающих FAD-активностью. В культуре, пригодной для трансплантации, количество метаболически активных β-клеток должно составлять не менее 90%.

3.6.4. Оценка функциональной активности культуры

Методом, подтверждающим функциональную состоятельность популяции β-клеток, являются результаты тестирования клеток на инсулинпродуцирующую активность с помощью набора для определения иммунореактивного инсулина ХОП ИБОХ. В результате тестирования средняя активность инсулина в культуре (после полной смены среды и стимуляции клеток 5 ммоль глюкозой в течение суток) должна составлять не менее 1000 нмоль/л.

3.6.5. Оценка биосовместимости клеток культуры с организмом потенциального реципиента

Биологический тест с сывороткой (плазмой) крови потенциального реципиента проводят с помощью метода фотокolorиметрического определения доли разрушенных β-клеток с использованием

двойного позитивного контроля в неоднородной клеточной популяции (Горанов В.А., 1999). Тест позволяет прогнозировать выживаемость трансплантируемых клеток в организме потенциального реципиента в ранний посттрансплантационный период (1–3-и сутки) и уровень гибели клеток, обусловленный повреждающими эффектами гуморальных иммунных факторов (интерлейкины, комплемент, антитела и др.) в процессе первичной адаптации трансплантата.

Используют нейтральный красный, захватывающийся только живыми клетками, который освобождается из клеток при их разрушении. При этом в качестве точки отсчета принимают максимальный уровень выхода красителя в надосадочную жидкость (т.е. 100% разрушение всех клеток в образце, соответствующем положительному контролю). Рекомендуется использовать монослойную культуру β -клеток, выращенную в 96-луночном планшете. По истечении сроков культивирования в среду вносят нейтральный красный в конечной концентрации 0,1%, с которым клетки инкубируют в течение 30 мин. После отмывки красителя вносят исследуемый агент (рекомендуется использовать сыворотку крови реципиента в концентрации 25% со средой RPMI-1640). Разрушение клеток-мишеней вызывает выход красителя в надосадочную жидкость, где измеряемая оптическая плотность пропорциональна количеству разрушенных клеток. В качестве первого позитивного контроля используется стрептозотоцин в нарастающих концентрациях (от 1 до 100 ммоль). В этом случае выход калибровочной прямой на плато свидетельствует об элиминации большинства β -клеток (среднее значение показателей «в период плато» соответствует $97,8 \pm 0,3\%$ погибших β -клеток, что было подтверждено с помощью окраски альдегид-фуксином — специфическим маркером зернистости в β -клетках и тестами на иммунореактивный инсулин). При этом большинство клеток других типов остаются интактными. Более высокие концентрации стрептозотоцина вызывают переход плато в восходящую кривую, что свидетельствует о разрушении клеток остальных типов. В качестве второго позитивного контроля используют 0,05 моль уксусной кислоты на 50% этаноле, что приводит к полному разрушению всех видов клеток. Калибровочная кривая, построенная с использованием указанных контролей, позволяет

дифференцировать разрушение β -клеток в исследуемой клеточной популяции от клеток других типов присутствующих в исследуемых образцах, а благодаря второму позитивному контролю — исключить из исследования пробы с избыточным содержанием не- β -клеток. Данный метод позволяет определить долю исследуемых β -клеток среди других типов и с достаточной точностью определить токсичность агентов, действие которых проявляется в гибели β -клеток, в неоднородной клеточной популяции.

Оптическую плотность (ОП) полученных растворов определяют на спектрофотометре «Мультискан» при длине волны 540 нм. Вычисление доли погибших клеток осуществляют по формуле:

$$N(\%) = (D_n - D_0) / (D_k - D_0) \times 100,$$

где D_k — ОП, соответствующая точке позитивного отсчета (100% гибель β -клеток);

D_n — ОП красителя в исследуемом образце;

D_0 — ОП в лунках, содержащих только среду инкубации и исследуемый агент.

Для использования с целью трансплантации конкретному реципиенту мы не рекомендуем использовать культуры β -клеток, в которых в данном тесте доля погибших клеток более чем на 25% превышает долю клеток, погибших в тестах с сывороткой крови здоровых субъектов.

3.6.6. Оценка количества и жизнеспособности клеток

Часть культуры забирают для определения количества и контроля жизнеспособности путем микроскопии в камере Горяева с трипановым синим (0,1%). При этом количество жизнеспособных клеток не должно быть меньше 90%. Данное исследование рекомендуется проводить непосредственно перед заключением клеток в макрокапсулу.

3.7. Отбор культуры и подготовка для инкапсуляции

Отбор клеток из флаконов производится с помощью раствора трипсина. Рекомендуется приготавливать трипсин непосредственно перед обработкой клеток. Для этого культуры освобождают от ростовой среды, бережно отмывают с Нерес-буфером и заливают раствором трипсина (0,15%) с последующей инкубацией в течение

5 мин при 37° С. После чего клетки пипетируют и отмывают от реагента со средой RPMI-1640. Часть культуры забирают для контроля количества и жизнеспособности с помощью микроскопии в камере Горяева с трипановым синим (0,1%). В случае наличия крупных клеточных конгломератов клетки могут быть дополнительно сепарированы с помощью нейлонового фильтра с диаметром пор 40 мкм.

3.8. Помещение клеток в контейнер

Общий объем клеточной суспензии доводят до 2 мл с помощью центрифугирования и вводят в контейнер, предназначенный для трансплантации с помощью стерильного шприца.

Для герметизации капсулы используют стандартный анатомический пинцет, бранши которого разогревают над огнем спиртовой горелки и затем охлаждают (контроль — электрический термометр) до температуры 250° С. Затем края отверстия макрокапсулы сближают с некоторым усилием до полного сплавления. Контейнер должен находиться в свежей культуральной среде до момента помещения в организм реципиента не более 20 мин.