

КСЕНОТРАНСПЛАНТАЦИЯ КАК АЛЬТЕРНАТИВНЫЙ МЕТОД ЛЕЧЕНИЯ ИНСУЛИНЗАВИСИМОГО САХАРНОГО ДИАБЕТА

А В Прохоров, С. И. Третьяк, В. А Горанов, А. А. Глинник

2-я кафедра хирургических болезней (зав. - проф. СИ. Третьяк) Белорусского государственного медицинского университета, г. Минск

Введение

В работах отечественных и зарубежных исследователей убедительно показана прямая зависимость между степенью компенсации гликемии и развитием вторичных осложнений у больных инсулинзависимым сахарным диабетом (ИЗСД) [1, 9]. Несмотря на внедрение в клиническую практику современных препаратов инсулинзаместительной терапии, добиться стойкой и длительной нормализации метаболического обмена удается только у небольшого процента пациентов. В то же время развитие прогрессирующей диабетической нефропатии, сосудистых осложнений, гипо- и гипергликемических состояний составляют основную причину летальности в этой группе больных [1, 4, 8,9]

Успешная аллотрансплантация поджелудочной железы позволяет достичь достаточно длительной инсулиннезависимости нормогликемии, нормализации уровней гликолизированного гемоглобина, снизить летальность в группе пациентов с терминальной стадией диабетической нефропатии. Однако высокая смертность (15-30%), послеоперационные осложнения, постоянная иммуносупрессия, сохраняющийся аутоиммунитет в отношении донорского аллотрансплантата, высокая себестоимость (80—120тыс. долларов США в год) оставляют показания к этому вмешательству только у пациентов с уремией, нуждающихся в одновременной трансплантации почки [4, 8, 9].

В силу указанных обстоятельств и того, что эндокринная ткань железы составляет всего 1-2%, свободная островковая; трансплантация представляется наиболее рациональной и целесообразной альтернативой трансплантации целого органа. Несмотря на всю привлекательность клеточной терапии в лечении ИЗСД, отдаленные результаты этого метода остаются не вполне удовлетворительными. С 1990 по 1995 г. в мире было выполнено 177 аллотрансплантаций островков пациентам с I типом сахарного диабета, тем не менее только 7% больных достигли инсулин-независимости в течение года [6]. Неудачи клеточной трансплантации связаны с техническими трудностями выделения и культивирования островков, трансплантацией недостаточного их количества, контринсулярным и токсическим действием иммуносупрессивных препаратов в отношении β -клеток, отторжением трансплантата и сохраняющейся аутоиммунной болезнью. Последние данные, представленные канадскими исследователями, свидетельствуют о значительном прогрессе в аллотрансплантаций островков и потенциальной возможности создания инсулин-независимости [7]. Следует отметить, что ограниченный успех интрапортальной аллотрансплантаций β -клеток связан преимущественно с массивной иммуносупрессивной терапией препаратами последнего поколения.

С целью продления жизни трансплантатов были предприняты попытки иммуноизоляции клеток путем их макро- и микроинкапсулирования. Микроинкапсуляция клеток в альгинат-полилизин или агарозу как в эксперименте, так и в клинической практике не дали ожидаемого долговременного результата из-за быстро развивающегося фиброза, нарушения питания и гибели β -клеток[5].

Нашими экспериментальными исследованиями было показано, что ткани, обладающие диффузионным типом питания, могут длительное время сохраняться в токе крови, как иммуногенной зоне, не подвергаясь реакции отторжения [3]. Используя механический принцип иммуноизоляции в экспериментальной модели аллоксанового диабета на собаках, было установлено, что алло- или ксеногенная культура островковых клеток, заключенная в полупроницаемую мембрану и помещенная в просвет артерии, полностью компенсирует экспериментальный диабет и сохраняет жизнеспособность (50-60% пересаженной культуры) более 3 лет [2].

Очень серьезным препятствием в развитии островковой аллотрансплантации является дефицит аллогенного эмбрионального и фетального материала. Даже используя современные методы культивирования клеток для одной трансплантации, требуется 2-4 взрослой донорской поджелудочной железы [5, 7]. Кроме того, следует учитывать юридические, этические и религиозные мотивы, затрудняющие получение человеческого донорского материала.

Материал и методы

В нашей экспериментальной и клинической работе мы пошли по пути использования ксеногенных источников островковых клеток. Основываясь на опыте НИИТ и ИО (г. Москва) и других исследователей [4], в течение 2001-2003 гг. нами выполнено 11 ксенотрансплантаций больным с ИЗСД. Длительность заболевания колебалась от 5 до 30 лет. Возраст больных составил 23—56 лет. Женщин было 5, мужчин - 6. Суточная потребность в инсулине составляла 40-62 Ед. Из 11 пациентов трое страдали панкреатогенным диабетом после перенесенного тотального панкреонекроза.

Несмотря на постоянное наблюдение эндокринолога, стационарное лечение до 5-6 раз в году, течение диабета было крайне нестабильное, с частыми гипо- и гипергликемическими состояниями. У всех пациентов имели место в той или иной степени явления нефропатии, ретинопатии, ангиопатии.

Источником культуры β -клеток у первых 6 пациентов были эмбрионы и новорожденные кролики. У остальных - плоды поросят. Культуру островковых клеток получали по методике Misler S. et al. (1981) в нашей модификации с последующим микробиологическим, вирусологическим и опухолевым тестированием. Функциональную активность культуры исследовали с помощью набора для определения иммунореактивного инсулина, а также световой микроскопией с использованием инвертированного микроскопа и прижизненной окраской инсулина дитизоном. Среднее количество островковых клеток для каждой трансплантации колебалось от 6 до 10 млн.

Культура клеток перед трансплантацией помещалась в макрокапсулу, изготовленную из полиамида и представляющую собой полупроницаемую мембрану со стандартизированным размером пор. Основные требования к материалу: хорошая диффузионная способность и проницаемость для трофогенов, биоинертность в отношении иммобилизованной в ней культуры клеток и крови, атромбогенность, сертификация материала и разрешение на его использование в инвазивной практике, прочность и эластичность. Для создания достаточной диффузии между кровью и полостью капсулы, а также для предотвращения лимфоцитарной и макрофагальной реакции на ксеночультуру оптимальным размером оказались поры диаметром 1—2 м. Размеры капсулы составили 12-15 мм в длину и 4-5 мм в диаметре.

Для уменьшения вероятности тромбоза трансплантацию капсулы с культурой (β -клеток) проводили в просвет артериального русла. Первой больной культурой

клеток была имплантирована в абдоминальный отдел аорты ниже отхождения почечных сосудов. Остальным пациентам - по разработанной нами методике - в глубокую артерию бедра с использованием аутовенозной ангиопластики.

До- и послеоперационный контроль эффективности ксенотрансплантации осуществляли на основании определения уровней С-пептида (C-Peptide Igma, Immunotech, Чехия), иммунореактивного инсулина (ШО-ИНС-ГЙМ251, Беларусь), сывороточного фруктозамина (Fructosamin kit, Rosh-diagnostics, Польша), а также суточных профилей гликемии и инсулинпотребности.

Результаты и обсуждение

Первые сутки послеоперационного периода у всех пациентов характеризовались значительным снижением уровней глюкозы крови вплоть до нормогликемии и значительным снижением инсулинпотребности до 6-16 Ед/сут. Такое резкое снижение инсулинпотребности мы связывали с вымыванием из капсулы «базального» инсулина. В последующие сутки гликемия нарастала с большими колебаниями уровней глюкозы и суточной инсулинпотребностью до 40-45 Ед. Наибольшие и плохо контролируемые колебания гликемии наблюдались у больных с аутоиммунной природой ИЗСД. Нестабильное течение диабета, скорее всего, было связано с адаптацией культуры клеток к новым условиям функционирования. Через 1,5-2 месяца после пересадки наблюдалась постепенная стабилизация течения диабета и снижение суточного уровня гликемии до 4,5-9,8 ммоль/л, а инсулинпотребности - до 25-32 Ед/сут (рис. 1).

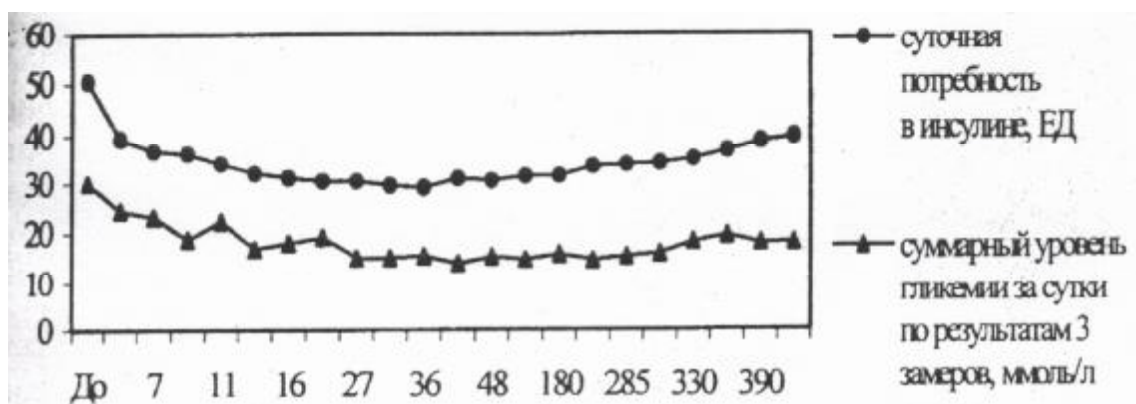


Рис.1. Суточная потребность в инсулине и суммарный уровень гликемии за сутки

В течение всего периода наблюдения эти показатели оставались стабильными и общее снижение инсулин-потребности достигало 60-65%

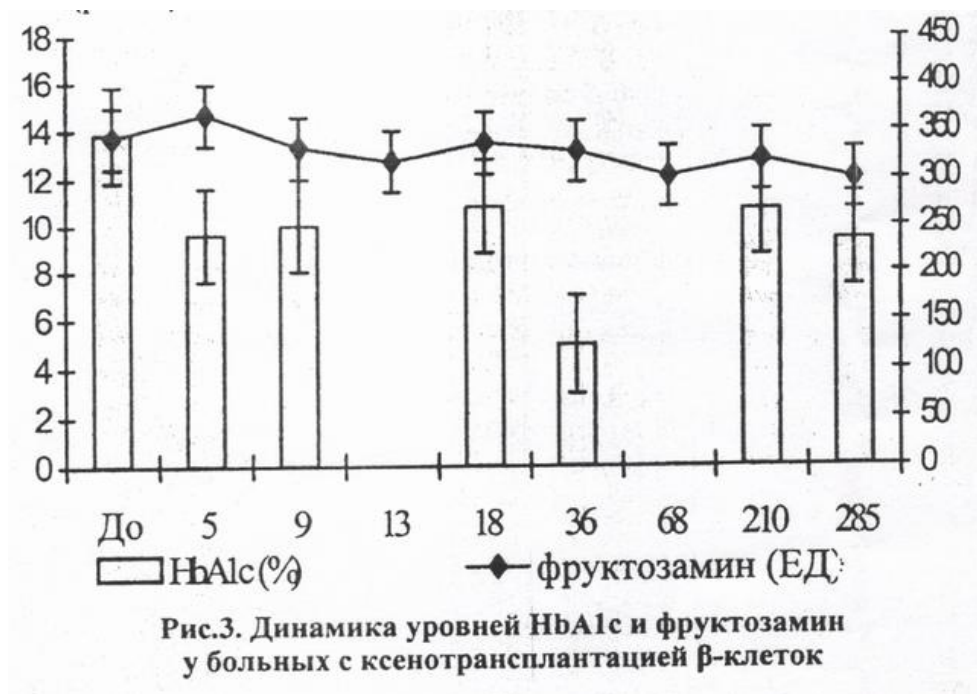
Одновременно со стабилизацией течения диабета значительно улучшалось состояние больных. Исчезала слабость, жажда, чувство страха перед возможным развитием гипогликемической комы. Через 6-8 месяцев больные отмечали увеличение массы тела на 3-5 кг.

О хорошем функционировании пересаженных клеток свидетельствовало постепенное увеличение уровня С-пептида (7 дней, 3, 6, 12, 18 месяцев), который с нулевого показателя до трансплантации повышался до $28 \pm 4,0$ нмоль/мл ($P < 0,05$), а при стимуляции - до $36 \pm 7,8$ нмоль/мл ($P < 0,05$). Максимальный подъем уровней С-пептида прямо коррелировал с клинической стабилизацией диабета, снижением

инсулинпотребности, суточной гликемии и достоверным повышением уровней иммунореактивного инсулина (рис. 2).



С течением времени наступало и достоверное снижение сывороточного фруктозамина как показателя гликирования белков(рис.3).



В послеоперационном периоде осложнения были отмечены у 2 пациентов. У одного больного, поступившего с выраженной нефропатией и явлениями ХПН, в течение 30 дней отмечалась лимфоррея. Во втором случае возникла несостоятельность аутовенозной ангиопластики и развитие ложной аневризмы

глубокой артерии бедра, что потребовало удаления капсулы с культурой клеток через 1,5 месяца после трансплантации. При этом инсулинпотребность, уменьшившаяся с 52 до 24 Ед в сутки после трансплантации, возвратилась к исходному показателю после удаления имплантата.

Две пациентки через 11 и 12 месяцев возвратились к прежним дозам экзогенного инсулина, хотя уровни тощакового и постпрандиального С-пептида остаются у них достаточно высокими до настоящего времени (в среднем 21 и 26 нмоль/л соответственно), что косвенно подтверждает функционирование трансплантатов.

К настоящему моменту максимальный срок наблюдения у 5 больных составил 1-1,8 года, у остальных - до года.

Всем пациентам через 2 недели, 30 дней, 6, 12 месяцев и 1,5 года выполнялась контрольная сонография и доплерография сосудов в зоне трансплантации с целью инструментального подтверждения отсутствия тромбоза и достаточного кровотока. Признаков тромбообразования ни в одном случае отмечено не было. Скорость кровотока по общей бедренной артерии в среднем составляла 1,35 м/с, по глубокой артерии бедра в зоне трансплантации - 1,5 м/с.

Наиболее благоприятный результат был получен у пациентов с панкреатогенным инсулинзависимым диабетом и больных с нормальной массой тела. У них произошло максимальное снижение инсулинпотребности (до 70-80%) со стабильным уровнем гликемии. Благоприятный долгосрочный эффект трансплантации, скорее всего, связан с неиммунной природой диабета и низкой цитотоксичностью плазмы. К сожалению, не ясным остается идентичное течение посттрансплантационного периода у всех пациентов и отсутствие полного нормогликемического эффекта при достаточно позитивных лабораторно-функциональных тестах. При этом количество пересаженных островков или источник ксенокультуры существенно не влияли на послеоперационный результат. Особо следует отметить, что у 2 пациенток, которые через 10-12 месяцев вернулись к прежним дозам инсулинпотребности, островковые клетки продолжали функционировать, подтверждалось достаточно высокими уровнями С-пептида.

Заключение

Ксенотрансплантация островковых клеток поджелудочной железы является прямой альтернативой аллотрансплантации, обладая высокой функциональной способностью, и позволяет избежать многих этических проблем, а также дефицита культуры клеток, связанного с получением человеческого донорского материала. Пересадка ксеногенных островковых клеток по разработанной нами методике позволила значительно снизить инсулин зависимость и уменьшить инсулинпотребность в среднем на 60-65%, полностью компенсировать гипо- и гипергликемические состояния, стабилизировать течение сахарного диабета, улучшить качество жизни больных. В то же время ряд вопросов конотрансплантации требует дальнейшего клинического изучения целью разработки более совершенных методов иммуноизоляции предоперационного отбора реципиентов, в первую очередь на основе изучения цитотоксичности крови в отношении пересаживаемой культуры клеток.

Список литературы

1. Балаболкин М. И. Сахарный диабет.- М.: Медицина 1994.-384 с.
2. Прохоров А В., Третьяк С. К, Горанов В.А, Маркелов Д.В
Свободная трансплантация культуры β -клеток в лечении экспериментального сахарного диабета // Актуальные вопросы современной медицины: Материалы юбилейной научн. конф., посв. 80-летию БГМУ. В 2 ч. Ч. II / Под ред. С. Л. Кабака.- Мн.: БГМУ 2001.-С. 91-93.
3. Шотт А. В., Третьяк С. И, Леонтьук А. С Необычные иммунологические реакции в трансплантологии // 23-й пленум! Правления общества белорусских хирургов: Тез.докл.- Лида, 1999/МЗРБ. В 2 ч.-Гродно, 1999.-С. 190-191.
4. Шумаков В. К, Блюмкин В.Н, Скалецкий НН и др. Трансплантация островковых клеток поджелудочной железы, Изд-во «Канон», 1995.- 383 с.
5. De Vos P., Hamel A.F., Tatarkiewicz K. Reviews: Considerations for successful transplantation of encapsulated pancreatic is-lets // Diabetologia.- 2002.- № 45.- P. 159-173.
6. Hering B. J., Schultz A. O., Geier C et al: Newsletter № 6. Int. Islet Transplant. Registry, 1995.
7. Shapiro A. M., Lakey J. K, Rajotte R. V. et al Islet transplatation in seven patients with type 1 diabetes mellitus using a cocorticoid-free immunosuppressive regimen // N. Engl. J. Med.2000 --№ 343.- P. 230-238.
8. Sollinger H. W.t Geffner S. R. Pancreas transplantation // . Clin. North Am.- 1994.- № 74.- P. 1183-1195.
9. Sutherland D. E. R. Pancreatic transplantation: an update// Betes Rev.- 1993.-№ 1.- P. 1-14.
10. The Diabetes Control Complications Trial Research Group : The effect of intensive treatment of diabetes on the development and progression of long-term complications in insulin-dependent diabetes mellitus//N. Engl. J. Med.- 1993.- № 329.- P. 977-986.