

ВЕСТНИК

ТРАНСПЛАНТОЛОГИИ

И ИСКУССТВЕННЫХ

ОРГАНОВ



2' 2004

ГИСТОЛОГИЧЕСКАЯ СТРУКТУРА МАКРОИНКАПСУЛИРОВАННЫХ ФЕТАЛЬНЫХ β -КЛЕТОК ПОДЖЕЛУДОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ ПОСЛЕ КСЕНОГЕННОЙ ТРАНСПЛАНТАЦИИ В СОСУДИСТОЕ РУСЛО

Прохоров А.В., Третьяк С.И., Руденок В.В.

Белорусский государственный медицинский университет, г. Минск

HISTOLOGICAL STRUCTURE OF MACRO-INCAPSULATED FETAL B-CELLS OF THE PANCREAS AFTER XENOTRANSPLANTATION IN THE BLOOD STREAM

The article presents the results the morphological study findings after xenotransplantation of fetal islet cells of the pancreas of rabbits in the aorta of dogs with diabetes mellitus. The possibility of long-term preserving the transplanted culture in the blood stream without impulse therapy is indicated. The investigations have demonstrated an important role of vascularization in the transplant survival.

В настоящее время трансплантация островковых клеток поджелудочной железы признана наиболее целесообразным и физиологичным подходом в хирургическом лечении инсулинзависимого сахарно-

го диабета (ИЗСД). В мире накоплен уже достаточно большой опыт алло- и ксеногенных трансплантаций β -клеток [3, 5, 8, 11]. Однако, несмотря на использование различных методологических подхо-

дов, результаты лечения остаются не вполне удовлетворительными. Не удается добиться стойкого и длительного гипогликемического эффекта пересадки, главным образом, из-за гибели трансплантата в результате реакции отторжения. Основным методом предупреждения иммуноопосредованной деструкции клеток остается иммуносупрессивная терапия, обладающая выраженным нефро- и гепатотоксическим эффектом и оказывающая крайне неблагоприятное влияние на течение сахарного диабета и иммунологический статус реципиентов [5, 8, 13, 14].

Одним из направлений в защите трансплантата от иммунной агрессии является иммуноизоляция пересаживаемых клеток и их пересадка в иммунопривилегированные зоны и, в частности, в сосудистое русло [1, 2, 4]. Использование двойной защиты трансплантата позволяет отказаться от иммуносупрессивной терапии и использовать не только аллогенные, но и ксеногенные источники инсулин-продуцирующей ткани. Последнее является весьма актуальным из-за дефицита фетального и взрослого донорского аллогенного материала, а также многих этических и медицинских проблем [5, 8, 11].

Рядом исследований продемонстрировано большое значение реваскуляризации в выживании трансплантата, особенно в начальный посттрансплантационный период. Показано, что апоптоз и гибель основной массы иммуноизолированных клеток наступает в первые сутки после трансплантации [6].

Проведенные нами экспериментальные и клинические исследования показали достаточно высокую эффективность ксеногенной трансплантации при пересадке макроинкапсулированных островковых клеток в артериальное русло реципиентов [1, 2, 12]. Однако, несмотря на долговременное (более 2,5 лет) функционирование β -клеток, добиться полной инсулиннезависимости у больных с ИЗСД нам не удалось, хотя уровни сывороточного С-пептида, иммунореактивного инсулина поддерживались достаточно высокими в течение всего посттрансплантационного периода, а общее снижение инсулинпотребности при достижении эугликемии составляло 50–75% [1].

Поэтому целью настоящего исследования явилась морфологическая оценка клеточных структур трансплантата, оценка эффективности иммуноизоляции, степени реваскуляризации и неоангиогенеза в различные сроки после трансплантации.

Материалы и методы

Эксперименты проводились на 12 беспородных собаках весом от 15 до 24 кг с аллоксаниндуцированным диабетом, вызываемым по общепринятой методике. Трансплантацию β -клеток выполняли только при достижении клинических признаков диабета и уровне гликемии у животных не ниже 15 ммоль/л. В эксперименте использовали культуру островковых клеток поджелудочных желез плодов кроликов, которую получали по методике Misler S. et al. [10] в нашей модификации с последу-

ющим микробиологическим, вирусологическим и туморопластическим тестированием. Функциональную активность культуры исследовали с помощью набора для определения иммунореактивного инсулина, световой микроскопией с использованием инвертированного микроскопа и окраской культуры дитизоном. В среднем количество кластеров островковых клеток для каждой трансплантации составляло 6000–8000 IEs на килограмм.

Для иммуноизоляции островковых клеток нами была использована макроинкапсуляция в микропористые капсулы из производных полиамида с диаметром пор 1–2 μ [15]. Основанием для выбора данного биоматериала явилась его биоинертность в отношении иммобилизованной культуры клеток и крови, хорошая проницаемость для трофогенов, атромбогенность, прочность и эластичность. Выбранный нами диаметр пор позволяет предупредить проникновение в просвет капсулы иммунокомпетентных клеток, сохраняя при этом проницаемость трофогенов. Пересадку капсулы с культурой β -клеток производили в абдоминальный отдел аорты ниже отхождения почечных сосудов путем продольной аортотомии и фиксации капсулы к интиме сосуда 2 П-образными швами. Забор материала и морфологические исследования препаратов «аорта-капсула» были выполнены через 2 недели, 1, 3, 6, 13 месяцев после трансплантации. Окраску препаратов производили гематоксилин-эозином и по Ван-Гизону.

Результаты и обсуждение

Наблюдение и контроль гликемии у животных после экспериментальной ксенотрансплантации свидетельствовали о быстром купировании клинических признаков диабета и нормализации уровня глюкозы крови у всех животных на 3–4 сутки после пересадки. Эугликемический эффект поддерживался в течение всего периода наблюдения. При морфологическом исследовании поперечных срезов препаратов «макрокапсула-аорта» через 2 недели после трансплантации сохранялся свободный просвет аорты без признаков тромбоза. Стенка капсулы с ее микропористой структурой прослеживалась на всем протяжении, покрытая снаружи тонким слоем фибрина. В зоне фиксации капсулы к стенке сосуда четко определялись слои стенки аорты с небольшой воспалительной инфильтрацией на границе интимы и базальной мембраны. Ее просвет был заполнен дезорганизованной пересаженной клеточной культурой с элементами формирующегося соединительнотканного каркаса. Среди волокон молодой соединительной ткани определялись единичные формирующиеся сосуды с форменными элементами в просвете. Лимфоцитарных и макрофагальных инфильтратов в просвете капсулы не определялось (рис. 1).

Через два месяца после трансплантации макрокапсула достаточно прочно была фиксирована к стенке аорты соединительной тканью, тонкий слой которой покрывал ее по свободному краю. В про-

свете капсулы формировался каркас из молодой соединительной ткани с включенными между волокнами группами от 20 до 40 островковых клеток в окружении разнокалиберных кровеносных сосудов. Признаков воспалительной инфильтрации в стенке аорты, а также внутри капсулы не отмечалось. В клеточных элементах внутри капсулы прослеживались округлые, центрально расположенные ядра с ядрышками и глыбками хроматина (рис. 2).

Морфологическая картина через 6 и 13 месяцев характеризовалась развитием зрелой соединительной ткани в просвете капсулы, формированием различных по размеру групп клеток, напоминающих островки Лангерганса, с хорошо выраженной сосудистой сетью (рис. 3, 4). При этом ни в одном препарате не прослеживалось лимфоцитарных и макрофагальных инфильтратов. Основная масса клеточных кластеров располагалась в дистальной части капсулы. Клетки сохраняли все признаки жизнеспособности с хорошей дифференциацией ядер, ядрышек, глыбок хроматина и цитоплазмы.

Следует особо отметить то обстоятельство, что количество пересаженных клеток в течение первого месяца уменьшалось, оставаясь неизменным в последующие сроки спустя 3–13 месяцев после трансплантации. Исследования, проведенные ранее, показали, что в течение первых 2 недель процент жизнеспособных клеток составлял ~ 85%, а к концу первого месяца ~ 60–75% [2, 4].

Отсутствие лимфоцитарно-макрофагальной инфильтрации во всех наблюдениях позволяет предположить, что гибель определенной части островковых клеток является не результатом иммуноопосредованной деструкции, а следствием нарушения трофики. Возможно, что тонкий слой фибрина, покрывающий капсулу в первые дни после имплантации, препятствует адекватной диффузии трофогенов внутрь капсулы. Этому может быть подтверждение, что гибель части клеток наступает в течение первых недель после трансплантации, когда еще не сформировалась адекватная сосудистая сеть. Как показали наши исследования, неоангиогенез происходит в первые недели после пересадки

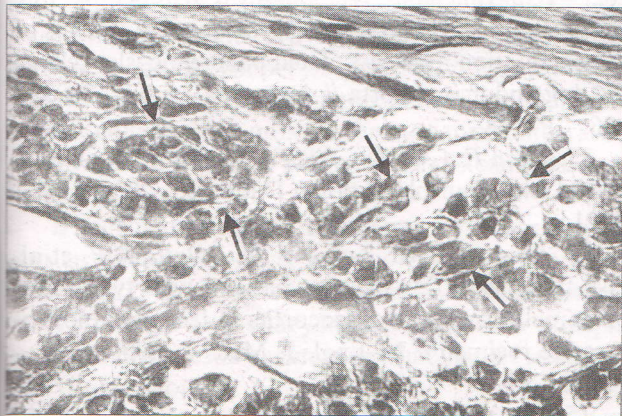


Рис. 3. Кластеры клеток, напоминающие островки Лангерганса (обозначены стрелками) среди элементов соединительнотканного каркаса и кровеносных сосудов через 6 мес. после ксенотрансплантации. Окраска: гематоксилин-эозин. $\times 200$.

и к первому месяцу сосудистая сеть уже достаточно хорошо сформирована. Поэтому развитие довольно выраженной соединительной ткани на поверхности трансплантата не оказывает существенного влияния на трофику культуры островковых

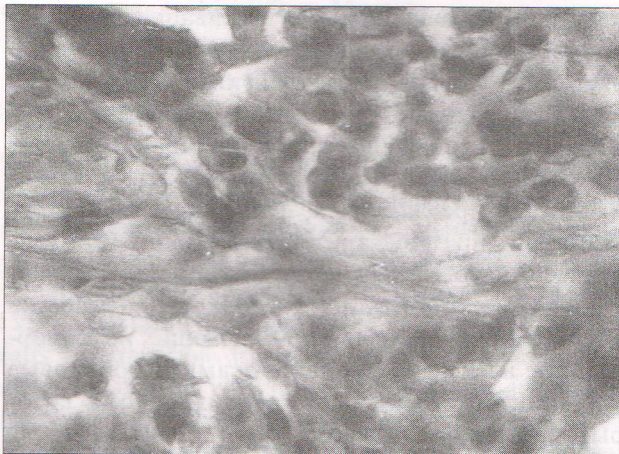


Рис. 1. Фетальные β -клетки с хорошо контурируемыми ядрами в просвете капсулы через 2 нед. после ксенотрансплантации. Между клетками тонкие соединительнотканые волокна. Окраска: гематоксилин-эозин. $\times 1000$.

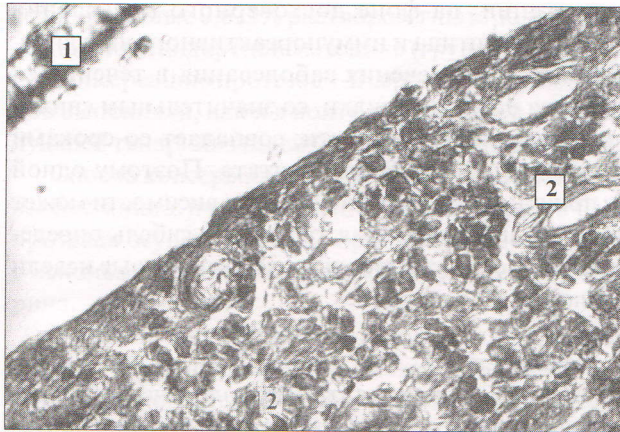


Рис. 2. Фетальные β -клетки в просвете капсулы, заключенные в соединительнотканый каркас через 2 мес. после ксенотрансплантации: 1 – стенка капсулы, 2 – разнокалиберные кровеносные сосуды с форменными элементами. Окраска: гематоксилин-эозин. $\times 200$.

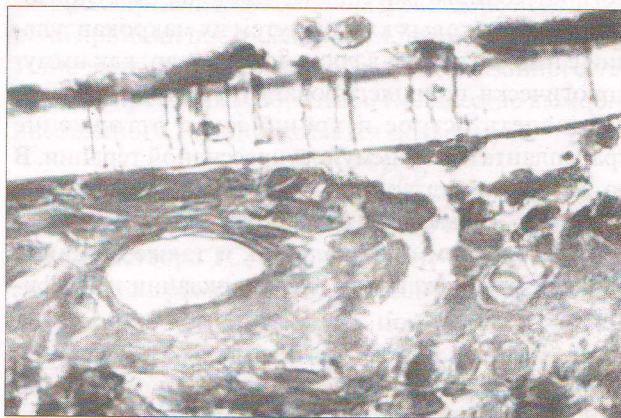


Рис. 4. Островковые клетки, элементы соединительнотканной стромы и кровеносные сосуды в подкапсулярной зоне через 18 мес. после ксенотрансплантации. Окраска: гематоксилин-эозин. $\times 1000$.

клеток. Анализ гистологических препаратов показывает, что через месяц после трансплантации количество клеточных кластеров остается стабильным. Полученные нами результаты согласуются с результатами зарубежных исследователей. Mattsson G. и соавт. [9] считают, что адекватная реваскуляризация является решающим для выживания и функционирования пересаженных островков, причем она наступает с 14 дня после трансплантации, но степень васкуляризации и плотность сосудистой сети снижена по сравнению с эндогенными островками. Аналогичных выводов придерживается De Vos P. и соавт. [6], предлагая для улучшения реваскуляризации создание предварительно матрицы, стимулирующей ангиогенез в зоне предполагаемой имплантации и местообитания островков. По мнению Hirshberg B. и соавт. [7], применяющих интрапортальное введение островков, сами островковые клетки стимулируют рост капилляров, сеть которых формируется на протяжении 30 дней после трансплантации.

Косвенным подтверждением нарушения нейрогуморальной регуляции островковых клеток у больных ИЗСД может быть и нестабильное течение диабета в течение первого месяца после ксенотрансплантации, на фоне достоверного повышения уровня С-пептида и иммунореактивного инсулина. Стабилизация течения заболевания в течение 2–3 месяца после пересадки, со значительным снижением инсулинпотребности, совпадает со сроками реваскуляризации трансплантата. Поэтому одной из причин отсутствия инсулиннезависимости может являться недостаточная трофика и гибель определенной массы островковых клеток в первые недели после трансплантации.

Заключение

Анализируя результаты морфологических исследований, можно заключить, что ксенотрансплантация островковых клеток поджелудочной железы является выгодной альтернативой аллотрансплантации, обладая высокой функциональной способностью и позволяющая преодолеть дефицит аллогенного клеточного материала. Двойная иммуноизоляция островковых клеток путем их макрокапсуляции с имплантацией в сосудистое русло, как иммунологически привилегированную зону, позволяет преодолеть острое и хроническое отторжение трансплантата без иммуносупрессивной терапии. В то же время ряд вопросов требуют дальнейшего изучения. Это касается разработки более совершенных методов иммуноизоляции, а также создания условий для адекватной васкуляризации и трофики трансплантата.

Литература

1. Прохоров А.В., Третьяк С.И., Горанов В.А., Романович В.П. Интрасосудистая ксенотрансплантация островковых клеток в лечении инсулинзависимого сахарного диабета // Достижения медицин-

ской науки Беларуси. Выпуск VII. – Минск, ГУ РНМБ. – 2002. – С. 96–97.

2. Прохоров А.В., Третьяк С.И., Горанов В.А., Маркелов Д.В. Свободная трансплантация культуры β -клеток в лечении экспериментального сахарного диабета // Актуальные вопросы современной медицины. Материалы юбилейной научной конференции, посвященной 80-летию БГМУ, ч. 2. – Минск. – 2001. – С. 91–93.

3. Скалецкий Н.Н., Гончарова Т.Н., Засорина Л.В. и др. Ксенотрансплантация культур островковых клеток на пути достижения длительной инсулиннезависимости у больных сахарным диабетом I типа // Вестник трансплантологии и искусственных органов. – 2002. – 3. – С. 85–86.

4. Шотт А.В., Третьяк С.И., Леонтьев А.С. Необычные иммунологические реакции в трансплантологии // 23-й пленум Правления общества белорусских хирургов: Тез. докл., Лида, 22–23 апреля 1999 г. МЗ РБ в 2 ч. – Гродно, 1999. – С. 190–191.

5. Шумаков В.И., Блюмкин В.Н., Скалецкий Н.Н. и др. Трансплантация островковых клеток поджелудочной железы. – Изд-во «Канон», 1995. – 383 с.

6. De Vos P., Hamel A.F., Tatarkiewicz K. Considerations for successful transplantation of encapsulated pancreatic islets // Diabetologia – 2002. – 45. – Issue 2. – P. 159–173.

7. Hirshberg B., Mog S., Patterson N. et al. Histopathological Study of Intrahepatic Islets Transplanted in the Nonhuman Primate Model Using Edmonton Protocol Immunosuppression // J. Clin. Endocrinol. Metab. – 2002. – 87 (12). – P. 5424–5429.

8. Kovarik J., Mandel T.E. Islet Transplantation // Transpl. Proc. – 1999. – 31. – P. 45–48.

9. Mattsson G., Jansson L., Carlsson P.-O. Decreased Vascular Density in Mouse Pancreatic Islets After Transplantation // Diabetes – 2002. – 51. – P. 1362–1366.

10. Misler S., Mordes J.P., Rossini A.A. Animal models of diabetes // Am. J. Med. – 1981. – 70 (2). – P. 353–360.

11. Platt J.L., Lin S.S. The Future Promises of Xenotransplantation // Ann. N Y Acad. Sci. – 1998. – 862. – P. 5–18.

12. Prochorov A., Tretjak S., Roudenok V. Effects of transplantation of encapsulated pancreatic islet cells in the dog abdominal aorta // Ann. Anat. suppl. – 2003. – 186. – P. 108.

13. Ryan E.A., Lakey J.R.T., Paty B.W. et al. Successful Islet Transplantation // Diabetes. – 2002. – 51. – P. 2148–2157.

14. Shapiro A.M., Lakey J.R., Rajotte R.V. et al. Islet transplantation in seven patients with type 1 diabetes mellitus using a glucocorticoid-free immunosuppressive regimen // N. Engl. J. Med. – 2000. – 343. – P. 230–238.

15. Tretyak S.I., Prochorov A.V., Goranov V.A., Mokhort T.V. The use of polyamide for macroencapsules for β -cells transplantation // 22th EASD-congress. Hungary. Budapest. 17–23 September. – 2002. – A. 420.