

ISSN 0002-354X

ДОКЛАДЫ

НАЦИОНАЛЬНОЙ АКАДЕМИИ
НАУК БЕЛАРУСИ

ТОМ 48



1

ЯНВАРЬ—ФЕВРАЛЬ

2004

УДК 616.379—008.64—089—097

А. В. ПРОХОРОВ

КСЕНОТРАНСПЛАНТАЦИЯ В ЛЕЧЕНИИ ИНСУЛИНЗАВИСИМОГО САХАРНОГО ДИАБЕТА (ИММУНОЛОГИЧЕСКАЯ И МОРФОЛОГИЧЕСКАЯ ОЦЕНКА)

(Представлено академиком Е. П. Демидчиком)

Белорусский государственный медицинский университет

Поступило 13.10.2003

В настоящее время трансплантация островковых клеток поджелудочной железы признана наиболее перспективным методом хирургического лечения инсулинзависимого сахарного диабета (ИЗСД) [1—3]. Однако основным препятствием на пути успешной трансплантации остается иммуноопосредованная деструкция β -клеток и рецидив аутоиммунитета [2—6].

Одним из перспективных направлений в преодолении иммунной защиты реципиента является иммуноизоляция клеток и трансплантация культуры клеток в иммунопривилегированные зоны. Проведенные ранее экспериментальные исследования показали, что клетки, обладающие диффузионным типом питания, могут неопределенно длительное время функционировать в токе крови, не подвергаясь реакции отторжения [7,8]. Целью настоящего исследования явилась морфологическая оценка макроинкапсулированной культуры ксеногенных островковых клеток поджелудочной железы, пересаженной в сосудистое русло и изучение иммунного ответа реципиентов с ИЗСД на ксенотрансплантацию.

В экспериментальных и клинических исследованиях нами была использована ксеногенная культура островковых клеток поджелудочных желез плодов кроликов. Культуру клеток получали по методике Mislér S. et al. (1986) в нашей модификации с последующим исследованием функциональной активности, микробиологическим, вирусологическим и опухолевым тестированием. Для иммуноизоляции островковых клеток была применена макроинкапсуляция в микропористые капсулы из производных полиамида с диаметром пор до 1—2 μ и высокой степенью биосовместимости [9]. В среднем количество кластеров островковых клеток для каждой трансплантации составляло от 7 до 10 млн.

В течение 2001—2003 гг., в клинических условиях, 13 пациентам с лабильным течением ИЗСД, инсулинпотребностью 56—72 Ед/сут и прогрессирующими вторичными осложнениями диабета (различная степень ретинопатии, нефропатии, ангиопатии) была выполнена ксеногенная трансплантация островковых клеток поджелудочной железы плодов кроликов в глубокую артерию бедра без использования иммуносупрессивной терапии. Согласно данным клинико-лабораторного наблюдения (более двух лет с момента операции) у всех реципиентов наступила стабилизация течения диабета, снижение потребности в экзогенном инсулине на 25—75%, купирование гипо- и гипергликемических состояний, повышение уровня С-пептида, иммунореактивного инсулина, снижение уровней фруктозамина и гликолизированного гемоглобина.

Для оценки иммунологического ответа реципиентов на ксеногенную трансплантацию и эффективности иммуноизоляции пересаженных клеток, были исследованы свежесыведенные лимфоциты. Лимфоциты получены на градиенте фикола/верографина (1077), отмыты раствором Хэнкса и находились в среде RPMI1640 до момента тестирования. Клетки в количестве 100000 отмывали физиологическим раствором. Остаток ресуспендировали в 20 мкл рабочего раствора моноклональных антител CD3, CD4, CD8, CD25, CD95 (Becton Dickinson), меченых FITS и инкубировали в течение 30 мин при 37 °С. Затем смесь центрифугировали и надосадочную жидкость удаляли. Осадок дважды отмывали физиологическим раствором и конечный объем доводили до 200 мкл.

Анализ суспензии осуществляли методом проточной цитофлуориметрии на аппарате FACS Vantage. Возбуждение флуоресценции осуществляли аргоновым лазером (488/80 мВт). Гейтирование пула β -клеток проводили исходя из распределения событий по прямому и боковому рассеиванию. В анализ брали 5000 событий. Регистрацию сигнала осуществляли с

использованием фильтра 53/30 нм. Содержание цитотоксических иммунных комплексов

(ЦИК) в сыворотке крови изучали с помощью стандартной методики [4].
 Основное прогностическое значение в развитии иммунологической агрессии против островковых клеток имеют 2 субкласса лимфоцитов: CD3 и CD4 [3,4,10-12]. В случае транс-плантации неинкапсулированных островковых клеток, наблюдается увеличение доли CD3 лимфоцитов. Большая часть Т-лимфоцитов активизируется и экспрессирует CD4-рецептор (Т-хелперы), а на β-клетках селективно экспрессируются антигены системы гистосовместимости II класса, необходимые для распознавания CD4 + Т-лимфоцитами [10-12]. В обследованной группе реципиентов, в большинстве случаев как до, так и после трансплантации, уровень экспрессии CD3 и CD4 рецепторов не превышал показателей, определенных в контроле, что свидетельствует в пользу отсутствия активации Т-клеточного звена иммунной системы (таблица).

Показатели экспрессии рецепторных маркеров лимфоцитов у реципиентов (n = 11) с внутрисосуистой трансплантацией островковых клеток

Лимфоциты (субпопуляции)	Показатели до операции				Показатели после операции			
	CD3	CD4	CD8	CD25	CD95	ПИК		
Среднее	41,68	49,47	16,53	23,0	9,11	26,6		
Ошибка средней	3,77	3,1	1,75	1,91	1,67	10,24		
Среднее	41,76	47,51	18,46	21,5	11,24	22,90		
Ошибка средней	4,19	3,2	2,32	2,42	1,52	10,18		
Достоверность различия с показателями до операции	p > 0,1	p > 0,1	p > 0,05	p > 0,05	p > 0,05	p > 0,05		

Не было зарегистрировано и увеличения количества активированных лимфоцитов (CD25). До операции этот показатель составлял $23 \pm 1,9$, после — $21,5 \pm 2,4\%$. Это подтверждает благоприятный прогноз проведенных трансплантаций, хотя было показано [11], что CD25-лимфоциты больших ИЗСД способны активизироваться к β-клеткам островка поджелудочной железы с образованием розеток. Выраженность данного феномена находится в обратной корреляции с продолжительностью жизни островковых клеток в органе реципиентов.
 У реципиентов с имплантацией макрокапсулы мы не отметили достоверного изменения уровня CD8-лимфоцитов ($16,5 \pm 1,75\%$ — до операции и $18,46 \pm 2,3\%$ — после), что также свидетельствует о стабильности иммунологических параметров.

Косвенным подтверждением появления и активации аутореактивных лимфоцитов среди реципиентов, является характерная для них сниженная способность лимфоцитов к апоптозу. Данное состояние может проявляться уменьшением количества лимфоцитов CD95 +, что наблюдается у пациентов с ИЗСД [4]. У обследованных реципиентов средний уровень экспрессии CD95-лимфоцитов не имел тенденции к изменению и достоверно не превышал контрольный показатель. Об отсутствии активации лимфоцитов говорит и отсутствие накопления цитотоксических иммунных комплексов в крови пациентов после трансплантации.
 Подтверждением отсутствия иммуноопосредованной деструкции пересаженной культуры клеток явились и экспериментальные исследования, выполненные на 12 беспородных собак с аллоксаноминдуцированным сахарным диабетом. Ксенотрансплантацию фрагментов β-клеток производили в абдоминальной области артерии животного.

При морфологическом исследовании серийных срезов препаратов «артерия-капсула», через 2 нед, 1 и 3 мес после ксенотрансплантации, отчетливо прослеживалась капиллярная окклюзия в стенке брюшной артерии. На границе со стенкой артерии и внутри капилляров фиксировались в стенке артерии в стенке артерии, в местах фиксации капсулы отрезки умеренная лимфоцитарная инфильтрация, не прослеживающаяся в более отдаленных сроках наблюдения. В просвете артерии тромботические массы и лимфоцитарная инфильтрация отсутствовали. Пересаженные клетки располагались компактно пучками, большими группами, включавшими 20-30 и более клеток. В центре клеток располагалось округлое, крупное ядро, окруженное ободком цитоплазмы. Волокнистый компонент, представляющий собой соединительной тканью, разделила клеточные группы (рис. 1).
 Гистологическая картина, спустя 13 и 18 мес после ксенотрансплантации, сохраняла все признаки, характерные для предыдущих сроков наблюдения с отсутствием признаков тромбоза



Рис. 1. Макрокапсула с β -клетками поджелудочной железы плодов кроликов в просвете брюшной аорты собаки спустя 2 мес после ксенотрансплантации. Стрелками обозначена стенка капсулы и островковые клетки. Окраска: гематоксилин-эозин. Увеличение: $\times 1000$

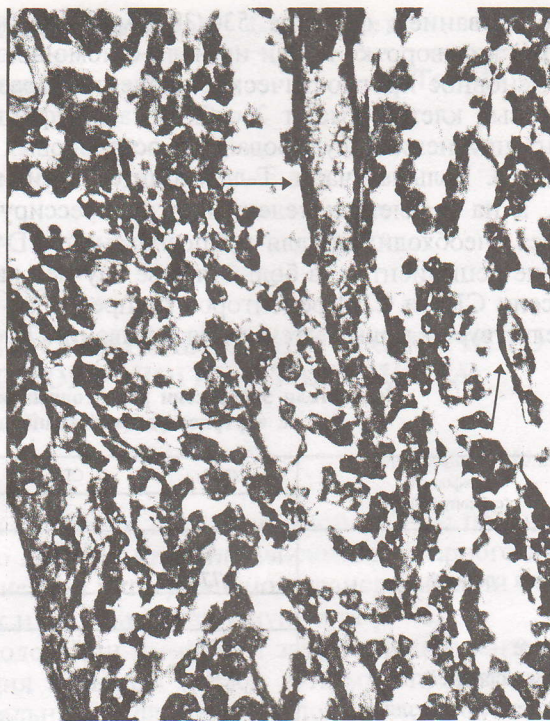


Рис. 2. Макроинкапсулированные β -клетки поджелудочной железы плодов кролика в просвете аорты собаки спустя 18 мес после ксенотрансплантации. Стрелками обозначены кровеносные сосуды среди островковых клеток. Окраска: гематоксилин-эозин. Увеличение: $\times 200$

и лимфоцитарно-макрофагальной инфильтрации. Внутри капсулы прослеживались сформированные группы клеток, подобно островкам Лангерганса. Клетки сохраняли овальную форму, округлые ядра с четкими контурами кариолеммы. Внутри ядер визуализировались ядрышки и глыбки хроматина (рис. 2).

Несмотря на все признаки функционирования трансплантата, ни у одного из пациентов мы не смогли достичь полной инсулиннезависимости. Экспериментальные морфологические исследования показали, что после трансплантации капсула покрывается тонким слоем фибрина, как реакция на чужеродную ткань, и в течение 10–12 дней слой фибрина трансформируется в молодую соединительную ткань. В этот же период времени наблюдается и прорастание фибробластов и неоангиогенез в просвете капсулы. Поэтому одним из предположений, объясняющих неполную эффективность трансплантации, является гибель определенной части клеток в раннем посттрансплантационном периоде из-за недостаточной васкуляризации и трофики трансплантата. Наши данные согласуются и с результатами зарубежных исследователей, считающих, что отсутствие хорошей васкуляризации трансплантата в раннем посттрансплантационном периоде является основной причиной гибели островковых клеток при условии их иммуноизоляции или иммуносупрессии [5].

Таким образом, макроинкапсуляция β -клеток, как метод иммуноизоляции с имплантацией трансплантата в сосудистое русло, позволяет без иммуносупрессивной терапии преодолеть иммунологический барьер, реакции острого и хронического отторжения, являющихся главной причиной неудач клеточной трансплантации. Как иммунологически привилегированная зона, сосудистое русло является наиболее привлекательным «местообитанием» трансплантата. Мы не выявили достоверных изменений иммунологических показателей до и после трансплантации, что свидетельствует об отсутствии иммунного ответа на пересаженный комплекс «капсула — островковые клетки». Это особенно актуально, учитывая тот факт, что островковые клетки были пересажены в организм пациентов с ИЗСД, т. е. потенциально обладающих предрасположенностью к развитию иммуно-деструктивных реакций в отношении β -клеток. Учитывая дефицит аллогенного донорского материала, ряд этических и медицинских проблем, ксенотрансплантация островковых клеток поджелудочной железы является реальной альтернативой аллотрансплантации в лечении больных с ИЗСД.

This paper presents the results of the morphological investigations of macroencapsulated islet cells of the pancreas of rabbit fetuses transplanted into the abdominal area of the aorta of 12 dogs with alloxan-induced diabetes mellitus. The investigations showed that xenoislet cells in the blood stream were not rejected and preserved all morphological signs of vitality. Parallel investigations of the immunological status of 11 patients with insulin-dependent diabetes mellitus demonstrated that after xenotransplantation of β -cells in the blood stream, there were no significant changes in activation of lymphocytes and in accumulation of cytotoxic immune complexes. Post-operative follow-up during the period over 2 years showed that xenotransplantation was a rather effective method of surgical treatment of diabetes, and immunoisolation of cells and their transplantation into the blood stream allowed to overcome the immunological barrier of the recipient without the immunosuppressive therapy.

Summary

XENOTRANSPLANTATION IN TREATMENT OF INSULIN-DEPENDENT DIABETES MELLITUS (IMMUNOLOGICAL AND MORPHOLOGICAL ASSESSMENT)

PROKHOROVA V.

1. Скалецкий Н. Н., Гончарова Т. Н., Засорина Л. В. и др. // Вестник трансплантологии и иммунологии / 23-й пленум. Правления общества белорусских хирургов: Тез. докл., Лида, 22—23 апреля 1999 г. Гродно. 1999. С. 190—191.
2. Прохорова А. В., Третьяк С. И., Горанов В. А., Романович В. П. // Достижения медицинской науки Беларуси. Вып. VII. Мн., 2002. С. 96—97.
3. Шотт А. В., Третьяк С. И., Леонтьев А. С. Небывшие иммунологические реакции в трансплантологии / 23-й пленум. Правления общества белорусских хирургов: Тез. докл., Лида, 22—23 апреля 1999 г. Гродно. 1999. С. 190—191.
4. Третьяк С. И., Прохорова А. В., Горанов В. А., Мокхорт Т. В. / The use of polyamide for macroencapsules for β -cells transplantation. 22th EASD-congress, Budapest, 17—23 september, 2002. A. 420.
5. Friedmann T., Smith R. N., Colvin R. B., Iacomini J. // Diabetes 1999. Vol. 48. Issue 12. P. 2340—2348.
6. Szanya V., Erman J., Taylor C., Holness C., Fathman C. G. // J. Immunol. 2002. Vol. 169, N 5. P. 2461—2465.
7. Zhan Y., Brady J. L., Sutherland R. M., Lew A. M. // J. Immunol. 2001. Vol. 167, N 11. P. 6279—85.
8. De Vos P., Hamel A. F., Tatarakiewicz K. // Diabetologia 2002. Vol. 45. Issue 2. P. 159—173.
9. Tyden G., Reinhold F. P., Sundkvist G., Bolinder J. // N. Engl. J. Med. 1996. Vol. 335, N 12. P. 860—863.
10. Коватик Л., Мандель Т. Е. // Transpl. Proc. 1999. N 31. P. 45—48.
11. Райт У. Основы иммунологии М., 1991.
12. De Vos P., Hamel A. F., Tatarakiewicz K. // Diabetologia 2002. Vol. 45. Issue 2. P. 159—173.