



2-2004

ЗДРАВООХРАНЕНИЕ

ISSN 0044-1961

Научно-
практический
ежемесячный
журнал

QUANTITUM
PROFECTO
ARTIUM
MEDICINA
NOBILISSIMA

Из всех наук
(искусств)
безусловно
медицина
самая
благородная

рапия и диагностика: Статьи и тез. докл. междунар. науч.-практ. конф.— Минск, 1998.— С. 22—28.

19. Barrat C., Catheline J. M., Rizk N., Champault G. G. // *Surg. Laparosc. Endosc.*— 1999.— Vol. 9, N 1.— P. 27—31.
20. Bonanni F., Reed J., Hartzell G. et al. // *J. Am. Coll. Surg.*— 1994.— Vol. 179, N 3.— P. 273—278.
21. Gotz F., Pier A., Bacher C. // *Surg. Endosc.*— 1990.— N 4.— P. 6—9.
22. Nowzaradan Y., Barnes J. P., Westmoreland J., Hojabri M. // *Surg. Laparosc. Endosc.*— 1993.— Vol. 3, N 6.— P. 470—476.
23. Ortega A. E., Hunter J. G., Peters J. H. et al. // *Am. J. Surg.*— 1995.— Vol. 169.— P. 208—212.
24. Pier A., Gotz F., Bacher C. // *Surg. Laparosc. Endosc.*— 1991.— N 1.— P. 8—13.
25. Schreiber J. H. // *Surg. Endosc.*— 1987.— N 1.— P. 211—216.
26. Strathern D. W., Jones B. T. // *Surg. Endosc.*— 1999.— Vol. 13, N 3.— P. 287—290.
27. Tate J. J. T. // *Br. J. Surg.*— 1996.— Vol. 83.— P. 1169—1170.

Поступила 05.11.03.

**А. В. ПРОХОРОВ, С. И. ТРЕТЬЯК, В. В. РУДЕНКО,
В. А. ГОРАНОВ, А. А. ГЛИННИК**

КСЕНОТРАНСПЛАНТАЦИЯ β -КЛЕТОК В СОСУДИСТОЕ РУСЛО КАК АЛЬТЕРНАТИВНЫЙ МЕТОД ЛЕЧЕНИЯ ИНСУЛИНЗАВИСИМОГО САХАРНОГО ДИАБЕТА

Белорусский государственный медицинский университет

Экспериментальными и клиническими исследованиями достаточно убедительно показана возможность лечения инсулинзависимого сахарного диабета (ИЗСД) путем трансплантации островковых клеток поджелудочной железы [3, 10, 14]. Приоритетным направлением в этой области остается аллотрансплантация β -клеток поджелудочной железы плодов человека или взрослых доноров. Однако дефицит аллогенного донорского материала, несовершенство законов о трансплантации, а также ряд этических и медицинских проблем резко ограничивают использование аллотрансплантации. Работами зарубежных и отечественных исследователей показана возможность успешного использования ксеногенных источников β -клеток, в частности фетальных островковых клеток кроликов и свиней [3, 8, 13].

Основной причиной неудач трансплантации является реакция отторжения. При ксенотрансплантации формируются реакции, включающие фазы острого и хронического отторжения. Острая реакция обусловлена взаимодействием с трансплантатом натуральных антител человека к углеводному эпитопу GAl α -3GAl, который присутствует в тканях большинства животных, но отсутствует у человека. Связывание антител активирует систему комплемента, что приводит к разрушению трансплантата в течение нескольких часов. В том случае, если не произошла острая деструкция клеток трансплантата, включаются типичные механизмы иммунного отторжения, реализующиеся через цитотоксические Т-лимфоциты и цитокины [1, 7, 10, 13, 18].

ANTISEPTIC TREATMENT OF VERMIFORM PROCESS STUMP UNDER LAPAROSCOPIC APPENDECTOMY

N. V. Zavada, T. L. Nalbandyan, V. V. Slizen

The work was based on bacteriologic studying of sixty four vermiform processes walls and lumens contents removed during appendectomies. The vermiform processes changes were phlegmonous in forty eight (75%) cases and gangrenous — in sixteen (25%) cases. The clinical part of the study consisted of bacteriologic studies of microflora from the vermiform processes of sixty two patients with acute appendicitis a ligature method of laparoscopic appendectomy being applied. The patients were divided into two groups: the 1st group included thirty patients (twenty five patients with a phlegmonous appendicitis, five persons with a gangrenous appendicitis) their vermiform processes stumps treated with Iodine 5% solution; the 2d consisted of thirty seven patients (twenty seven patients with a phlegmonous appendicitis, five persons with a gangrenous appendicitis) their vermiform processes stumps treated with a combined preparation made of three antiseptics — Iodine 5% solution, hydrogen peroxide 3% solution and 0,02% chlorhexidine ratio 1:1:1. Appliance of the latter combination allowed to make the antimicrobial treatment of the vermiform processes stumps more efficient.

До настоящего времени основным методом предупреждения отторжения остается иммуносупрессивная терапия. Однако современные иммуносупрессивные протоколы, обладающие выраженным гепато- и нефротоксическим эффектом и оказывающие крайне неблагоприятное влияние на течение сахарного диабета, не могут предотвратить острое отторжение, связанное с ксенотрансплантацией. Поэтому поиск эффективных способов иммуноизоляции пересаживаемых клеток является приоритетным в клеточной трансплантологии.

В качестве одного из направлений в преодолении иммунной защиты реципиента предлагается двойная иммуноизоляция клеток путем их макроинкапсуляции в микропористые капсулы и трансплантация культуры клеток в иммунопривилегированные зоны [2, 4]. Целью настоящего исследования явилась сравнительная оценка иммунного ответа реципиентов с ИЗСД на ксенотрансплантацию и морфологических изменений макроинкапсулированной культуры островковых клеток поджелудочной железы в различные сроки после их трансплантации в сосудистое русло.

Материал и методы

Проведенные ранее экспериментальные исследования продемонстрировали, что клетки, обладающие диффузионным типом питания и имплантированные в ток крови, могут длительное время функционировать, не подвергаясь реакции отторжения, причем до 60—70% пересаженных клеток остаются жизнеспособными в течение года после трансплантации [2]. Учитывая многолетний опыт НИИТИО (Москва), в экспериментальных и клинических исследованиях была использована ксеногенная культура плодов кроликов. Культуру островковых клеток получали по методике S. Misler и соавт. [12] в собственной модификации с последующим микробиологическим, вирусологическим и туморопластическим тестированием. Функциональную активность культуры определяли с помощью набора для определения иммунореактивного инсулина, световой микроскопии с использованием инвертированно-

Для морфологической оценки возможной иммунорес-
 редованной деструкции пересаженной ксенотрансплан-
 тации островковых клеток выполнены экспериментальные
 исследования на 12 беспородных собак с аллоксанин-
 дучируемым сахарным диабетом. Диабет моделировали
 по общепринятой методике. Ксенотрансплантацию фе-
 тальных β -клеток выполняли только при появлении досто-
 верных клинических признаков диабета у животных и уров-
 не глюкозы в крови не менее 15 ммоль/л. Капсулу с куль-
 турой β -клеток пересаживали в абдоминальный отдел
 аорты [2].

Основное прогностическое значение в развитии имму-
 нологической агрессии против островковых клеток имеют
 2 субкласса лимфоцитов: CD3 и CD4 [1, 7, 16, 18]. В слу-
 чае трансплантации неинкапсулированных островковых кле-
 ток наблюдается увеличение доли лимфоцитов CD3. Боль-
 шая часть T-лимфоцитов активируется и экспрессирует
 рецептор CD4 (T-хелперы) [7, 16, 18], а на β -клетках се-
 лективно экспрессируются антигены системы гистосовмес-
 тимости II класса, необходимые для распознавания CD4+
 T-лимфоцитами. В обследованной группе реципиентов, в
 большинстве случаев как до, так и после трансплантации,
 уровень экспрессии рецепторов CD3 и CD4 не превышал
 показателей, определяемых в контроле, что свидетель-
 ствует в пользу отсутствия активации T-клеточного звена
 иммунной системы (табл.).

Не было зарегистрировано и увеличения количества
 активированных лимфоцитов (CD25). Это подтверждает
 благоприятный прогноз проведенных трансплантаций,
 хотя было показано [16], что лимфоциты CD25 больших
 ИСДЛ способны адгезироваться к β -клеткам островка под-
 желдочной железы с образованием розеток. Выражен-
 ность данного феномена находится в обратной корреляции
 с продолжительностью жизни островковых клеток в орга-
 низме реципиентов.

У реципиентов с имплантационной макрокапсулой так-
 же не отмечено достоверного изменения уровня лимфо-
 цитов CD8, что свидетельствует о стабильности иммуно-
 логических параметров.

Косвенным подтверждением появления и активации у
 реципиентов аутореактивных лимфоцитов является харак-
 терная для них сниженная способность лимфоцитов к
 апоптозу. Данное состояние может проявляться в умень-
 шении количества клеток CD25+, что наблюдается у па-
 циентов с ИСДЛ [10]. У обследованных реципиентов сред-

Срок исследования		CD3	CD4	CD8	CD25	CD95	ЦИК
До операции		41,68±3,77	49,47±3,1	16,53±1,75	23,0±1,91	9,11±1,67	26,6±10,24
После операции		41,76±4,19	47,51±3,2	18,46±2,32	21,5±2,42	11,24±1,52	22,90±10,18
		P>0,1	P>0,1	P>0,05	P>0,05	P>0,1	P>0,05

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

Для оценки иммунологического ответа реципиентов на
 ксенотрансплантацию и эффективности иммунорес-
 тензии пересаженных клеток были получены на
 выделенные лимфоциты. Лимфоциты были получены на
 градиенте фикола/вопорфина (1077), отмывты раствором
 Ханкса и находились в среде RPMI1640 до момента тес-
 тирования. Клетки в количестве 100000 отмывали физио-
 логическим раствором. Остаток ресуспензировали в 20 мкл
 рабочего раствора моноклональных антител CD3, CD4,
 CD8, CD25, CD95 (Beckon Dickinson), меченых FITC, и ин-
 кубировали в течение 30 мин в темноте при 37°C. Затем
 смесь центрифугировали и надосажденую жидкость уда-
 лили. Осадок дважды отмывали физиологическим раство-
 ром и конечный объем довели до 200 мкл.

Анализ суспензии осуществляли методом проточной
 цитофлюориметрии на аппарате "FACS Vantage". Возбуж-
 дение флуоресценции осуществляли аргоновым лазером
 (488/80 мВт). Фейтрование пула β -клеток проводили ис-
 ходя из распределения событий по прямому и боковому
 рассеиванию. В анализ брали 5000 событий. Фейтратцию
 сигнала осуществляли с использованием фильтра 530/30
 нм. В качестве дополнительного параметра, характеризу-
 ющего уровень накопления специфических антител, был
 использован показатель содержания цитотоксических им-
 мунных комплексов (ЦИК). Содержание ЦИК в сыворотке
 крови изучали с помощью стандартной методики [1].

В течение 2001—2003 гг. у 15 пациентов с лабильным
 течением ИСДЛ, инсулинотребностью 56—72 Ед/сут, час-
 тыми гипо- и гипергликемическими состояниями и прогрес-
 сирующими вторичными осложнениями диабетом (ретино-,
 нефро-, ангиопатии) выполнена ксенотрансплантация
 цитостромовых клеток поджелудочной железы плодов
 кроликов в грудную клетку без использования
 иммуносупрессивной терапии. Согласно данным клинико-
 лабораторного наблюдения (более 2 лет с момента опе-
 рации) у всех реципиентов отмечались достоверные при-
 знаки функционирования трансплантата — снижение по-
 требности в экзогенном инсулине на 25—75%, купирование
 гипо- и гипергликемических состояний, повышение уровня
 С-пептида, иммунореактивного инсулина, снижение уров-
 ней фруктозамина и гликолизированного гемоглобина.

Для оценки иммунологического ответа реципиентов на
 трансплантацию и эффективности иммунорес-тензии пересажива-
 ных клеток были получены на выделенные лимфоциты. Ли-
 мфоциты были получены на градиенте фикола/вопорфина
 (1077), отмывты раствором Ханкса и находились в среде
 RPMI1640 до момента тестирования. Клетки в количестве
 100000 отмывали физиологическим раствором. Остаток
 ресуспензировали в 20 мкл рабочего раствора моноклональ-
 ных антител CD3, CD4, CD8, CD25, CD95 (Beckon Dickinson),
 меченых FITC, и инкубировали в течение 30 мин в темноте
 при 37°C. Затем смесь центрифугировали и надосажденую
 жидкость удалили. Осадок дважды отмывали физиологиче-
 ским раствором и конечный объем довели до 200 мкл.

Анализ суспензии осуществляли методом проточной
 цитофлюориметрии на аппарате "FACS Vantage". Возбуж-
 дение флуоресценции осуществляли аргоновым лазером
 (488/80 мВт). Фейтрование пула β -клеток проводили ис-
 ходя из распределения событий по прямому и боковому
 рассеиванию. В анализ брали 5000 событий. Фейтратцию
 сигнала осуществляли с использованием фильтра 530/30
 нм. В качестве дополнительного параметра, характеризу-
 ющего уровень накопления специфических антител, был
 использован показатель содержания цитотоксических им-
 мунных комплексов (ЦИК). Содержание ЦИК в сыворотке
 крови изучали с помощью стандартной методики [1].

ний уровень экспрессии лимфоцитов CD95 не имел тенденции к изменению и достоверно не превышал контрольный показатель. Об отсутствии активации лимфоцитов свидетельствовало и отсутствие накопления ЦИК в крови пациентов после трансплантации.

Трансплантация островковых клеток поджелудочной железы экспериментальным животным приводила к быстрому купированию клинических признаков диабета и нормализации уровня глюкозы крови на 3—4-е сутки после пересадки, и нормогликемический эффект сохранялся на протяжении всего периода наблюдения (более 2 лет). При морфологическом исследовании серийных поперечных срезов препаратов «макрокапсула—аорта» через 2 нед после трансплантации отчетливо прослеживалась капсула, фиксированная к стенке брюшной аорты, покрытая тонким слоем фибрина. Небольшая лимфоцитарная инфильтрация отмечалась только в стенке аорты в местах фиксации к ней капсулы. В просвете капсулы пересаженные клетки располагались компактно цепочками, большими группами, включавшими 20—30 и более клеток. В центре клеток визуализировалось округлое ядро, окруженное ободком цитоплазмы. Волокнистый компонент, представленный рыхлой неоформленной соединительной тканью, разделял клеточные группы, формируя каркас. На границе со стенкой аорты и внутри капсулы прослеживались формирующиеся и сформированные кровеносные сосуды с форменными элементами. Лимфоцитарно-макрофагальных инфильтратов в просвете капсулы не отмечалось (рис. 1).

Гистологическая картина спустя 6 и 13 мес после ксенотрансплантации сохраняла все признаки, характерные

для предыдущих сроков наблюдений, отсутствовали признаки тромбоза и лимфоцитарно-макрофагальной инфильтрации. Капсула была прочно фиксирована к стенке аорты соединительной тканью, а внутри капсулы прослеживались сформированные группы клеток, подобные островкам Лангерганса поджелудочной железы. Клетки сохраняли овальную или округлую форму, округлые ядра с четкими контурами кариолеммы. Внутри ядер визуализировались ядрышки и глыбки хроматина. Группы клеток были окружены разнокалиберными кровеносными сосудами, формировавшими хорошо выраженную сосудистую сеть (рис. 2).

Полученные результаты показывают, что макрокапсулирование β -клеток в микропористую мембрану и имплантация клеток в ток крови позволяют преодолеть иммуноопосредованную деструкцию трансплантата без иммуносупрессивной терапии и сохранить долговременное выживание трансплантата. Это особенно актуально, когда островковые клетки пересаживают пациентам с ИЗСД, то есть потенциально обладающим предрасположенностью к развитию иммунодеструктивных реакций в отношении β -клеток.

Однако, несмотря на хороший терапевтический эффект и значительное снижение инсулинпотребности, ни в одном из клинических наблюдений не удалось достичь полной инсулиннезависимости. Анализ литературных данных показал, что одной из причин этого могла быть недостаточная васкуляризация трансплантата, особенно в первые недели после пересадки [6, 11]. Как показали морфологические исследования в ранние сроки после трансплантации, кап-

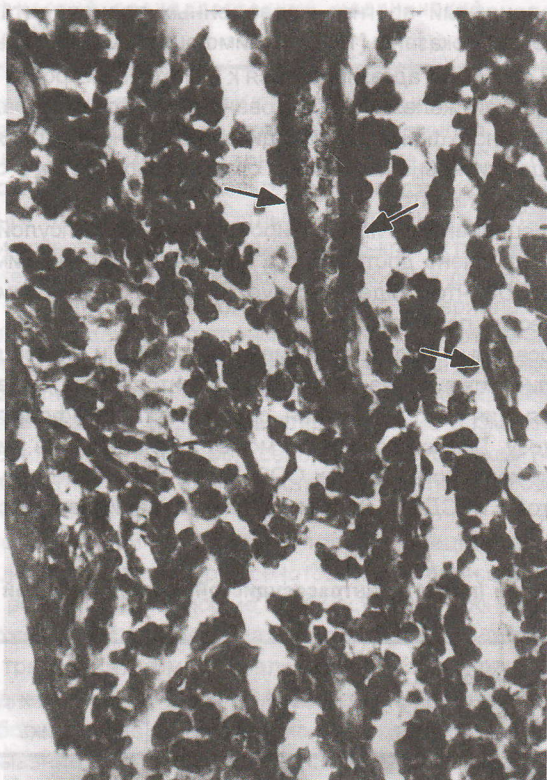


Рис. 1. Макрокапсулированные β -клетки поджелудочной железы плодов кролика в просвете аорты собаки спустя 2 мес после ксенотрансплантации: стрелками обозначены кровеносные сосуды среди островковых клеток. Окраска гематоксилином и эозином. Ув. 200



Рис. 2. Макрокапсула с β -клетками поджелудочной железы плодов кролика в просвете брюшной аорты собаки спустя 18 мес после ксенотрансплантации: стрелками обозначена стенка капсулы. Окраска гематоксилином и эозином. Ув. 1000

васкуляризации и улучшения трофики трансплантата, проведение исследований цитохимической реактивности эндотелия в отношении пересаженной культуры клеток, чувствительности к ксеногенному инсульту, роли антител в развитии интулинрезистентности.

ЛИТЕРАТУРА

1. Полт У. Основы иммунологии. — М., 1991.
2. Романовский А. И. Определение оптимальной методики пересадки островковых клеток поджелудочной железы. Автореф. дис. ... канд. мед. наук. — Минск, 2001.
3. Скалецкий Н. Н., Гончарова Т. Н., Засоруна Л. В. и др. // *Вестн. трансплантологии и искусственных органов.* — 2002. — N 3. — С. 85—86.
4. Шомт А. В., Третьяк С. И., Леонтьев А. С. // XVIII пленум Прагвенная об-ва белорусских хирургов: Тез. докл. — Гродно, 1999. — С. 190—191.
5. Bosi E., Vraghi S., Matti P. et al. // *Diabetes.* — 2001. — Vol. 50. — P. 2464—2471.
6. De Vos P., Hamel A. F., Tatarkevich K. // *Diabetologia.* — 2002. — Vol. 45 (iss. 2). — P. 159—173.
7. Friedman T., Smith R. N., Colvin R. B., Iacomini J. // *Diabetes.* — 1999. — Vol. 48 (iss. 12). — P. 2340—2348.
8. Groth C. G., Korsgen O., Tibell A. et al. // *Lancet.* — 1994. — Vol. 344, N 8934. — P. 1402—1404.
9. Hirschberg B., Montgomery S., Wysocki M. G. et al. // *Diabetes.* — 2002. — Vol. 51. — P. 2135—2140.
10. Kovalick J., Mandel T. E. // *Transpl. Proc.* — 1999. — Vol. 31 (Suppl. 1/2A). — P. 45—48.
11. Mattson G., Jansson L., Carlsson P.-O. // *Diabetes.* — 2002. — Vol. 51. — P. 1362—1366.
12. Milder F., Mordes J. P., Rossini A. A. // *Am. J. Med.* — 1981. — Vol. 70, N 2. — P. 353—360.
13. Platt J. L., Lin S. S. // *Ann. N. Y. Sci.* — 1998. — N 862. — P. 5—18.
14. Shapiro A. M., Lakey J. R., Rajotte R. V. et al. // *N. Engl. J. Med.* — 2000. — Vol. 343. — P. 230—238.
15. Sun Y., Ma X., Zhou D. et al. // *J. Clin. Invest.* — 1996. — Vol. 98, N 6. — P. 1417—1422.
16. Szanya V., Etmann J., Taylor C. et al. // *J. Immunol.* — 2002. — Vol. 169, N 5. — P. 2461—2465.
17. Tashiro H., Iwata H., Watsck G. L. et al. // *Transplant. Proc.* — 1998. — Vol. 30. — P. 498—499.
18. Zhan Y., Brady J. L., Sutherland R. M., Lew A. M. // *J. Immunol.* — 2001. — Vol. 167, N 11. — P. 6279—6285.

Получена 17.11.03.

β-CELLS XENOTRANSPLANTATION INTO VASCULAR CHANNEL AS ALTERNATIVE METHOD FOR MANAGING INSULINDEPENDENT DIABETES MELLITUS

A. V. Prokhorov, S. I. Trebak, V. V. Rudenok, V. A. Goranov, A. A. Gilnik

Basing on the outcomes of studying immunologic parameters in eleven recipients suffering from insulindependent diabetes mellitus after the islet cells were transplanted into their vascular channel and on the results received in the experimental morphologic studies it was shown that the islet cells microcapsulation and their transplantation into the blood flow prevented an acute and a chronic rejection of the same, no immune activity preserved allowed to consider xenotransplantation a real alternative to allotransplantation.

сула покрывается тонким слоем фибрина (реакция на чужеродную ткань) и в течение 10—12 дней слой фибрина трансформируется в молодую соединительную ткань. В этот же период наблюдается прорастание фибробластов и неонатогенез в просвете капилляры. Поэтому было высказано предположение, возможно, обрывается неполнозначности трансплантации, о том, что происходит гибель определенной части клеток в ранний посттрансплантационный период из-за недостаточной васкуляризации и трофики трансплантата. Данное положение убедительно показано исследованиями трансплантации микрокапсулированных клеток в альгинат-полилизиновые и агарозные мембраны [6, 15, 17]. Но в исследованиях наступала полная компенсация экскреции ментального диабета у всех животных. Поэтому следует рассматривать еще несколько причин неполной эффективности трансплантации в клинических условиях.

Во-первых: возможно, что чувствительность к инсулину интулинзависимых клеток человека и животных различна. Во-вторых, при использовании методики трансплантации предсмотрена пересадка культуры клеток в артериальный кровоток, что является не вполне физиологичным и, возможно, нарушает гуморальную регуляцию пересаженных островковых клеток. В. Hirschberg и соавт. [9] показали, что интрапортальное введение в отличие от внутривенного введения островковых клеток, нельзя не учитывать роль аутоантител к интулину ксеногенных клеток. Данные E. Bosi и соавт. [5] свидетельствуют о повышении уровня антител GAD, относящихся к иммуноглобулинам G и M, причем у пациентов с повышенными уровнями антител интулинзависимости не была достигнута. Наконец, не следует исключать наличие хотя и небольших различий в аминокислотной структуре человеческого и кроличьего интулина и связанную с этим различную чувствительность клеток к инсулину.

ВЫВОДЫ

1. Иммуноизоляция островковых клеток поджелудочной железы путем их микропористой макрокапсуляции, пересадка трансплантата в сосудистое русло как иммунологически привилегированную зону позволяют без иммунологической барьер рецпитента, реакции отторжения и хронического отторжения.
2. Длительное выживание трансплантата, высокая функциональная активность культуры островковых клеток поджелудочной железы дают основание считать ксенотрансплантацию реальной альтернативой аллотрансплантации в лечении больных с ИЗСД. Возможно, неограниченных поставок ксеногенной эндокринной ткани позволяют избежать дефицита аллогенного донорского материала и создать банк культуры островковых клеток. Для повышения эффективности ксенотрансплантации в лечении ИЗСД требуется изучение ряда вопросов, касающихся возможности создания условий для ранней