

Н.М. Яковец, Е.А. Назарова, С.И. Кривенко, А.М. Федорук, О.О. Руммо
**ПЕРВЫЙ ОПЫТ ВЫДЕЛЕНИЯ ОСТРОВКОВЫХ КОМПЛЕКСОВ
ПОДЖЕЛУДОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ ЧЕЛОВЕКА ДЛЯ АЛЛОГЕННОЙ
ТРАНСПЛАНТАЦИИ ПРИ САХАРНОМ ДИАБЕТЕ 1 ТИПА**

*УЗ «9-я городская клиническая больница»,
РНПЦ Трансплантации органов и тканей*

Аллогенная трансплантация островковых комплексов поджелудочной железы успешно применяется в медицинских учреждениях США и Европы как вспомогательный метод для лечения сахарного диабета 1 типа. Настоящее исследование посвящено отработке методики выделения островков Лангерганса из поджелудочной железы мультиорганного донора и оценку их функциональной характеристики.

Ключевые слова: *поджелудочная железа, сахарный диабет 1 типа, изоляция островков Лангерганса, трансплантация.*

N. M. Yakovets, E. A. Nazarov, S. I. Krivenko, A. M. Fedoruk, O. O. Rummo
**THE FIRST EXPERIENCE OF ALLOCATION OF OSTROVKOVY COMPLEXES
OF A PANCREAS OF THE PERSON FOR ALLOGENNY TRANSPLANTATION AT
DIABETES OF 1 TYPE**

Allogenic transplantation of pancreatic islets, obtained from a human pancreas, is successfully using in medical centers of USA and Europe as an alternative to isolated pancreas transplantation for curing type 1 diabetes mellitus. The present study aims to develop method of islets isolation from the pancreas of multiorgan donor and to assess functional characteristics of islets.

Key words: *pancreas, type 1 diabetes mellitus, islets of Langerhans, isolation of islets, transplantation.*

Оригинальные научные публикации

Сахарный диабет занимает первое место среди эндокринологических заболеваний. Так, в Республике Беларусь на 1 января 2012 года зарегистрировано 223 955 пациентов с сахарным диабетом, из них 1 500 детей [1]. Среди этих пациентов 5% страдают сахарным диабетом 1 типа, 93% – сахарным диабетом 2 типа, остальные имеют специфические типы сахарного диабета.

В основе сахарного диабета 1 типа (СД 1) лежит хроническое аутоиммунное структурно-функциональное повреждение панкреатических β -клеток островков Лангерганса с последующим развитием инсулиновой недостаточности, сопровождаемая выраженной инсулинопенией, а иногда и полным отсутствием секреции инсулина.

Основным методом лечения больных, страдающих СД 1, является инсулиновая терапия. Однако она приводит к большим колебаниям уровня глюкозы крови, вызывая гипергликемические капиллярные поражения, а также увеличивает риск гипогликемических приступов с летальным исходом.

На протяжении десятилетий проводятся исследования, направленные на возможность замещения утраченной функции островков поджелудочной железы и восстановления регуляции углеводного обмена. Наиболее эффективными современными хирургическими методиками возвращения физиологического гомеостаза глюкозы являются: аллогенная трансплантация поджелудочной железы и аллогенная трансплантация изолированных островковых комплексов поджелудочной железы.

Трансплантация поджелудочной железы улучшает качество жизни пациента, эффективно корригирует гликемию и позволяет бороться с хроническими осложнениями СД. Пересадка комплекса почка-поджелудочная железа считается «золотым стандартом» при развитии терминальной стадии хронической почечной недостаточности на фоне диабетической нефропатии у больных СД 1. Вместе с тем, вышеуказанные потенциальные выгоды сопровождаются и потенциальными рисками. К ним относятся: риск хирургического вмешательства и связанных с ним осложнений, риск отторжения трансплантата и негативные эффекты иммуносупрессии [11]. Поэтому изолированная трансплантация поджелудочной железы, по мнению Американской диабетической ассоциации, является порой неоправданно опасным мероприятием [7].

Трансплантация островковых комплексов поджелудочной железы – относительно новая операция замещения утраченной функции поджелудочной железы. По данным отчета Коллаборативного регистра трансплантации островковых клеток (Collaborative Islet Transplant Registry, CITR) в период с 1 января 1999 по 31 декабря 2009 года в медицинских учреждениях Северной Америки (27 центров), Европы (3 центра) и Австралии (2 центра) проведены 1072 аллогенные трансплантации островковых клеток 571 реципиенту (481 изолированная трансплантация островковых клеток и 90 после или одновременно с трансплантацией почки). Среди реципиентов 31% перенес одну, 47% - две, 20% - три, 2% - от четырех до шести аллотрансплантаций. Согласно CITR количество инсулиннезависимых реципиентов к концу 1-го, 2-го, 3-го и 4-го

года составляет 70%, 55%, 45% и 36% соответственно [2]. По данным того же регистра риск осложнений в периоперационном периоде примерно в 20 раз ниже, чем при трансплантации поджелудочной железы [8]. Обсуждаемый способ лечения позволяет улучшить состояние пациента с тяжелой гликемической лабильностью и частыми, несмотря на оптимизацию инсулинотерапии, гипогликемическими эпизодами. Кроме того, данная процедура замедляет прогрессирование осложнений диабета. Еще одним положительным аспектом является то, что здоровые островковые комплексы можно получить из поджелудочной железы, не пригодной для органной трансплантации, что особенно важно при нехватке донорского материала.

Цель исследования – разработка методики выделения островков Лангерганса из поджелудочной железы доноров со смертью мозга, полученной в процессе операции по мультиорганному забору.

Задачи: разработать методику забора поджелудочной железы у донора со смертью мозга и подготовки её к дальнейшей ферментативной обработке; выделить островки Лангерганса и оценить их эндокринную принадлежность и жизнеспособность.

Материалы и методы. Забор поджелудочной железы производили у доноров ($n=2$) со смертью мозга с бьющимся сердцем. Доноры соответствовали стандартным критериям донорства: их возраст составил 32 и 30 лет, индекс массы тела – 28 и 26, отсутствовал алкогольный анамнез, не было эпизодов гипотонии в процессе кондиционирования. По сумме морфометрических параметров и оценке после флашинга поджелудочная железа указанных доноров была признана непригодной для органной трансплантации.

В процессе операции мультиорганного забора до флашинга манипуляции с верхнебрыжеечной, гастродуоденальной и селезеночной артериями были минимальными для снижения риска вазоспазма и ишемии поджелудочной железы. Была применена статическая холодовая консервация с использованием раствора Кустодиол (Dr. F.Kohler Chemie GmbH, Германия). Во время флашинга поджелудочную железу окружали ледяной крошкой для наиболее эффективного снижения температуры, после флашинга чревный ствол и воротную вену пересекали «в пользу» аллографта печени, после эксплантации которого пересекали первую и четвертую части 12-перстной кишки. Орган удаляли вместе с участком 12-перстной кишки и селезенкой. Капсула поджелудочной железы оставалась интактной.

После доставки органокомплекса в Республиканский научно-практический центр трансплантации органов и тканей в условиях операционной проводили подготовку поджелудочной железы к выделению комплекса островковых клеток. После отделения селезенки, 12-перстной кишки, крупных сосудов и жировой ткани производили канюляцию протоковой системы гибкими пластиковыми катетерами диаметром 1 мм. Со стороны 12-перстной кишки канюлировали выходные отверстия главного и добавочного панкреатических протоков. В области перешейка надсекали паренхиму поджелудочной железы в проекции главного панкреатического протока, последний выделяли и катетеризировали в обе стороны без полного пере-

сечения (рис. 1). Время холодовой ишемии составило 8 и 4 часа соответственно.

Выделение островков Лангерганса проводили согласно инструкции SOP ICPF-001 «Выделение островков из поджелудочной железы человека» с некоторыми модификациями [4]. Разрушение экзокринной паренхимы поджелудочной железы проводили путём инфузии смесью ферментов нейтральной протеазы NB (активность $\geq 1,6$ Ед/мг) и коллагеназы NB 1 (активность $\geq 5,52$ Ед/мг) (Serva Electrophoresis, Германия) в проток поджелудочной железы (ретроградная внутрипротоковая ферментация) при температуре 37°C . Для дальнейшей ферментативной обработки и расщепления до отдельных островков, экзокринных клеток и клеток микроокружения поджелудочную железу помещали в камеру Рикорди (Biorep Technologies, США) (рис. 2) и инкубировали 20-25 мин. при температуре 37°C . После ферментативного расщепления в камере железу подвергали механической перфузии средой с использованием перистальтического насоса со строгим соблюдением температурного режима на каждом из этапов процессинга.

Сепарирование изолированных островковых комплексов от экзокринной составляющей проводили центрифугированием с предварительной мануальной последовательной загрузкой градиентов плотности Ficoll DL-400 (Sigma-Aldrich, Германия) (1,110, 1,096 и 1,069 мг/л соответственно) и суспензии клеток.

Принадлежность выделенных клеток к островкам Лангерганса определяли методом окрашивания образцов дитизином (Millipore S.A.S., Франция). Подсчёт количества островковых клеток проводили при микроскопировании с применением фазового контраста (Nikon, Япония) (рис. 3).

Жизнеспособность островковых клеток после выделения и в процессе культивирования *in vitro* определяли методом исключения трипанового синего. Культивирование клеток проводили в специализированной среде CMRL 1066 (Invitrogen, США), содержащей 10 % эмбриональной телячьей сыворотки (Invitrogen, США), 1% антибиотика (Invitrogen, США), 5,6 мМ/л глюкозы (Sigma-Aldrich, Германия) при 37°C , 95% влажности и 5%

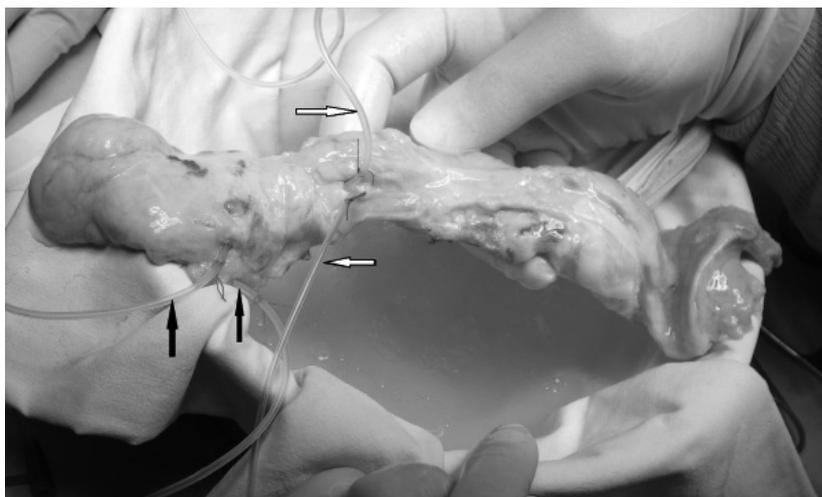


Рис. 1. Канюлирование главного и добавочного панкреатических протоков со стороны двенадцатиперстной кишки (обозначено чёрными стрелками) и канюлирование главного панкреатического протока в обе стороны на уровне перешейка (обозначено белыми стрелками) [Яковец Н.М., Назарова Е.А.].



Рис. 2. Подготовительный этап изоляции островковых клеток поджелудочной железы в камере Рикорди [Назарова Е.А., Яковец Н.М.].

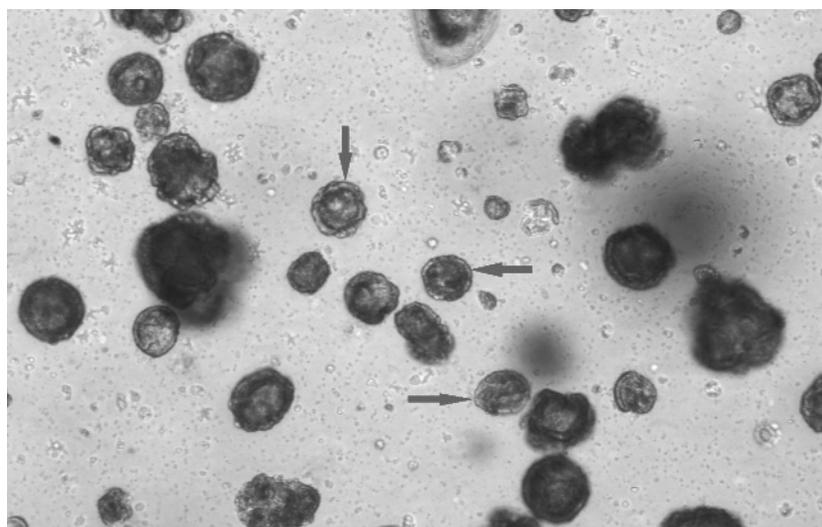


Рис. 3. Клетки, выделенные из поджелудочной железы, фазовый контраст, увеличение $\times 100$, окраска дитизином. (Островки Лангерганса обозначены стрелками) [Назарова Е.А., Яковец Н.М.].

содержании CO₂ в течение 72 часов из расчёта 500 - 700 островков на 1 мл культуральной среды. Замену среды (половину объёма) производили 1 раз в 3 дня.

Результаты и обсуждение

Методика выделения поджелудочной железы в процессе мультиорганного забора от донора со смертью мозга с бьющимся сердцем использована в двух случаях. Использованный метод выделения и канюляции протоковой системы поджелудочной железы позволили предупредить повреждения капсулы железы и эффективно нагнетать ферментативный раствор во все отделы поджелудочной железы без уклонения. Все это позволило получить пригодный для выделения комплекса островковых клеток орган.

В процессе изоляции островков из поджелудочной железы донора полуавтоматическим методом получено 30 000 и 168 000 островковых эквивалентов (в первом и втором случаях соответственно). Совместно с эндокринными клетками визуализировалась значительная примесь экзокринного компонента (около 50%). Жизнеспособность островковых клеток в методе по исключению трипанового синего после выделения и в процессе культивирования *in vitro* составила 99 %. Этот факт свидетельствовал о правильности выбора концентрации и соотношения ферментов, а также соблюдения требуемых температурных и временных режимов при обработке железы.

Выделение островковых клеток считается успешным, если клеточность составляет более 300 000 островковых комплексов, что позволяет выполнить трансплантацию реципиенту массой примерно 60 кг. Обсуждая причины недостаточного количества полученного в нашем исследовании материала необходимо отметить, что на данный параметр может влиять способ консервации поджелудочной железы. Так, консервация с использованием перфлюорокарбонатов по мнению Y. Kuroda способствует синтезу молекул АТФ и повышает «сохранность» органа [5]. Однако исследования J. Caballero-Corbalán указывают на отсутствие достоверной разницы в количестве и качестве полученных островков поджелудочной железы при сравнении консервации перфлюорокарбонатами со статической холодной консервацией [3]. Это объясняется тем, что перфлюорокарбонаты не проникают внутрь ишемизированного органа и эффективность их мала применительно к поджелудочной железе человека. В исследовании M.J. Taylor отмечено, что гипотермическая машинная перфузия обеспечивает непрерывную доставку пластического материала к ишемизированным клеткам поджелудочной железы и позволяет выводить продукты метаболизма, что способствует сохранению жизнеспособности большего объема клеточного материала. Возникающий при данном виде консервации отек поджелудочной железы обеспечивает лучшее переваривание и больший клеточный выход [10]. В сообщениях W.E. Scott показано достоверное увеличение уровня АТФ во всей ткани поджелудочной железы после 24 часов перфузии (длительной перфузии газообразным увлажненным кислородом через сосуды эксплантационного органа) в сравнении со статической консервацией и консервацией перфлюорокарбонатами, что позволило получить более жизнеспособную культуру

островковых клеток [9].

Кроме вариантов консервации поджелудочной железы не меньшее значение имеет метод выделения клеточной культуры. С. Ricordi в своих исследованиях указывает, что для получения фракции островковых комплексов высокой степени очистки (≥70 %) необходимо применение полностью автоматизированной системы сепарации центрифужного типа (например, клеточный сепаратор COBE 2991) [6].

К тому же в последнее время активно ведутся исследования по возможности экспансии островковых клеток в процессе культивирования, что также позволит подготовить клеточный трансплантат, богатый островковыми комплексами.

Таким образом, трансплантация островковых клеток открывает большие перспективы лечения больных СД 1. Полученные предварительные результаты свидетельствуют о возможности получения островковых комплексов, пригодных для аллогенной трансплантации. Вместе с тем, объем клеточного материала, несмотря на сохранение его функциональной активности, является недостаточным. Это требует усовершенствования технологий на всех этапах подготовки клеточного трансплантата. Для решения данной проблемы изучаются возможности преколонизации доноров, использования добавок в консервирующие растворы, применения новых способов консервации поджелудочной железы (машинная перфузия и персуфляция, использование перфлюорокарбонатов), культивирования островковых комплексов совместно с мезенхимальными стволовыми клетками.

Литература

1. Шепелькевич, А.П. / Статья главного внештатного эндокринолога Министерства здравоохранения Республики Беларусь к всемирному Дню диабета // [Электронный ресурс] – Режим доступа: http://www.rspch.by/ZOG_sugar.html. Дата доступа: 30.08.2013.
2. Электронный ресурс Коллаборативного регистра трансплантации островковых клеток. Режим доступа: <http://www.citregistry.org>. Дата доступа: 30.08.2013.
3. Caballero-Corbalán J. et al./ No beneficial effect of two-layer storage compared with UW-storage on human islet isolation and transplantation // *Transplantation*, 2007, № 84(7), с.864-9.
4. Human pancreatic islet isolation SOP ICPF-001 Cell Transplant Center, Diabetes Research Institute, University of Miami Miller School of Medicine, 2010.
5. Kuroda Y. et al./ The possibility of restoration of human pancreas function during preservation by the two-layer method following normothermic ischemia // *Transplantation*, 1994 - № 2, Vol.57, с. 282-285.
6. Ricordi C., Lacy P.E. et al/ Automated method for isolation of human pancreatic islets // *Diabetes*, 1988, № 37, с. 413.
7. Robertson R.P. et al./ Pancreas Transplantation in Type 1 Diabetes // *Diabetes Care*, 2004, № 27 (дополнение 1), с.105.
8. Sá JR, Gonzalez A.M. et al./ Transplante de pâncreas e ilhotas em portadores de diabetes melito // *Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia*, 2008 - № 52, с. 355-66.
9. Scott, W.E. et al./ Pancreas oxygen persufflation increases ATP levels as shown by nuclear magnetic resonance // *Transplantation Proceedings*, 2010, № 6, Vol.42, с.2011-2015.
10. Taylor, M.J., Baicu S.C./ Current state of hypothermic machine perfusion preservation of organs: the clinical perspective // *Cryobiology*, 2010, № 60, с. 20-35.
11. Venstrom, J.M., McBride M.A. et al./ Survival After Pancreas Transplantation in Patients With Diabetes and Preserved Kidney Function // *JAMA*, 2003 - № 290(21), с. 2817-23.

Поступила 2. 09.2013 г.