

КСЕНОТРАНСПЛАНТАЦИЯ КУЛЬТУРЫ В-КЛЕТОК В ЛЕЧЕНИИ ИНСУЛИНЗАВИСИМОГО САХАРНОГО ДИАБЕТА

В клинических условиях 6-ти больным с инсулинзависимым сахарным диабетом выполнена ксенотрансплантация культуры в-клеток эмбрионов и новорожденных кроликов в просвет аорты и глубокую артерию бедра. После операции, со сроком наблюдения до 1 года, наблюдался хороший клинический антидиабетический эффект со снижением суточного профиля гликемии, инсулинпотребности на 60-65%, повышением уровня С-пептида, иммунореактивного инсулина и снижением гликирования белков по фруктозаминному тесту.

Ключевые слова: инсулинзависимый сахарный диабет, ксенотрансплантация, культура островковых клеток

Xenotransplantation of b-cell embryo culture and newborn rabbits into the aorta lumen and dup. femoral artery was performed in 6 patients in the hospital. Good antidiabetic effect with a daily glycemia profile decrease, 60 – 65 % of insulin requirement, C-peptide, imunoreactive insulin level increase and protein glycoenating decrease due to the fructosamine test was obtained after the operation during one year of observation.

Key words: insulin dependent diabetes mellitus, xenotransplantation, islet cell culture.

Несмотря на достижения современной диабетологии, проблема лечения инсулинзависимого сахарного диабета (ИЗСД) остается весьма актуальной. Неуклонно растет число больных, и по данным ВОЗ заболеваемость диабетом составляет 3—5% населения земного шара, а с учетом недиагностированных форм распространенность его достигает 6 — 7%. В структуре летальности основное место занимают коматозные состояния, диабетическая нефропатия с развитием почечной недостаточности, синдром диабетической стопы с развитием диабетической гангрены, сосудистые и кардиальные осложнения. Фундаментальные медицинские исследования создали предпосылки для разработки и внедрения в клиническую практику новых препаратов инсулинзаместительной терапии. Получены новые формы инсулина, созданы аппараты искусственной поджелудочной железы. Однако развитие инсулинрезистентности, не контролируемые гипо- и гипергликемические состояния, особенно в ночное время, не позволяют считать консервативный метод окончательным в лечении сахарного диабета.

В связи с этим в последние годы большое распространение получили трансплантационные методы лечения ИЗСД – аллотрансплантация поджелудочной железы на сосудистых связях и свободная пересадка островковых клеток. Как известно, манифестация диабета наступает при гибели 80% в-клеток, а общая масса островковой ткани поджелудочной железы составляет лишь 1—2%. Поэтому пересадку в-клеток следует признать наиболее рациональным методом в лечении ИЗСД. Показания к сегментарной или полной трансплантации поджелудочной железы в настоящее время сужены и касаются случаев развития у пациентов уремической стадии диабетической нефропатии [9]. В этих случаях может выполняться одновременная трансплантация как поджелудочной железы, так и почки. Несмотря на биологическую целесообразность такого вмешательства, по данным лучших трансплантационных центров Европы и Америки, остается высокой

послеоперационная летальность, крайне высокая себе-стоимость вмешательства, необходимость длительной иммуносупрессивной терапии, а осложнения иммуносупрессивного и хирургического характера достигают 75% [4,8,9].

Свободная пересадка островковых клеток является биологической альтернативой трансплантации поджелудочной железы, а предварительное выделение и культивирование β -клеток практически исключает введение реципиенту иммунологически агрессивной экзокринной панкреатической части железы.

Наиболее распространенным источником получения культуры островковых клеток считается неонатальная и фетальная ткань человека. Однако, несмотря на большие преимущества, получение культуры клеток плодов и новорожденных человека имеет свои существенные недостатки: дефицит аллогенного материала, что не позволяет создать достаточный банк культуры клеток, религиозные проблемы и негативная реакция общества; трудоемкий протокол обследования доноров на широкий спектр тяжелых, а порой и смертельных инфекций.

С 1983 г. НИИТ и ИО (г.Москва), учитывая хороший антидиабетический эффект островковых ксенокultur, стали использовать донорский материал, полученный из ксеногенных источников: плодов крупного рогатого скота, свиней и т.д., а с 1990 г. — донорский материал плодов и новорожденных кроликов. Выбор кроличьего материала связан с тем, что: белковая структура кроличьего и человеческого инсулина весьма похожи (различия только по нескольким аминокислотам); хороший антидиабетический эффект кроличьего инсулина; хорошая репродуктивная способность кроликов, что позволяет создать достаточный банк культуры клеток, сокращается протокол микробиологического обследования [1,4].

Несмотря на очевидные преимущества свободной трансплантации островковых клеток перед трансплантацией всего органа, результаты алло- и ксенотрансплантаций остаются не вполне удовлетворительными. Это связано, главным образом, с непродолжительностью антидиабетического эффекта, что требует в последующем дополнительных подсадов клеток. По данным литературы, максимальное функционирование клеток наблюдается в течение 6 — 10 мес. При этом зона трансплантации (воротная вена, пульпа селезенки, печени, большой сальник и т.д.) не имеет существенного значения. Причиной гибели клеток является, как правило, реакция отторжения [2,4,5,6,8].

Многочисленными экспериментальными исследованиями белорусских ученых было доказано, что ткани, имеющие диффузионный тип питания, в токе крови как аиммуногенной зоне, могут длительное время сохраняться, не подвергаясь реакции отторжения [2,3]. Ранее проведенные нами экспериментальные исследования на собаках с аллоксановым сахарным диабетом показали, что ксенокultura кроликов, помещенная в капсулу и имплантированная в аорту, создает хороший стойкий нормогликемический эффект в течение 2-х и более лет [1,2,3]. Учитывая большой экспериментальный опыт и опыт ксенотрансплантаций НИИТ и ИО [4], целью нашего исследования явилось оценить эффективность трансплантации культуры островковых клеток поджелудочной железы эмбрионов и новорожденных кроликов в лечении больных ИЗСД.

Материал и методы. Получив разрешение Министерства здравоохранения Республики Беларусь на ксенотрансплантацию β -клеток, в течение 2001—2002 г.г. нами выполнено 6 трансплантаций больным, страдающим ИЗСД. Длительность заболевания диабетом колебалась от 16 до 30 лет. Возраст больных составлял 23—56

лет. Суточная потребность в инсулине составляла 56—62 Ед. Среди больных был 1 мужчина, остальные женщины. Несмотря на постоянное наблюдение эндокринолога, периодическое стационарное лечение в эндокринологических клиниках, течение диабета у всех больных было крайне нестабильное с частыми гипо- и гипергликемическими состояниями. У всех пациентов имели место в той или иной степени явления нефропатии, ретинопатии, ангиопатии.

Для фиксации клеточного материала в просвете сосудистого русла в эксперименте нами был разработан контейнер, изготовленный из полиамида и представляющий собой полупроницаемую мембрану. Основными требованиями к материалу явились: хорошая диффузионная способность и проницаемость для трофогенов, биоинертность в отношении иммобилизованной 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 исключения возможности развития лимфоцитарной и макрофагальной реакции на ксенокультуру, оптимальным размером явились поры диаметром 1—2 м. Размеры капсулы составили 12—15 мм в длину и 4—5 мм в диаметре.

Культуру островковых клеток получали по методике Mislér S. et al.[7] в нашей модификации с последующим микробиологическим, вирусологическим и опухолепластическим тестированием. Функциональную активность культуры определяли с помощью набора для определения иммунореактивного инсулина. Общее количество клеток для каждой трансплантации составляло 6—10 млн.

Трансплантацию культуры β -клеток проводили в абдоминальный отдел аорты (1 больной) и в глубокую артерию бедра с использованием аутовенозной ангиопластики (5 больных). До- и послеоперационный контроль эффективности ксенотрансплантации осуществляли на основании определения С-пептида (C-Peptide Irma, Immunotech, Чехия), иммунореактивного инсулина (RIO-ИНС-ПГ-1251, ИБОХ, Беларусь), сывороточного фруктозамина (Fructosamin kit, Rosh-diagnostik, Польша), а также суточного профиля гликемии и инсулинпотребности.

Результаты и обсуждение. Первые сутки послеоперационного периода у всех пациентов наблюдалось значительное снижение гликемии, вплоть до нормогликемии и инсулинпотребности до 6—16 Ед/сут, что мы связывали с диффузией «базального» инсулина из капсулы в просвет сосудистого русла. В последующем гликемия нарастала, и инсулинпотребность возрастала до 40—45 Ед/сут. Нестабильное течение диабета, скорее всего, 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).

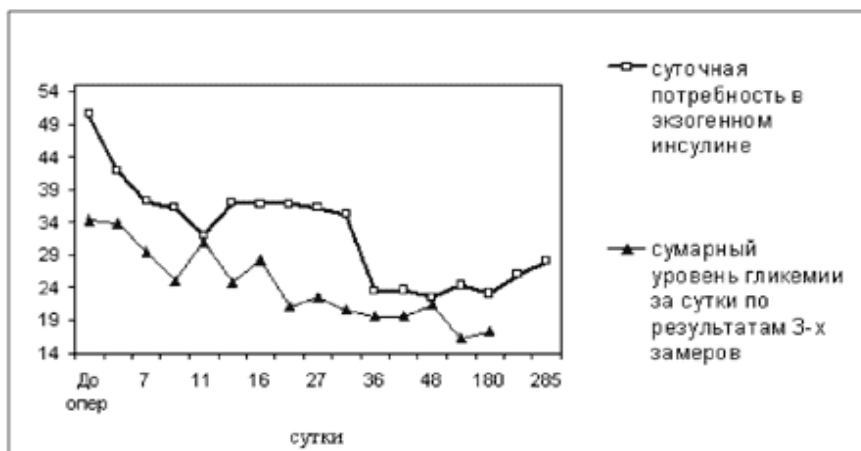


Рис.1. Динамика инсулинпотребности и гликемии

В течение всего периода наблюдения эти показатели оставались стабильными и общее снижение инсулинпотребности достигало 60—65%.

Одновременно со стабилизацией течения диабета значительно улучшалось состояние больных. Исчезала жажда, гипо- и гипергликемические состояния, чувство страха перед возможным развитием гипоккомы. Через 6—8 месяцев больные отмечали увеличение массы тела на 3—5 кг, а в биохимическом анализе крови уровень общего белка и его фракций достигал нормы.

О стабилизации течения диабета и росте компенсации эндокринно-метаболических процессов у всех пациентов свидетельствовал и постепенный подъем уровня С-пептида, который с нулевой отметки, что говорит о полной несостоятельности собственного островкового аппарата, поднимался до 28 Нмоль/мл, а при стимуляции до 36 Нмоль/мл (постпрандильный уровень). Максимальный подъем уровня С-пептида прямо коррелировал с клинической стабилизацией диабета, снижением инсулинпотребности, суточной гликемии и достоверным повышением уровня ИРИ (рис.2).

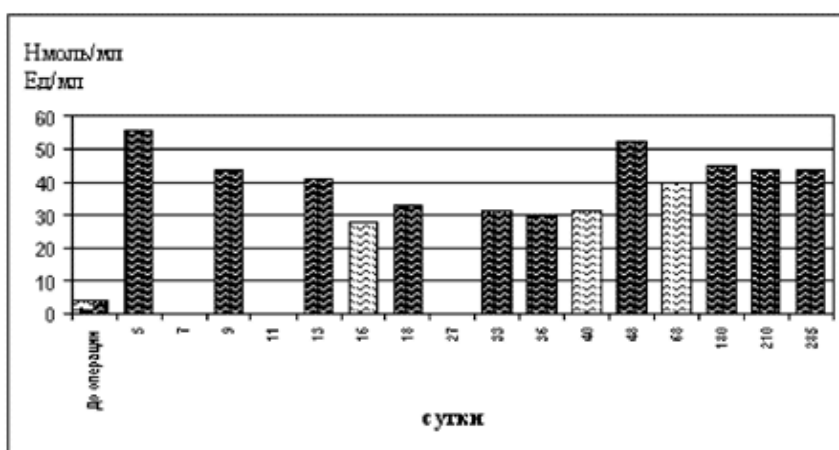


Рис. 2. Динамика изменения С-пептида и иммунореактивного инсулина

Еще одним подтверждением компенсаторного влияния ксенотрансплантации явилось снижение гликирования белков, что подтверждалось достоверным снижением уровня сывороточного фруктозамина у всех пациентов (рис.3).

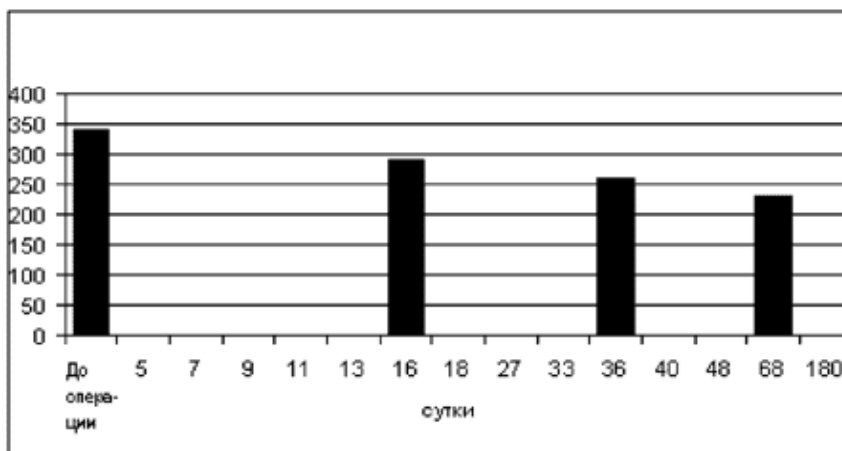


Рис. 3. Динамика изменения сывороточного фруктозамина

Послеоперационный период протекал без осложнений. Только у одного больного, поступившего с выраженной нефропатией и явлениями ХПН, в течение 30 дней отмечалась лимфорея. Всем пациентам через 2 недели, 30 дней и 6 месяцев назначалась 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, а скорость кровотока по общей бедренной артерии составляла в среднем 1,35 м/с, по глубокой артерии бедра в зоне трансплантации – 1,5 м/с.

Выводы

1. Ксенотрансплантация островковых клеток поджелудочной железы по разработанной методике позволяет значительно снизить инсулинзависимость и уменьшить инсулинпотребность на 60 – 65%.
2. Полностью компенсировать гипо- и гипергликемические состояния.
3. Стабилизировать течение сахарного диабета.
4. Улучшить качество жизни диабетиков.

Литература

1. Прохоров А.В., Третьяк С.И., Горанов В.А., Маркелов Д.В. Свободная трансплантация культуры в-клеток в лечении экспериментального сахарного диабета // Актуальные вопросы современной медицины: Материалы юбилейной научн. конф., посв. 80-летию БГМУ в двух частях. Часть II / Под ред. С.Л.Кабака. - Мн.: БГМУ, 2001, с.91-93.
2. Третьяк С.И. Длительное сохранение жизнеспособности аллогенных тканей в сосудах и сердце реципиента (эксперимент.исслед.). Автореф.дис. ...д-ра мед.наук: 14.00.27, 14.00.41/ БелГИУВ.- Мн., 1996, - 33 с.
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, 22-23 апреля 1999 г./ МЗ РБ в 2-х ч. – Гродно, 1999.- с.190-191.
4. Шумаков В.И., Блюмкин В.Н., Сколецкий Н.Н. и соавт. Трансплантация островковых клеток поджелудочной железы. Изд-во «Канон», 1995. – 383 с.
5. Kim S.C., We Y.M., Lee J.H. et al. Impact of purification of pancreas islet in canine intraportal islet transplantation // Transpl.Proc.- 1998.- Vol.30, №7.- P.3423-3424.
6. Lacy P.E. Islet transplantation in diabetes mellitus // Diabetes.- 1990.- Vol.111, №3 .- P.1-3.
7. Misler F., Mordes J.P., Rossini A.A. Animal models of diabetes // Am.J.Med., 1981.- Vol.70(2).- P.353-360.

8. Sutherland D.E.R., Moundry K.C. Clinical pancreas and islet transplantation // Transplant. Proc.- 1987.- Vol.19, №1. – P.113-120. Toledo-Pereyra L.H., Dewan S., Mittal V.K., Gordon D.A. Clinical pancreas transplantation. Complete review of eight years experience // Arch.Surg., 1991.- Vol.55, №9.- P.576-581.