

**Использование изолированных участков сосудов при трансплантации островковых клеток поджелудочной железы**  
*Белорусский государственный медицинский университет*

Сосудистая стенка обладает необходимыми иммунопротективными свойствами, позволяющими обеспечить долговременное сохранение жизнеспособности и функционирования трансплантата при пересадке его в изолированный участок сосуда без применения иммуносупрессивной терапии. Данная методика может быть использована при отсутствии условий для внутрисосудистой макрокапсулярной трансплантации или как дополнительный метод пересадки в комплексном лечении больных сахарным диабетом.

Ключевые слова: трансплантация островковых клеток, иммуноизоляция, сахарный диабет, сосудистая стенка.

Несмотря на использование различных методологических подходов при пересадке панкреатических островковых клеток у больных сахарным диабетом основной причиной неудач остается иммуноопосредованная деструкция трансплантата. При этом основная роль в развитии деструкции отводится Т-лимфоцитам в особенности субклассам лимфоцитов CD3 и CD4, которые запускают процессы разрушения трансплантата [3,9,16]. CD3 – это мембраносвязанный белковый комплекс, состоящий из пяти гликопротеинов, связанный с антигенспецифическим рецептором (Ti). Этот комплекс «CD3+Ti» и представляет собой антигенспецифический Т-клеточный рецептор периферических Т-лимфоцитов человека. Связывание антигена, ассоциированного с детерминантами МНС, является специфическим сигналом для активации зрелой Т-клетки. При этом CD3 участвует в передаче сигнала внутрь клетки. Непосредственным результатом связывания антигена с рецептором является поступление в клетку ионов Ca<sup>2+</sup> [3,4].

CD4 – антиген гликопротеиновой природы, который экспрессирует примерно на 2/3 периферических Т-лимфоцитов. На этапе созревания клеток в тимусе CD4 экспрессируется всеми клетками, а в ходе их дифференцировки сохраняется только на субпопуляции, переставшей экспрессировать CD8-антиген. В периферической крови примерно 5% клеток несут одновременно маркеры CD4 и CD8. Зрелые CD4<sup>+</sup>-Т-клетки включают Т-лимфоциты, функционально характеризуемые как хелперы и индукторы. При контакте Т-лимфоцитов (Ti/h – индукторов хелперов) с антигенпрезентирующей клеткой CD4 выступает в роли специфического места связывания детерминант белковых молекул МНС класса II [3,4].

Важное значение в развитии иммунных реакций также играют субклассы CD8, CD25, которые отвечают за активность и стабильность иммунитета. CD8 – антиген, который экспрессируется примерно на 1/3 периферических Т-клеток, созревающих из CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup>-Т-лимфоцитов. Субпопуляция CD8<sup>+</sup>-Т-клеток включает цитотоксические и супрессорные Т-лимфоциты. При контакте с клеткой-мишенью CD8 выступает в роли рецептора неополлиморфных детерминант белков МНС класса I [3,6].

Антиген CD25 экспрессируется на активированных Т-лимфоцитах. Это гликопротеин, идентифицированный как низкоаффинный рецептор к интерлейкину-2 (IL-2). Совместно с белком 75К антиген CD25 образует высокоаффинный рецептор ИЛ-2 [4].

Достаточно широкое применение Эдмонтонского протокола интрапортальной аллогенной трансплантации островковых клеток показало, что использование интенсивной иммуносупрессивной терапии позволяет в течение года добиться инсулиннезависимости приблизительно у 50% реципиентов. Однако высокая себестоимость вмешательства (от 90 до 120 тыс. долларов США в год), необходимость постоянной высокоэффективной иммуносупрессивной терапии и повторных трансплантаций в течение года, дефицит аллогенного материала не позволяют считать данный метод окончательным [12,13]. В тоже время рядом экспериментальных и клинических исследований было показано, что применение микропористой макроинкапсуляции ксеногенных островков с имплантацией трансплантата в сосудистое русло, позволяет полностью отказаться от иммуносупрессивной терапии и добиться долговременного выживания островков с выраженным антидиабетическим эффектом. При этом наиболее благоприятными зонами трансплантации являются сосуды предплечья или глубокая артерия бедра [7]. К сожалению, развитие у больных сахарным диабетом макро- и микрососудистых осложнений в ряде случаев делает невозможным внутрисосудистую трансплантацию макроинкапсулированной культуры островковых клеток. Ранее проведенные экспериментальные исследования по пересадке алло-и ксеногенной эндокринной ткани в полости сердца и аорту без иммуноизоляции продемонстрировали длительное выживание трансплантата и отсутствие признаков его отторжения, что позволило утверждать, что сосудистое русло является иммунологически выгодной зоной, где не срабатывают ни клеточные, ни гуморальные компоненты иммунитета [8]. На основании этих исследований стало возможным предположить, что иммунопротекция в сосудистом русле связана не только с кровотоком, но и с некоторыми свойствами сосудистой стенки препятствующими развитию иммунологического конфликта в системе «реципиент – клеточный трансплантат». Поэтому, целью настоящего исследования явилось экспериментальное изучение иммунопротективной функции сосудистой стенки на основании исследования иммунного ответа реципиента при пересадке ксеногенных панкреатических островковых клеток в изолированную вену бедра, а также оценка морфологических изменений трансплантата в различные сроки после трансплантации.

#### Материал и методы

Исследования были проведены на шести беспородных собаках массой 12-17 кг. В эксперименте использована аллоксаниндуцированная модель сахарного диабета по методике В.Г. Баранова и соавт. [1]. Для индукции диабета был использован препарат «Аллоксангидрат ч.» («Хемапол», Чехия). Аллоксан вводился внутривенно в дозировке 70 мг/кг. Культуру ксеногенных островковых клеток получали от плодов кроликов по методике О. Korsgen et al. [10]. С целью повышения устойчивости культуры клеток к посттрансплантационному стрессу её обрабатывали диabetопротекторами: никотинамидом и аминокислотным

комплексом [2]. Активность культуры после ее стимуляции 5 мМ глюкозой в течение суток составляла не менее 1000 нМоль/л.

Под общей внутривенной анестезией раствором тиопентала производили разрез параллельно ходу бедренной вены. Последняя на протяжении 4-5 см обнажалась, притоки перевязывались. Приводящий и отводящий концы сосуда лигировались. Через проксимальный конец сосуд опустошали от крови, промывали физиологическим раствором для удаления всех форменных элементов, и перевязывали. Взвесь островковых клеток в количестве более 6000 IQS/кг вводилась в просвет сосуда пункционно инсулиновым шприцем. Рана ушивалась наглухо. В послеоперационном периоде назначалась антимикробная терапия раствором гентамицина 80 мг внутримышечно два раза в сутки.

Инсулинотерапия не проводилась в течение всего послеоперационного периода. Исследование уровня гликемии проводили с использованием тест-полосок и глюкометра AccuCheck (Германия). Забор крови осуществляли в течение первых семи суток ежедневно, после чего в течение недели-один раз в три дня, далее – раз в неделю. Все исследования проводились во временном интервале 1230-1330. Для оценки иммунологического ответа реципиентов на ксенотрансплантацию и эффективности иммуноизоляции проводили исследование свежезамороженных лимфоцитов. Определяли субклассы CD3, CD4, CD8 и CD25. В предтрансплантационном периоде всем животным проводили забор крови для определения базового уровня Т-лимфоцитов, относительно которых и определялось изменение показателей. После пересадки островковых клеток исследования выполняли спустя десять суток, один, три и шесть месяцев после операции. Литературные данные свидетельствуют, что в эти сроки наблюдается максимальная активация иммунных реакций, которые в дальнейшем стабилизируются [14]. Забор крови осуществлялся во временном интервале 1200 – 1300. Исследование осуществлялось на аппарате FACS Vantage. Полученные данные вносились в компьютерную базу данных и обрабатывались с помощью программ MS Excel и Statistica 6,0. Учитывая небольшое количество исследований оценка достоверностей изменений показателей проводилась с использованием критерия Мана-Уитни. Сроки наблюдения за животными составили 12 месяцев.

Забор материала для морфологического исследования проводился на 14, 30 день, спустя 3, 6, 12 месяцев после операции. Препараты окрашивали гематоксилин – эозином и подвергали световой микроскопии с использованием микроскопа Karl Zeiss (увеличение 10x, 100x, 400x).

#### Результаты и обсуждение

В предоперационном периоде у животных развивались все признаки диабета-снижение активности, жажда, выпадение шерсти, отказ от пищи. Уровень гликемии составлял  $13,7 \pm 2,6$  ммоль/л ( $p \leq 0,05$ ). Начиная со вторых суток после трансплантации наблюдалось постепенное снижение уровня глюкозы крови на 20 – 25% в сутки и купирование клинических признаков диабета. Нормализация гликемии наступала к 4 суткам после операции и составляла  $4,1 \pm 2,1$  ммоль/л ( $p \leq 0,05$ ). Эти показатели сохранялись практически неизменными с колебаниями в пределах статистической достоверности в течение всего периода наблюдения. Вместе с этим исчезали и клинические проявления диабета.

Для определения исходных значений иммунограммы мы определяли уровень CD-белков в предоперационном периоде. Учитывая, что введение аллоксана может вызвать изменения в иммунологическом статусе животного, забор крови проводился непосредственно перед введением последнего. Уровни CD-белков в пред- и послеоперационном периоде представлены в таблице.

Таблица

Уровни CD-белков в различные сроки до и после трансплантации в изолированное сосудистое русло (n=6)

T-лимфоциты сутки	CD 3	CD 4	CD 8	CD 25
До операции	13,20±2,95*	7,80±2,28*	3,60±0,89*	4,00±1,22*
10 сут	13,80±2,49*	8,20±2,17*	4,40±1,15*	3,80±1,30*
1 мес	13,80±2,94*	8,20±1,64*	3,20±0,83*	3,60±1,34*
3 мес	14,40±2,79*	8,00±1,73*	3,40±1,34*	3,80±1,64*
6 мес	13,00±3,00*	7,40±1,51*	4,00±1,41*	4,60±1,34*
6 мес				

\* -достоверность  $p < 0,05$ .

Основное прогностическое значение в развитии иммунной агрессии против пересаженных островковых клеток имеют субклассы лимфоцитов CD3 и CD4. Именно они первыми активируются при попадании в организм чужеродного агента и запускают всю цепь реакций иммунного ответа. В нашем исследовании мы не отметили статистически достоверных изменений показателей данных субклассов лимфоцитов. Также не было отмечено возрастание количества активированных лимфоцитов (CD 25). Не наблюдалось и увеличения CD 8 лимфоцитов, что свидетельствовало о стабильности иммунологических параметров (рис. 1).

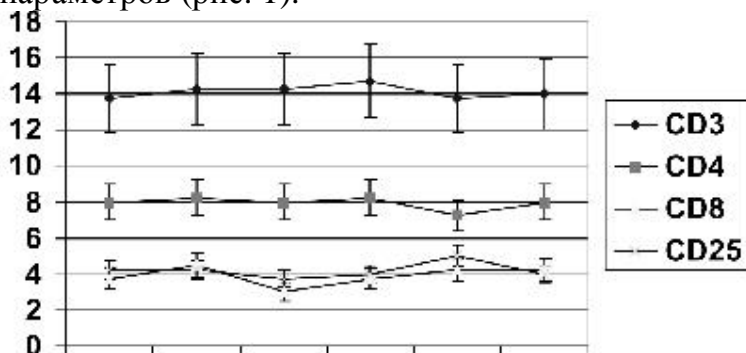


Рис. 1. Динамика изменений CD3, CD4, CD8, CD25 в плазме экспериментальных животных до и после трансплантации островковых клеток

При морфологическом исследовании спустя 14 суток после трансплантации в просвете изолированного участка вены определялась взвесь островковых клеток без четкой структуры. Клеточной инфильтрации вокруг сосуда и в его просвете не отмечалось. В то же время, среди островковых клеток начинали появляться единичные капилляры, что свидетельствовало о начале неоангиогенеза. К тридцатым суткам после операции происходила структуризация трансплантата, с формированием кластеров островковых клеток. Вокруг организующихся клеточных структур разделенных волокнами молодой соединительной ткани определялись единичные капилляры. Данные изменения отмечались и спустя три месяца после пересадки, однако выраженность микроциркуляторного русла значительно возрастала. Этот процесс полностью завершился к шестому месяцу

после операции и трансплантат представлял собой клеточные образования, подобные островкам Лангерганса, которые разделялись волокнами соединительной ткани, окруженные разнокалиберными капиллярами (рис.2).

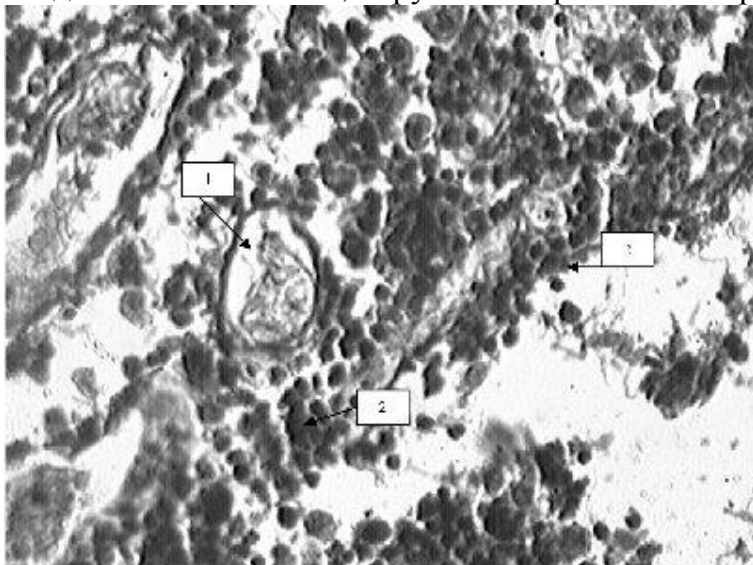


Рис. 2. Культура островковых клеток в изолированном сосуде спустя 6 месяцев после трансплантации (окраска гематоксилин-эозин, х60, 1-капилляр, 2-островковые клетки)

Экспериментальные исследования по пересадке ксеногенной культуры островковых клеток в изолированное сосудистое русло показали, что сосудистая стенка обладает иммунопротективными свойствами, позволяющими долговременно сохранять жизнеспособность и функцию трансплантата. При этом как в раннем, так и в позднем посттрансплантационном периодах отсутствуют лимфоцитарная и макрофагальная инфильтрация трансплантата, а также и активация клеточного иммунитета. Это свидетельствует о том, что изолированный участок вены может использоваться как биологический контейнер для макроинкапсулированной культуры клеток. С нашей точки зрения принципиально важным является деликатное выделение участка сосуда. Во время его мобилизации мы стремились сохранить его связь с окружающими тканями, что обеспечивало сохранение адекватного питания сосудистой стенки, а, следовательно, сохранение трофики и максимальной выживаемости трансплантата до развития неоангиогенеза внутри изолированного сосуда. По данным ряда исследований неоангиогенез при любой методике пересадки клеточного трансплантата является основополагающим для сохранения его жизнеспособности [11,15]. Наши морфологические исследования свидетельствовали, что уже через 2 недели в просвете изолированной вены развивается достаточно выраженная капиллярная сеть, окружающая кластеры островковых клеток и тем самым создающая условия для долговременного выживания и функционирования трансплантата. Процессы организации трансплантата и неоангиогенеза, развивающиеся в просвете вены были аналогичны процессам, развивающимся при пересадке островковых клеток в микропористой макрокапсуле в просвет глубокой артерии бедра. Источником неоангиогенеза, скорее всего, являются эпителиоциты, попадающие в культуру островков при их выделении.

## Выводы

1. Сосудистая стенка обладает необходимыми иммунопротективными свойствами, позволяющими обеспечить долговременное сохранение жизнеспособности и функционирования трансплантата при пересадке его в изолированный участок сосуда без применения иммуносупрессивной терапии.
2. Данная методика, являясь малоинвазивным пособием, может быть использована как самостоятельный метод трансплантации островковых клеток при отсутствии условий для внутрисосудистой макрокапсулярной трансплантации из-за атеросклеротического поражения магистральных артерий или как дополнительный метод пересадки в комплексном лечении больных сахарным диабетом.

## Литература

1. Баранов, В.Г., Соколова, И.М., Гаспарян, Э.Г. и др. Экспериментальный сахарный диабет. // Роль в клинической диабетологии / Л. Наука, 1983.
2. Горанов, В.А., Горанова, Ю.А. Некоторые аспекты повышения резистентности б-клеток поджелудочной железы. // Вестник фонда фундаментальных исследований. – 2006-№ 2(36) – с. 145-154
3. Иммунология // Под ред. У. Пола. – М.: Мир, 1988.
4. Клиническая иммунология и аллергология // Под ред. Л. Йегера.: Пер. с англ. – М., 1990.
5. Клиническая иммунология и аллергология // Под ред. Г. Лолора, Т.Фишера, Д.Адельмана: Пер. с англ. – М., Практика, 2000,-806 с.
6. Лебедев, К.А., Понякина, И.Д. Иммунограмма в клинической практике-М., «Медицина». – 1990. – 256 с.
7. Прохоров, А.В. Хирургическое лечение инсулинзависимого сахарного диабета путем ксенотрансплантации островковых клеток поджелудочной железы в артериальное русло (экспериментально-клиническое исследование)// Автореф. дис. доктора мед. наук. /БелМАПО-Минск 2005
8. Третьяк, С.И. Длительное сохранение жизнеспособности аллогенных тканей в сосудах и сердце реципиента (экспериментальное исследование)// Автореф. дис. доктора мед. наук / Бел ГИУВ – Минск, 1996.
9. Giordano, C., De-Maria, R., Todaro, M. et al. Study of T-cell activation in type I diabetic patients and pre-type I diabetic subjects by cytometric analysis: antigen expression defect in vitro. // J.Clin.Immunol. 1993, 13(1), pp 68-78.
10. Korsgren, O., Sandler, S., Landstrom, A.S. et al. Large-scale production of fetal porcine pancreatic islet like cell clusters. An experimental tool for studies of islet cell differentiation and xenotransplantation // Transplantation.1988,45(30), p. 509-514.
11. Nyqvist, D., Kohler, M. et al. Donor islet endothelial cells participate in formation of function vessels within pancreatic islet grafts.// Diabetes – 2005. 54, p. 2287-2293,
12. Ryan, E.A., Paty, B.W. et al. Five – Year follow-Up After Clinical Islet Transplantation.// Diabetes, 54(7), pp 2060-2069.
13. 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.
14. Triponez, F., Oberholzer, J. et al. Xenogenic islet re-transplantation in mice triggers an accelerated, species-specific rejection // Immunology, 101(4), p. 548-554

15. De Vos, P., Hamel, A.F., Tatarkiewicz, K.: Considerations for successful transplantation of encapsulated pancreatic islets// *Diabetologia* – 2002. 45(2), p. 159-173
16. Zhan, Y., Brady, J.L., Sutherland, R.M., Lew, A.M. Without CD4 help, CD8 rejection of pig xenografts requires CD28 costimulation but not perforin killing.// *J. Immunol.* 2001, 167(11), p. 6279-85.