

Можно ли компенсировать диабет с помощью трансплантации инсулинпродуцирующей ткани в иммунопривилегированные зоны организма?

¹Куликов А. В., ²Архипова Л. В., Смирнова Г. Н., Куликов Д. А.,
³Наумов А. Д., ³Сухонос Ю. А., Куликова П. А.

¹Институт теоретической и экспериментальной биофизики РАН, г. Пущино

²Московский областной научно-исследовательский клинический институт им. М. В. Владимирского (МОНИКИ), г. Москва

³Военно-медицинская академия им. С. М. Кирова, г. Санкт-Петербург

⁴Московский государственный университет им. М. В. Ломоносова (факультет фундаментальной медицины), г. Москва

⁵Институт Радиобиологии НАН Белоруссии, г. Гомель, Белоруссия

Введение

Диабет — слово греческое и означает «сифон» или «протекать». Использование этого слова для обозначения заболевания, которое протекает с большим употреблением воды и быстрым её выведением из организма, принадлежит греческому врачу Аретерису Каппадокийскому (138–81 гг. до н. э.).

Первое клиническое описание заболевания проведено египетскими врачами за 1500 лет до нашей эры. Сахарный диабет был известен в Индии, Китае, Древней Греции и Италии. В работе индийского врача Сусрата (400 лет до н.э.) приведено не только клиническое описание болезни, но и её различные клинические формы. На основании вкуса мочи Томас Уиллис (1674) разделил диабет на сахарный (*diabetes mellitus*) и несладкий, безвкусный (*diabetes insipidus*). М. Добсон (1776) установил, что сыворотка крови и моча больных сахарным диабетом содержит сахар. На этом основании М. Добсон однозначно указал, что сахарный диабет является системным заболеванием организма, а не первичной почечной болезнью, как считалось до этого [2, 5].

Большая социальная значимость сахарного диабета состоит в том, что он приводит к ранней инвалидизации и летальности в связи с поздними сосудистыми осложнениями диабета, в числе которых — микроангиопатии (ретинопатия и нефропатия), макроангиопатии (инфаркт миокарда, инсульт, гангрена нижних конечностей), невропатии. Сахарный диабет — очень частая причина слепоты, смерти от уремии, велик риск

развития сердечно-сосудистых заболеваний. На фоне сахарного диабета летальность таких больных увеличивается в 2–3 раза. Риск развития ишемической болезни сердца и инфаркта миокарда возрастает более чем в два раза, патологии почек — в 17 раз, гангрены нижних конечностей — в 20 раз, гипертонической болезни — более чем в три раза [12, 8, 9, 2, 5].

Как следует из данных литературы, слепота, ампутация конечностей, почечная недостаточность, поражения сердечно-сосудистой системы, невропатии и другие патологии в значительно большей степени выражены у больных диабетом, чем у населения в целом. Но наиболее тревожны факты, что только 50 % больных сахарным диабетом типа 1 доживают до 50 лет. Остальные погибают преимущественно от терминальной почечной недостаточности в возрасте от 20 до 40–50 лет [6, 14, 19].

Сахарный диабет типа 1 — это болезнь, вызванная разрушением β -клеток островков Лангерганса поджелудочной железы в большинстве случаев аутоиммунного генеза. Аутоиммунная реакция против β -клеток может индуцироваться у лиц с генетической предрасположенностью, обусловленной несколькими генами, в том числе — генами области HLA на коротком плече 6-й хромосомы, под воздействием экзогенных факторов (вирусные инфекции, токсические вещества). Когда медленно и постепенно развивающийся диабет приводит к гибели 80–95 % инсулинпродуцирующих клеток, возникает абсолютный дефицит инсулина, приводящий к тяжёлым метаболическим нарушениям. Лечение

таких пациентов требует назначения пожизненной инсулинотерапии [11, 20].

На сегодняшний день, как уже говорилось, главная причина высокой смертности пациентов с сахарным диабетом типа 1 — это поздние осложнения, такие как диабетическая микроангиопатия (ретинопатия, нефропатия, нейропатия) и макроангиопатия (атеросклероз). Развитие осложненной обусловлено хронической гипергликемией и сопутствующими метаболическими нарушениями [7, 3].

К сожалению, достижение и поддержание постоянной нормогликемии оказывается довольно сложной задачей, и в подавляющем большинстве случаев результаты лечения оставляют желать лучшего. В серии работ показано, что в нашей стране в поликлинических условиях не более 15 % больных компенсированы в достаточной мере, в то время как остальная часть находится в стадии субкомпенсации или декомпенсации. При этом, несмотря на относительно хорошее самочувствие и отсутствие выраженных клинических признаков декомпенсации, показатели углеводного обмена оказываются неудовлетворительными [11].

Патогенетической терапией сахарного диабета типа 1 является экзогенный инсулин. Однако заместительная терапия инсулином не позволяет восстановить функцию β -клеток. Частичное восстановление возможно после клинической манифестации заболевания [17], но продолжающийся процесс деструкции β -клеток приводит к полному переходу на заместительную терапию экзогенным инсулином. При этом известно, что какое-то время при уже текущем аутоиммунном процессе сохраняется нормальная секреция инсулина [22]. Терапия даже высокоочищенными препаратами монокомпонентного человеческого инсулина не позволяет избежать специфических осложнений диабета и добиться полной компенсации всех видов обмена [16, 10, 21, 18]. В связи с этим большое значение в последнее время приобретают исследования в области трансплантационных способов лечения сахарного диабета, но им всегда и в обязательном порядке должны предшествовать исследования и разработки по различным моделям экспериментальных эндокринопатий и других патологических состояний [1, 13, 15]. О некоторых разработанных нами моделях мы расскажем ниже.

Задачей работы было создание экспериментальных моделей, позволяющих проследить различные физиологические изменения в организме животных в период инициации, течения и трансплантологической компенсации аллоксанового диабета, а также максимальное прод-

ление периода нормогликемии у оперированных животных.

Основным отличием разработанных нами моделей от используемых ранее в биомедицинских исследованиях является то, что инсулинпродуцирующие клетки мы пересаживали в относительно иммунопривилегированные зоны организма — переднюю камеру глаза (ПКГ) и под белочную оболочку тестикул. Эти обстоятельства позволили не использовать после трансплантации иммунодепрессанты, при этом трансплантаты обеспечивали полную или частичную нормализацию всех исследованных показателей. Если в контрольной группе с острым аллоксановым диабетом (гипергликемия более 20 ммоль/л) животные погибали, как правило, на сроках до 1 месяца, то после трансплантации эмбриональной или неонатальной поджелудочной железы в ПКГ или под белочную оболочку тестикул животные жили с полной либо частичной нормализацией основных физиологических показателей на сроках, соизмеримых с естественной продолжительностью жизни.

Материалы и методы

Получение экспериментального диабета

Экспериментальный диабет у крыс получали с помощью аллоксана фирмы «Chempol», «ДИАЭМ», «Sigma», обладающего избирательным токсическим действием на β -клетки, продуцирующие инсулин. Внутривентрикулярно вводили 5 % раствор токсина из расчёта 200–280 мг сухого вещества на 1 кг массы тела. У кроликов экспериментальный диабет вызывали внутривенным введением 170 мг/кг 5 % раствора аллоксана.

Алло- и ксенорансплантация поджелудочной железы в переднюю камеру глаза

Для трансплантации отбирали животных, у которых в течение 2-х и более недель гликемия была не менее 19,5 ммоль/л, а глюкозурия, как правило, превышала 2 %. В большинстве случаев гликемия составляла 21–25 ммоль/л. Пересаженные ткани проводили в стерильных условиях. В работе использовали крыс-доноров с 17–18-дневной беременностью, для чего предварительно за 17–18 дней к 5 самкам подсаживали 1 самца. В некоторых случаях в качестве доноров поджелудочной железы использовали новорождённых крысят.

Поджелудочную железу выделяли у эмбрионов под стереомикроскопом МБС-9. С хвостово-

го конца железы отрезали 1–2 кусочка объёмом 0,8–1 мм³, которые переносили в чашку Петри со стерильной средой Игла. Крысам-реципиентам с острым экспериментальным диабетом на глаз наносили по 1 капле 0,1 % раствора атропина и 0,5 % раствора дикаина. Трансплантацию проводили под эфирным наркозом.

Забирали материал из чашки Петри и трансплантировали его в переднюю камеру глаза туберкулиновым шприцом, фиксированным на препаратодателе. На наконечник шприца надевали тефлоновую трубочку длиной 20 см, заполненную средой Игла. Трубочка заканчивалась стеклянным наконечником (внутренний диаметр 0,8 мм), куда и попадали трансплантаты.

Разрез длиной 1,5–2 мм производили простерилизованным глазным скальпелем либо лезвием, закреплённом в держателе. Трансплантаты общим объёмом 3–4 мм³ с помощью описанного приспособления медленно (7–10 сек) выдавливали и помещали на радужную оболочку глаза, как можно дальше от разреза. Позднее в качестве инструмента для трансплантации стали использовать модернизированную микропипетку с изменяющимся объёмом от 5 до 25 мкл.

В случае ксенотрансплантации плодной железы человека или цыплёнка объём пересаживаемого материала был в среднем 3–4 мм³, в случае пересадки поджелудочной железы одномесячного поросёнка до 6 мм³, что связано с меньшим количеством эндокринной ткани в их поджелудочной железе в сравнении с плодной поджелудочной железой. Иммунодепрессантов ни до операции, ни после не использовали. После операции животных содержали на стандартной диете.

Микрохирургический метод аллотрансплантации микрофрагментов ткани неонатальной поджелудочной железы в паравазальную клетчаточную щель семенника

Метод трансплантации был разработан совместно с сотрудниками кафедры оперативной хирургии и клинической анатомии РУДН (проф. И. Д. Кирпатовским, с.н.с. В. Н. Бродягиным, асп. Ю. И. Кистнер). Операция проводилась под общей анестезией парами эфира. По средней линии живота выполнялся разрез длиной 2 см. Левый семенник выводился в рану. В бессосудистой зоне семенника производился прокол белочной оболочки. Строго под белочной оболочкой поверх семенных канальцев поочередно вводились микродилататоры различного диаметра по ходу паравазальной клетчаточной

щели субкапсулярного сосудистого сплетения семенника, не проникая в паренхиму органа. В результате формировался искусственный карман, расположенный поверх семенных канальцев. Затем в созданный карман паравазальной клетчаточной щели вводились микрофрагменты ткани поджелудочной железы объёмом 25–30 мкл с помощью дозатора «MICROMAN».

После пересадки прокол белочной оболочки ушивался атрауматичной иглой с нитью 6/0. Семенник обрабатывался антисептическим раствором мирамистина и помещался в мошонку. Операционная рана ушивалась через все слои узловыми швами нитью 2–3/0.

После аллотрансплантации микрофрагментов неонатальной ткани поджелудочной железы в семенник, с целью проведения в дальнейшем биологического теста для определения фертильности животных, у крыс без диабета осуществлялось односторонняя перевязка и пересечение семенного протока интактного (правого) семенника.

Результаты

Наиболее высокий процент компенсации экспериментального диабета был получен, когда в качестве донора и реципиента использовали крыс Вистар (89 %). Полная компенсация (3,8–8,8 ммоль/л) отмечалась у 153 оперированных животных (49 %), а частичная (8,8–13,8 ммоль/л) — у 124 крыс (40 %). Для того чтобы убедиться, что нет больших различий при разных вариантах аллотрансплантации, была проведена серия экспериментов по трансплантации эмбриональной поджелудочной железы беспородных крыс крысам Вистар. Компенсация диабета наступала у 81 % животных, полная — у 15 оперированных животных (40,5 %), и частичная — также у 15 животных (40,5 %).

Использование кроликов для аллотрансплантации эмбриональной поджелудочной железы в ПКГ имеет свои недостатки и преимущества. Кролики требуют повышенного, по сравнению с крысами, внимания при уходе за ними, особенно в период индукции диабета и плохо переносят наркоз. Зато являются идеальной моделью для проведения динамической тонометрии оперированных глаз. Этот тест в силу его непригодности для мелких грызунов нельзя провести на крысах.

Из 10 оперированных животных полная компенсация экспериментального диабета в течение срока наблюдения отмечалась у 3 кроликов, частичная — у 4, не было компенсации у 3 кроликов (погибли в течение месяца после операции).

Таблица 1

Результаты аллотрансплантации фетальной поджелудочной железы в переднюю камеру глаза животным с экспериментальным диабетом

Реципиент	Донор	Компенсация диабета шт/(%)		Всего прооперировано
		полная	частичная	
Крысы Вистар	Крысы Вистар	153 (49 %)	124 (40 %)	311 (100 %)
Крысы Вистар	Крысы беспородные	15 (40,5 %)	15 (40,5 %)	37 (100 %)
Кролик Шиншилла	Кролик Шиншилла	3 (30 %)	4 (40 %)	10 (100 %)

Время наблюдения не менее 3 месяцев

В последней группе животных наблюдали выраженные признаки воспаления: наличие экссудата в передней камере глаза, помутнение роговицы и хрусталика. У них экссудат в передней камере рассосался на 7–10 сутки, но развилось стойкое помутнение роговицы, вероятно, из-за значительного повреждения роговичного эндотелия во время трансплантации и контакта трансплантата, расположенного в прикорневой зоне радужной оболочки, с эндотелием роговицы.

Двум кроликам с полной компенсацией аллоксанового диабета через 4 месяца после операции провели удаление глаз с трансплантатами, после чего у животных в течение двух недель наступил рецидив диабета. У всех 7 кроликов с полной или частичной компенсацией аллоксанового диабета провели динамическую тонометрию оперированных глаз. Повышение внутриглазного давления, по сравнению с парным глазом без трансплантата и с внутриглазным давлением контрольных животных, обнаружено не было.

Это говорит о том, что трансплантат не мешает нормальной циркуляции глазной жидкости и не блокирует Шлеммов канал, через который она оттекает от глаза. Как правило, трансплантат прикреплялся к радужной оболочке на том участке, куда его помещали во время операции.

Не было отмечено особенностей развития трансплантата в зависимости от места его локализации на радужной оболочке. Через 3–4 недели после операции началась различная интенсивности пигментация трансплантатов, так что со временем их было трудно различить на фоне радужной оболочки глаза.

Перед трансплантацией концентрация глюкозы в крови у подопытных животных была почти в 5 раз выше по сравнению с этим показателем у контрольной группы того же возраста. Мониторинг содержания глюкозы велся постоянно в течение всего эксперимента, как правило, 1 раз в неделю. С помощью трансплантации фетальной поджелудочной железы (ФПЖ) в ПКГ уда-

Таблица 2

Содержание глюкозы в крови интактных, диабетических и с компенсированным аллотрансплантацией диабетом крыс на разных сроках жизни

Возраст животных (мес.)	Интактный контроль (моль/л)	Глюкоза перед трансплантацией (моль/л)	Компенсированный диабет (ммоль/л)
4	5,0 ± 0,18 n = 10	23 ± 0,3 n = 32 p < 0,001	–
6	4,6 ± 0,05 n = 10	–	5,1 ± 0,1 n = 5 p < 0,001
10	4,9 ± 0,07 n = 10	–	5,5 ± 0,21 n = 5 p < 0,05
20	5,7 ± 0,03 n = 10	–	6,4 ± 0,1 n = 5 p < 0,001

n – количество животных

Содержание глюкозы и иммунореактивного инсулина в крови после инициации диабета и через 4 месяца после трансплантации фетальной поджелудочной железы в ПКГ диабетических крыс

Интактный контроль Возраст 4 мес. n = 6	Глюкоза Ммоль/л	5,47 ± 0,18
	ИРИ ММЕД/мл	23,25 ± 2,41
Аллоксановый диабет Возраст 4 мес. n = 11	Глюкоза Ммоль/л	24,4 ± 0,72 p < 0,001
	ИРИ ММЕД/мл	0,6 ± 0,06 p < 0,001
Интактный контроль Возраст 8 мес. n = 3	Глюкоза Ммоль/л	4,17 ± 1,1
	ИРИ ММЕД/мл	10,60 ± 3,39
Компенсированный диабет Возраст 8 мес. n = 5	Глюкоза Ммоль/л	5,79 ± 0,49
	ИРИ ММЕД/мл	15,2 ± 1,52

лось снизить высокую гипергликемию до уровня близкого к интактному контролю. Основным результатом этой части работы было то, что удалось показать возможность именно долговременной трансплантологической компенсации высокой дооперационной гипергликемии.

Одним из важнейших показателей при инициации и компенсации диабета является, помимо количества глюкозы, содержание инсулина в крови.

Из табл. 3 видно, что как количество глюкозы, так и количество иммунореактивного инсулина (ИРИ) после манифестации экспериментально-го диабета достоверно различаются у интактных

животных и крыс с аллоксановым диабетом. ИРИ у диабетических животных определялся в следовых количествах, его было в 39 раз меньше, чем у животных контрольной группы.

Через 4 месяца после трансплантации эмбриональной поджелудочной железы в ПКГ животных с аллоксановым диабетом показатели ИРИ и глюкозы полностью нормализовались. Причём концентрация ИРИ у животных с компенсированным диабетом была даже выше, чем у контрольных крыс.

В этой серии трём крысам с острым диабетом вместо поджелудочной железы трансплантировали равные по объёму кусочки лёгкого (контроль на специфичность ткани), животные погибли при высоком уровне гипергликемии (более 20 ммоль/л) и глюкозурии (более 2 %), через 7, 19 и 23 дня.

Количество глюкозы в моче — важный прогностический показатель. Как видно из таблицы, с помощью трансплантации удаётся добиться полной компенсации по этому параметру.

Одним из важных физиологических показателей, характеризующих как диабет типа 1 у человека, так и острый аллоксановый диабет у животных, является повышенное потребление воды и, как следствие, полиурия. После трансплантации эмбриональной поджелудочной железы в ПКГ крыс с аллоксановым диабетом происходит снижение потребления воды в 3,8 раза, и эти показатели достоверно не отличаются от потребления воды интактными животными того же возраста.

Таблица 4

Содержание глюкозы в моче и потребление воды животным до и после трансплантации

	Количество глюкозы в моче, %	Суточное потребление воды на 100 г массы (мл)
Диабет n = 9	более 2	88,4 ± 7,1*
Через 2 мес. после трансплантации n = 19	0–0,150	23,5 ± 2,2
Интактный контроль n = 12	0–0,1	18,5 ± 1,9

n = количество животных. * p < 0,001

Аллотрансплантация микрофрагментов ткани неонатальной поджелудочной железы в паравазальную клетчаточную щель семенника с целью компенсации экспериментального диабета

Из-за ограниченности объёма статьи в этой серии мы остановимся только на одном наиболее прогностическом показателе, а далее приведём только выводы по всей работе, касающейся трансплантации инсулинпродуцирующей ткани под белочную оболочку тестикул.

Как видно из рис. 1, к 28 дню погибли все контрольные животные с аллоксановым диабетом. Если же на 14 день после манифестации диабета проводилась трансплантация инсулинпродуцирующей ткани, уровень глюкозы снижался до значений, близких к норме.

Таким образом, с помощью новой методики удаётся полностью либо частично нормализовать исследованные физиологические показатели, состояние углеводного обмена в течение всего срока наблюдения.

Гистологические исследования показали выживаемость трансплантатов и продукцию ими

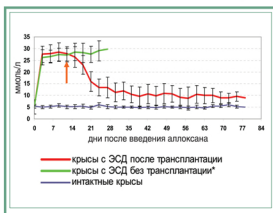


Рис. 1. Динамика гликемии у интактных, диабетических крыс и животных с интратестикулярной трансплантацией

инсулина на всех сроках исследования 4, 6, 9 недель после пересадки.

Проведённое спаривание крыс на разных сроках после пересадки ткани поджелудочной железы в семенник с последующей перевязкой семявыносящего протока контралатерального интактного семенника показало полную сохранность фертильности у животных.

Литература

- Александрова М. А., Подгорный О. В. Биология стволовых клеток и клеточные технологии. Под ред. М. А. Пальцева. – М.: Медицина, 2002. – С. 163–190.
- Балаболкин М. И. //Эндокринология. – М.: 1989. – С. 247–261.
- Балаболкин М. И., Клебанова Е. М., Кремнистая В. М. Диагностика и классификация сахарного диабета // Сахарный диабет, 1999, № 3. – С. 15.
- Балаболкин М. И., Клебанова Е. М., Кремнистая В. М. Патогенез ангиопатий при сахарном диабете // Сахарный диабет, 1999, № 1. – С. 99–108.
- Балаболкин М. И. Диабетология. – М.: Медицина, 2000. – 672 с.
- Дедов И. И., Анциферов М. Б. Основные задачи здравоохранения по выполнению сент-винсентской декларации, направленной на улучшение качества лечебно-профилактической помощи больным сахарным диабетом // Пробл. Эндокринологии, 1992, Т. 38, № 1. – С. 4–12.
- Дедов И. И. Поздние осложнения сахарного диабета. Актуальные проблемы эндокринологии // Тезисы докладов III Всероссийского съезда эндокринологов 4–7 июня 1996 г. – М.: 1996. – С. 5–6.
- Ефимов А. С., Ткач С. Н. Электрофизиологическая характеристика диабетической полинейропатии // Сов. мед., 1988, № 8. – С. 3–5.
- Жуковский М. А. Сахарный диабет у детей. – Куйбышев, 1989. – 160 с.
- Зак К. П., Малиновская Т. Н., Большова-Зубковская Е. В. Состояние иммунной системы у детей, больных сахарным диабетом I типа (обзор литературы и собственные исследования) // Эндокринология, 2001, № 2. – С. 191–203.
- Касаткина Э. П. Сахарный диабет у детей и подростков // М.: Медицина, 1996. – С. 7–49.
- Мазовещий А. Г., Великов В. К. / В кн. «Сахарный диабет», – М.: Медицина, 1987. – 288 с.
- Милюшина Л. А., Полтавцева Р. А., Марей М. В., Подгорный О. В., Сухих Г. Т., Александрова М. А. Модификация фенотипов клеток пигментного эпителия глаза человека на ранних стадиях развития *in vitro*. // Клеточные технологии в биологии и медицине, 2009, № 3. – С. 128–135.
- Нестеров А. П. Диабетические поражения органов зрения // Пробл. Эндокринологии, 1997, Т. 43, № 3. – С. 16–19.
- Подгорный О. В., Александрова М. А. BLBP-иммунореактивные клетки в первичной культуре нейральных предшественников эмбрионального мозга мыши. // Клеточные технологии в биологии и медицине, 2009, № 1. – С. 16–23.
- Фромен Л. А., Фелинг Ф., Бродус А. Е. Эндокринология и метаболизм: Пер. с англ. – М.: Медицина, 1985, Т. 2. – 416 с.
- Щербачева Л. Н., Лобанова А. М., Арбузова М. И. Функциональная активность островкового аппарата у детей с впервые выявленным сахарным диабетом // Педиатрия, 1989, № 11. – С. 10–14.
- Andreani D., Federlin K. F., Di Mario U. // Immunology in diabetes. – London – Edinburgh: Kimpton Med. Publ., 1984. – P. 298.
- Clarc C. M., jr. Lee D. A. Prevention and treatment of the complications of diabetes mellitus // New England J. Med., 1995, V. 332, № 18. – P. 1210–1217.
- Lavin N. Manual of Endocrinology and Metabolism. Boston/New York/ Toronto/London, 1994. – P. 759–824.
- Podolsky S., Viswanathan M. Secondary diabetes. The spectrum of the diabetic syndromes // New York. Reaven Press. 1980. – 602 p.
- Ziegler A. G., Standl E. Typ-1-Diabetes mellitus: Immunopathogenese und Chancen einer primären Immunotherapie // Med. klin., 1987, V. 82. – P. 796–800.