

# НЕКОТОРЫЕ АСПЕКТЫ КЛЕТОЧНОЙ ЗАМЕСТИТЕЛЬНОЙ ТЕРАПИИ ПРИ САХАРНОМ ДИАБЕТЕ

## Часть I. Возможности алло- и ксенотрансплантации поджелудочной железы

Л.А. Можейко, М.А. Можейко

УО «Гродненский государственный медицинский университет»

---

*В обзоре кратко проанализированы и обобщены данные литературы о методах алло- и ксенотрансплантации поджелудочной железы как клеточной заместительной терапии диабета.*

**Ключевые слова:** диабет, алло- и ксенотрансплантация, поджелудочная железа, В-клетки.

---

Сахарный диабет – быстро прогрессирующее заболевание, представляющее не только медицинскую, но и социально-экономическую проблему. Это самая распространенная эндокринная патология, занимающая первое место среди эндокринных заболеваний и четвертое место по причине смерти [10]. Всего в мире сахарный диабет поражает 6-9% населения. По прогнозам ВОЗ и Международной федерации диабета число больных сахарным диабетом к 2025 году возрастет до 358 млн [15]. В США он приобретает масштаб эпидемии. По данным Американской ассоциации диабетологов для американцев, рожденных в 2000 году, риск данного заболевания составляет 1:3 [40]. В Республике Беларусь зарегистрировано более 100 тыс. больных сахарным диабетом, в том числе на учете состоит более 1,5 тыс. детей и подростков [12]. Актуальность проблемы трансплантации поджелудочной железы связана, в первую очередь, с тем парадоксальным фактом, что более чем через 70 лет после исторических работ Banting и Best не удается даже с помощью самой современной инсулинотерапии и индивидуально подобранной диеты предохранить больных от развития поздних вторичных осложнений диабета. Особенно это касается диабета 1 типа, который в результате аутоиммунной реакции приводит к массовой гибели В-клеток поджелудочной железы, сопровождающейся абсолютной инсулиновой недостаточностью. Совершенствование настоящих и разработка новых методов его лечения является исключительно важной проблемой теоретической и практической медицины.

Единственным радикальным методом лечения инсулинзависимого сахарного диабета считается трансплантация поджелудочной железы. Научные исследования в этой области проводятся по нескольким направлениям: аллогенная органная трансплантация поджелудочной железы или ее фрагментов; свободная трансплантация островков и различных культур островковых клеток, полученных от аллогенного и ксеногенного донора; создание искусственной поджелудочной железы.

Попытки лечения инсулинзависимого сахарного диабета органной трансплантацией предпринимались уже с начала XX века. До 1966 г. она производилась преимущественно в эксперименте. Первая пересадка поджелудочной железы для лечения диабетической нефропатии и сахарного диабета у человека была выполнена W.D.Kelly с коллегами в 1967 г. В последующее десятилетие было произведено 60 трансплантаций поджелудочной железы в клинических условиях, однако трансплантаты функционировали короткое время и летальность

достигала 75% [15,19]. К 2000 году количество трансплантаций увеличилось до 15710. В настоящее время проводится около 1500 пересадок поджелудочной железы, в основном, в США. Многолетний опыт показал, что, несмотря на продолжающиеся поиски в совершенствовании хирургической техники трансплантация поджелудочной железы или ее сегментов остается сложной операцией, сопряженной с большим риском для жизни больного. Высокий процент послеоперационных осложнений, необходимость поджелудочной иммуносупрессивной терапии, ограниченный срок функционирования трансплантата, этический и экономический аспекты ограничили показания к органной трансплантации. Сейчас такие операции выполняются в сочетании с трансплантацией почки у больных диабетической нефропатией и почечной недостаточностью. Расходы в течение 3 лет на 100 условных реципиентов при трансплантации почки и поджелудочной железы составляют 16,11 млн долларов [48].

Альтернативой традиционной трансплантации поджелудочной железы на сосудистых ножках рассматривается трансплантация островков или их клеток. Целесообразность и рациональность ее обусловлена, прежде всего, тем, что продуцирующие инсулин клетки составляют всего 1-2% от общей массы органа. Помимо этого, она имеет и другие преимущества, т.к. не требует сложного хирургического вмешательства, более безопасна и выполнима до развития поздних осложнений. Поиск шел по двум путям: 1 – получение и трансплантация интактных островков, способных вырабатывать инсулин; 2 – получение и пересадка культур островковых клеток поджелудочной железы. В связи с идентичностью материала донора и реципиента более предпочтительной многими авторами считается аллотрансплантация. Источником островков при этом может служить поджелудочная железа взрослых доноров или фетальная и неонатальная ткань.

Первые попытки пересадки островков поджелудочной железы были неэффективными. Технические трудности выделения и изоляции островков осложняли решение проблемы. Метод автоматической ферментации, фильтрации и сепарации островков из поджелудочной железы взрослых трупных доноров, предложенный C.Ricordi из университета Майами [29], стал определенным прорывом в этой области. Благодаря ему удалось довести степень очистки клеточного материала до 90% и из одной донорской поджелудочной железы получить до 600-800 тысяч островков [45]. Пересадка препаратов по-

зволила авторам снизить потребности в эндогенном инсулине на достаточно длительное время, а в некоторых случаях достичь инсулиннезависимости [31]. Вместе с тем, как и при любой аллотрансплантации, пересаженные островки подвергались реакции отторжения [23, 25, 37]. Сложность и высокая стоимость процедуры получения препарата островков, а также несовершенство иммуносупрессивных протоколов, возможность инфицирования реципиента вирусом простого герпеса, ВИЧ, цитомегаловирусом сдерживали широкое распространение свободной трансплантации.

Практическое осуществление метода стало возможным после разработки многих его деталей специалистами университета Альберта в г.Эдмонтон, Канада во главе с профессором A.Shapiro (т.е. создания Эдмонтонского протокола в 2000 году) [34]. Для подготовки островков с высоким выходом клеток использовалась методика C.Ricordi. Больные получали достаточное количество островков, взятых от одного или нескольких трупов, которое в среднем составляло 11392 островка на 1 кг массы тела. С момента взятия поджелудочной железы у донора до введения в портальную систему печени проходило не более 3-4 часов. Клетки попадали в печень, где получали кровоснабжение и начинали реагировать на изменения уровня сахара в крови, выделяя достаточные количества инсулина. Причем реакция трансплантированных клеток на глюкозу появлялась практически немедленно и на протяжении первых нескольких недель их функция улучшалась. Второй особенностью протокола Эдмонтон является уникальная комбинация иммуносупрессивных лекарств. Она не направлена на подавление всей иммунной системы человека, а блокирует только специфические иммунные реакции, которые разрушают собственную ткань больного или вызывают отторжение пересаженной ткани. Она позволяет избежать применения стероидных гормонов, которые токсичны для островковых клеток и способны вызывать устойчивость (резистентность) к инсулину. На 64-й сессии Американской диабетической Ассоциации (6 июня 2004) были доложены результаты первого международного исследования эффективности трансплантации клеток островков поджелудочной железы по протоколу Эдмонтон, в котором на протяжении 4 лет участвовали 9 центров из США, Канады и Европы [33,41]. Через год после трансплантации островков 19 из 36 участников исследования были полностью независимы от инсулина. У 5 из этих больных независимость от инсулина была достигнута после одной инъекции, у 7 потребовалось 2 или 3 инъекции. Из остальных 17 больных, которым через год требовалось введение инсулина, у 7 наблюдалось улучшение контроля диабета. Основной исследователь проекта отметил, что близкая методика трансплантации в мире использована более чем у 350 человек. Позже были предложены дополнительные к протоколу процедуры, индуцирующие толерантность к трансплантируемым инсулинсекретируемым клеткам. Это прежде все использование антител к различным Т-лимфоцитам и иммунокомпетентным клеткам. Селективные моноклональные антитела играют ключевую роль в индукции иммунологической толерантности, воздействуя на клетки, участвующие в раннем распознавании и деструкции трансплантированных островков.

Одновременно с направлением свободной аллотрансплантации эндокринных островков, принятом у и активно разрабатываемом в США и Италии, начали проводиться исследования по применению для этих целей культивированных островковых клеток плодов человека. Су-

щественный вклад в решение проблемы внесли исследователи НИИ трансплантологии и искусственных органов (НИИИТ и ИО) РФ и Киевского НИИ эндокринологии и обмена веществ. Первая аллотрансплантация культуры островковых клеток была выполнена под руководством В.И.Шумакова в 1979 г. в Московском НИИИТ и ИО. Параллельно разрабатывались теоретические и экспериментальные предпосылки ксенотрансплантации островковых клеток наиболее филогенетически близких к человеку животных – приматов: плодов свиньи, крупного рогатого скота, новорожденных поросят, новорожденных кроликов [8, 11, 16, 18, 20, 35, 43]. Это было продиктовано многими причинами, основными из которых являются: трудности получения трансплантационного биологического материала и его хранения (для создания культуры островковых клеток для одной трансплантации требуется до 4-х поджелудочных желез) [47]; различная внутриутробная патология плода; возможность инфицирования реципиента вирусными агентами донора; необходимость иммуносупрессивной терапии [50]. С другой стороны, аллотрансплантация обладает более выраженным и продолжительным клиническим эффектом. Так, при аллогенной трансплантации указывается длительность лечебного эффекта от 8 до 20 месяцев, а процент успешных трансплантаций – 90%; при ксеногенной трансплантации, соответственно, длительность эффекта от 6 до 14-16 месяцев и 75-80% успешных трансплантаций. Вопрос о применении аллогенной или ксеногенной культуры островковых клеток для трансплантации больным сахарным диабетом остается дискуссионным [3].

Трансплантация культуры островковых клеток проводится различными путями и в разные ткани (под капсулу селезенки, под капсулу почки, под капсулу печени, в брюшную полость, в портальную венозную систему, внутримышечно – в прямую мышцу живота, в ретробульбарную клетчатку глаза) [7]. Это кардинально не влияет на результаты трансплантации. Однако существуют так называемые иммуопривелигированные органы и зоны, защищающие трансплантат от иммунной агрессии – передняя камера глаза, головной мозг и тестикулы. Использование их позволило Н.Н.Скалецкому и соавт. [6] получить антидиабетический эффект до 3-х лет. Для иммуноизоляции пересаженной эндокринной ткани применяются также методы инкапсуляции [28]. При микроинкапсуляции каждый островок окружается полупроницаемой мембраной, предотвращающей контакт с иммунокомпетентными клетками реципиента [24,32]. Однако такие микрокапсулы стимулируют защитную реакцию реципиента на инородное тело, что ведет к гибели островковых клеток [39, 28].

При макроинкапсуляции (модели своего рода биоискусственной поджелудочной железы) возможна внутрисосудистая и внесосудистая трансплантация. Трансплантация под кожу или в брюшную полость относительно безопасна, но оставляет ту же проблему биосовместимости и, кроме того, вызывает агрегацию инкапсулированной ткани в большие группы, что нарушает ее питание [36, 38]. Используя предположение, что среда крови является одной из иммунологически выгодных зон, основанное на наблюдениях Ю.Н.Ярошинского и соавт. [17], А.В.Ваев и соавт. [26] было предложено внедрение макроинкапсулированных островковых клеток в просвет кровеносных сосудов. По мнению А.В.Шота и соавт. [4, 9] и С.И.Третьяка [21], клеточный и гуморальный компоненты иммунитета при этом не срабатывают, что позволяет избежать иммуносупрессивной терапии. Такой способ трансплантации позволяет получить длительный ан-

тиадиабетический эффект (более 2,5 лет), стабилизацию течения диабета, улучшение качества жизни [13, 14, 21].

Таким образом, метод свободной алло- и ксенотрансплантации культуры островковых клеток поджелудочной железы по поводу сахарного диабета прочно вошел в клиническую практику. Подводя итоги клинических результатов по трансплантации островковых клеток за 25 лет, В.И.Шумаков и др. наряду с достижениями отметили, что проблема несет в себе еще много вопросов, которые ждут своего разрешения [19]. Один из них – почему освобождение от инсулиновой зависимости длится всего несколько месяцев или 1,5-2 года, как добиться более длительного антидиабетического эффекта и инсулиннезависимости. Остаются также трудности изолирования островковых клеток, недостаточного количества трупных поджелудочных желез и хороших средств иммунологической защиты. В связи с этим большой интерес вызывает возможность использования новых источников для получения здоровых инсулинпродуцирующих клеток. Первым претендентом в этом списке значатся стволовые клетки.

Различают эмбриональные стволовые клетки и стволовые клетки взрослых. Как те, так и другие обладают ключевым свойством – способностью к самоподдержанию. Это означает, что при их делении образуются дочерние клетки, одна часть которых идентична материнским и поддерживает численность популяции, а другая – подвергается дифференцировке. Второе их свойство – полипотентность. Стволовые клетки обладают способностью дифференцироваться в клетки различных тканей. Наиболее перспективным считается использование эмбриональных клеток. Стволовые клетки эмбриона пролиферируют в культуре и присущая им пластичность в отношении будущего развития делает их потенциально неограниченным источником клеток. Оказалось возможным получить в тканевой культуре из эмбриональных стволовых клеток предшественники островковых клеток поджелудочной железы, однако их число еще ограничено. Учеными Института биологии гена РАН и Харьковского института криобиологии с помощью методов молекулярной биологии и цитологии разработана методика индукции дифференцировки стволовых стромальных клеток в направлении клеток, синтезирующих инсулин. Установлено, что в культуре тканей они формируют структуры, напоминающие островки [1]. Испанские исследователи полученные с помощью генной инженерии инсулинпродуцирующие клетки трансплантировали мышам с диабетом. Через 24 часа содержание глюкозы у мышей снизилось до нормы. Спустя 4 недели у 60% мышей уровень гликемии оставался нормальным, что свидетельствовало о приживлении трансплантированных клеток. При дальнейшем исследовании продуцирующие инсулин клетки были обнаружены у животных в селезенке и печени. Однако есть опасность влияния некоторых клеток-предшественников на развитие злокачественной опухоли [30, 46].

Установлен факт, что при определенных условиях стволовые клетки костного мозга или крови пуповины эмбрионов человека могут дифференцироваться в клетки, подобные В-клеткам островков поджелудочной железы [30,46]. Есть указания и на то, что предшественниками островковых клеток являются нейральные стволовые клетки. По мнению А.Pearse, создателя концепции APUD-серии, все ее клетки являются производными нейроэктодермы, которая мигрирует на ранней стадии эмбриогенеза из нервного гребня в передний отрезок кишечной трубки, вследствие чего их стали называть нейроэндок-

риноциты. В состав APUD-серии входят и эндокринные клетки поджелудочной железы. В последующие годы Э.Пирс и его сотрудники уточнили концепцию нейроэктодермального происхождения клеток APUD-серии. Была высказана гипотеза, согласно которой они дифференцируются из единого эмбрионального зачатка – эктобластов, имеющих нейроэндокринную программу развития, и подтверждалось, что нейральные клетки являются предшественниками островковых клеток поджелудочной железы [42]. К настоящему времени клетки со свойствами островковых инсулинпродуцирующих клеток получены из нейральных в культуре тканей [44]. Тем не менее, многие исследователи, использовавшие различные методические подходы к решению этой проблемы, пришли к заключению, что нет никаких оснований считать происхождение эндокринных клеток поджелудочной железы нейроэктодермальным [22, 27, 49].

Использование эмбриональных стволовых клеток человека из оплодотворенной яйцеклетки имеет такой существенный недостаток, как иммунологическое отличие этих клеток от потенциального реципиента трансплантата. Кроме того, это наталкивается на сильное противодействие со стороны религиозного сообщества [1].

Взрослые стволовые клетки встречаются значительно реже и, в основном, в костном мозге. Стволовые клетки костного мозга могут дифференцироваться в типичные клетки других органов (печень, мышцы, мозг). Наличие стволовых клеток в поджелудочной железе пока не доказано, однако не исключена возможность, что стволовые клетки других органов при особых условиях будут способствовать образованию эндокринных клеток поджелудочной железы. Показано, например, что прогениторные клетки из некоторых органов плодов или взрослых, таких как печень или костный мозг, способны дифференцироваться «в клетки, имеющие фенотип В-клеток» [30, 46].

Возможно будущее в лечении сахарного диабета принадлежит не трансплантации железы или ее фрагментов, а биотехнологическим методам. Такие работы пока находятся на стадии экспериментов. Однако шансы на успех получения новых источников инсулинпродуцирующих клеток постоянно растут и в ближайшие годы перспектива их использования для лечения сахарного диабета станет вполне реальной. Эта тема широко дискутируется и требует отдельного обсуждения.

#### Список использованной литературы

1. Аметов, А.С. Первый ингибитор дипептидилпептидазы-4 ситаглиптин: достижение цели в лечении сахарного диабета/ А.С. Аметов, Е.В. Карпова // Эндокринология столицы: Мат. VI Московского городского съезда эндокринологов. – Москва, 18-19 марта 2008. – С. 28-33.
2. Аметов, А.С. Роль и место глюкагоноподобного пептида-1 в управлении сахарного диабета 2 типа / А.С. Аметов, О.П. Пьяных, А.В. Ильичева // Эндокринология столицы: Мат. VI Московского городского съезда эндокринологов. – Москва, 18-19 марта 2008. – С. 34-39.
3. Балаболкин, М.И. Дифференциальная диагностика и лечение эндокринных заболеваний: Руководство / М.И. Балаболкин, Е.М., Клебанова, В.М. Кремнинская. – М: ООО Медицинское информационное агентство, 2008. – 752 с.
4. Балаболкин, М.И. Лечение сахарного диабета и его осложнений / М.И. Балаболкин, В.М. Кремнинская, Е.М. Клебанова. – М., 2005. – 130 с.
5. Борисова, Н.А. Желчеобразовательная функция печени при выключении из пищеварения двенадцатиперстной кишки: автор. ... дисс. канд. мед. наук/ Н.А. Борисова. – Томск, 1976. – 156 с.
6. Горгун, Ю.В. Компьютерно-томографическая характеристика инсулинопродуцирующей функции поджелудочной железы

у больных холестазом: автор. ... дисс. канд. мед.наук: 14.00.05-внутри. болезни / Ю.В. Горгун. – Мн., 2000. – 20 с.

7. Горгун, Ю.В. Состояние эндокринной функции поджелудочной железы при желчекаменной болезни / Ю.В. Горгун // Здравоохранение. 2000. – №4. – С. 10-11.

8. Гоу, В.Л. Роль гастроинтестинальных гормонов в регуляции функций желудочно-кишечного тракта после приема пищи и в межпищеварительный период / В.Л. Гоу, Дж. Миллер // Физиология и патофизиология желудочно-кишечного тракта / под ред. Дж. М. Полак [и др.]. – М.: Медицина, 1989. – С. 164-172.

9. Двенадцатиперстная кишка и гомеостаз / М.А. Медведев [и др.]. – Томск: Изд-во Томского университета, 1985. – 23 с.

10. Кветной, И.М. Диффузная эндокринная система / И.М. Кветной, В.В. Южаков // Руководство по гистологии: Учебное пособие / под ред. Д.К. Данилова, В.Л. Быкова, И.А. Одинцова. – СПб., 2001. – С. 509-541.

11. Можейко, Л.А. Морфофункциональное исследование эндокринного аппарата поджелудочной железы в условиях желчной недостаточности // Л.А.Можейко, А.А. Туревский, Т.И. Шалада // Докл. Академии наук БССР. – 1989. – т. 33, № 10. – С. 951-954.

12. Нарушения в энтероинсулярной оси / В.Крейтцфельдт [и др.] // Физиология и патофизиология желудочно-кишечного тракта / под ред. Дж. М. Полак [и др.]. – М.: Медицина, 1989. – С. 134-144.

13. Спасов, А.А. Иноретины (физиология, патология, фармакология) / А.А.Спасов, М.П. Самохина, А.Е. Буланов // Вопр. биол., мед. и фармац. химии. – 2009. – №4. – С. 3-7.

14. Chiang, G.Y. Regulation of bile synthesis pathway, nuclear receptor and mechanisms / G.Y. Chiang // G. Hepatol. – 2004. – №10. – P. 539-551.

15. Dupre, J. Stimulation of release of insulin by an extract of

intestinal mucosa / Y.Dupre, Y.C. Beck // Diabetes. – 1960. – №15. – P. 555-559.

16. Ermini, M. Functional modification of endocrine after internal biliary fistula (experimental research) / M.Ermini, C. Magaluso, P. Massiello // Acta Diabetol. Lat. – 1978. – №15. – P. 303-309.

17. Ermini M. Modifications of pancreatic islet tissue after internal biliary fistula / M.Ermini, M. Seccia, G.Evangelista // Acta Diabetol.Lat. – 1975. – №12. – P. 150-159.

18. Internal biliary diversion improves glucose tolerance in the rat / G.Manfredini [et al.] // Amer. G. Physiol. – 1985. – V.249, №1. – P.519-527.

19. Leriche R., Essai sur le traitement chirurgical du diabete par la derivation biliare: documents experimentaux et cliniques / R. Leriche, .....Joung // Ann. Endocrinol. – 1939. – P. 3-10.

20. McInture, N. New interpretation of oral glucose tolerance / N.McInture, C.D. Holdworth, D.S.Turner // [Ancet.]. – 1964. – № 2, – P. 20-21.

21. Mintz, D. Effect of angiotension II on immunoreactive insulin / D. Mintz, J. Finster, M. Staepf // J. Clin. Endocrinol. and Metabol., – 1967. – V. 27, № 5. – P. 671-688.

22. Moody, A.G. Insulin releasing polypeptides of the gut / A.G.Moody // Excerpta Med. Int.Congr. – 1976. – V. 413. – P. 76-82.

23. Regulation of the release of cholecystokinin by bile salts in dogs and humans / G.Guillermo [et al.] // Gastroenterology. – 1988. – № 4, – P. 1036-1046.

24. Togni, G. Contributo alla conoscenza dei rapporti tra deviazione biliare e diabete / G.Togni // Mineroa Med. – 1942. – № 2. – P. 43-45.

25. Unger, R.H. Entero-insular axis / R.H.Unger, A.M. Eisentraut // Arch. Intern. Med. – 1969. – № 123. – P. 261-266.

## SOME ASPECTS OF CELL REPLACEMENT THERAPY FOR DIABETES MELLITUS

### Part I. EFFECTS OF ALLO- AND XENOTRANSPLANTATION OF THE PANCREAS

L.A.Mozheiko, M.A. Mozheiko

Educational Institution «Grodno State Medical University»

*The literature data on the methods of allo- and xenotransplantation of the pancreas as a cell replacement therapy for diabetes have been shortly analyzed and summarized in the review.*

**Key words:** diabetes, allo- and xenotransplantation, pancreas, B-cells.

Поступила 19.04.2012