

МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ
ГОСУДАРСТВЕННОЕ ВЫСШЕЕ УЧЕБНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ
«БЕЛОРУССКАЯ МЕДИЦИНСКАЯ АКАДЕМИЯ
ПОСЛЕДИПЛОМНОГО ОБРАЗОВАНИЯ»

УДК 616.379-008.64-089-06:616.37-018.1-089.843:616.13

ПРОХОРОВ
Александр Викторович

**ХИРУРГИЧЕСКОЕ ЛЕЧЕНИЕ ИНСУЛИНЗАВИСИМОГО
САХАРНОГО ДИАБЕТА ПУТЕМ КСЕНОТРАНСПЛАНТАЦИИ
ОСТРОВКОВЫХ КЛЕТОК ПОДЖЕЛУДОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ
В АРТЕРИАЛЬНОЕ РУСЛО**
(экспериментально-клиническое исследование)

14.00.27 – хирургия

АВТОРЕФЕРАТ
Диссертации на соискание ученой степени
доктора медицинских наук

Минск – 2005

Работа выполнена в УО «Белорусский государственный медицинский университет»

Научный консультант:

доктор медицинских наук, профессор **Третьяк Станислав Иванович**,
УО «Белорусский государственный медицинский университет»,
2-я кафедра хирургических болезней

Официальные оппоненты:

доктор медицинских наук, профессор **Леонович Сергей Иванович**,
УО «Белорусский государственный медицинский университет»,
1-я кафедра хирургических болезней

доктор медицинских наук, профессор **Мартов Юрий Борисович**,
УЗ «Витебская городская клиническая больница скорой
медицинской помощи», заместитель главного врача по хирургии

доктор медицинских наук, профессор **Данилова Лариса Ивановна**,
ГВУУ «Белорусская медицинская академия последипломного
образования», кафедра эндокринологии

Оппонирующая организация: Гродненский государственный
медицинский университет

Защита состоится 2 марта 2005 г. в 13.00 часов на заседании совета
по защите диссертаций Д 03.15.03 в Белорусской медицинской академии последипломного образования (220013, г. Минск, ул. П. Бровки, 3, тел. 232-11-20).

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Белорусской медицинской академии последипломного образования.

Автореферат разослан « ____ » _____ 2005 года.

Ученый секретарь совета
по защите диссертаций,
доктор медицинских наук, профессор

В.В. Курек

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы диссертации

Мировой опыт изучения сахарного диабета I типа (СД I типа) свидетельствует, что трансплантационные методы лечения являются патогенетически обоснованными и наиболее перспективными в терапии этого заболевания. В настоящее время аллотрансплантация поджелудочной железы является единственным методом, позволяющим добиться полной инсулиннезависимости. Однако, несмотря на биологическую целесообразность данного вмешательства, полная или сегментарная трансплантация поджелудочной железы остается сложным, дорогостоящим хирургическим вмешательством, требующим пожизненной иммуносупрессивной терапии, несущим за собой высокую послеоперационную летальность (15–30 %) (В. Шумаков, 1995; R. Stratta, 1998; H. Sollinger et al., 1998) и тяжелые послеоперационные осложнения (75 %) (R. Caldara et al., 1991; C. Gruessner et al., 1997; D. Sutherland et al., 1996; A. Tibell et al., 1994; G. Tyden et al., 1992).

Ввиду того, что эндокринная часть поджелудочной железы составляет лишь 1–2 %, пересадку островковых клеток, как метода «эндокринного замещения», следует признать наиболее целесообразным подходом в лечении сахарного диабета. Лучшим источником инсулинпродуцирующей ткани является аллогенная островковая ткань. Однако получение взрослой или фетальной островковой ткани связано с целым рядом проблем, главная из которых заключается в дефиците донорского материала. Наиболее перспективным источником островковых клеток являются животные, главным образом свиньи и кролики, которые могут обеспечить практически неограниченный источник островковой ткани.

Несмотря на очевидные преимущества свободной трансплантации островковых клеток, результаты алло- и ксенотрансплантаций остаются не вполне удовлетворительными. Это связано, главным образом, с гибелью трансплантата в результате иммуноопосредованной деструкции клеток. По данным Международного регистра трансплантации островковых клеток (ITR 1998) функционирование аллотрансплантата ограничивается 6–12 месяцами на фоне интенсивной иммуносупрессивной терапии. При этом зона «местообитания» трансплантата (воротная вена, пульпа селезенки, печени, большой сальник) существенно не влияет на выживаемость островковых клеток.

Экспериментальными исследованиями по изучению судьбы различных тканевых объектов, помещенных в ток крови (A. Baue et al., 1968; A. Carpentier et al., 1969; Ю.Н. Ярошинский и др., 1974; А.В. Шотт и др., 1992, 1999; С.И. Третьяк, 1996) было показано, что ткани, имеющие диффузионный тип питания, могут длительное время сохраняться, не подвергаясь реакции отторжения. Это позволило признать, что среда крови, как и передняя камера глаза, головной мозг, тестикул, является иммунологически выгодной зоной, где не срабатывают ни клеточные, ни гуморальные компоненты иммунитета реципиента.

Исходя из вышеизложенного, предметом настоящего исследования явилось экспериментальное обоснование возможности длительного сохранения макроинкапсулированной ксеногенной островковой ткани поджелудочной железы в просвете сосудистого русла реципиента без иммуносупрессивной терапии и разработка принципиально нового хирургического метода лечения сахарного диабета I типа с внедрением в клиническую практику.

Связь работы с крупными научными программами и темами

Работа выполнялась по теме НИР 2-й кафедры хирургических болезней Белорусского государственного медицинского университета «Разработка клинико-диагностического и лечебного алгоритма при гепатобилиарной патологии и заболеваниях поджелудочной железы» (№ государственной регистрации 1998875 от 20.03.1998 г.), в рамках двух инновационных проектов «Разработка метода хирургического лечения сахарного диабета путем трансплантации островковых клеток в сосудистое русло» (проект № 6/00-П от 07.04.2000 г.), «Разработать малоинвазивный метод ксенотрансплантации островковых клеток поджелудочной железы в лечении сахарного диабета» (проект № 2/02-П от 24.04.2002 г.), совместной белорусско-немецкой исследовательской программы «Изучение транзитерной пластичности нейронов периферической нервной системы (№ государственной регистрации 19984129 от 16.12.1998 г.) и при поддержке Фонда фундаментальных исследований Республики Беларусь (проект Б03-153).

Цель и задачи исследования

Цель исследования — разработать новый метод хирургического лечения сахарного диабета I типа на основе клеточных трансплантационных технологий, позволяющий обеспечить долговременный антидиабетический эффект без применения иммуносупрессивной терапии и тем самым значительно облегчить течение заболевания, улучшить качество жизни больных и снизить экономические затраты на лечение

Задачи исследования:

1. Осуществить подготовку фетальной культуры островковых клеток поджелудочной железы кроликов для трансплантации с контролем и стабилизацией ее контаминации и функциональной активности и исследовать возможность пролонгирования жизнеспособности ксеногенных панкреатических островковых клеток в организме реципиента с помощью диабетопротекторов.
2. Исследовать и обосновать выбор биосовместимого синтетического материала для макроинкапсуляции пересаживаемой культуры островковых клеток поджелудочной железы, отвечающий оптимальному режиму диффузии трофогенов и обеспечивающий оптимальную иммунопротекцию трансплантата.

3. Разработать малоинвазивную методику внутрисосудистой трансплантации макроинкапсулированных ксеногенных β -клеток в эксперименте на животных с аллоксаниндуцированным сахарным диабетом.

4. Провести экспериментальные морфологические, морфометрические и иммуногистохимические исследования пересаженной в сосудистое русло ксеногенной культуры островковых клеток в различные сроки наблюдения для оценки выживаемости, функциональной активности клеток и эффективности макрокапсулярной иммунопротекции.

5. Исследовать эффективность трансплантации ксеногенных островковых клеток в сосудистое русло у больных с тяжелыми осложненными формами сахарного диабета I типа в раннем и отдаленном посттрансплантационном периоде и оценить состояние сосудистого русла реципиентов после трансплантации на основе сонографического и доплерографического исследований.

6. Оценить экономическую эффективность предлагаемого хирургического метода лечения больных с сахарным диабетом I типа.

Научная новизна полученных результатов

В работе впервые:

1. Разработаны подходы по усилению адаптационных способностей островковых клеток поджелудочной железы *in vitro* и *in vivo*, что позволило добиться повышения их резистентности к условиям местообитания в организме реципиента не менее чем на 40 % (заявка на изобретение в Национальный центр интеллектуальной собственности Республики Беларусь — ЦНИС Республики Беларусь — № а20030138 от 19.02.2003 г. и № а20030424 от 13.05.2003 г.).
2. На основании физико-математического моделирования и тестов *in vitro*, для производства макрокапсулы были отобраны синтетические материалы из производных полиамида и нейлона. Материалы обладали эластичностью и прочностью, оптимальными гемореологическими характеристиками и хорошими диффузионными способностями для трофогенов и инсулина, а также характеризовались атромбогенностью, биоинертностью и биосовместимостью в отношении пересаживаемой культуры клеток и среды крови.
3. Установлено, что в сосудистом русле возможно длительное сохранение жизнеспособности ксеногенной культуры островковых клеток поджелудочной железы без использования иммуносупрессивной терапии.
4. Показано, что двойная иммуноизоляция клеток, путем их микропористой макроинкапсуляции и трансплантации в иммунопривилегированную зону (сосудистое русло) предотвращает острое и хроническое отторжение трансплантата.
5. Установлено, что выживание пересаженной ксеногенной культуры островковых клеток в первые дни после трансплантации осуществляется исключительно за счет диффузии трофогенов в полость капсулы.

6. Определены этапы перестроечных процессов и организации культуры клеток в просвете макрокапсулы. Установлено, что неоангиогенез в капсуле развивается в первую неделю после пересадки и в дальнейшем питание трансплантата осуществляется исключительно за счет вновь сформированных сосудов.

7. Установлено, что к 6 месяцу после пересадки формируется эндокринная часть биоискусственной поджелудочной железы, напоминающая островки Лангерганса, со всеми присущими органу признаками — организацией, кровоснабжением, функцией и морфологическими признаками нейрогуморальной регуляции.

8. Разработаны малоинвазивные методы трансплантации, включающие пересадку культуры островковых клеток, как в артериальное, так и артериовенозное русло. К ним относятся трансплантация островковых клеток в глубокую артерию бедра (ГАБ) и в просвет артериовенозного соустья на предплечье (заявка на изобретение в Национальный центр интеллектуальной собственности Республики Беларусь — ЦНИС Республики Беларусь — № а20030091 от 05.02.2003 г. и № а20040956 от 20.10.2004 г.).

9. В клинических условиях, для лечения сахарного диабета I типа, применена внутрисосудистая ксенотрансплантация фетальной островковой ткани поджелудочной железы. Достигнуто долговременное (более 2,5 лет) сохранение жизнеспособности и функционирования культуры островковых клеток в организме реципиента без применения иммуносупрессивной терапии.

Практическая значимость полученных результатов

Предложенный способ повышения устойчивости ксеногенных островковых клеток к реакциям отторжения в организме реципиента позволил обеспечить долговременное выживание трансплантата, поддержание необходимого пула клеток, находящихся в стадии медленного вызревания, повысить их функциональную активность и увеличить продолжительность антидиабетического эффекта трансплантации.

Экспериментально разработанная и физико-математически обработанная модель микропористой макрокапсулы из производных полиамида и нейлона позволила использовать данные материалы при трансплантации ксеногенных островковых клеток в клинических условиях у больных сахарным диабетом I типа. Разработанные принципиально новые малоинвазивные методы трансплантации островковых клеток в глубокую артерию бедра и артериовенозное соустье на предплечье могут использоваться в сосудистых отделениях областных центров Республики и отделениях хирургической диабетологии.

Морфологические, иммуногистохимические и морфометрические исследования продемонстрировали возможность создания экстраоргана эндокринного аппарата биоискусственной поджелудочной железы. Обнаруженная структурная и морфофункциональная организация островковых клеток в про-

свете капсулы после трансплантации углубляет, систематизирует и расширяет современные представления о филогенетически определенных межклеточных взаимоотношениях. Эти результаты могут быть использованы как нормативные при проведении медико-биологических научных исследований в разделах цитологии, эмбриологии, гистологии, патоморфологии и трансплантологии.

Полученные результаты долговременного сохранения и функционирования ксеногенной культуры клеток в организме реципиента расширяют знания в изучении иммунологически выгодных зон и установленных ранее новых закономерностей в трансплантологии. Установленный экспериментально и клинически долговременный антидиабетический эффект трансплантации макроинкапсулированной культуры ксеногенных панкреатических клеток создает предпосылки для трансплантации других эндокринных тканей в клинических условиях, в том числе тироцитов и паратироцитов при недостаточности щитовидной и парашитовидных желез, что является весьма актуальным в связи с последствиями аварии на ЧАЭС.

Экономическая значимость

Выделенная и культивированная культура ксеногенных островковых клеток может служить коммерческим продуктом на внутреннем и внешнем рынке. Клиническое применение трансплантации ксеногенных островковых клеток позволило достигнуть значительного экономического эффекта при лечении больных сахарным диабетом I типа. В течение первых 2-х лет после трансплантации прямые затраты на лечение данной категории больных снизились в 2 раза. На фоне значительного улучшения качества жизни, достигнуто сохранение трудоспособности реципиентов и их адаптационные социальные возможности.

Внедрение полученных результатов

Результаты диссертации внедрены в хирургических отделениях 9-й, эндокринологических отделениях 1-й и 10-й городских клинических больниц г. Минска; научной, учебной и лечебной работе кафедр Белорусского государственного медицинского университета.

Клиническая трансплантация островковых клеток выполнена жителям Брестской, Гомельской, Могилевской областей и г. Минска. В процессе выполнения настоящего исследования подано 4 заявки на изобретения, утверждены Министерством здравоохранения Республики Беларусь и изданы 2 инструкции по применению.

Основные положения диссертации, выносимые на защиту

1. Культивирование ксеногенных островковых клеток в атмосфере азота, при гипотермии и предтрансплантационная обработка культуры клеток диабетопротекторами позволяет повысить устойчивость клеток к трансплантацион-

ному стрессу, обеспечить долговременное выживание трансплантата, поддержание необходимого пула клеток, находящихся в стадии медленного вызревания, повысить функциональную активность и увеличить продолжительность антидиабетического эффекта трансплантации.

2. Разработанная для иммобилизации ксеногенной культуры островковых клеток макрокапсула из производных полиамида и нейлона, со стандартизированным диаметром пор 1–2 мкм, обеспечивает адекватное питание трансплантата и обратную диффузию гормонов — продуктов функционирования островковых клеток.

3. Разработанные методы трансплантации макроинкапсулированной культуры островковых клеток в глубокую артерию бедра и артериовенозное соустье на предплечье являются безопасными, малотравматичными хирургическими пособиями, составляющими выгодную альтернативу внутриаортальной трансплантации.

4. Трансплантация в сосудистое русло ксеногенных островковых клеток, инкапсулированных в микропористую макрокапсулу, приводит к формированию экстраорганный биоискусственной поджелудочной железы со всеми признаками — организацией, кровоснабжением, функцией и нейрогуморальной регуляцией.

5. Питание трансплантата путем диффузии осуществляется только в течение первых суток после трансплантации. В дальнейшем, питание и функционирование трансплантированных островковых клеток происходит за счет неоангиогенеза. Полное формирование биоискусственного эндокринного аппарата ксеногенной поджелудочной железы, подобно островкам Лангерганса, наступает через 6 месяцев после трансплантации.

6. Двойная иммуноизоляция ксеногенных островковых клеток путем макроинкапсуляции и трансплантации в иммунологически выгодную зону (сосудистое русло) полностью предотвращает иммуноопосредованную деструкцию островковых клеток, что исключает необходимость проведения иммуносупрессивной терапии.

7. Трансплантация макроинкапсулированных ксеногенных островковых клеток в сосудистое русло больных сахарным диабетом I типа обеспечивает долговременный антидиабетический эффект, позволяет снизить инсулинпотребность на 60–75 %, компенсировать острые осложнения сахарного диабета, улучшить качество жизни пациентов.

8. Трансплантация островковых клеток поджелудочной железы позволяет в течение первых 2-х лет после пересадки уменьшить прямые расходы на лечение больных сахарным диабетом I типа в 2 раза.

Личный вклад соискателя

Все разделы диссертации выполнены автором самостоятельно на базе Центральной научно-исследовательской лаборатории Белорусского государственного медицинского университета, 2-й кафедры хирургических болезней БГМУ, отделения хирургической гепатологии 9-й ГКБ г. Минска, отделений эндокринологии 1-й ГКБ г. Минска, НИКИ эндокринологии и радиационной медицины.

Получение, подготовка и культивирование культуры ксеногенных островковых клеток поджелудочной железы проводилось на базе ЦНИЛ БГМУ при участии заведующего лабораторией биохимических методов исследования канд. мед. наук В.А. Горанова и старшего лаборанта Ю.А. Горановой.

Экспериментальные исследования проводились автором в экспериментально-биологической клинике БГМУ (при участии в качестве ассистентов: канд. мед. наук В.П. Романовича, клинического ординатора А.А. Глинника, аспиранта В.Я. Хрыщановича и заведующей ЭБК Л.В. Будько).

Изготовление микропрепаратов, морфологические, морфометрические и иммуногистохимические исследования проводились на базе ЦНИЛ БГМУ, кафедре нормальной анатомии БГМУ при участии профессора В.В. Руденка, кафедре морфологии медицинского университета г. Любека (Германия) при участии профессора Ф. Кюннеля.

Биохимические и иммунологические исследования выполнены на базе биохимических и иммунологических лабораторий 9-й, 10-й ГКБ г. Минска и НИКИ радиационной медицины и эндокринологии. Отбор больных для трансплантации островковых клеток проводился в отделениях эндокринологии НИКИ радиационной медицины и эндокринологии, 1-й ГКБ г. Минска, городском эндокринологическом центре при участии главного внештатного эндокринолога Министерства здравоохранения Республики Беларусь, доцента З.В. Заборовской.

Физико-математическое описание и лабораторный эксперимент для изучения процессов массопереноса в макрокапсуле выполнены при участии заведующего лабораторией реофизики и макрокинетики института тепло- и массообмена им. А.В. Лыкова НАН Беларуси профессора З.П. Шульмана и старшего научного сотрудника А.А. Маханька.

Апробация результатов диссертации

Материалы диссертационной работы были представлены для обсуждения:

- на совместных заседаниях хирургического общества хирургов г. Минска и Минской области (Минск, 2002 и 2004 гг.);
- XII-м съезде хирургов Республики Беларусь (Минск, 2002 г.);

– Международной конференции «Роль биологически активных веществ в интегративной деятельности организма в норме и в процессе формирования общеадаптационного синдрома» (Ереван, Армения, 2003 г.);

– XX-м рабочем совещании немецкого анатомического общества (Вюрцбург, Германия, 2003 г.);

– 99-м конгрессе международного анатомического общества (Вена, Австрия, 2004 г.);

– заседании ученого совета Гродненского государственного медицинского университета (Гродно, 2004 г.);

– III-м съезде трансплантологов Украины (Донецк, Украина, 2004 г.);

– на XXIV-м Пленуме Правления Ассоциации белорусских хирургов (Минск, 2004 г.).

Материалы диссертации вошли в раздел работы, представленной на соискание Государственной премии Республики Беларусь за 2003 г.

Опубликованность результатов

По материалам исследований опубликовано 46 научных работ, из них: 29 статей в научных отечественных и зарубежных журналах, 9 статей в рецензируемых научных сборниках, 2 тезисов докладов, 2 инструкции по применению, утвержденные Министерством здравоохранения Республики Беларусь; подано 4 заявки на изобретения. Общее количество страниц опубликованных материалов — 217.

Структура и объем диссертации

Диссертационная работа изложена на 164 страницах компьютерного набора и состоит из введения, общей характеристики работы, аналитического обзора литературы (глава 1), материалов и методов исследования (главы 2, 3), результатов собственных исследований (главы 4–6), заключения (глава 7), списка использованной литературы и приложений. Текстовая часть диссертации занимает 134 страницы с включением 4 таблиц, 6 рисунков, 26 микрофотографий и 12 графиков. Библиографический список содержит 384 источника, в том числе 84 работы на русском и 300 на иных языках, занимает 30 страниц.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Методика исследования и общая характеристика экспериментальных наблюдений

Основным направлением нашего исследования было развитие способа пересадки ксеногенных островковых клеток поджелудочной железы плодов кроликов в ток крови и изучение ответной реакции реципиента (собак) с экспериментальным аллоксановым диабетом на ксенотрансплантацию. Исследование имело целью разработку нового малоинвазивного метода хирургического лечения сахарного диабета I типа, заключающегося в трансплантации макроинкапсулированной ксеногенной островковой культуры клеток в сосудистое русло реципиента без использования иммуносупрессивной терапии.

В экспериментальной части работы необходимо было выяснить возможность длительного сохранения жизнеспособности и функции пересаженных ксеногенных островковых клеток в токе крови реципиента и разработать биологический контейнер, обладающий хорошими диффузионными свойствами для адекватного питания трансплантата и обратной диффузии инсулина, хорошей биосовместимостью с островковыми клетками и тканями реципиента, а также обладающий хорошими иммунопротективными свойствами.

Для внедрения внутрисосудистой ксенотрансплантации в клиническую практику необходимо было в экспериментальных условиях разработать малоинвазивный и безопасный метод внутрисосудистой трансплантации макроинкапсулированной культуры островковых клеток, обеспечивая при этом адекватное питание трансплантата и его функционирование.

Поставленные задачи решались следующим образом:

1. Учитывая «посттрансплантационный стресс» пересаживаемой культуры островковых клеток при перемещении ее в новые условия функционирования, было необходимо разработать новые методологические подходы в подготовке островковых клеток для трансплантации с целью получения устойчивой и высокофункциональной инсулинпродуцирующей ткани.

2. О возможности длительного сохранения ксеногенной культуры панкреатических островковых клеток в сосудистом русле реципиента мы судили по морфологическим, морфометрическим и иммуногистохимическим изменениям, которые происходили в трансплантате в различные посттрансплантационные периоды после пересадки в артериальный и смешанный артериовенозный кровоток. Об антидиабетическом эффекте ксенотрансплантации судили по изменениям клинического течения экспериментального аллоксанового диабета у животных и динамике уровня гликемии. Сохранение жизнеспособности и функционирование трансплантата оценивали на основании морфологических,

морфометрических и иммуногистохимических исследований в различные посттрансплантационные периоды.

3. Для макроинкапсуляции ксеногенной панкреатической островковой ткани необходимо было разработать контейнер, обладающий хорошими диффузионными свойствами, атромбогенностью, биоинертностью в отношении пересаживаемой культуры клеток и среды крови реципиента, прочностью и эластичностью.

4. Для обеспечения оптимального массопереноса трофогенов внутрь капсулы и инсулина в токе крови необходимо было создать экспериментальную модель и провести физико-математическое моделирование конвективно-диффузионного массопереноса глюкозы и инсулина, которое позволило определить оптимальную гемореологическую форму макрокапсулы и ее размеры.

На основании экспериментальных данных была подтверждена гипотеза о возможности длительного сохранения ксеногенной панкреатической островковой ткани в сосудистом русле реципиента без иммуносупрессивной терапии, что в дальнейшем легло в основу клинического применения ксенотрансплантации в лечении больных с сахарным диабетом I типа.

Все исследования выполняли согласно «Правилам проведения работ с использованием экспериментальных животных», утвержденных Советом Белорусского государственного медицинского университета 24.06.1995 г., которые соответствуют требованиям Всемирного общества защиты животных (WSPA) и Европейской конвенции по защите экспериментальных животных.

Всего было выполнено 22 хронических опыта на собаках. 17 животным трансплантация макроинкапсулированных островковых клеток была произведена в абдоминальный отдел аорты (А.И. Романовский, 2001). Однако этот метод имел существенные недостатки. В первую очередь это касалось травматичности вмешательства, а также потенциальной возможности развития смертельных хирургических осложнений. Кроме того, метод предусматривает сброс, секреторируемых островковыми клетками гормонов, из макрокапсулы, непосредственно в системный артериальный кровоток, что недостаточно физиологично. Исходя из этого, мы поставили цель, приблизить методику внутрисосудистой трансплантации к более физиологичным условиям, создавая возможность оттока продуктов островковых клеток из макрокапсулы непосредственно в системный венозный кровоток, одновременно создавая условия артериализации крови для профилактики сосудистого тромбоза. Для реализации этой задачи был использован принцип артериовенозного шунтирования. Модель такой имплантации была исследована на 5 животных. Артериовенозный свищ формировался между бедренными сосудами конечности, а макрокапсула с островковыми клетками помещалась в сформированном анастомозе, что позволяло контейне-

ру омываться как артериальной, так и венозной кровью, богатой метаболитами, непосредственно участвующими в регуляции функции клеток (рис. 1).

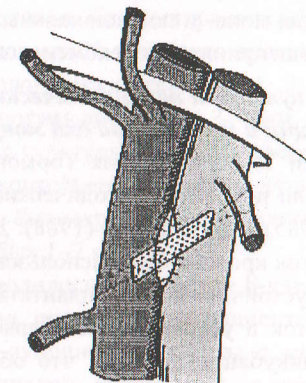


Рис. 1. Схема трансплантации макрокапсулы в артериовенозное соустье на бедре

Для морфологической оценки пересаженной культуры клеток, препараты (капсула вместе с сосудами) забирались на 7, 14, 30, 60-й дни, через 6, 12 и 18 месяцев после пересадки. Материал фиксировали в 10 %-ном растворе нейтрального формалина. Для гистологического исследования парафиновые срезы окрашивались гематоксилином-эозином и по Ван-Гизону по общепринятым методам. Для исключения возможного восстановления функции собственных островковых клеток одновременно проводился забор ткани поджелудочной железы экспериментальных животных.

Морфометрические исследования проводились по рекомендациям (Г.Г. Автандилов, 1990) и состояли в определении числа перикарионов с контурирующимися ядрами в пяти произвольно выбранных областях (подкапсулярные зоны, центр, полюса капсулы), на каждом 5-м или 10-м срезе (в зависимости от размера капсулы). Полученные числовые данные выражали в процентах. Для оценки результатов использовался анализатор изображений «Bioscan-NT» и программы, разработанные в лаборатории компьютерных технологий ЦНИЛ Белорусского государственного медицинского университета. Статистический анализ полученных в ходе исследования данных, проводился по стандартным методам и формулам на ЭВМ IBM PC с использованием пакета программ «STATISTICA 5.0». Достоверность различий оценивали при помощи t-критерия Стьюдента-Фишера. Различия рассматривались как статистически достоверные при уровне значимости $P < 0,05$.

Для иммуногистохимической оценки препараты «сосуд-капсула» фиксировали в 2 %-ном растворе Замбони. Нами была применена разновидность не-

прямого иммунопероксидазного метода. Оценка результатов исследования проводилась на светооптическом уровне с использованием универсального фото-микроскопа «Аxiophot» (Zeiss, Германия). Контроль иммуногистохимической реакции, тканевых антигенов, моно- и поликлональных антител, реагентов проводился в соответствии с общепринятыми рекомендациями (Т. Voensisch, 2001).

Подготовка ксеногенной культуры панкреатических островковых клеток для трансплантации и контейнера для макроинкапсуляции

В основу подготовки и тестирования гормонпродуцирующих клеток поджелудочной железы были положены методические подходы, отражённые в работах В.Н. Блюмкина (1985) и О. Korsgren (1988). Для получения фетальной культуры островковых клеток кролика было использовано 680 плодов. Для создания высокоактивного и устойчивого трансплантата нами впервые была использована инкубация клеток в условиях атмосферы азота и одновременном понижении температуры инкубации до 24°C, что обеспечивало поддержание необходимого пула для восстановления трансплантата после «стресса», связанного с перемещением культуры в организм реципиента. За 6 дней до трансплантации в культуру клеток вносили стерильные растворы диабетопротекторов (рабочие разведения 1:100), приготовленных на Нерес-буфере никотинамида (в конечной концентрации 10 мМ) и сульфата цинка (в конечной концентрации 10 мг/мл). В комплексе с диабетопротекторами наступало замедление метаболизма и пролиферации клеток, снижение их рецепторной чувствительности к воздействию повреждающих агентов, в том числе антител и комплемента.

Подготовленная для трансплантации культура клеток подвергалась микробиологическому, вирусологическому и туморопластическому тестированию согласно методическим рекомендациям «Аттестация перевиваемых клеточных линий — субстратов производства и контроля медицинских и иммунобиологических препаратов» М., 1989. РД 42-28-10-89, и приказу № 31 Министерства здравоохранения Республики Беларусь.

Оценка структурно-функциональной состоятельности культуры осуществлялась путем окраски дитизоном (F. Mislér et al., 1986), флюоресцентными антиинсулиновыми антителами (K. Rieneck и др., 2000), проточной цитофлюориметрией с нагрузочными тестами. Продукция инсулина популяцией островковых клеток тестировалась с помощью набора для определения иммунореактивного инсулина Института биоорганической химии НАН Беларуси. В результате тестирования средняя активность инсулина в культурах (после полной смены среды и стимуляции клеток 5 мМ глюкозой в течение суток) составляла не менее 1000 нМоль/л.

Количество и жизнеспособность островковых клеток определяли прямым методом — путём микроскопии в камере Горяева с трипановым синим (0,1 %-ный раствор). При этом количество жизнеспособных клеток и их класте-

ров составляло не менее 90 % непосредственно перед заключением клеток в макрокапсулу.

Для макроинкапсуляции нами были отобраны биосинтетические материалы из полиамида и нейлона. Для тестирования были изготовлены контейнеры из производных полиамида № 6 технологических серий № 13М, 13В, 11Д, 11М, сополиамида технологических серий № 1, 2, 3 и нейлона (фирма Buckmann) цилиндрической формы диаметром 3–4 мм, длиной 25–30 мм, которые перед заключением в них культуры клеток, подвергались стерилизации гамма-излучением. В готовые контейнеры вводилась культура клеток, и контейнеры герметично запаивались. Диаметр пор стенок контейнера составлял по результатам «пузырьковой пробы» 1–2 мкм.

Исследование проводилось на культуре β-клеток плодов кроликов в присутствии сыворотки крови, полученной от пациентов с СД I типа (20 % по объёму). Использовались 6-луночные планшеты с монослоем β-клеток в сроке 10 дней, в которые помещались контейнеры, содержащие аналогичную мягко-супендированную культуру. По прошествии 3-х дней в среду культивирования вносился прижизненный краситель — нейтральный красный в концентрации 0,05 %-ного раствора на 20 минут, после чего отпипетированные клетки отдельно из контейнера и планшета (контроль) дифференцировали по уровню жизнеспособности с помощью микроскопа в камере Горяева.

В результате проведенных исследований было установлено, что к окончанию 3-дневного срока инкубации способность проникновения красителя через стенку контейнера сохранилась в большинстве образцов, кроме сополиамида технологической серии № 2 и полиамида № 6 технологической серии № 11Д. Это свидетельствовало об утрате диффузионных свойств данных контейнеров. В остальных образцах сохранялась хорошая диффузия красителя, а микроскопия подтверждала высокий показатель сохранения жизнеспособности клеток, как заключенных в контейнер, так и на дне планшетов. При дополнительном окрашивании докрашивалось не более 10 % клеток. Количество жизнеспособных клеток было сравнимо с контролем — $86,0 \pm 11,0$ %. Сохранение высокого процента жизнеспособных клеток указывало на биоинертность материала в отношении клеточной культуры и на хорошую диффузионную способность материалов.

Физико-математическое описание конвективно-диффузионного массопереноса инсулина и глюкозы из капсулы, трансплантированной в артерию (исследование проведено совместно с сотрудниками лаборатории реофизики и макрокинетики Института тепло- и массообмена им. А.В. Лыкова НАН Беларуси)

Эффективность трансплантации макроинкапсулированных островковых клеток в сосудистое русло во многом зависит от трофических условий внутри трансплантируемого контейнера, что во многом определяется условиями кон-

вективно-диффузионного массопереноса трофогенов, глюкозы и инсулина с учетом неньютоновости крови и гемодинамических условий в системе «артерия-капсула» с β -клетками. Ранее математическое описание диффузионного массопереноса было представлено в моделях Маки-Кейзера (1995) и Кинера (2001). Поскольку кровоток играет существенную роль в процессе массопереноса глюкозы и инсулина, а гемореологический фактор может влиять как на интенсивность выработки инсулина, так и на условия, способствующие тромбообразованию, необходимо было провести физико-математическое моделирование системы «кровоток-макрокапсула с островковыми клетками» для определения оптимальной гемореологической формы и локализации контейнера в просвете сосуда. Схематически модель Маки-Кейзера и Кинера, а в более широком плане и модель массопереноса инсулина и глюкозы в системе «капсула-артерия», можно представить в виде:

$$\left[\begin{array}{l} \text{Скорость изме-} \\ \text{нения массы} \end{array} \right] = \left[\begin{array}{l} \text{Диффузионный} \\ \text{массоперенос} \end{array} \right] + \left[\begin{array}{l} \text{Конвективный} \\ \text{массоперенос} \end{array} \right] + \left[\begin{array}{l} \text{Внутренние} \\ \text{источники/стоки} \end{array} \right]$$

Параметры модели, для численных расчетов кинетики концентрации инсулина в рассматриваемой биосистеме, приведены в табл. 1.

Таблица 1

Коэффициенты моделей Маки-Кейзера и Кинера

$DG, 10^{-6} \text{ см}^2/\text{с}$	$DI, 10^{-6} \text{ см}^2/\text{с}$	$G0, \text{ ммоль/л}$	$Kinh, 10^{-6} \text{ ммоль/л}$	$Ki, 10^{-6} \text{ ммоль/л}$	$Km, \text{ ммоль/л}$
6.6	2.1	1.5	1.0	40.0	9.8
$Ks, \frac{\text{ммоль}}{\text{л-мин}}$	$K1, \text{ ммоль/л}$	$K2, \text{ ммоль/л}$	$Lbed, \text{ мм}$	$L, \frac{\text{ммоль}}{\text{л-мин}}$	$\tau L, \text{ мин}$
0.13	1.4	17.0	0.3	0.01	20
$Vm, \frac{\text{ммоль}}{\text{л-мин}}$	$Vs, \frac{\text{ммоль}}{\text{л-мин}}$	$V1, \frac{\text{ммоль}}{\text{л-мин}}$	$V2, \frac{\text{ммоль}}{\text{л-мин}}$	$v, \text{ мм/мин}$	
0.24	0.034	120	32	3.8	

Учет гемореологического фактора в собственной модели выработки и массопереноса инсулина в кровь из капсулы, имплантируемой в артерию

Отличительной особенностью биосистемы искусственной эндокринной поджелудочной железы — капсулы с β -клетками, имплантируемой в артерию, по сравнению с другими подобными системами является наличие кровотока вблизи поверхности этой капсулы. Данное обстоятельство весьма благоприятно для достаточного и оперативного выделения инсулина этой системой, поскольку интенсивный артериальный кровоток обеспечивает у поверхности капсулы высокое содержание кислорода, а также значительные градиенты концентраций глюкозы и инсулина. Наша модель выработки и массопереноса инсулина в кровь из капсулы, имплантируемой в артерию больного СД I типа основана на

модели Кинера, но в отличие от этой модели она описывает конвективно-диффузионный массоперенос глюкозы и инсулина в принципиально иной системе, включающей как область исключительно диффузионного массопереноса (суспензия клеток в капсуле), так и область конвективно-диффузионного массопереноса (артериальная кровь вблизи капсулы). Другая отличительная особенность нашей модели — расчет профиля скорости в сосуде с капсулой и его учет при моделировании конвективной диффузии в крови. Знание профиля скорости необходимо также и для оценки площади застойных зон вблизи мембраны капсулы, т. е. областей с повышенным риском тромбообразования. Геометрически задачу выработки инсулина и кинетики уровня глюкозы в крови человека при применении рассматриваемой системы искусственной поджелудочной железы иллюстрирует рис. 2.

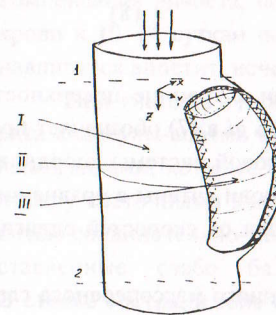


Рис. 2. Схематическое изображение биосистемы искусственной эндокринной поджелудочной железы. 1, 2 — входное и выходное сечения, ограничивающие расчетную область артерии с искусственной аневризмой. I — поток крови, II — мембрана капсулы, III — суспензия клеток внутри капсулы

Научная идея нашего исследования состоит в описании кинетики выработки инсулина на основе решения задачи конвективно-диффузионного массопереноса глюкозы и инсулина с учетом неньютоновости крови и гемодинамических условий в системе «артерия-капсула» с островковыми клетками. Массоперенос глюкозы и инсулина в этой системе описывают следующие уравнения (подстрочный символ s обозначает глюкозу ($s=G$) и инсулин ($s=I$)):

$$\frac{\partial C_s^I}{\partial t} + \sum_{j=1}^3 v_j \frac{\partial C_s^I}{\partial x_j} = D_s^I \sum_{j=1}^3 \frac{\partial^2 C_s^I}{\partial x_j^2}; \quad (1)$$

$$\frac{\partial C_s^{II}}{\partial t} = D_s^{II} \sum_{j=1}^3 \frac{\partial^2 C_s^{II}}{\partial x_j^2}; \quad (2)$$

$$\frac{\partial C_s^{III}}{\partial t} = D_s^{III} \sum_{j=1}^3 \frac{\partial^2 C_s^{III}}{\partial x_j^2} + S_s; \quad (3)$$

$$C_s^I|_{\Gamma_{out}} = C_s^{II}|_{\Gamma_{out}}, \quad D_s^I \frac{\partial C_s^I}{\partial n}|_{\Gamma_{out}} = D_s^{II} \frac{\partial C_s^{II}}{\partial n}|_{\Gamma_{out}}; \quad (4)$$

$$C_s^{II}|_{\Gamma_{in}} = C_s^{III}|_{\Gamma_{in}}, \quad D_s^{II} \frac{\partial C_s^{II}}{\partial n}|_{\Gamma_{in}} = D_s^{III} \frac{\partial C_s^{III}}{\partial n}|_{\Gamma_{in}}; \quad (5)$$

$$C_s^*|_{t=t_1} = C_{s,0}^*, \quad * - I, II, III; \quad (6)$$

$$\rho \left(\frac{\partial v_i}{\partial t} + \sum_{j=1}^3 v_j \frac{\partial v_i}{\partial x_j} \right) = - \frac{\partial P}{\partial x_i} + \sum_{j=1}^3 \left[\frac{\partial}{\partial x_j} \left(\mu \frac{\partial v_i}{\partial x_j} \right) + \frac{\partial \mu}{\partial x_j} \frac{\partial v_j}{\partial x_i} \right] + \rho g_i, \quad i = 1, 2, 3; \quad (7)$$

$$\sum_{j=1}^3 \frac{\partial v_j}{\partial x_j} = 0, \quad j = 1, 2, 3. \quad (8)$$

В (4) и (5) n обозначает направление нормали к границе поверхности (производная берется в этом направлении), а параметр g_i в (7) обозначает проекцию ускорения свободного падения на ось i декартовой системы координат. Гемореологические особенности и неньютоновость крови учтены в уравнениях движения (7) зависимостью кажущейся вязкости крови от скоростей сдвига в каждой точке течения.

Теоретические расчеты конвективно-диффузионного массопереноса глюкозы и инсулина в системе «макрокапсула-артерия» были смоделированы в лабораторном эксперименте, в задачи которого входила непосредственная проверка качества теоретических выводов относительно предпочтительности тех или иных форм и размеров капсулы. Исследования показали, что можно выделить несколько факторов, принципиальных с точки зрения эффективности функционирования капсулы с β -клетками, трансплантируемой в артерию. Уменьшению эффективности подобных систем способствуют их большие геометрические размеры и неоптимальность формы, зависимость коэффициентов диффузии инсулина и глюкозы от температуры, степени агрегирования молекул инсулина и объемной доли клеток в суспензии, а также организация этих клеток в виде островков, образование стромы, снижение проницаемости мембраны, отделяющей суспензию β -клеток от внешней среды. Наличие кислорода в достаточном количестве — необходимое условие нормального функционирования островковых клеток, однако, чувствительность последних к недостатку кислорода существенно зависит от используемого глюкозосодержащего буфера (суспензирующей среды).

На основании теоретических расчетов и экспериментальных исследований при использовании полиамида и нейлона для производства макрокапсулы,

были рассчитаны оптимальные параметры контейнера для макроинкапсуляции островковых клеток, которые составили: длина макрокапсулы — 25–30 мм, диаметр капсулы — 3–4 мм, диаметр пор — 1–2 мкм, форма капсулы — цилиндрическая.

Результаты экспериментальной ксенотрансплантации островковых клеток в сосудистое русло реципиента

В послеоперационном периоде при внутриаортальной трансплантации погибло 3 животных на 2, 6 и 7-е сутки после операции из-за передозировки аллоксана (1 собака) и внутрибрюшного кровотечения (2 животных).

Эффективность экспериментальной трансплантации оценивалась нами на основании клинических наблюдений и определения уровня глюкозы крови. Начиная с 3–5 суток после пересадки клеток, у всех животных быстро наступала компенсация диабета, постепенное снижение и нормализация уровня глюкозы крови к 10–14 суткам после трансплантации. Клинически у животных восстанавливался аппетит, исчезала полидипсия и полиурия.

При гистологическом исследовании серийных поперечных срезов препарата «капсулы-аорта» через 7 дней отмечались клетки с базофильными округлыми ядрами, которые были расположены группами по всей площади срезов. Между клеточными кластерами в отдельных участках наблюдались тонкие извитые соединительно-тканые волокна и элементы культуральной среды, представленные слабо базофильными, кристаллоподобными образованиями. В стенке сосуда, в зоне фиксации капсулы полиамидными нитями, отмечалась небольшая лимфоцитарно-макрофагальная инфильтрация.

Через 2 недели после трансплантации отчетливо прослеживалась капсула, фиксированная к стенке брюшной аорты, которая была покрыта тонким слоем фибрина. В просвете капсулы пересаженные клетки располагались компактно цепочками или большими группами, включающими 20–30 и более клеток. В центре клеток визуализировалось округлое ядро с ровными контурами кардиолецеммы, окруженное ободком однородно окрашенной цитоплазмы. Волокнистый компонент, представленный рыхлой неоформленной соединительной тканью, разделял клеточные группы, формируя каркас. На границе со стенкой аорты и внутри капсулы прослеживались формирующиеся и сформированные капилляры с эритроцитами. Лимфоцитарно-макрофагальных инфильтратов в просвете капсулы не наблюдалось. По сравнению с предыдущим сроком наблюдения (7 дней) клетки претерпевали начало организации, выстраиваясь в группы и цепочки вокруг формирующихся и уже сформированных сосудов.

Через месяц после трансплантации в просвете капсулы формировался каркас из рыхлой соединительной ткани с расположенными между волокнами клеточными группами в окружении разнокалиберных кровеносных сосудов. Признаков воспалительной инфильтрации в стенке аорты, а также внутри кап-

сулы не отмечалось. Спустя 2 месяца после ксенотрансплантации наблюдалась дальнейшая организация трансплантата. Волокнистый компонент, представленный волокнами неоформленной соединительной ткани, разделял островковые клетки, которые группами по 20–30 клеток локализовались вокруг формирующихся и сформированных капилляров.

Через 6 месяцев после пересадки в просвете капсулы наблюдалось развитие зрелой соединительной ткани, а также наличие различных по размеру групп клеток, напоминающих островки Лангерганса, с хорошо выраженной сосудистой сетью — структуры, характерной для эндокринной части definitivoй поджелудочной железы. При этом ни в одном из препаратов не прослеживалось лимфоцитарных и макрофагальных инфильтратов. Клетки сохраняли все признаки жизнеспособности с хорошей дифференциацией цитоплазмы, а также ядер, ядрышек и глыбок хроматина. Гистологическая картина, спустя 13 и 18 месяцев после ксенотрансплантации, характеризовалась всеми признаками, характерными для предыдущих сроков наблюдений — отсутствием тромбоза в просвете сосуда и клеточной инфильтрации.

При иммуногистохимическом исследовании в просвете капсулы большинство популяции составляли иммунореактивные к инсулину клетки. Они проявляли различной выраженности иммуногистохимическую реакцию и располагались группами или, реже, одиночно. При морфометрии количество инсулинпродуцирующих клеток составляло более 60 %. Как правило, большие клеточные группы с сильной степенью реакции к инсулину концентрировались вокруг кровеносных сосудов, при этом нередко границы между маркированными по инсулину клетками в кластере не определялись. В незначительном количестве прослеживались также иммунонегативные клетки и соединительно-тканые волокна.

Учитывая эпителиальное происхождение островковых клеток и генетически определенные межтканевые взаимоотношения, можно предполагать, что трансплантированная культура островковых клеток, выделяет ростовые факторы, стимулирующие пролиферативные процессы эпителиоцитов и фибробластов, попадающих в культуру клеток при ее выделении и культивировании. Этим можно объяснить и быстрое развитие соединительно-тканного каркаса для островковых клеток и неоангиогенеза уже в течение первых 2-х недель после трансплантации. Появление первых капилляров было отмечено уже через 2 недели после пересадки клеток, т. е. их формирование происходит параллельно развитию соединительной ткани. Это является принципиально важным обстоятельством, которое обеспечивает долговременную трофику трансплантата. Такие межтканевые взаимоотношения определяют и возможность влиять на состояние трансплантата и его функционирование. Это может предполагать создание оптимальных условий для роста тканей и васкуляризации трансплантата,

создавая наилучшие условия для питания клеток и необходимую гуморальную регуляцию со стороны организма реципиента.

Таким образом, гистологические и иммуногистохимические исследования капсулы с ксеногенной культурой фетальных клеток кролика, пересаженной в просвет брюшной аорты собак, свидетельствуют о выживаемости и функциональной полноценности (секреция инсулина) клеток, которые сохраняются спустя длительный период времени (13–18 месяцев) после трансплантации. Отсутствие лимфоцитарно-макрофагальной инфильтрации во всех наблюдениях позволяет предположить, что гибель определенной части островковых клеток является не результатом иммуноопосредованной деструкции, а следствием нарушения трофики. Возможно, что тонкий слой фибрина, покрывающий капсулу в первые дни после имплантации, препятствует адекватной диффузии трофогенов внутрь капсулы. Подтверждением этому положению является факт гибели части клеток в течение первых недель после трансплантации, когда еще не сформировалась адекватная сосудистая сеть. Поэтому отложение фибрина и развитие в последующем соединительной ткани на поверхности трансплантата не оказывает существенного влияния на трофику культуры островковых клеток в отдаленном периоде. Гистологический и иммуногистохимический анализ содержимого капсул свидетельствует о стабильном количестве инсулинпродуцирующих клеточных элементов в кластерах, уже спустя месяц после трансплантации в сосудистое русло. Поэтому макрокапсуляция необходима только в первые недели после трансплантации для компактной фиксации панкреатических островковых клеток в просвете сосуда, а также обеспечения диффузионного питания трансплантата до момента формирования капиллярной сети в просвете капсулы.

В настоящее время сложно сделать окончательные выводы о преимуществе ксенотрансплантации панкреатических островковых клеток при формировании артериовенозного соустья, так как максимальные сроки наблюдения за животными составили 6 месяцев. Однако клинико-лабораторные исследования показали, что антидиабетический эффект трансплантации у животных наступал уже на 3–4 сутки, полностью исключая экзогенную инсулинотерапию. Вмешательство оказалось менее травматичным и намного легче переносилось животными. Предварительные морфологические исследования в сроки от 1 недели до 6 месяцев продемонстрировали такую же гистологическую перестройку тканей в просвете капсулы, но визуальное сосудистая сеть, представленная разнокалиберными сосудами, была значительно богаче. Обнадеживающим явился также и факт долговременного сохранения жизнеспособности 80 % пересаженных островковых клеток, по сравнению с 60 % при внутриаортальной трансплантации. Все это свидетельствовало о том, что создание смешанного артериовенозного кровотока, позволяет оптимизировать питание трансплантата в первые

недели после пересадки. В свою очередь, требует дополнительного изучения влияние смешанного кровотока на степень и скорость ревааскуляризации, а также на функциональную активность пересаженных островковых клеток.

Клиническая ксенотрансплантация макроинкапсулированных панкреатических островковых клеток в сосудистое русло реципиента

В настоящее время зарегистрированы единичные случаи достижения инсулиннезависимости в течение 1 года после аллотрансплантации на фоне иммуносупрессивной терапии. Исходя из этого, нам необходимо было оценить влияние ксенотрансплантации фетальной островковой ткани на клиническое течение СД I типа, суточную инсулинпотребность, профиль гликемии, изменения маркеров инсулиновой секреции и компенсации диабета (С-пептид в сыворотке, фруктозамин, иммунореактивный инсулин), а также влияние ксенотрансплантации на некоторые механизмы гормональной регуляции, определяющие лабильное течение диабета.

Клиническое применение ксеногенной трансплантации островковых клеток поджелудочной железы в сосудистое русло было внедрено в 9-й клинической больнице г. Минска согласно приказу Министерства здравоохранения Республики Беларусь № 36 от 19.02.2001 г. «О клиническом применении метода пересадки β-клеток больным сахарным диабетом». Показаниями к ксеногенной трансплантации островковых клеток у больных СД I типа были:

- 1) лабильное течение диабета с частыми гипо- и гипергликемическими состояниями;
- 2) прогрессивно нарастающая резистентность к экзогенному инсулину;
- 3) высокая инсулинпотребность;
- 4) длительность заболевания более 5 лет;
- 5) прогрессирующие хронические осложнения диабета (ретинопатия, нефропатия, ангиопатия);
- 6) панкреатогенный сахарный диабет с высокой инсулинпотребностью.

В клинических условиях, в течение 2001–2004 гг., нами было выполнено 20 ксеногенных трансплантаций островковых клеток 19 больным СД I типа (7 женщин, 12 мужчин). Возраст пациентов составил от 23 до 53 лет, инсулинпотребность колебалась от 42 до 100 Ед/сут. Основную группу больных (7 женщин, 9 мужчин) составили реципиенты с аутоиммунным сахарным диабетом. У 3-х больных причиной сахарного диабета был тяжелый тотальный панкреонекроз.

Ранее было установлено, что большая часть инсулинпродуцирующих клеток находится в неактивном состоянии, а для достижения эугликемии требуется ~500 тыс. клеток. Но, в случае трансплантации, следует учитывать «клеточный стресс» и период адаптации клеток к новым условиям функционирования, а также нарушение нейрогуморальной регуляции. Поэтому определенно

судить о количестве функционирующих клеток после трансплантации представляется достаточно сложным. Согласно ИТР (1999, 2001 гг.) для достижения инсулиннезависимости при аллотрансплантации рекомендуется >6000 IEQs на килограмм. Исходя из этого, количество островковых клеток для каждой пересадки составляло от 5 до 7 млн.

При клиническом применении ксеногенной трансплантации островковых клеток нами были использованы 3 методики внутрисосудистой трансплантации.

1. Первой пациентке макрокапсула была имплантирована в брюшной отдел аорты по методике, разработанной в эксперименте. Несмотря на относительную простоту выполнения вмешательства, методика, с нашей точки зрения, имеет некоторые общехирургические недостатки:

- широкий доступ и травматичность вмешательства;
- косметический дефект после лапаротомии;
- в случае развития послеоперационных осложнений необходимость выполнения релапаротомии;
- отрыв капсулы или ее повреждение могут вести к острой артериальной непроходимости с развитием декомпенсированной ишемии нижних конечностей, нарушению функции органов малого таза, мезентериальной кишечной непроходимости в системе нижнебрюшечной артерии.

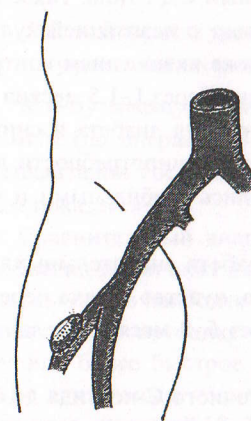


Рис. 3. Схема имплантации макрокапсулы в глубокую артерию бедра

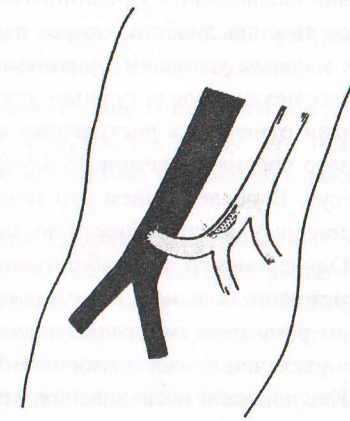


Рис. 4. Схема имплантации макрокапсулы в венозный фрагмент артериовенозного соустья на предплечье

2. Учитывая возможные вышеперечисленные осложнения была разработана имплантация макрокапсулы в ГАБ с использованием аутовенозной ангиопластики (рис. 3, заявка на изобретение № а 20030091 от 05.02.2003 г.).

3. Для создания наиболее физиологических условий функционирования трансплантата нами была разработана малоинвазивная методика трансплантации островковых клеток с формированием артериовенозного соустья на предплечье, предусматривающая сброс гормонов в системный венозный кровоток (рис. 4, заявка на изобретение № а 20040956 от 20.10.2004 г.).

Перемещение дистального конца кубитальной вены предплечья и анастомозирование с артерией по типу «конец в бок», обеспечивало артериализацию венозного кровотока, что предупреждало возможность тромбообразования в венозном фрагменте шунта.

В послеоперационном периоде, в течение 5-ти суток, у всех больных проводилась стандартная антитромботическая терапия, включающая гепарин (20000 Ед/сут), трентал (5 мл/внутривенно/сут), реоглюман (400 мл/сут). Корректирующая инсулинотерапия проводилась по уровню гликемии инсулином короткого и пролонгированного действия на основании 4 замеров в течение суток.

Первые сутки после ксенотрансплантации у всех реципиентов характеризовались нормализацией уровня глюкозы крови и снижением инсулинпотребности до 6–16 Ед/сут. Такое резкое снижение инсулинпотребности мы связывали с вымыванием из капсулы «базального» инсулина. В последующие сутки отмечались значительные колебания гликемии с возрастанием суточной инсулинпотребности до 40–45 Ед. Следует отметить, что наибольшие колебания гликемии наблюдались у реципиентов с аутоиммунным СД I типа. Такое нестабильное течение диабета, скорее всего, было связано с адаптацией культуры клеток к новым условиям функционирования, а также включением контррегуляторных механизмов регуляции углеводного обмена. Через 1–1,5 месяца после пересадки отмечалась постепенная стабилизация течения диабета и снижение суточного уровня гликемии до 4,5–9,8 ммоль/л, а инсулинпотребности до 25–32 Ед/сут. В последующем эти показатели оставались стабильными и общее снижение инсулинпотребности достигало 60–75 %.

Одновременно со стабилизацией течения диабета значительно улучшалось состояние больных. Исчезала слабость, жажда, чувство страха перед возможным развитием гипогликемической комы. Через 6–8 месяцев больные отмечали увеличение массы тела на 3–5 кг.

Как показали исследования, уровень сывороточного С-пептида до операции составлял $2,9 \pm 1,4$ ед., что свидетельствовало о полной функциональной несостоятельности собственных β -клеток поджелудочной железы. К 14-му дню после трансплантации наблюдалось его повышение до $89,0 \pm 5,2$ ед. ($P < 0,05$), а затем постепенное снижение, которое к 6-му месяцу составляло $33,0 \pm 2,1$ ед. ($P < 0,05$), а в последующем, $29,3 \pm 2,7$ ед. ($P < 0,01$ по сравнению с дооперационным уровнем), оставаясь стабильным на протяжении всего периода наблюде-

ния. Повышение уровня С-пептида прямо коррелировало с динамикой иммуно-реактивного инсулина (ИРИ). При этом показатель корреляции составлял 0,578 (рис. 5).

К 14-му дню после трансплантации отмечалось повышение ИРИ до $29,5 \pm 2,39$ мкЕд/л (до операции $4,87 \pm 1,87$ мкЕд/л, $P < 0,05$), а затем наблюдалось постепенное снижение показателя до $20,0 \pm 3,74$ мкЕд/л ($P < 0,05$). Этот уровень в дальнейшем поддерживался на протяжении 2-х лет после трансплантации. В посттрансплантационном периоде отмечено и достоверное снижение сывороточного фруктозамина (СФА), как маркера гликирования белков, составляя обратную корреляцию с С-пептидом ($-0,4446$) и ИРИ ($-0,4349$) (рис. 6).

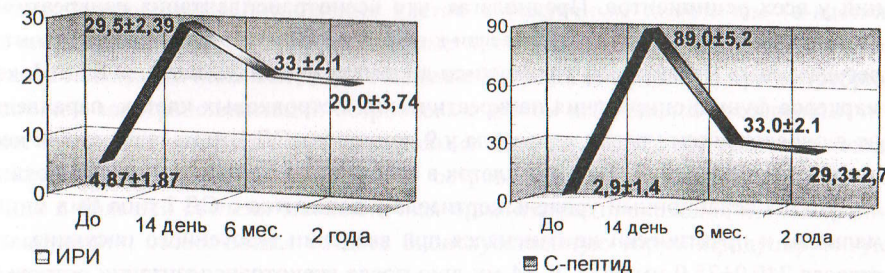


Рис. 5. Динамика уровней ИРИ (мкЕд) и сывороточного С-пептида (уед) у реципиентов ($n=9$) в течение 2-х лет после ксенотрансплантации

К 6-му месяцу после трансплантации уровень СФА снизился до $260,0 \pm 11,0$ мкМ (до операции $340,0 \pm 24,0$ мкМ; $P < 0,05$), а к концу 2-го года после трансплантации составил $250,0 \pm 24,0$ мкМ ($P < 0,05$ по сравнению с дооперационным показателем).

Сравнительный анализ клинического эффекта трансплантации, при использовании различных методик показал, что все они являются достаточно эффективными. Но наиболее отчетливый эффект был получен у 3-х больных, оперированных по методике с формированием артериовенозного соустья. У них наступило более быстрое и максимальное снижение инсулинпотребности (до 80 %) с длительным поддержанием эугликемии при экзогенной инсулинотерапии не превышающей 18–20 Ед/сут.

В норме обычная физиологическая реакция на гипогликемию стимулирует возбуждение симпатической нервной системы, секрецию глюкагона, адреналина, кортизола, АКТГ, стимуляцию гликолиза и компенсацию гипогликемии. Но длительное течение СД I типа и экзогенная инсулинотерапия приводят к нарушению нейрогуморальной регуляции, ведущей к неконтролируемым колебаниям гликемии. Восстановление «обратной связи» возможно только при создании биоискусственного источника эндогенного инсулина путем транспланта-

ции поджелудочной железы или при пересадке панкреатических островковых клеток. В то же время, данные о возможности восстановления контррегуляторных механизмов после островковой трансплантации противоречивы. С. Meyer et al. (1998) показали восстановление ответной реакции адреналина и кортизола с предупреждением клинических проявлений гипогликемии после аллотрансплантации. По данным В.В. Paty et al. (2002), у реципиентов с длительным течением СД I типа, после интрапортальной аллотрансплантации островковых клеток, несмотря на обеспечение относительно длительной инсулиннезависимости, не восстанавливалась гипогликемическая гормональная контррегуляция и симптомы «узнавания» гипогликемии. Наши наблюдения свидетельствовали о стабилизации течения заболевания и исчезновении гипогликемических состояний у всех реципиентов. Предполагая, что ксенотрансплантация панкреатических островковых клеток может вести к определенному восстановлению контррегуляторных механизмов, мы изучили динамику уровня С-пептида и ИРИ, как маркеров функционирования панкреатических островковых клеток, параллельно с определением уровня кортизола у 9 пациентов СД I типа, перенесших ксенотрансплантацию островковых клеток в сроки до 2-х лет. Исследования показали, что дооперационный уровень кортизола у пациентов с СД I типа был минимальным и практически не изменялся при введении экзогенного инсулина, составляя $240,0 \pm 35,0$ нмоль/л. К 14-му дню после ксенотрансплантации островковых клеток уровень кортизола повышался, достигая $330,0 \pm 40,0$ нмоль/л ($P < 0,05$). Ко 2-му месяцу после операции наступало его постепенное снижение до $280,0 \pm 25,0$ нмоль/л и к 6-му месяцу стабилизировался на уровне $260,0 \pm 30,0$ нмоль/л ед. ($P < 0,05$ по сравнению с дооперационным), который сохранялся на протяжении всего периода наблюдения. Статистическая обработка уровней кортизола и С-пептида, кортизола и ИРИ, С-пептида и ИРИ, в одинаковые временные промежутки, выявила прямую корреляционную зависимость показателей, которые составили соответственно 0,985, 0,398 и 0,578 (рис. 6).

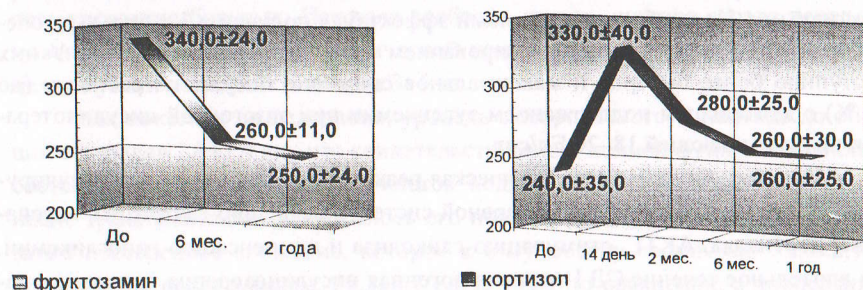


Рис. 6. Изменения уровня СФА (мкМ) и кортизола (нМ) у реципиентов СД I типа ($n=9$) после ксенотрансплантации островковых клеток

Прямая корреляционная зависимость между этими показателями свидетельствует о включении контррегуляторных механизмов со стороны симпатoadrenalовой системы в ответ на повышение секреции эндогенного инсулина трансплантированными клетками. Восстановление «обратной связи» к 3-му месяцу после операции прямо коррелировало с улучшением клинического течения СД I типа, купированием гипогликемических состояний, поддержанием нормогликемии на фоне поддерживающей экзогенной инсулинотерапии.

Возможно, что ответ контринсулярных гормонов на трансплантацию островковых клеток, может зависеть от местообитания и способа имплантации трансплантата. Так, при интрапортальном введении островковых клеток, происходит их диффузное распределение по паренхиме печени, что исключает межклеточные взаимоотношения клеток с различным хемотипом (α -клетки, β -клетки, λ -клетки, рр-клетки), которые прослеживаются в островках Лангерганса поджелудочной железы. По данным V. Gupta et al. (1997), при интрабрюшинной аллотрансплантации островковых клеток наблюдался достоверный ответ глюкагона при развитии гипогликемии. При таком способе трансплантации возможно локальное формирование островкоподобной структуры клеток. Еще в большей степени межклеточная организация происходит при макроинкапсуляции, позволяющая создать биоискусственную гормонпродуцирующую ткань.

Следует также отметить, что применение свободной аллотрансплантации островковых клеток предусматривает интенсивную иммуносупрессивную терапию. Но, обладая выраженным контринсулярным действием и увеличивая потребность в секреции инсулина, иммуносупрессоры подавляют естественную физиологическую реакцию, нарушая принцип «обратной связи», и, приводя тем самым, к стойкой контррегуляторной дисфункции.

Всем пациентам через 2 недели, 1, 6, 12 и 18 месяцев были выполнены контрольные ультразвукографические и доплерографические исследования сосудов (HDI 5000 фирмы Philips) в зоне трансплантации с целью подтверждения отсутствия тромбоза, оценки характера кровотока и расположения капсулы в просвете сосуда. Ни в одном случае сужения просвета сосудов и тромбоза отмечено не было. При доплерографии пиковая линейная скорость кровотока в общей бедренной артерии составляла $1,37 \pm 0,29$ м/с, по глубокой артерии бедра, в зоне имплантации капсулы — $1,7 \pm 1,1$ м/с. В случае имплантации капсулы в венозный фрагмент сформированного артериовенозного шунта на предплечье, сохранялся достаточный просвет кубитальной вены с достаточным ламинарным кровотоком в шунте. Пиковая линейная скорость кровотока при этом соответствовала таковой в нормальной воротной вене.

В послеоперационном периоде осложнения были отмечены у 3-х пациентов. У одного больного после пересадки островковых клеток в ГАБ и опериро-

ванного на фоне ХПН, в течение 30 дней отмечалась лимфорей в зоне вмешательства. Во втором случае, через 1,5 месяца после трансплантации, на фоне инфицирования раны развилась несостоятельность аутовенозной ангиопластики с развитием ложной аневризмы ГАБ, что потребовало удаления капсулы с культурой клеток и перевязки ГАБ. В третьем случае, при использовании артериовенозного анастомоза, развился тромбоз в зоне имплантации макрокапсулы. Данное осложнение было связано с недостаточной артериализацией венозного фрагмента из-за малого диаметра кубитальной вены, что было не учтено при операции.

Иммунологический ответ реципиента на ксенотрансплантацию островковых клеток в сосудистое русло

Для объективной оценки иммунопротективных свойств среды крови и макрокапсуляции необходимо было изучить экспрессию ряда лимфоцитарных рецепторов, являющихся маркерами активности иммунологических процессов, протекающих в организме при ксенотрансплантации.

Для оценки иммунологического ответа реципиента и эффективности иммуноизоляции пересаженных клеток, были исследованы свежeweделенные лимфоциты у 11 реципиентов через 2 недели после вмешательства. Лимфоциты были получены на градиенте фикола/верографина (1077), отмыты раствором Хэнкса и находились в среде RPMI1640 до момента тестирования. Клетки в количестве 100000 отмывали физиологическим раствором. Остаток ресуспензировали в 20 мкл рабочего раствора моноклональных антител CD3, CD4, CD8, CD25, CD95 (Becton Dickinson), меченых FITS и инкубировали в течение 30 минут в темноте при 37°C. Затем смесь центрифугировали и надосадочную жидкость удаляли. Осадок дважды отмывали физиологическим раствором и конечный объем доводили до 200 мкл. Анализ суспензии осуществляли методом проточной цитофлюориметрии на аппарате FACS Vantage. Возбуждение флюоресценции осуществляли аргоновым лазером (488/80 мВт). Гейтирование пула β -клеток проводили исходя из распределения событий по прямому и боковому рассеиванию. В анализ брали 5000 событий. Регистрацию сигнала осуществляли с использованием фильтра 530/30 нм. В качестве дополнительного параметра, характеризующего уровень накопления специфических антител, был использован показатель содержания цитотоксических иммунных комплексов (ЦИК). Содержание ЦИК в сыворотке крови изучали с помощью стандартной методики (У. Ройт, 1991).

Основное прогностическое значение в развитии иммунологической агрессии против островковых клеток имеют 2 субкласса лимфоцитов: CD3 и CD4. В случае трансплантации неинкапсулированных островковых клеток наблюдается увеличение доли CD3 лимфоцитов. Большая часть Т-лимфоцитов активируется и экспрессирует CD4-рецептор (Т-хелперы), а на β -клетках селективно

экспрессируются антигены системы гистосовместимости II класса, необходимые для распознавания CD4 + Т-лимфоцитами. В обследованной группе реципиентов в большинстве случаев как до, так и после трансплантации уровень экспрессии CD3 и CD4 рецепторов не превышал показателей, определяемых в контроле, что свидетельствовало об отсутствии активации Т-клеточного звена иммунной системы.

Не было зарегистрировано и увеличения количества активированных лимфоцитов CD25. До операции этот показатель составлял $23 \pm 1,9$ %, после — $21,5 \pm 2,4$ %. Это подтверждает благоприятный прогноз проведенных трансплантаций, хотя было показано, что CD25-лимфоциты больных СД I типа способны адгезироваться к β -клеткам островка поджелудочной железы с образованием розеток. Выраженность данного феномена находится в обратной корреляции с продолжительностью жизни островковых клеток в организме реципиентов.

У реципиентов с имплантированной макрокапсулой не отмечалось достоверного изменения уровня CD8-лимфоцитов ($16,5 \pm 1,75$ % — до операции и $18,46 \pm 2,3$ % — после), что также свидетельствовало о стабильности иммунологических параметров.

Косвенным подтверждением появления и активации аутореактивных лимфоцитов среди реципиентов является характерная для них сниженная способность лимфоцитов к апоптозу. Данное состояние может проявляться уменьшенным количеством клеток CD95+, что наблюдается у пациентов с СД I типа. У обследованных реципиентов средний уровень экспрессии CD95-лимфоцитов не имел тенденции к изменению и достоверно не превышал контрольный показатель. Об отсутствии активации лимфоцитов говорит и отсутствие накопления ЦИК в крови пациентов после трансплантации.

Отдаленные клинические результаты и экономическая эффективность ксенотрансплантации островковых клеток

Из 19 оперированных больных хороший долговременный результат отмечен у 14 (73,7 %) пациентов. После реабилитационного периода показатели гликемии стабилизировались, а суточное снижение инсулинпотребности достигло 60–75 %. Ни в одном из наблюдений после трансплантации не было зарегистрировано гипогликемии, потребовавшей оказания экстренной медицинской помощи. Следует отметить, что у 12 пациентов до операции развитие гипогликемических ком, преимущественно в ночное время, требовало экстренных вызовов скорой помощи до 2–3-х раз в неделю. Наиболее благоприятный эффект ксенотрансплантации был получен у реципиентов с панкреатогенным СД I типа и у больных с нормальной массой тела. Максимальное снижение у них инсулинпотребности составило 70–85 % со стабильным уровнем гликемии в течение всего периода наблюдения. Долговременный эффект трансплантации у этих реципиентов связан, скорее всего, с неиммунной природой диабета.

Удовлетворительный результат отмечен у 2-х пациентов с аутоиммунным сахарным диабетом. Несмотря на сохранение функции пересаженных островковых клеток в течение 1,5 лет (по данным исследования тощакового, постпрандиального уровня С-пептида в сыворотке и ИРИ), общее снижение инсулинпотребности составило не более 10 %. Отрицательный результат зарегистрирован у 3-х больных (тромбоз артериовенозного шунта, нагноение раны, потребовавшее удаления макрокапсулы, тяжелая декомпенсированная форма диабета, не поддающаяся экзогенной инсулинотерапии).

К сожалению, не ясным остается отсутствие полного нормогликемического эффекта трансплантации при достаточно позитивных лабораторно-функциональных тестах. При этом количество пересаженных островков существенно не влияло на послеоперационный результат. Одной из вероятных причин неполного антидиабетического эффекта пересадки может быть гибель определенного пула островковых клеток в раннем посттрансплантационном периоде из-за нарушения трофики клеток. Этому может быть подтверждением клинический результат повторной ксенотрансплантации, который продемонстрировал быстрое снижение инсулинпотребности у пациентки с 40 Ед/сут до 18 Ед/сут. Однако не следует забывать и о роли антиинсулиновых антител. Учитывая ксеногенный характер островковых клеток и продуцируемый ими инсулин, можно думать и о развитии определенной инсулинрезистентности к кроличьему инсулину, что требует дополнительного изучения.

Расчет экономических затрат относительно оперированных нами пациентов показал, что прямые расходы на лечение сахарного диабета в течение года составляли от 1400 до 1600 \$ США на каждого больного (инсулинотерапия, средства контроля гликемии, плановые госпитализации в отделения эндокринологии, вызовы скорой медицинской помощи, пребывание в отделении реанимации). В свою очередь, экономические затраты на трансплантацию островковых клеток составили от 500 до 600 \$ США на одного пациента. В послеоперационном периоде ни один из оперированных больных не нуждался в оказании скорой помощи и госпитализации в отделения интенсивной терапии, за исключением одного больного с ХПН, нуждающегося в гемодиализе. Следует отметить, что все реципиенты оставались работоспособными без дополнительного трудоустройства. Таким образом, экономические затраты на лечение оперированных больных в течение первого года уменьшились на ~200 \$ США, а в последующие 3 года экономия средств составила 600 \$ США в расчете на одного больного.

1. Перемещение культуры панкреатических островковых клеток в организм реципиента при трансплантации сопровождается клеточным «посттрансплантационным стрессом», апоптозом и потерей значительного количества островковых клеток, снижением их жизнеспособности и функциональной активности. Разработанные при культивировании новые методологические подходы позволили стабилизировать структурные и функциональные показатели островкового трансплантата, добиться повышения резистентности островковых клеток на 40 %. Обработка очищенной ксеногенной культуры фетальных островковых клеток поджелудочной железы средой азота при одновременном понижении температуры до 24°C и внесение в культуру клеток диabetопротекторов (никотинамида и сульфата цинка), обеспечило поддержание в трансплантате необходимого пула инсулинпродуцирующих клеток в стадии медленного созревания для восстановления трансплантата после «стресса» и сохранение жизнеспособными и высокоактивными до 90 % островковых клеток [41, 42, 43, 45].

2. Наиболее предпочтительными материалами для производства макрокапсулы являются микропористые сетки из производных полиамида № 6 технологических серий 13М, 13В, 11М и нейлона, обладающие свойствами атробогенности, биоинертности в отношении пересаживаемой культуры клеток, биосовместимости с тканями реципиента, эластичностью, прочностью. Строгая стандартизированность пор, диаметром 1–2 мкм, обеспечивает хорошие диффузионные свойства материалов и оптимальные условия для массопереноса трофогенов и инсулина в токе крови. Разработанная геометрическая модель макрокапсулы с островковыми клетками, имплантированной в артериальное русло, и физико-математическое описание конвективно-диффузионного массопереноса глюкозы и инсулина с учетом гемореологического фактора и неньютоновости крови, позволили определить оптимальные параметры контейнера, которые составили: длина макрокапсулы — 25–30 мм, диаметр — 3–4 мм, форма — цилиндрическая, диаметр пор — 1–2 мкм [1, 2, 5, 6, 7, 23, 26, 37, 38, 39, 40].

3. Макроинкапсуляция панкреатических островковых клеток и трансплантация в сосудистое русло, как иммунологически выгодную зону, создает двойной принцип иммунопротекции, что позволяет долговременно сохранить жизнеспособность ксеногенной культуры островковых клеток, преодолеть острое и хроническое отторжение трансплантата без иммуносупрессивной терапии и тем самым обеспечить долговременный антидиабетический эффект трансплантации. Микропористость макрокапсулы обеспечивает достаточное диффузионное питание трансплантата, одновременно препятствует проникновению в полость капсулы иммунокомпетентных клеток и ряда форменных эле-

ментов, предотвращая тем самым иммуноопосредованную и цитолитическую деструкцию островков [13, 16, 23, 25, 26, 27, 28, 30, 31, 34, 35, 36].

4. Наиболее предпочтительными являются малоинвазивные методы трансплантации, включающие пересадку культуры островковых клеток в глубокую артерию бедра и в просвет артериовенозного соустья на предплечье. Трансплантация островковых клеток в глубокую артерию бедра обеспечивает адекватное питание трансплантата, сохраняя главный принцип иммунопротекции — иммунологическую привилегированность среды крови, в то же время, исключая опасные для жизни общехирургические осложнения. Формирование артериовенозного шунта создает условия для контакта трансплантата с венозной и артериальной кровью, что обеспечивает функционирование островкового аппарата в условиях, приближенных к физиологическим. Артериализация венозного кровотока предотвращает тромбообразование в зоне имплантации макрокапсулы. Оба метода дают возможность ретрансплантации, в случае гибели трансплантата или снижения его функциональной активности [3, 4, 11, 14, 15, 22, 23, 44, 46].

5. При пересадке макроинкапсулированной ксеногенной фетальной культуры панкреатических островковых клеток в ток крови выявлены следующие закономерности:

- выживание пересаженной культуры клеток в первые дни после трансплантации осуществляется исключительно за счет диффузии трофогенов в полость капсулы через ее микропоры;
- с первых суток в просвете капсулы развиваются процессы организации и неопластического ангиогенеза, за счет которого и поддерживается в последующем жизнеспособность и функционирование трансплантата;
- к 6-му месяцу после пересадки полностью формируется организованная структура бионискусственной поджелудочной железы, напоминающая островки Лангерганса нативной поджелудочной железы со всеми присущими органу признаками — организацией, кровоснабжением, функцией и морфологическими признаками нейрогуморальной регуляции;
- в артериальном русле количество пересаженных функционирующих клеток достигает 60 %; в артериовенозной фистуле имеют место наиболее благоприятные физиологические условия функционирования трансплантата, что позволяет долговременно сохранять до 80 % островковых клеток [8, 19, 23, 25, 27, 29, 46].

6. Внутрисосудистая ксенотрансплантация фетальных островковых клеток кролика является высокоэффективным методом хирургического лечения сахарного диабета I типа, позволяющим у большинства пациентов добиться длительного функционирования трансплантата без иммуносупрессивной терапии, стабилизации течения заболевания, снижения инсулинпотребности на 60–

75 %. Формирование биоискусственного источника эндогенного инсулина восстанавливает принцип «обратной связи», нарушенный в результате длительного течения диабета и экзогенной инсулинотерапии. Поддержание уровня гликемии на физиологическом уровне, особенно в ночное время, предупреждает развитие неконтролируемых гипо- и гипергликемических состояний и создает предпосылки для нормализации метаболизма и предупреждения развития и прогрессирования хронических осложнений диабета. На протяжении более 2,5 лет, по данным клинико-лабораторных исследований (уровень С-пептида, иммунореактивного инсулина, кортизола), активность трансплантата остается стабильной [11, 15, 17, 21, 22, 24, 32, 33, 37, 38].

7. Возможность длительного сохранения культуры клеток, обладающих диффузионным типом питания, в организме реципиента без иммуносупрессивной терапии, открывает возможности для пересадки других эндокринных клеток. Это особенно актуально для нашей Республики, столкнувшейся с проблемой патологии щитовидной и паращитовидных желез после аварии на Чернобыльской АЭС. В частности, разработка и внедрение в клиническую практику ксенотрансплантации тиро- и паратироцитов, позволит приступить к трансплантационному разрешению проблемы недостаточности щитовидной и паращитовидных желез [8, 15, 20, 24, 29, 32].

8. Разработанные методы хирургического лечения инсулинзависимого сахарного диабета выгодно отличаются от зарубежных аналогов возможностью долговременного сохранения терапевтического эффекта, относительной простотой выполнения хирургического вмешательства, позволяющим улучшить качество жизни пациентов, относящихся к категории неизлечимых больных, значительным экономическим эффектом. Использование фетальной ксеногенной культуры островковых клеток в лечении сахарного диабета позволяет полностью преодолеть дефицит аллогенного донорского материала, избежать ряд сложных экономических, этических и юридических проблем, связанных с аллотрансплантацией, создать банк ксеногенной культуры островковых клеток чистой линии [9, 10, 11, 15, 17, 22, 24, 29, 32, 37].

9. В настоящее время, в Республике, только прямые расходы на лечение больного инсулинзависимым сахарным диабетом составляют от 1400 до 1600 \$ США. Интрапортальная аллотрансплантация островковых клеток, как наиболее приоритетный метод клеточной трансплантации в ведущих трансплантационных центрах США и Западной Европы, требует от 80 до 120 тыс. \$ США в год. При этом основные затраты приходятся на получение взрослого донорского материала (2–4 донора поджелудочной железы), выделение и культивирование островковых клеток, иммуносупрессивную терапию, 2–3 ретрансплантации в течение года. Наши расчеты показали, что себестоимость одной интрасосудистой ксенотрансплантации, по разработанной нами методике, составляет от 500

до 600 \$ США, при этом экономия средств достигается использованием ксеногенных источников островковой ткани, исключением иммуносупрессии и необходимостью только одной трансплантации в течение 3-х лет. Улучшение клинического течения заболевания приводит к значительному снижению затрат на инсулинотерапию, средства контроля диабета, затрат, связанных со стационарным лечением. Экономический эффект в течение первого года после трансплантации, в расчете на одного пациента, составляет в среднем 200 \$ США, а в последующие 3 года до 600 \$ США. Сокращение не прямых расходов, куда входят улучшение качества жизни, сохранение трудоустройства и трудоспособности, пенсионные выплаты и т. д., создают дополнительную экономию средств [15, 18, 20, 24].

СПИСОК РАБОТ ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИЙ

Статьи в научных журналах

1. Прохоров А.В. Состояние гемостаза и лечение больных сахарным диабетом, осложненного диабетическими язвами. – Минск, 1988. – 11с. – Деп. во ВНИИМИ МЗ СССР № Д-15027 от 14.03.88.
2. Прохоров А.В., Войтенко Н.К. К вопросу о состоянии гемостаза у больных сахарным диабетом с декомпенсированной ишемией нижних конечностей. – М., 1988. – 8 с. – Деп. во ВНИИМИ МЗ СССР № Д-16568 от 16.11.88.
3. Прохоров А.В., Савченко А.Н. Дифференцированный подход к выбору метода хирургического лечения декомпенсированной ишемии нижних конечностей у больных сахарным диабетом. – Минск, 1988. – 9 с. – Деп. во ВНИИМИ МЗ СССР № Д-15384 от 13.05.88.
4. Прохоров А.В., Романович В.П., Карась Н.В. Применение поясничной симпатэктомии при декомпенсированной ишемии нижних конечностей у больных сахарным диабетом // Здоровоохранение Белоруссии. – 1988. – № 9. – С. 16–18.
5. Прохоров А.В., Парховченко Э.И., Болотина Н.Е. Система гемостаза у больных диабетической ангиопатией нижних конечностей // Хирургия. – 1988. – № 2 – С. 96–100.
6. Прохоров А.В., Романович В.П., Карась Н.В., Перепелица С.И. Возможности симпатэктомии в лечении поражений нижних конечностей у больных сахарным диабетом // Вестн. хирургии. – 1990. – № 11. – С. 12–14.
7. Прохоров А.В., Болотина Н.Е. Применение гемосорбции для коррекции гемостаза у больных с диабетической гангреной // Здоровоохранение Беларуси. – 1993. – № 2. – С. 54–58.
8. Третьяк С.И., Шотт А.В., Романовский А.И., Прохоров А.В. Новые возможности трансплантации эндокринных органов и тканей // Новости хирургии. – 1998. – Т. 9, № 2. – С. 136–137.
9. Щетинин Н.Н., Прохоров А.В. Социальные и психологические аспекты хирургической деонтологии // Здоровоохранение. – 1998. – № 6. – С. 76–78.
10. Щетинин Н.Н., Прохоров А.В., Третьяк С.И., Манулик В.А. Актуальные проблемы медицинской деонтологии // Мед. новости. – 2000. – № 11. – С. 48–51.
11. Прохоров А.В., Третьяк С.И., Горанов В.А., Романович В.П., Горанова Ю.А. Ксенотрансплантация культуры В-клеток в лечении инсулинзависимого сахарного диабета // Бел. мед. журн. – 2002. – № 1. – С. 72–74.
12. Прохоров А.В., Третьяк С.И., Горанов В.А., Романович В.П. Интрасудистая ксенотрансплантация островковых клеток в лечении инсулинзависимого сахарного диабета // Достижения медицинской науки Беларуси. – Вып. VII. – Минск: ГУ РНМБ, 2002. – С. 96–97.

13. Goranov V.A., Mokhort T.V., Prochorov A.V., Tretsjak S.I. The use of polyamid macrocapsules for beta cells transplantation // *Diabetologia*. – 2002. – Vol. 45 – A. 140. (425).
14. Прохоров А.В., Третьяк С.И. Малоинвазивная технология внутриартериальной ксенотрансплантации β -клеток в лечении инсулинозависимого сахарного диабета // *Достижения медицинской науки Беларуси*. – Вып. VIII. – Минск: ГУ РНМБ, 2003. – С. 95–96.
15. Прохоров А.В., Третьяк С.И. Ксенотрансплантация как метод лечения инсулинзависимого сахарного диабета // *Вестн. науч.-практ. медицины. Интервенционная радиология и рентгеноэндоваскулярная хирургия*. – Минск, 2003. – С. 33–40.
16. Прохоров А.В., Третьяк С.И., Горанов В.А., Руденок В.В., Глинник А.А., Петракова О.Н., Глеб С.П., Зинкевич Е.А., Коверко С.В. Влияние внутрисосудистой ксенотрансплантации островковых клеток поджелудочной железы на ряд иммунологических показателей // *Бел. мед. журн.* – 2003. – № 4. – С. 87–89.
17. Прохоров А.В., Третьяк С.И., Горанов В.А., Руденок В.В., Глинник А.А. Ксенотрансплантация β -клеток в сосудистое русло как альтернативный метод лечения инсулинзависимого сахарного диабета // *Здравоохранение*. – 2004. – № 2. – С. 14–17.
18. Прохоров А.В. Хирургическое лечение сахарного диабета: трансплантация поджелудочной железы // *Бел. мед. журн.* – 2004. – № 1. – С. 23–26.
19. Прохоров А.В. Ксенотрансплантация в лечении инсулинзависимого сахарного диабета (иммунологическая и морфологическая оценка) // *Докл. НАН Беларуси*. – 2004. – № 1. – С. 84–87.
20. Щетинин Н.Н., Прохоров А.В., Третьяк С.И. Ксенотрансплантация в свете биомедицинских и психосоциальных проблем // *Мед. новости*. – 2004. – № 4. – С. 3–8.
21. Прохоров А.В., Заборовская З.В., Горанов В.А., Глинник А.А. Влияние ксенотрансплантации панкреатических островковых клеток на механизмы контррегуляции у больных инсулинзависимым сахарным диабетом // *Бел. мед. журн.* – 2004. – № 3. – С. 75–77.
22. Третьяк С.И., Прохоров А.В., Горанов В.А., Глинник А.А. Долговременные результаты ксенотрансплантации В-клеток в артериальное русло // *Анналы хирург. гепатол.* – 2004. – Т. 9, № 2. – С. 243–244.
23. Прохоров А.В., Третьяк С.И., Руденок В.В., Горанов В.А., Глинник А.А. Долговременное сохранение панкреатических островковых клеток без иммуносупрессивной терапии при трансплантации в сосудистое русло реципиента // *Трансплантология*. – 2004. – Т. 7, № 3. – С. 337–340.

24. Третьяк С.И., Прохоров А.В., Глинник А.А. Отдаленные результаты ксенотрансплантации макроинкапсулированной культуры островковых клеток поджелудочной железы // *Трансплантология*. – 2004. – Т. 7, № 3. – С. 364–366.
25. Прохоров А.В., Третьяк С.И., Руденок В.В. Гистологическая структура макроинкапсулированных фетальных β -клеток поджелудочной железы после ксеногенной трансплантации в сосудистое русло // *Вестн. трансплантологии и искусственных органов*. – 2004. – № 2. – С. 37–40.
26. Маханек А.А., Шульман З.П., Прохоров А.В., Горанов В.А., Третьяк С.И. Физико-математическое описание конвективно-диффузионного массопереноса инсулина и глюкозы из капсулы, трансплантированной в артерию // *Препринт № 2*. – Минск, 2004. – 44 с.
27. Prochorov A., Tretjak S., Roudenok V. Macroincapsulation of fetal pancreatic β -cells is long-lasting source of insulin-inducing tissue in abdominal aorta of dogs with alloxan induced diabetes // *Ann Anat.* – 2004. – Т. 186. – S. 149.
28. Prochorov A., Tretjak S., Roudenok V. Effects of transplantation of encapsulated pancreatic islet cells in the dog abdominal aorta // *Ann Anat.* – 2004. – Т. 186. – S. 270.
29. Prochorov A.V., Tretjak S.I., Roudenok V.V., Goranov V.A. Long-term normalization of diabetes mellitus after xenotransplantation of fetal pancreatic islet cells into the blood stream without immunosuppressive therapy // *Transpl.Proc.* – 2004. – Vol. 36, issue 9. – P. 2855–2856.
- Материалы съездов, пленумов и конференций**
30. Прохоров А.В., Третьяк С.И. Трансплантация инкапсулированной культуры β -клеток в лечении экспериментального сахарного диабета // *Международ. науч. симпозиум: Белорусско-польские дни хирургии, г. Гродно, 18–19 окт. 2001 г.: Сб. материалов*. – Гродно, 2001. – С. 146–147.
31. Прохоров А.В., Третьяк С.И., Горанов В.А., Маркелов Д.В. Свободная трансплантация культуры β -клеток в лечении экспериментального сахарного диабета // *Актуальные вопросы современной медицины: Материалы юбилейной науч. конф., посв. 80-летию БГМУ*. – Минск, 2001. – Ч. 2. – С. 91–93.
32. Прохоров А.В., Третьяк С.И., Романович В.П., Горанов В.А. Ксенотрансплантация культуры β -клеток в лечении инсулинзависимого сахарного диабета // *Материалы XII съезда хирургов Республики Беларусь, г. Минск, 22–24 мая 2002 г.* – Минск, 2002. – Ч. 2. – С. 269–271.
33. Прохоров А.В., Третьяк С.И., Горанов В.А., Романович В.П., Горанова Ю.А. Первый опыт интрасосудистой ксенотрансплантации культуры β -клеток в лечении инсулинозависимого сахарного диабета // *Материалы XX съезда хирургов Украины*. – Тернополь, 2002. – Т. 2. – С. 488–489.
34. Горанов В.А., Мохорт Т.В., Мельнов С.Б., Лавничук О.А., Прохоров А.В. Дополнительные критерии оценки риска отторжения инкапсулирован-

ных β -клеток в организме потенциального реципиента // Актуальные вопросы современной медицины: Материалы юбилейной науч. конф., посв. 80-летию БГМУ. – Минск, 2001. – Ч. 1. – С. 72–73.

35. Прохоров А.В., Третьяк С.И., Руденок В.В., Горанов В.А. Влияние внутрисосудистой ксенотрансплантации островковых клеток поджелудочной железы на ряд иммунологических показателей у больных инсулинзависимым сахарным диабетом // Материалы международной конференции «Роль биологически активных веществ в интегративной деятельности организма в норме и в процессе формирования общеадаптационного синдрома» / ЕрГМУ. – Ереван, 2003. – С. 137–139.

36. Горанов В.А., Третьяк С.И., Прохоров А.В., Петракова О.Н., Лавничук О.А., Дударенко О.И., Глинник А.А. Показатели иммунного статуса реципиентов после ксенотрансплантации β -клеток в сосудистое русло // Актуальные вопросы эндокринной хирургии, хирургической гепатологии и трансфузионной медицины: Сб. научн. тр. посвящ. 60-летию зав. каф. хирургических болезней медико-профилактического факультета, заслуженного врача РФ, д.м.н., проф. М.Ф. Заривчацкого / МЗ РФ. – Пермь, 2003. – С. 49–54.

37. Прохоров А.В., Третьяк С.И., Горанов В.А., Глинник А.А. Ксенотрансплантация как альтернативный метод лечения инсулинзависимого сахарного диабета // Актуальные вопросы эндокринной хирургии, хирургической гепатологии и трансфузионной медицины: Сб. научн. тр. посвящ. 60-летию зав. каф. хирургических болезней медико-профилактического факультета, заслуженного врача РФ, д.м.н., проф. М.Ф. Заривчацкого / МЗ РФ. – Пермь, 2003. – С. 105–113.

38. Прохоров А.В. Экспериментальные и клинические результаты ксенотрансплантации панкреатических островковых клеток в лечении сахарного диабета // Актуальные вопросы гнойно-септической и панкреато-биллярной хирургии: Материалы XXIV Пленума Правления Ассоциации белорусских хирургов, г. Минск, 26 ноября 2004 г. – Минск, 2004. – С. 213–214.

Тезисы докладов

39. Prokhorov A.V. Hemosorption in correction for hemostasis of patients suffering from diabetic gangrenes // Book of Abstracts "Transfer processes in biomedical problems" international school-seminar. – Minsk, Belarus, 15–21 may 1995. – Minsk, 1995. – P. 118–119.

40. Prokhorov A.V. Hemostasis system and the development of the diabetic gangrene of the feet // Book of Abstracts "Transfer processes in biomedical problems" international school-seminar. – Minsk, Belarus, 15–21 may 1995. – Minsk, 1995. – P. 120–121.

Заявки на изобретения и инструкции по применению

41. Третьяк С.И., Горанов В.А., Прохоров А.В. Способ повышения устойчивости ксеногенных островковых клеток к реакциям отторжения в организме реципиента (инструкция по применению). – Регистрационный № 49–0303; Утв. МЗ РБ 25.11.03. – Минск, 2003.

42. Горанов В.А., Третьяк С.И., Прохоров А.В. Подготовка культуры островковых клеток для трансплантации в контейнерах с микропористой стенкой (инструкция по применению). – Регистрационный № 50–0303; Утв. МЗ РБ 25.11.03. – Минск, 2003.

43. Горанов В.А., Прохоров А.В., Третьяк С.И. а20030138 Способ лечения сахарного диабета // Афіцыйны бюл. Нац. цэнтра інтэлектуальнай уласнасці. – 2004. – № 3. – С. 14.

44. Прохоров А.В., Третьяк С.И., Романович В.П., Горанов В.А. а20030091 Способ хирургического лечения сахарного диабета // Афіцыйны бюл. Нац. цэнтра інтэлектуальнай уласнасці. – 2004. – № 3. – С. 13.

45. Третьяк С.И., Горанов В.А., Прохоров А.В., Бильдюкевич А.В., Фенько Л.А. Способ подготовки клеточного трансплантата к посадке в сосудистое русло // Заявка на изобретение № а 20030424, приоритет изобретения 13.05.2003.

46. Прохоров А.В., Горанов В.А., Третьяк С.И., Романович В.П. Способ трансплантации островковых клеток поджелудочной железы в сосудистое русло // Заявка на изобретение № а 20040956, приоритет изобретения 20.10.2004.