Современные аспекты трансплантации островков поджелудочной железы при сахарном диабете

И.И. Дедов, М.И. Балаболкин, Е.М. Клебанова

Эндокринологический научный центр (дир. – акад. РАН и РАМН И.И. Дедов) РАМН, Москва

Сахарный диабет типа 1 (СД 1) является следствием аутоиммунной деструкции островков поджелудочной железы с последующим развитием абсолютной инсулиновой недостаточности, сопровождаясь выраженной инсулинопенией, а иногда и полным отсутствием секреции инсулина. Несмотря на внедрение современных технологий в практику терапии сахарного диабета (генноинженерный инсулин человека и его аналоги, шприц-ручки и инсулиновые помпы, глюкометры, в том числе и неинвазивные и др.), вопросы строгой компенсации углеводного обмена и предупреждение развития сосудистых осложнений диабета остаются актуальными.

Установлено, что для уменьшения частоты развития сердечно-сосудистых заболеваний, их стабилизации и профилактики необходима строгая компенсация углеводного обмена, близкая к нормогликемии, а также сохранение нормальных показателей липидного обмена и артериального давления. Достижение перечисленного на протяжении длительного времени сопряжено с высоким риском частых гипогликемий, которые могут быть причиной летального исхода. Именно этим объясняется стремление разработать такие методы лечения сахарного диабета, которые предполагали бы достижение целевых установок по компенсации углеводного и липидного обменов при отсутствии гипогликемий, что может быть достигнуто только применением технологий, предусматривающих наличие нормальной обратной связи регуляции углеводного обмена, что имеет место у здорового человека. Идеальным для достижения такого состояния является пересадка поджелудочной железы, β-клеток островков поджелудочной железы и разработка конструкций, функционирующих на принципах гормональной, главным образом, инсулиновой регуляции углеводного обмена. Пересадка поджелудочной железы или островков поджелудочной железы необходима в первую очередь для больных СД 1, количество которых, хотя значительно меньшее по сравнению с количеством больных СД 2, но имеет тенденцию к увеличению во всех странах мира. Так, в США насчитывается около 1 млн больных СД 1, в Российской Федерации – около 300 тыс.

На протяжении десятилетий проводятся исследования, направленные на возможность замещения утраченной функции островков поджелудочной железы, восстановления функции инсулярного аппарата поджелудочной железы и нормальной регуляции углеводного обмена. Научные исследования проводятся по нескольким направлениям: аллогенная трансплантация поджелудочной железы или ее фрагментов; пересадка островков поджелудочной железы, полученных от аллогенного или ксеногенного донора; разработка и создание искусственной поджелудочной железы.

Первая пересадка поджелудочной железы для лечения диабетической нефропатии и сахарного диабета была выполнена W.D. Kelly и соавт. (1967). Однако выживаемость больных и функция пересаженного органа оставались крайне низкими, что определялось отсутствием средств и методов, позволяющих успешно воздействовать на процессы отторжения и функцию пересаженного органа. Внедрение современных иммуносупрессивных средств (метилпреднизолон, азатиоприн, циклоспорин А, антисыворотки к субпопуляциям Т-лимфоцитов) способствовало предупреждению отторжения пересаженной поджелудочной железы, которая, как правило, проводится одновременно с трансплантацией почки при сохранении в течение длительного времени их функции. Такую органную трансплантацию поджелудочной железы проводят больным, находящимся в терминальной стадии диабетической нефропатии. К 1998 г., по данным A. Gruessner и D. E. R. Sutherland [6], в мире было проведено свыше 10 000 подобных операций, причем наибольшее их количество приходилось на 1991-1997 гг. В большинстве случаев такие операции проводятся у больных сахарным диабетом и уремией, и для проведения подобных трансплантаций используется трупная поджелудочная железа или ее часть и почки. По данным международного регистра по пересадке поджелудочной железы к августу 2000 г. количество проведенных трансплантаций поджелудочной железы увеличилось до 15 710. В настоящее время в мире ежегодно проводится около 1500 пересадок поджелудочной железы, причем более 90% таких операций проводится в США.

Основная проблема пересадки поджелудочной железы или ее фрагментов обусловлена отторжением пересаженной ткани. Для предупреждения отторжения пересаженной ткани применяется антилимфоцитарная сыворотка, а также другие методы, видимо, оказывающие положительное влияние

на реакцию отторжения посредством иммуномодулирующего влияния на иммунную систему реципиента (длительное сохранение культуры клеток при температуре 22-24°С, или 37°С при высоких или гипербарических концентрациях кислорода, криоконсервирование, облучение ультрафиолетом или рентгеновскими лучами, обработка культуры островковой ткани моноклональными антителами к антигенам 2-го класса системы гистосовместимости). Иммуносупрессивная терапия после трансплантации почек и фрагментов поджелудочной железы включает моно- или поликлональные антитела к Т-клеткам, ингибиторы кальцинейрина (циклоспорин или такролимус), антиметаболиты (азатиоприн или мофетилмикофенолат) и кортикостероиды.

В течение первого года после трансплантации комплекса почка-поджелудочная железа полная инсулинонезависимость сохраняется у 94% больных, а при трансплантации только поджелудочной железы – у 89%; спустя 5 лет инсулинонезависимость сохраняется у 81 и 67% соответственно. После трансплантации улучшается качество жизни больных: не требуется введения экзогенного инсулина, нет необходимости в проведении мониторинга глюкозы, отсутствуют ограничения в диете, наиболее выраженные положительные изменения наблюдаются в течении нейропатии, что проявляется не только задержкой ее прогрессирования, но и значительным регрессом клинических симптомов, включая восстановление имеющегося гастропареза. Восстановление функциональной активности почек выражено в большей степени и на более длительное время после трансплантации почка-поджелудочная железа, чем после трансплантации только почки. Пролиферативная ретинопатия не подвергается обратному развитию, хотя скорость ее прогрессирования замедляется.

Несмотря на увеличение количества одновременных трансплантаций почки и поджелудочной железы больным СД 1 в сочетании с уремией, преимущества такой терапии (качество жизни больных и стоимость лечения) по сравнению с трансплантацией почки и последующей интенсивной инсулиновой терапией остаются под сомнением. В этой связи расширяются показания для проведения трансплантации почка-поджелудочная железа на более ранней стадии почечной недостаточности. Пересмотру показаний к подобной трансплантации способствовало широкое использование современных иммуносупрессоров (такролима и микофенолата) и кишечного дренажа внешнесекреторной функции поджелудочной железы. Моделирование «стоимость-эффективность» показало, что расходы в течение 3 лет на 100 условных реципиентов при проведении им пересадки почек составляют 10,7 млн. долларов, а при трансплантации почки и поджелудочной железы – 16,11 млн. долларов.

Пересадка островков поджелудочной железы с целью освобождения больных от инсулинозависимости проводится также на протяжении многих десятилетий. Первые попытки пересадки островков (фрагметов) поджелудочной железы были проведены в 30-х годах прошлого столетия, но они оказались неэффективными. В 1960-е годы были разработаны методы очистки островков поджелудочной железы от соединительной и внешнесекреторной ткани с помощью коллагеназы. В последующие годы были проведены экспериментальные и клинические исследования, при которых трансплантация (суспензия) островковых клеток проводилась различными путями и в различные ткани: инъекция в портальную вену, т.е. в печень; инъекция в селезеночную вену и в селезенку; инъекция в пульпу селезенки; инъекция и имплантация в брюшную полость; пересадка (трансплантация или инъекция) под капсулу почки; инъекция в прямую мышцу живота; имплантация в подкожную жировую клетчатку передней стенки живота; имплантация культуры островковых клеток предварительно инкапсулированных (макро- и микроинкапсулирование).

Надежды на возможность пересадки островков поджелудочной железы как взрослого человека, так и островков поджелудочной железы плодов человека не оправдались. Уже в первой работе, выполненной J. S. Najarian и соавт. (1977), было показано, что из 7 больных, страдающих СД типа 1, получивших интраперитонеальную и интрапортальную трансплантацию суспензированной поджелудочной железы взрослого человека и ребенка, ни у одного не было достигнуто инсулинонезависимости и лишь у 4 больных, получивших интрапортальную трансплантацию, отмечалось временное снижение потребности в инсулине.

Первая отечественная аллотрансплантация культур плодных островковых клеток была проведена В.И. Шумаковым в 1979 г. За период с 1981 по 1984 гг. в Научно-исследовательском институте трансплантологии и искусственных органов (Москва) осуществлена аллотрансплантация у 65 больных [17], из которых 42 больных наблюдались в течение года. У 18 больных доза вводимого инсулина оставалась сниженной на 18-67%, а у 7 больных потребность в инсулине вернулась к уровню до трансплантации. Из 20 больных с лабильным до трансплантации течением сахарного диабета у 15 оно оставалось стабильным и лишь у 3 возобновилось лабильное течение заболевания. К сожалению, авторы не осуществляли мониторинг показателей функции пересаженных островковых клеток, функционального состояния иммунной системы в разные сроки после трансплантации и особенно в

отдаленные сроки, что наиболее важно для оценки эффективности предложенной терапии. Следует отметить, что после проведенных операций не наблюдалось случаев полной инсулиннезависимости, т.е. отмены инсулинотерапии. В различные периоды после проведенных аллотрансплантаций отмечалось улучшение в основном субъективных показателей состояния больных диабетом (улучшение общего самочувствия, снижение интенсивности болей в конечностях, улучшение зрения и др.), тогда как динамика некоторых объективных показателей была чаще всего временной. Так, базальная секреция С-пептида (показатель секреции и высвобождения инсулина) повышалась до 0,3-0,49 нг/мл через 1 месяц после пересадки, а затем снижалась до уровня, наблюдаемого до трансплантации – 0,1-0,2 нг/мл.

Более эффективной является аутотрансплантация островков поджелудочной железы в портальную систему, например, у больных, у которых по тем или иным причинам была выполнена панкреатэктомия. Первая такая операция была выполнена J. Dobroschke и соавт. (1978) а к 1995 г., по данным Международного регистра по пересадке островков, в 20 центрах было осуществлено уже 140 аутотрансплантаций. В нашей стране Л.В. Поташев и соавт [15] также осуществили аутотрансплантацию микрофрагментов эндокринной ткани поджелудочной железы больному, страдавшему хроническим панкреатитом, которому была проведена субтотальная ее резекция. Однако даже при таких аутотрансплантациях у больных, не страдающих сахарным диабетом, в последующем возникает необходимость проведения заместительной инсулинотерапии.

Одновременно с использованием для возможного лечения СД первичных культур островковых клеток плодов человека начали проводиться исследования по применению для этих целей ксеногенных культивированных островковых клеток различных животных. В качестве трансплантационного материала применялись культуры, полученные из поджелудочной железы плодов свиньи, плодов крупного рогатого скота, новорожденных поросят или новорожденных кроликов. Основным мотивированием разработки методов ксенотрансплантации островков поджелудочной железы для лечения больных сахарным диабетом явилось желание снизить стоимость расходов как по получению трансплантационного материала (определенные трудности получения поджелудочной железы внутриутробных плодов человека, отсутствие возможности сепарации и очистки островков поджелудочной железы), так и иммуносупресивной терапии, применение которой необходимо в послеоперационном периоде.

Н.Н. Скалецкий и соавт. [16] разработали способ получения культур из неонатальной поджелудочной железы кролика без использования ферментной обработки, фильтрации, центрифугирования и других технических приемов выделения островков. Как отмечают В.И. Шумаков и соавт. [18], использование в качестве источника островковых клеток поджелудочной железы кроликов позволило значительно увеличить количество клинических трансплантаций. К 1994 г. было выполнено более 800 алло- и ксенотрансплантаций культур островковых клеток (в том числе культур плодных островковых клеток человека, культур островковых клеток плодов крупного рогатого скота, свиньи и культур, полученных из поджелудочной железы новорожденных кроликов). Кроме того, за пределами НИИ трансплантологии и искусственных органов сотрудниками этого учреждения было осуществлено еще около 200 пересадок (все – ксенотрансплантации культур островковых клеток поджелудочной железы новорожденных кроликов). Подавляющее большинство пересадок было выполнено внутримышечным способом, инъецированием материала в прямую мышцу живота.

Определенным прорывом в трансплантации островков поджелудочной железы оказалась разработка методов автоматической ферментации, фильтрации и сепарации островков из поджелудочной железы взрослых трупных доноров, позволяющих получать из одной железы до 800 000 островков, доводя чистоту конечного материала до 90% [10]. С этого времени стало возможным получать и трансплантировать больным СД такое количество островков поджелудочной железы, которое необходимо для восстановления нарушенного углеводного обмена при полном отказе от экзогенного введения инсулина. Одновременно было показано, что островки человека, трансплантированные в печень, способны к выживанию в течение нескольких лет при отсутствии признаков отторжения и рецидива аутоиммунности, что было подтверждено гистологическими исследованиями [11]. В некоторых случаях трансплантированые больным СД типа 1 островки человека функционировали в течение нескольких лет, способствуя нормализации углеводного обмена и уровня HbA1c, при отсутствии гипогликемии [3].

Поджелудочная железа взрослого человека весит около 70 г и содержит от 400 000 до 1,5 млн. островков, диаметр каждого составляет около 150 мкм (μm), что соответствует 0,5-4% объема поджелудочной железы. Функция пересаженной островковой ткани может быть эффективной в случае, если количество трансплантируемых островков составляет 6000 или более на 1 кг массы больного, при условии введения указанного количества островков в портальную систему [5]. Трансплантируемые островки поджелудочной железы должны быть свободны от

бактерий и грибков, а доноры тестированы на содержание антител к вирусу гепатита А, В и С, ВИЧ 1 и 2 типа, цитомегаловирусу. Подготовленные для трансплантации островки поджелудочной железы должны быть тестированы на способность секреции инсулина в инкубационной среде с высоким содержанием глюкозы – 16,7 ммоль/л. За несколько лет, по данным B. J. Hering и C. Ricordi [7], было проведено более 300 трансплантаций островков поджелудочной железы человека, но успех таких пересадок был ниже 10%.

Высокая частота отторжения пересаженных островков человека обусловлена влиянием эндотоксинов, содержащихся в трансплантируемом материале, так как островки способны абсорбировать эндотоксины через LPS рецепторы с развитием последующей воспалительной реакции в месте проведенной пересадки. Используя эндотоксинсвободные реагенты и улучшив перитрансплантационное лечение реципиента, F. Bertuzzi и соавт. [4] добились наличия инсулинонезависимости у 60% оперированных ими больных.

Сенсационным прозвучало сообщение группы ученых из Эдмонтона (Канада), которые во главе с проф. A. Shapiro в 2000 г. доложили на заседании 60-й конференции Американской диабетической ассоциации результаты успешной трансплантации островков поджелудочной железы 5 больным СД типа 1 с полной отменой инсулинотерапии в послеоперационном лечении. Высокая эффективность описанного метода трансплантации островков поджелудочной железы человека обусловлена несколькими факторами. Каждый больной получил достаточное количество очищенных островков, которое составляло в среднем 11 392 островка на 1 кг массы тела больного. Такое количество островков поджелудочной железы для каждого больного было получено из 2-3 донорских трупных желез. С момента смерти и взятия поджелудочной железы у донора до получения суспензии островков и введения их в портальную систему печени проходило не более 3-4 ч, т.е. был ликвидирован этап приготовления культуры островков поджелудочной железы. Кроме того, для профилактики отторжения была использована иммуносупрессивная терапия, не содержащая глюкокортикоидов. Основу такой терапии составили антитела к CD25 (зенапакс) и очень низкие дозы такролимуса (FK506) и сиролимуса (рапамицина). После трансплантации островков поджелудочной железы экзогенный инсулин был отменен, и у всех 5 больных гликемия оставалась в течение 7,2 мес. в пределах нормы. Через несколько месяцев были опубликовано более расширенное сообщение уже о 7 больных сахарным диабетом [4], которым была проведена указанная операция. В качестве иммуносупрессии использовали рапамицин (сиролимус) и FK-506 (такролимус) с антителами к рецепторам ИЛ-2 (даклизумаб). Клиническая эффективность и качество жизни больных после проведенной трансплантации островковых клеток была представлена в последующей публикации [13], в которой рассмотрены результаты лечения ранее прооперированных 12 больных (4 женщин и 8 мужчин), страдающих сахарным диабетом, которым трансплантация островковых клеток была проведена в соответствии с Эдмонтонским протоколом. Период наблюдения после операции составил в среднем 10,2 мес. Содержание глюкозы в дооперационный период натощак и после приема пищи составлял о 12,5±1,9 и 20,0±2,7 ммоль/л, а после трансплантации уровень глюкозы достоверно снизился до 6,3±0,3 и 7,5±0,6 ммоль/л. Концентрация HbA1c в крови также достоверно снизилась с 8,3±0,5% до 5,8±0,1%. Содержание С-пептида натощак составляло 0,66±0,06 нмоль/л, а через 1,5 ч после приема пищи – 1,29±0,25 нмоль/л. На момент обследования у 4 больных сохранялся нормальный глюкозотолерантный тест; у 5 – нарушенная толерантность к глюкозе и у 3 выявлялся посттрансплантационный диабет (2 больных принимали пероральные сахароснижающие препараты и 1 больной – менее 10 ед инсулина в сутки). У 11 из 12 больных инсулиновая независимость была достигнута лишь после трансплантации 9000 островков на 1 кг массы тела. При проведении глюкозотолерантного теста четко выявлялся положительный ответ в секреции инсулина (область секреции инсулина под кривой). Применение у 8 больных антисыворотки к α-ФНО во время инфузии островков в портальную вену позволило у 3 больных (37%) получить инсулиновую независимость даже в условиях использования островков от одного донора.

Сравнительно недавно R. Alejandro и соавт. [1, 2] получили хорошие результаты после внутрипортальной трансплантации культуры островков человека у 7 больных с полным отсутствием инсулиновой зависимости в течение года. Ими были предложены дополнительные к протоколу группы во главе с A. Shapiro процедуры, позволившие уменьшить иммуногенность культуры островков и достичь лучшего уровня иммунологической супрессии до того как указанная культура островков была трансплантирована в печень больного. Эта же группа исследователей [11a] показала, что улучшение выживаемости трансплантированных островковых клеток может быть получено при применении оксигенированных перфторуглеводов для предварительного консервирования донорской поджелудочной железы.

Более длительное сохранение функции островковых клеток и профилактика их отторжения могут быть достигнуты путем индукции толерантности к трансплантированным инсулинсекретируемым

клеткам несколькими процедурами: применением минимально допустимых доз облучения с использованием радиоизотопа самария вместе с лексидроном, достигая при этом высокого уровня клеточного химеризма при минимальных дозах облучения; использованием антител к различным субпопуляциям Т-лимфоцитов и иммунокомпетентным клеткам, участвующим в индукции иммунного ответа (анти-CD154, анти-CD45, анти-CD25).

Как известно, селективные моноклональные антитела играют ключевую роль в индукции иммунологической толерантности. Использование антител к CD154 блокирует взаимодействие CD40-CD154, приводит к множественным эффектам не только на уровне В- и Т-лимфоцитов, но и других клеток (дендрические и эндотелиальные клетки, макрофаги), участвующих в раннем распознавании и деструкции трансплантированных островков, что было продемонстрировано в эксперименте на моделях аутоиммунного диабета у NOD мышей. Более длительное выживание трансплантированных островков наблюдалось и при блокаде CD45 клеток, которые играют большую роль в активировании лимфоцитов.

Наибольшая эффективность функции пересаженных островков сохраняется при проведении трансплантации в портальную вену, но при этом возможны такие осложнения, как кровотечение или тромбоз портальной вены [7]. Отрицательные последствия внутрипортальной пересадки островков заключаются также и в том, что в портальном кровообращении наблюдается наиболее высокая концентрация иммуносупрессивных препаратов, принятых внутрь (через рот), по сравнению с их содержанием в системном кровообращении, что проявляется прямым токсическим влиянием на трансплантированные островковые клетки или их выживание даже при применении нестероидных иммуносупрессивных препаратов. Роль и влияние эндотоксинов на недостаточность функции пересаженных островков были продемонстрированы исследованиями, в которых показано, что влияние эндотоксинов осуществляется через их комплексирование с LPS рецепторами островков с последующим повышением образования цитокинов и усилением апоптоза клеток островка. Возможность оценки функциональной активности трансплантированных внутрипортальным путем островков поджелудочной железы была показана J. F. Markmann и соавт. [9], применивших метод МРТ для выявление печеночного стеатоза, наличие которого отражает нарушение локальной утилизации инсулина, что свидетельствует об ухудшении функции трансплантированных островков.

Несмотря на явную эффективность предложенной трансплантации островковых клеток, остается ряд моментов, свидетельствующих о том, что проблема излечения СД типа 1 пока еще далека от разрешения. Во-первых, для каждого больного требуется 2-3 донорские поджелудочные железы для получения достаточного количества островковых клеток, необходимых для трансплантации. Во-вторых, для предупреждения отторжения пересаженных островков поджелудочной железы необходимо применять иммуносупрессивную терапию. Хотя последняя и отличается от классической иммуносупрессивной терапии, тем не менее, она оказывает отрицательное влияние на функциональную активность иммунной системы организма. Однако нельзя не отметить, что основным достижением проведенных исследований является разработка метода профилактики отторжения трансплантанта и предохранение пересаженных клеток от аутоиммунного разрушения.

В настоящее время имеется реальная возможность излечения сахарного диабета с помощью аллотрансплантации островковых клеток поджелудочной железы человека при условии выполнения всех требований Эдмонтонского протокола. Однако остается ограниченность биологического материала (поджелудочной железы человека), необходимого для лечения миллиона больных, страдающих диабетом, что диктует необходимость разработки альтернативных методов лечения, направленных на достижение инсулинонезависимости у больных СД типа 1.

К сожалению, попытки отечественных и зарубежных ученых применения свободной трансплантации как культуры островковых клеток плодов человека, так и ксенотрансплантации (плодов крупного рогатого скота, плодов и новорожденных поросят или кроликов) не могут привести к желаемым результатам по нескольким причинам. Отсутствует возможность выделения и почти 100% очистки островков поджелудочной железы от ацинозной и соединительной тканей, антигены которых являются инициаторами иммунного отторжения и аутоиммунной деструкции пересаженных тканей. Для единовременной пересадки требуется не менее 1 000 000 островков, получение которых сопряжено с отсутствием аппаратуры для автоматической сепарации и подсчета островков, которые должны быть получены в течение ограниченного времени и пересажены больному.

По нашему глубокому убеждению, **широкое применение** (как это проводится до настоящего времени) **отечественными учеными трансплантации культур островковых клеток, полученных из поджелудочной железы поросят или кроликов, должно быть запрещено** по нескольким причинам: во-первых, это ксенотрансплантация, которая вызывает последовательную активацию различных механизмов иммунной системы, приводя к отторжению пересаженных кле-

ток; во-вторых, отсутствие иммуносупрессивной терапии приводит к гибели трансплантируемого материала и, возможно, активизации аутоиммунных механизмов, готовность к которым у больных СД типа 1 достаточно выражена; в-третьих, этические моменты (трансплантации культур островковых клеток новорожденных поросят или кроликов проводятся больным на платной основе); в-четвертых, у больных создается иллюзия возможности излечения от сахарного диабета, что приводит к отсутствию у них мотивации к проведению интенсивной инсулинотерапии, которая позволяет достичь строгой компенсации сахарного диабета и тем самым замедлить или остановить прогрессирование поздних сосудистых осложнений диабета.

Каков же выход из создавшейся ситуации? Вполне обнадеживающими являются исследования о возможности применения для лечения сахарного диабета стволовых клеток, а также подтверждение факта наличия пролиферации β-клеток у взрослого человека.

К стволовым клеткам относятся клетки, способные регенерировать дочерние клетки, которые в свою очередь способны образовывать большое количество различных дифференцированных клеток. Различают эмбриональные стволовые клетки и стволовые клетки взрослых. Эмбриональные стволовые клетки являются производными бластоцитов млекопитающих. Они плюрипотентны и обладают способностью дифференцироваться в различные ткани эмбриона, включая образование всех трех эмбриональных герминальных слоев и β-клеток поджелудочной железы. Взрослые стволовые клетки встречаются значительно реже и участвуют в регенерации различных тканей (печень, мозг, скелетные мышцы, кожа), но, в основном, они выявляются в костном мозге. Стволовые клетки костного мозга могут дифференцироваться в типичные клетки других органов, включая такие органы как печень, мышцы, мозг и сердце. Эти клетки подобно эмбриональным стволовым клеткам способны к самовозобновлению и образованию диффренцированных клеток. Указанное позволяет считать, что существует возможность, что стволовые клетки различных органов, помимо поджелудочной железы, у взрослого способны к образованию в них при особых условиях и β-клеток. Наличие стволовых клеток в поджелудочной железе пока не доказано. Однако обнаружение митоза и неогенеза β-клеток в поджелудочной железе крыс после химической (стрептозотоцин) или хирургической панкреатэктомии позволяет предполагать, что эти клетки образуются из недифференцированных стволовых клеток. После панкреатэктомии увеличивается количество клеток с содержанием белка PDX1, которые являются производными эпителиальных стволовых клеток протоков поджелудочной железы. Ген PDX1 и белок этого гена необходимы для развития экзокринной и эндокринной части поджелудочной железы в самом раннем периоде ее развития. Регенерация поджелудочной железы, наблюдаемая после панкреатэктомии у лабораторных животных, свидетельствует о возможности наличия стволовых клеток, которые служат источником для образования новых островков, содержащих β-клетки.

Имеются обнадеживающие данные о возможности применения для лечения сахарного диабета глюкагоноподобного пептида (GLP-1) и печеночного фактора роста.

Реальной альтернативой алло- или ксенотрансплантации культур или «свежих» островковых клеток, по нашему мнению, является разработка биотехнологических методов, позволяющих полностью выполнять функцию естественных инсулинсекретируемых клеток.

Вселяют оптимизм данные, представленные на 61-ом конгрессе Американской диабетической ассоциации в 2001 г. о возможности генной терапии сахарного диабета и, в частности, лекция C.B. Newgard по искусственным конструкциям или системам, функционирующим почти адекватно естественным β-клеткам. За основу по созданию системы, секретирующей инсулин, была взята β-клетка (стволовые, а возможно и иммортализованные β-клетки) островка поджелудочной железы человека с использованием вектора аденовируса и цитомегаловируса. Инкорпорация аденовируса, содержащего ген β-галактозы, в изолированные островки крысы способствовала экспрессии гена в 70-80% островков. Используя INS-1 линию β-клеток, был получен высокореливантный клон 832/13, который обладал в течение 9 мес способностью к секреции инсулина в ответ на стимуляцию глюкозой, а затем с помощью аденовирусопосредованной методики была получена линия INS-1 β-клеток, способных к экспрессии гена глицеринкиназы, необходимого для осуществления глицерин-стимулированного синтеза и высвобождения инсулина. Методом селекции клеток инсулиномы был получен клон, резистентный к γ-интерферону и интерлейкину-1β, которые, как известно, опосредуют иммунный ответ. Успешно разрабатывается генетическая конструкция или система из модифицированных β-клеток, способная автономно функционировать по принципу «обратной связи» и секретировать адекватное количество инсулина. Однако исследования, проводимые в лаборатории C.B. Newgard, показывают, что разработка такой генной конструкции для лечения сахарного диабета связана с решением множества проблем. Считается, что в β-клетке при различных ее состояниях экспрессируются сотни и даже тысячи генов и необходима

идентификация наиболее важного количества генов, которые должны являться мишенями для терапевтического воздействия как при СД типа 1, так и СД типа 2. Генная терапия СД типа 1, видимо, будет решена раньше, чем успешная терапия СД типа 2. Созданные отдельные компоненты такой системы, функционирующие по принципу «обратной связи», способны контролировать скорость секреции инсулина в зависимости от содержания глюкозы в окружающей среде культуры таких клеток «инженерных» β-клеток. Такие «инженерные» β-клетки сохраняли свою функциональную активность при подкожном, внутрикожном и внутримышечном введении экспериментальным животным. Представленные исследования вселяют оптимизм в возможность создания в недалеком будущем новых терапевтических возможностей, позволяющих излечивать СД типа 1.

Разрабатывается возможность проведения неинвазивной (пероральной) генной терапии экспериментального диабета. На этом же конгрессе сообщалось о возможности проведения генной терапии диабета. При этом модифицированная кДНК проинсулина человека помещается в специальную кассету вместе с аденоассоциированным вирусным терминалом. После проглатывания и попадания в желудочно-кишечный тракт крысиный инсулиновый промотер осуществляет соответствующий контроль за экспрессией гена инсулина в нейроэндокринных клетках кишечника. Помимо снижения содержания глюкозы в крови у диабетических животных, наблюдаемое через 6-18 ч после перорального приема «системы», отмечалось длительное поддержание эугликемического состояния, опосредованное, вероятно, трансдукцией гепатоцитов. Кроме того, были также представлены данные о возможном использовании генетически измененных печеночных клеток в качестве продуцентов инсулина. Два вида печеночных клеток человека (клетки HEP G2 и HUH7) с кДНК инсулина человека при специальном контроле цитомегаловирусного промотера секретировали проинсулин человека, который накапливался в гранулах цитозоля клеток и секретировался в ответ на изменение уровня глюкозы в окружающей среде. Такие клетки продолжали секретировать инсулин после их трансплантации диабетическим иммунонекомпетентным мышам в количестве, необходимом для поддержания эугликемического состояния животных. Впервые, таким образом, была продемонстрирована возможность использования клеток печени для индукции их в клетки, которые могут являться «полноценной заменой» панкреатическим β-клеткам с последующим их использованием для проведения радикальной терапии СД типа 1.

Еще одним доказательством возможности разработки биотехнологического метода лечения сахарного диабета являются исследования по изучению становления эндокринной функции поджелудочной железы в период эмбрионального развития, что привело к открытию белка, являющегося транскриптационным фактором (PDX-1 или IDX-1/STF-1/IPF-1), контролирующим развитие поджелудочной железы и транскрипцию гена инсулина [8]. Фактор PDX-1 экспрессируется не только в период эмбриогенеза, но и во взрослом состоянии, что сочетается с неогенезом островков и дифференцировкой инсулинпродуцирующих клеток из прогениторных (стволовых) клеток. Были открыты так называемые белковые трансдукционные домены (PTDs), позволяющие белкам транслоцироваться через плазматическую мембрану и затем поступать в ядро клетки без эндоцитоза. Наличие PTD в третичной структуре хомеодомена антеннапедиа (транскриптационный дрозофильный фактор) является необходимым и достаточным условием для транслокации этого пептида в цитоплазму и ядро клеток. Далее было установлено, что белок PDX-1 регулирует свою собственную экспрессию посредством А-элемента своего собственного промотора, что вызывает индукцию экспрессии других β-клеточных генов, необходимых для экспрессии гена инсулина.

В 2003 г. впервые показано, что способность белка PDX-1 проникать внутрь клеток является следствием наличия в нем собственного специфического антеннапедиаподобного белка, и его функция аналогична действию PDX-1. Этот белок обладает способностью проникать в изолированные островки поджелудочной железы, комплексируясь с промотором гена инсулина и активируя его экспрессию. Кроме того, белок PDX-1 проникает в клетки панкреатических протоков, которые, как считают, являются прогениторными (стволовыми) клетками, индуцируя в них экспрессию гена инсулина. Эти исследования позволяют предположить, что экзогенный PDX-1 может быть использован в качестве своеобразного «усилителя» транскрипции гена инсулина для разработки метода лечения СД типа 1 без применения генной трансферной технологии. Показана возможность дифференцировки in vitro и in vivo панкреатических клеток человека в инсулинпродуцирующие клетки под влиянием трансриптационного фактора, каким является белок PDX1.

Будущее в лечении сахарного диабета принадлежит не пересадке поджелудочной железы или ее фрагмента в комплексе с почкой или без нее, а биотехнологическим методам.

К биотехнологическим методам и направлениям лечения сахарного диабета относится: генерация β-клеток из стволовых клеток, полученных от боль-

ного сахарным диабетом. Получение таких клеток in vitro в необходимом для поддержания нормального углеводного обмена количестве. Культура таких клеток может быть реимплантирована в портальную систему печени или другие ткани и не будет подвержена процессам отторжения, так как является производным собственных клеток организма. В качестве такого «усилителя» образования β-клеток из стволовых может быть использован экзогенный (возможно генноинженерного происхождения) белок PDX-1; генетическая манипуляция человеческих островковых клеток с целью повышения их резистентности к окислительному стрессу, снижению или снятию антигенности, что позволит уменьшить или даже ликвидировать возможность их иммунологического повреждения и отторжения; индукция образования собственных β-клеток у больного сахарным диабетом с помощью различных генетических манипуляций, результатом чего может быть дифференцировка островковых или инсулинсекретирующих клеток из ацинозных клеток протоков поджелудочной железы; генетическая модификация in vitro (а может быть и in vivo) различных клеток (фибробластов, гепатоцитов и др.) больного диабетом с возможностью достижения регулируемой секреции инсулина этими клетками с последующей их ретрансплантацией в организм того же больного; создание генетических конструкций in vitro с использованием островковых клеток различных животных, способных к регулируемой секреции инсулина, и трансплантируемых в организм человека в виде микрокапсул или других приспособлений, предохраняющих клетки от воздействия иммунной системы хозяина.

Литература

1. Alejandro R., Caulfield A., Fround T. et al., Cell Transplant. – 2001. – Vol. 10. – P. 520
2. Alejandro R., Ferreira J. V., Caulfield A. et al., Am J Transplant. – 2002. – Vol. 2. – Suppl. 3. – P. 227
3. Alejandro R., Lehmann R., Ricordi C. et al., Diabetes. – 1997. – Vol. 46. – P. 1983-1989
4. Bertuzzi F., Grohovaz F., Maffi P. et al., Diabetologia. – 2002. – Vol. 45. – P. 77-84
5. Bretzel R. G., Hering B. J., Brandhorst D. et al., Diabetologia. – 1994. – Vol. 37. – Suppl. 1, P. A38
6. Gruessner A., Sutherland D. E. R., Pancreas transplants for United States (US) and non US cases reported to International Pancreas Transplant Registry (IPTR) and to the United network for organ sharing (UNOS), In: Cecka M., Terasaki P (eds): Clinical transplants, 1997, Los Angeles, UCLA Tissue Typing laboratory, 1998
7. Hering B. J., Ricordi C., Graft Review. – 1999. – Vol. 2. – P. 12-27
8. Jonsson J., Carlsson L., Edlund T., Edlund H., Nature. – 1994. – Vol.37. – P. 606-609
9. Markmann J., F., Rosen M., Siegelman E. S. et al., Diebetes. – 2003. – Vol. 52. – P. 1591-1594
10. Ricordi C., Lacy P. E., Finke E/ et al., Diabetes. – 1988. – Vol. 37. – P. 413-420
11. Ricordi C., Rilo H. L., Carroll P. B. et al., Transplant Proc. – 1994. – Vol. 26. – P. 569
11a. Ricordi C., Fraker C., Szust J. et al., Transplantation – 2003 – Vol. 75 – P. 1524-1527
12. Ryan E. A., Lakey J., Paty B.W. et al., Diabetes – 2002 – Vol. 51 – P. 2148-2157
13. Ryan E. A., Lakey J., Rajotte R. V. et al., Diabetes. – 2001. – Vol. 50. – P.710-719
14. Shapiro A. M., Lakey J. R., Ryan E. A. et al., N. Engl. J. Med. – 2000. – Vol. 27. – P. 230-238
15. Поташов Л. В., Галибин О. В., Черникова М. В., Гринев К. М., Пробл. Эндокринол. – 1987. – №4. – стр. 43-44
16. Скалецкий Н. Н., Кирсанова Л. А., Блюмкин В. Н., В кн.: «Проблемы трансплантологии и искусственных органов», М. – 1994. – стр.73-80
17. Шумаков В. И., Блюмкин В. Н., Игнатенко С. Н. И др. Пробл. Эндокринол. – 1985. – №5. – стр.67-70
18. Шумаков В. И., Блюмкин В. Н., Скалецкий Н. Н. и др., Москва. – Канон. – 1995. -384 с