

*А.В.Прохоров, З.В.Заборовская, В.А.Горанов, А.А.Глинник*

## **Влияние ксенотрансплантации панкреатических островковых клеток на механизмы контррегуляции у больных инсулинзависимым сахарным диабетом**

*Белорусский государственный медицинский университет*

У 9 пациентов сахарным диабетом I типа, перенесших внутрисосудистую ксенотрансплантацию панкреатических островковых клеток в течение 2 лет, исследованы уровни сывороточного С-пептида, иммунореактивного инсулина и кортизола. Выявлена прямая корреляционная зависимость между этими показателями, свидетельствующая о восстановлении контррегуляторных механизмов. Восстановление реакции контринсулярных гормонов на эндогенную секрецию инсулина способствует исчезновению гипогликемических состояний и стабилизации течения диабета в посттрансплантационном периоде. Ключевые слова: сахарный диабет I типа, контррегуляция, кортизол, ксенотрансплантация.

A.V.Prokhorov, Z.V.Zaborovskaya, V.A. Goranov, A.A. Glinnik  
Impact of pancreatic islet cells xenografting on counterregulation mechanisms in patients with insulin – dependent diabetes mellitus  
The levels of serum S-peptide, immunoreactive insulin and cortisol have been studied in 9 patients with type I diabetes mellitus having undergone intravascular xenografting of pancreatic islet cells for 2 years. The direct correlative dependence between these findings has been revealed, which is the evidence of the counterregulation mechanisms restoration. The restoration of counterinsular hormones reaction to endogenous secretion of insulin contributes to the elimination of hypoglycemic conditions and the stabilization of the diabetes mellitus course during the postgrafting period.  
Key words: type I diabetes mellitus, counterregulation, cortisol, xenografting.

В настоящее время основную группу реципиентов, нуждающихся в трансплантации панкреатических островков, составляют больные сахарным диабетом I типа (СД I типа) с терминальной стадией диабетической нефропатии, нуждающихся одновременно в трансплантации почки [1,2,3]. Однако, существуют и другие группы пациентов с не менее тяжелыми осложнениями диабета, такими как лабильный диабет и неконтролируемые гипогликемические реакции. Несмотря на тщательный мониторинг уровня глюкозы крови и многократные инъекции экзогенного инсулина достичь стойкой эугликемии у этих пациентов удается далеко не всегда и сохраняется опасность угрожающей жизни гипогликемической комы. Поэтому обычная клиническая тактика эндокринологов заключается в поддержании более высоких уровней глюкозы крови. В то же время, значительные колебания гликемии создают предпосылки для развития тяжелых метаболических нарушений и прогрессирования хронических осложнений диабета [4].

В норме обычная физиологическая реакция на гипогликемию стимулирует возбуждение симпатической нервной системы, секрецию глюкагона, адреналина, кортизола, АКТГ, стимуляцию гликолиза и компенсацию гипогликемии [5]. Эти

реакции были бы полезны, если бы ограничивались только улучшением утилизации глюкозы. Но длительное течение СД I типа и экзогенная инсулинотерапия приводят к нарушению нейрогуморальной регуляции, ведущей к неконтролируемым колебаниям уровня гликемии. Восстановление «обратной связи» возможно только при создании биоискусственного источника эндогенного инсулина путем трансплантации поджелудочной железы или при пересадке панкреатических островковых клеток. Исследования пациентов с СД I типа, перенесших трансплантацию поджелудочной железы, свидетельствовали о восстановлении и нормализации секреции глюкагона и адреналина [6,7]. В то же время, данные ряда авторов [8,9,10] о возможности восстановления контррегуляторных механизмов после островковой трансплантации противоречивы. Наши наблюдения за больными СД I типа после ксенотрансплантации панкреатических островковых клеток 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, целью настоящего исследования явилось изучение динамики сывороточного С-пептида, иммунореактивного инсулина (ИРИ) и кортизола у пациентов СД I типа, перенесших внутрисосудистую ксенотрансплантацию островковых клеток.

#### Материал и методы

Из 18 оперированных больных исследования были проведены у 9 пациентов, посттрансплантационный период у которых составил более 2 лет. Все пациенты длительное время (более 10 лет) страдали СД I типа. В течение 2001-2003 гг., им была выполнена внутрисосудистая ксенотрансплантация макроинкапсулированных ксеногенных панкреатических фетальных островковых клеток в глубокую артерию бедра по разработанной в клинике методике [11]. Показаниями к трансплантации служили нестабильное течение сахарного диабета, частые гипогликемические состояния, нарастающая инсулинрезистентность, прогрессирование хронических осложнений диабета. Инсулинпотребность у всех больных до операции составляла 46-72 Ед/сут. Мужчин было 5, женщин – 4 в возрасте от 24 до 52 лет. У 3 пациентов причиной диабета был ранее перенесенный панкреонекроз.

Ксеногенную культуру панкреатических островковых клеток получали от плодов кроликов по методике Korsgren O. et al. [12] с последующим микробиологическим, вирусологическим и опухолепластическим тестированием. Для повышения устойчивости островковых клеток при ее пересадке, культуру дополнительно обрабатывали диabetопротекторами. Функциональную активность культуры перед трансплантацией исследовали с помощью набора для определения ИРИ, световой микроскопией с использованием инвертированного микроскопа и окраской культуры дитизоном. В среднем количество островковых клеток для каждой трансплантации составляло от 5 до 7 млн.

До- и послеоперационный мониторинг уровня С-пептида в сыворотке проводили с помощью набора C-Peptid Irma (Immunotech, Чехия), ИРИ – с помощью набора реактивов для определения инсулина в сыворотке крови человека рино-ИНС-ПГ-125I (ИБОХ, Беларусь), кортизола - по стандартной методике с использованием

набора для определения кортизола (ИБОХ, Беларусь). Обычными единицами измерения, используемыми при тестировании С-пептида, являются пг/мл и пМ. Тем не менее, у реципиентов при трансплантации фетальных  $\beta$ -клеток уровень протеина при измерении колебался в широких пределах, что может объясняться как различной степенью связи с белками-переносчиками в организме реципиента, так и с тем, что фетальные  $\beta$ -клетки могут секретировать значительное количество предшественников инсулина и, в частности, проинсулина, перекрестная реактивность которого с С-пептидом, даже в высокоочищенных наборах, составляет не менее 4%. Поэтому отображение изменений уровня С-пептида у реципиентов выполнено в виде долевого соотношения с максимальным полученным значением в виде условных единиц активности. Статистический анализ полученных в ходе исследования данных проводился по стандартным методам и формулам на ЭВМ IBM PC с использованием пакета программ MS Excel 6.0. Достоверность различий оценивали при помощи t-критерия Стьюдента-Фишера.

### Результаты

Концентрация кортизола в сыворотке здоровых лиц в возрасте от 20 до 45 лет колебалась от 213,0 до 664,0 нмоль/л, в среднем составляя 435 нмоль/л. 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 дню после ксенотрансплантации островковых клеток уровень кортизола повышался, достигая  $330,0 \pm 40,0$  нмоль/л ( $P < 0,05$ ). Ко второму месяцу после операции наступало его постепенное снижение до  $280,0 \pm 25,0$  нмоль/л и к 6 месяцу уровень кортизола стабилизировался на уровне  $260,0 \pm 30,0$  нмоль/л ( $P < 0,05$  по сравнению с дооперационным), который сохранялся на протяжении всего периода наблюдения. Параллельно нарастанию уровня кортизола наблюдалось и значительное повышение уровня сывороточного С-пептида, составившего к 14 дню после операции  $89,0 \pm 5,2$  ед (до операции  $2,9 \pm 1,4$  ед;  $P < 0,05$ ). Аналогично динамике кортизола к 3 месяцу после операции уровень С-пептида снижался и к 6 месяцу составлял  $33,0 \pm 2,1$  ед, оставаясь стабильным на уровне  $29,3 \pm 2,7$  ед ( $P < 0,01$  по сравнению с дооперационным показателем) на протяжении 2 лет после трансплантации.

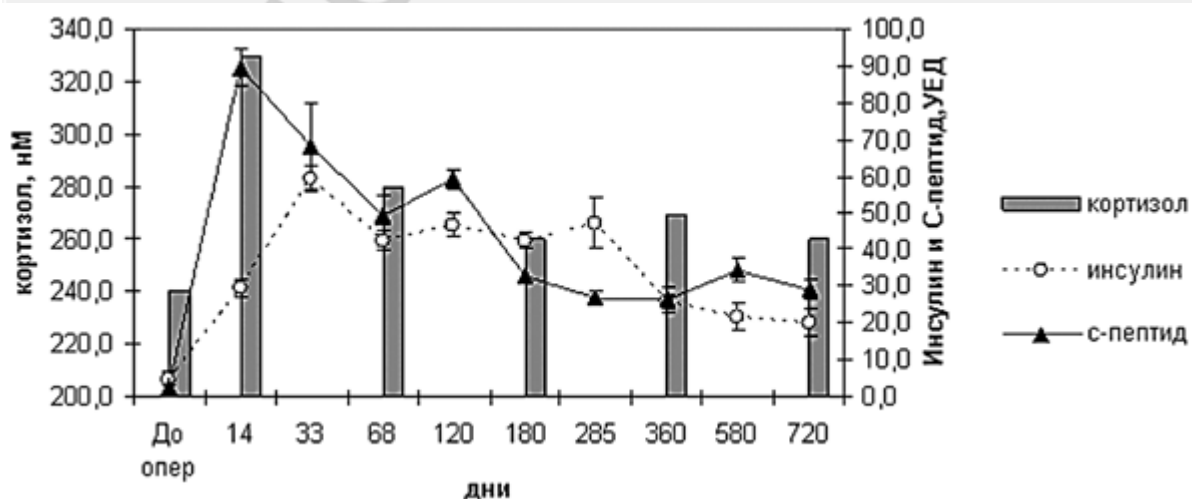


Рис. 1. Изменения уровня сывороточного С-пептида (ед), ИРИ (мкед/л) и кортизола (нМ) у реципиентов сахарным диабетом I типа (n=9) после ксенотрансплантации островковых клеток

Аналогичная динамика отмечена при определении ИРИ. Исследования в посттрансплантационном периоде свидетельствовали о значительном повышении ИРИ через месяц после операции (до операции -  $4,87 \pm 1,87$  мкед/мл; после -  $29,5 \pm 2,39$  мкед/мл;  $P < 0,01$ ), постепенно снижаясь к 6 месяцу и оставаясь стабильным на уровне  $20,0 \pm 3,74$  мкед/мл на протяжении всего периода наблюдения и достоверно выше дооперационного ( $P < 0,01$ ).

Статистическая обработка уровней кортизола и сывороточного 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.

#### Обсуждение

Как показали исследования, в первые 2 недели посттрансплантационного периода наблюдалось максимальное повышение показателей кортизола, сывороточного С-пептида и ИРИ. Прямая корреляционная зависимость между этими показателями свидетельствует о включении контррегуляторных механизмов со стороны симпато-адреналовой системы в ответ на повышение секреции эндогенного инсулина трансплантированными клетками. На данный период, так называемый период адаптации, выпадают и значительные колебания гликемии, скорее всего, связанные с длительным нарушением контррегуляции в результате нарушения эндогенной секреции инсулина собственными  $\beta$ -клетками островков Лангерганса у больных СД I типа. Продолжительность данного периода составляла в среднем 2-3 месяца. Постепенная стабилизация функции пересаженных островков, после периода их адаптации к новым условиям функционирования, приводит и к стабильной ответной реакции контринсулярных гормонов, что и подтверждается прямой корреляционной зависимостью уровня С-пептида, ИРИ и кортизола. Восстановление «обратной связи» к 3 месяцу после операции прямо коррелировало с улучшением клинического течения диабета, что проявлялось снижением инсулинпотребности, исчезновением гипогликемических состояний, нормализацией или тенденцией к нормализации массы тела реципиентов, улучшением качества жизни.

Наши результаты согласуются с данными Meyer S. et al.[9], которые показали восстановление ответной реакции адреналина и кортизола с предупреждением клинических проявлений гипогликемии после аллотрансплантации островковых клеток. В то же время, по данным Paty V.W. et al. [10], у реципиентов с длительным течением СД I типа, после интрапортальной аллотрансплантации островковых клеток, несмотря на обеспечение относительно длительной инсулиннезависимости, не восстанавливались гипогликемическая гормональная контррегуляция и симптомы «узнавания» гипогликемии. 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 (?-клетки, ?-клетки, ?-клетки, pp-клетки), которые прослеживаются в островках Лангерганса поджелудочной железы. По данным Gupta V. et al. [13] при интрабрюшинной аллотрансплантации островковых клеток наблюдался достоверный ответ глюкагона при развитии гипогликемии. При таком способе трансплантации возможно локальное формирование островковоподобной структуры клеток. Еще в большей степени межклеточная организация происходит при макроинкапсуляции, позволяющая создать биоискусственную гормонпродуцирующую ткань.

Следует также учитывать тот факт, что применяемый в большинстве трансплантационных центров Северной Америки и Западной Европы Эдмонтонский протокол свободной аллотрансплантации островковых клеток [14], 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. Поэтому полноценную оценку эффективности свободной островковой трансплантации в восстановлении контррегуляторных механизмов можно дать только при условии исключения использования иммуносупрессивных препаратов.

#### Заключение

Анализ проведенных исследований показал, что ксеногенная трансплантация островковых клеток способствует восстановлению адекватной реакции симпатoadреналовой системы на эндогенную секрецию инсулина ксенотрансплантатом. В этом, скорее всего, и лежит объяснение стабилизации течения диабета, исчезновение гипогликемических состояний, возможность стабильного поддержания нормогликемии на фоне коррегирующей экзогенной инсулинотерапии у реципиентов с СД I типа.

#### Литература

1. Kovarik J., Mandel T.E. Islet transplantation // *Transpl.Proc.* 1999, 31:45-48.
2. Liu Eric H., Herold Kevan C. Transplantation of the isles of Langerhans: New hope for treatment of type 1 diabetes mellitus // *ТЕМ* 2000,9:379-382.
3. Трансплантология. Руководство. Под ред. акад. В.И.Шумакова.- М.: «Медицина», 1995; Тула: «Репроникс Лтд.», 1995.- 391 с.
4. The DCCT Research Group: The effect of intensive treatment of diabetes on the development and progression of long-term complications in insulin-dependent diabetes mellitus // *N.Engl.J.Med.* 1993,329:977-986.
5. Физиология эндокринной системы. Л., «Наука», 1979. - 680 с.
6. Bolinder J., Wahrenberg H., Linde B. et al. Improved glucose counterregulation after pancreas transplantation in diabetic patients with unawareness of hypoglycemia // *Transplant.Proc.* 1991,23:1667-1669.
7. Diem P., Redmon J.B., Abid M.M. et al. Glucagon, catecholamine and pancreatic polypeptide secretion in type I diabetic recipients of pancreas allografts // *J.Clin.Invest.* 1990,86:2008-2013.

8. Kendall D.M., Teuscher A.U., Robertson R.P. Defective glucagons secretion during sustained hypoglycemia following successful islet allo- and autotransplantation in humans // *Diabetes* 1997,46:23-27.
9. Meyer C., Hering B.J., Grossmann R. et al. Improved glucose counterregulation and autonomic symptoms after intraportal islet transplants alone in patients with long-standing type I diabetes mellitus // *Transplantation* 1998,66:233-240.
10. Paty B.W., Ryan E.A., Shapiro A.M.J. et al. Intrahepatic islet transplantation in type I diabetic patients does not restore hypoglycemic hormonal counterregulation or symptom recognition after insulin independence // *Diabetes* 2002,51:3428-3434.
11. Прохоров А.В., Третьяк С.И., Романович В.П., Горанов В.А. Способ хирургического лечения сахарного диабета. Заявка на изобретение, № а 20030091 с приоритетом 05.02.2003.
12. Korsgren O., Sandler S., Landstrom A.S. et al. Large-scale production of fetal porcine pancreatic isletlike cell clusters. An experimental tool for studies of islet cell differentiation and xenotransplantation // *Transplantation*.1988,45(30):509-514.
13. Gupta V., Wahoff D.C., Rooney D.P. et al. The defective glucagons response from transplanted intrahepatic pancreatic islets during hypoglycemia is transplantation site-determined // *Diabetes* 1997,46:28-33.
14. Shapiro A.M., Lakey J.R., Rajotte R.V. et al. Islet transplantation in seven patients with type 1 diabetes mellitus using a glucocorticoid-free immunosuppressive regimen // *N.Engl.J.Med.* 2000,343, 230-238