

*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**

Исследование выполнено с целью изучения иммунологического ответа реципиентов на ксенотрансплантацию островковых клеток поджелудочной железы. Анализ проведен у 11 пациентов с инсулинзависимым сахарным диабетом, которым произведена внутрисосудистая пересадка ксеногенных островковых клеток поджелудочной железы плодов и эмбрионов кроликов без использования иммуносупрессивной терапии. Во всех наблюдениях не получено достоверных изменений антигенов лимфоцитов и показателя цитотоксических иммунных комплексов как до, так и после трансплантации, что свидетельствует об отсутствии ответной иммунной реакции на трансплантацию в сосудистое русло при условии иммуноизоляции островковых клеток.

Ключевые слова: инсулинзависимый сахарный диабет, ксенотрансплантация, культура островковых клеток.

Prokhorov A.V., Tretyak S.I., Goranov V.A., Rudenok V.V., Glinnik A.A., Petrakova O.N., Gleb S.P., Zinkevich E.A., Koverko S.V.

## **IMPACT OF INTRAVASCULAR XENOTRANSPLANTATION OF PANCREATIC ISLET CELLS ON SOME IMMUNOLOGIC CHARACTERISTICS**

The investigation was carried out to study immunologic response of recipients to xenotransplantation of pancreatic islet cells. 11 patients with insulin-dependent diabetes mellitus who received intravascular xenotransplantation of pancreatic islet cells of fetuses and rabbit embryos without the use of immunosuppressive therapy were examined. In all cases no significant changes in lymphocyte antigens and cytotoxic immune complexes index were found both before and after the transplantation which accounts for the absence of an immune response to intravascular transplantation on condition of islet cells immunoisolation.

Key words: Insulin-dependent diabetes mellitus, xenotransplantation, islet cell culture

В настоящее время создание биоискусственного источника инсулинпродуцирующей ткани представляется наиболее оптимальным подходом в лечении больных с ИЗСД. Однако, несмотря на экспериментальные и клинические исследования, результаты алло-и ксеногенных трансплантаций бета-клеток оказались не вполне удовлетворительными. Основным препятствием на пути успешной трансплантации остается деструкция

островковых клеток трансплантата в организме реципиента из-за реакции отторжения и рецидива аутоиммунитета [2,5,9,11,14].

Наиболее оптимальным источником инсулинпродуцирующей ткани является поджелудочная железа плодов человека или взрослых доноров. Однако, дефицит донорского материала, ряд социальных и культурных проблем не позволяют широко использовать этот источник островковых клеток в трансплантации. Поэтому использование ксеногенных источников beta-клеток и, в частности, свиней и кроликов, представляется весьма актуальным [3,9,11]. Тем более известно, что на протяжении многих десятилетий свиной инсулин являлся основным препаратом в терапии больных ИЗСД.

При трансплантации культуры островковых клеток, без использования специальных методов иммуносупрессии, развиваются реакции отторжения. Как показали экспериментальные исследования, при ксенотрансплантации формируются реакции отторжения ксенотрансплантата, которые могут включать фазы острого и хронического отторжения. Острая реакция обусловлена взаимодействием с трансплантатом присутствующих у человека натуральных антител к углеводному эпитопу Galbeta1-3Gal, который присутствует в тканях большинства животных, но отсутствует у человека. Связывание антител активирует систему комплемента, что и приводит к разрушению трансплантата в течение нескольких часов. В случае, если не произошла острая деструкция клеток трансплантата, включаются типичные механизмы иммунного отторжения, реализующиеся через цитотоксические Т-лимфоциты и цитокины [2,6,9,11].

До настоящего времени, основным методом предотвращения реакции отторжения является иммуносупрессивная терапия, обладающая выраженным гепато- и нефротоксическим эффектами и оказывающая негативное влияние на течение сахарного диабета и иммунный статус реципиентов. Кроме того, современные иммуносупрессивные протоколы не могут предотвратить острое отторжение, связанное с ксенотрансплантацией.

Одним из перспективных направлений в преодолении иммунной защиты реципиента является иммуноизоляция островковых клеток. Использование иммуноизолирующих покрытий и, в частности, альгинат-полилизинных или агарозных мембран, в большинстве случаев, не позволяет избежать снижения трофики островковых клеток и их деструкции за счёт фиброобразования [5].

Ранее, в экспериментальных исследованиях, мы показали возможность длительного сохранения ксеногенной островковой ткани поджелудочной железы в организме реципиента, помещенной в полиамидную микропористую капсулу с высоким уровнем биосовместимости и, имплантированную в сосудистое русло, как иммунологически привилегированную зону. Наш подход позволил создать адекватные условия для питания beta-клеток и предупредить повреждающее действие на них клеток иммунной системы реципиента [13].

Согласно литературным данным клинический опыт ксенотрансплантаций ограничен стандартными методами пересадки (свободная брюшная полость, прямая мышца живота и т.д.) без использования методов иммуноизоляции [3]. Аналогов экспериментального и клинического применения интрасосудистой островковой трансплантации в литературе мы не встретили. Исходя из этого,

целью нашего исследования явилось клиническое изучение иммунного ответа реципиентов с ИЗСД на ксенотрансплантацию иммуноизолированных островковых клеток поджелудочной железы, имплантированных в сосудистое русло.

#### МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В течение 2001-2003 г.г., в клинических условиях, 11 пациентам с лабильным течением ИЗСД, инсулинпотребностью 56-62 Ед/сут, частыми гипо- и гипергликемическими состояниями и прогрессирующими вторичными осложнениями диабета (различная степень ретинопатии, нефропатии, ангиопатии) была выполнена ксеногенная трансплантация островковых клеток поджелудочной железы плодов и эмбрионов кроликов в сосудистое русло (1-аорта, 10-глубокая артерия бедра) без использования иммуносупрессивной терапии. Согласно данным клинико-лабораторного наблюдения (более двух лет с момента операции) у всех реципиентов отмечались достоверные признаки функционирования трансплантата - снижение потребности в экзогенном инсулине на 25-65%, купирование гипо- и гипергликемических состояний, повышение уровня С-пептида, иммунореактивного инсулина, снижение уровней фруктозамина и гликолизированного гемоглобина.

Для оценки иммунологического ответа реципиентов на ксеногенную трансплантацию и эффективности иммуноизоляции пересаженных клеток, были исследованы свежевыделенные лимфоциты. 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 объём доводили до 200мкл.

Анализ суспензии осуществляли методом проточной цитофлюориметрии на аппарате FACS Vantage. Возбуждение флюоресценции осуществляли аргоновым лазером (488/80мВт). Гейтирование пула beta-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.

Содержание цитотоксических иммунных комплексов (ЦИК) в сыворотке крови было изучено с помощью стандартной методики [4].

#### РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Основное прогностическое значение в развитии иммунологической агрессии против островковых клеток имеют 2 субкласса лимфоцитов: CD3 и CD4 [1,6,7,12,15]. Процессирование и представление чужеродных специфических антигенов к распознаванию Т-хелперами (CD4), антиген-индуцированная активация которых является одним из важнейших условий развития направленной иммунной реакции, реализуется макрофагами. Активация, размножение и созревание Т-хелперных лимфоцитов также сопровождается продукцией многочисленных иммуоцитоккинов, необходимых для поддержки

аналогичных процессов в популяциях иммуноцитов, реализующих эффекторные процессы иммунных реакций и непосредственный лизирующий эффект на beta-клетки. При этом триггерные функции берут на себя ряд молекул, на которых происходит конвергенция путей развития иммунного ответа на трансплантат [6,12] – активационный лимфоцитарный маркер – CD25, а также показатель, характеризующий содержание супрессорных Т-лимфоцитов CD8 [16]. Помимо этого, уничтожение клетки-«мишени» может осуществляться путем «запуска» в ней механизмов апоптоза - «программированной клеточной гибели», путем воздействия экспрессированных на Т-лимфоцитах лигандов (Fas-L) на рецептор инициации названного процесса (CD 95) - в случае экспрессии последнего клеткой-«мишенью» [1,8,10,16].

В таблице 1 отражены результаты исследования экспрессии до и после трансплантации следующих антигенов лимфоцитов: CD 3, CD 4, CD 8, CD 25, CD 95. В качестве дополнительного параметра, характеризующего уровень накопления специфических антител, был использован показатель содержания цитотоксических иммунных комплексов (ЦИК).

Таблица 1. Показатели экспрессии рецепторных маркеров лимфоцитов у реципиентов (n=11) с интрасосудистой трансплантацией островковых клеток.

Лимфоциты (субпопуляции)	n	До операции M ± m	После операции M ± m	p<
CD3	11	41,68 ± 3,77	41,76 ± 4,19	-
CD4	11	49,47 ± 3,1	47,51 ± 3,2	-
CD8	11	16,53 ± 1,75	18,46 ± 2,32	-
CD25	11	23,0 ± 1,91	21,5 ± 2,42	-
CD95	11	9,11 ± 1,67	11,24 ± 1,52	-
ЦИК	11	26,6 ± 10,24	22,90 ± 10,18	-

p< – достоверность различий с показателями, полученными до операции

В случае трансплантации неинкапсулированных островковых клеток, наблюдается увеличение доли CD3 лимфоцитов. Большая часть Т-лимфоцитов активируется и экспрессирует CD4-рецептор (Т-хелперы) [6,12,15,16], а на beta-клетках селективно экспрессируются антигены системы гистосовместимости II класса, необходимые для распознавания CD4 + Т-лимфоцитами [6,9]. 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 свидетельствует в пользу отсутствия активации Т-клеточного звена иммунной системы.

Не было зарегистрировано и увеличения количества активированных лимфоцитов (CD25). До операции этот показатель составлял 23±1,9%, после – 21,5±2,4%. Это подтверждает благоприятный прогноз проведенных трансплантаций, хотя было показано [12], что CD25-лимфоциты больных ИЗСД способны адгезироваться к beta-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 мы также не отметили достоверного изменения уровня CD8-лимфоцитов ( $16,5 \pm 1,75\%$  - до операции и  $18,46 \pm 2,3\%$  - после), что также свидетельствует о стабильности иммунологических параметров.

Косвенным подтверждением появления и активации аутореактивных лимфоцитов среди реципиентов, является характерная для них сниженная способность лимфоцитов к апоптозу [1]. Данное состояние может проявляться уменьшенным количеством клеток CD95 +, что наблюдается у пациентов с ИЗСД [1,10]. 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 цитотоксических иммунных комплексов в крови пациентов после трансплантации.

Еще одним подтверждением отсутствия реакции отторжения на пересаженный трансплантат в токе крови явились и результаты экспериментальных морфологических исследований комплекса «аорта-капсула с островковыми клетками», выполненные в различные сроки наблюдения (от 1 месяца до 1 года). Во всех препаратах отсутствовала лимфоцитарно-макрофагальная инфильтрация при сохранении пула пересаженных ксеногенных островковых клеток в просвете капсулы.

В то же время, ни у одного из пациентов мы не смогли достичь полной инсулиннезависимости. Морфологические исследования показали, что после трансплантации капсула покрывается тонким слоем фибрина, как реакция на чужеродную ткань и, в течение 10-12 дней слой фибрина трансформируется в молодую соединительную ткань. В этот же период наблюдается и прорастание фибробластов и неоангиогенез в просвете капсулы. Поэтому, одним из предположений, возможно объясняющих не полную эффективность трансплантации, является гибель определенной части клеток в раннем посттрансплантационном периоде из-за недостаточной васкуляризации и трофики трансплантата. Наши данные согласуются и с результатами зарубежных исследователей, считающих, что отсутствие хорошей васкуляризации трансплантата в раннем посттрансплантационном периоде является основной причиной гибели островковых клеток при условии их иммуноизоляции или иммуносупрессии [5].

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Результаты наших клинических исследований свидетельствуют, что ксенотрансплантация островковых клеток поджелудочной железы является реальной альтернативой аллотрансплантации в лечении больных с ИЗСД. Полученные нами клинические данные подтверждают результаты экспериментальных исследований о возможности успешной трансплантации островковых клеток в сосудистое русло. Макроинкапсуляция beta-клеток, как метод иммуноизоляции с имплантацией трансплантата в сосудистое русло, позволяет без иммуносупрессивной терапии преодолеть иммунологический барьер, реакции острого и хронического отторжения, являющихся главной

причиной неудач клеточной трансплантации. Как иммунологически привилегированная зона, сосудистое русло является наиболее привлекательным «местообитанием» трансплантата.

Анализ результатов проведенных нами исследований не выявил достоверных изменений иммунологических показателей до и после трансплантации, что свидетельствует об отсутствии иммунного ответа на пересаженный комплекс «капсула – островковые клетки». Это особенно актуально, учитывая тот факт, что островковые клетки были пересажены в организм пациентов с ИЗСД, то есть потенциально обладающих предрасположенностью к развитию иммуно-деструктивных реакций в отношении beta-клеток.

#### Литература

1. Горанов В.А., Дударенко О.И., Жабинская О.Б. и др. Уровни некоторых рецепторных маркеров лимфоцитов при инсулинзависимом сахарном диабете. // Инфекция и иммунитет: Материалы науч.- практической конф. посв. 75-летию института БелНИИЭМ, Минск, 9 - 10 дек. 1999г. / МЗ РБ. БелНИИЭМ.- Минск, 1999. - С. 550 - 553.
2. Ройт У. Основы иммунологии М.:Мир. 1991. 328с.
3. Скалецкий Н.Н., Гончарова Т.Н., Засорина Л.В. и др. Ксенотрансплантация культур островковых клеток на пути достижения длительной инсулиннезависимости у больных сахарным диабетом I типа // Вестник трансплантологии и искусственных органов – 2002. №3, с.85-86.
4. De Vos P., Hamel A. F., Tatarkiewicz K. Considerations for successful transplantation of encapsulated pancreatic islets // Diabetologia 2002, Vol. 45, Issue 2, S. 159-173
5. Endocrinology and metabolism. New-York, McGraw-Hill International Book Company./ Ed.by Felig Ph.,Baxter J.D., Broadus A.E. 1982. 578
6. Friedman T., Smith R.N., Colvin R.B., Iacomini J. A critical role for human CD4+ T-cells in rejection of porcine islet cell xenografts // Diabetes 1999. Vol 48, Issue 12, 2340-2348
7. Giordano C., De-Maria R., Todaro M. et al. Study of T-cell activation in type I diabetic patients and pre-type I diabetic subjects by cytometric analysis: antigen expression defect in vitro. // J.Clin.Immunol. 1993. Vol. 13(1).P. 68-78.
8. Hsu P.N., Lin H.H., Tu C.F. et al. Expression of human Fas ligand on mouse beta islet cells does not induce insulinitis but is insufficient to confer immune privilege for islet grafts. // J. Biomed. Sci. 2001, 8(3):262-9.
9. Kovarik J., Mandel T.E. Islet Transplantation // Transpl. Proc., 1999, №31 (Suppl 1/2A), 45-48.
10. Krook H., Hagberg A., Song Z. et al. A distinct Th1 immune response precedes the described Th2 response in islet xenograft rejection.// Diabetes 2002, 51(1):79-86.
11. Platt J.L., Lin S.S. The Future Promises of Xenotransplantation // Ann. N Y Acad. Sci. – 1998, 862: 5-18.
12. Szanya V., Ermann J., Taylor C., Holness C., Fathman C.G. The subpopulation of CD4+CD25+ splenocytes that delays adoptive transfer of diabetes expresses L-selectin and high levels of CCR7.// J. Immunol. 2002,169(5):2461-5.

13. Tretsyak S.I., Prohorov A.V., Goranov V.A., Mokhort T.V. The use of polyamide for macroencapsules for beta-cells transplantation. 22th EASD-congress. Hungary. Budapest. 17-23 september. 2002. A.420.
14. Tyden G., Reinholt F.P., Sundkvist G., Bolinder J. Recurrence of Autoimmune Diabetes Mellitus in Recipients of Cadaveric Pancreatic Grafts // N. Engl. J. Med. 1996, N12; Vol. 335:860-863.
15. Yi S, Feng X., Hawthorne W.J., Patel A.T. et al. CD4+ T cells initiate pancreatic islet xenograft rejection via an interferon-gamma-dependent recruitment of macrophages and natural killer cells. //Transplantation 2002,73(3):437-46.
16. Zhan Y., Brady J.L., Sutherland R.M., Lew A.M. Without CD4 help, CD8 rejection of pig xenografts requires CD28 costimulation but not perforin killing.// J. Immunol. 2001, 167(11):6279-85.