МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ

ГОСУДАРСТВЕННОЕ ВЫСШЕЕ УЧЕБНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ

«ГРОДНЕНСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ МЕДИЦИНСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ»

УДК616.379-008.64-089:615.015.154

ЛЫЗИКОВ
Алексей Анатольевич

ПРОЛОНГИРОВАННАЯ ИММУНОСУПРЕССИЯ ПРИ ХИРУРГИЧЕСКОМ ЛЕЧЕНИИ САХАРНОГО ДИАБЕТА

(экспериментальное исследование)

14.00.27 - хирургия

АВТОРЕФЕРАТ
диссертации на соискание ученой степени
кандидата медицинских наук

Гродно, 2001

Работа выполнена в государственном высшем учебном учреждении «Гомельский государственный медицинский институт» и государственном высшем учебном учреждении «Витебский государственный медицинский университет».

Научный руководитель:
Доктор медицинских наук, профессор ***Аничкин В.В.,*** *профессор кафедры хирургических болезней №3 ГГМИ.*
Научный консультант:
Доктор медицинских наук ***Панько СВ.,*** *начальник областного УЗО Брестского облисполкома.*

Официальные оппоненты:
Доктор медицинских наук, профессор ***Гарелик П.В****., ректор ГГМУ, зав. кафедрой общей хирургии.*
Доктор медицинских наук, профессор ***Третьяк*** *С.И., зав. кафедрой хирургических болезней №2 БГМУ.*

Оппонирующая организация: Государственное высшее учебное учреждение «Белорусская медицинская академия последипломного образования».

Защита состоится « ____ »_____ 2002 года в часов на заседании совета по защите диссертаций Д 03.17.01. ГВУУ «Гродненский государственный медицинский университет» (230015, г. Гродно, ул Горького, 80. тел. (0152) 332661, (0152)63718).

С диссертацией можно ознакомиться з библиотеке ГВУУ «Гродненский государственный медицинский университет».

Автореферат разослан « ____ » _____2001 года

Ученый секретарь специализированного Совета, доктор медицинских наук, профессор
О. И. Дубровщик

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность проблемы. В настоящее время существующие традиционные методы (инсулинотерапия, диетотерапия, применение пероральных гипогликемизирующих препаратов) лечения больных сахарным диабетом не являются полностью эффективными [Гришин И.Н., Чур Н.Н., Балаболкин М.И., 2000], что побуждает к поиску новых, альтернативных методов лечения, в частности, хирургических, [Шумаков В.И., Блюмкин В.Н., Скалецкий Н.И. и др., 1994, Мартов Ю.Б., Подолинский С.Г., 1996], которые включают:

Органную аллотрансплантацию целой донорской поджелудочной железы или её сегмента с немедленным восстановлением кровотока в трансплантате.

Свободную трансплантацию островковых клеток поджелудочной железы аллогенного или ксеногенного донора в различные органы и ткани реципиента-больного сахарным диабетом.

При органной аллотрансплантации поджелудочной железы и при свободной трансплантации островковых клеток представляется возможным создание в организме больного функционирующего, физиологически адекватного механизма обратной связи, который позволит обеспечить как стабильную ремиссию, так и затормозить наступление и прогрессирование поздних осложнений сахарного диабета.

Органная аллотрансплантация поджелудочной железы больным сахарным диабетом и в настоящее время остается сопряженным с высоким риском послеоперационных осложнений и сомнительным отдаленным прогнозом вмешательством. Поэтому свободная трансплантация островковых клеток представляется оптимальным методом лечения сахарного диабета, так как этиопатогенетическая целесообразность данного метода успешно сочетается с простотой и безопасностью.

Тем не менее, при ксенотрансплантации островковых клеток возникают сложности, связанные с их приживлением [Шотт А.В., Леонтюк А.С, Третьяк СИ., Абуховский А.А., 1992], и, следовательно, с последующим функционированием [Шумаков В.И., Блюмкин В.Н., Скалецкий Н.Н., Игнатенко С.Н., Шальнев Б.И., Галибин О.В. 1994]. Одна из проблем связана с большим количеством побочных эффектов применяемых иммуносупрессантов.

Таким образом, экспериментальная разработка нового хирургического метода лечения сахарного диабета, заключающегося в ксенотрансплантации островковых клеток ксеногенной поджелудочной железы с последующей пролонгированной иммуносупрессией депо-лекарственными формами циклоспорина А приобретает особую актуальность.

Связь работы с крупными научными темами. Работа выполнялась по теме НИР «Разработать и внедрить методы оптимизации ведения больных

сахарным диабетом: диагностика поражений печени и почек, оценка эффективности-обучения, самоконтроля и лечения» в рамках Государственной программы «Неинфекционные заболевания» (№ гос. регистрации в ЦГР НИОКР 20002318).

Цель исследования. Разработка нового направления хирургического лечения сахарного диабета, заключающегося в трансплантации островковых клеток ксеногенной поджелудочной железы с последующей пролонгированной иммуносупрессией депо-лекарственными формами циклоспорина А.

Для реализации цели были поставлены следующие ***задачи:***

1. Провести сравнительный анализ выживаемости экспериментальных животных с токсическим аллоксановым сахарным диабетом при ксеногенной трансплантации островковых клеток поджелудочной железы в зависимости от вида вводимых лекарственных форм иммуносупрессантов.
2. Определить способность вызывать ремиссию, её длительность и характер при различных способах хирургического лечения аллоксанового и аутоиммунного сахарного диабета.
3. В эксперименте на крысах с аутоиммунным и аллоксановым сахарным диабетом изучить динамику морфологических изменений внутренних органов и трансплантированных ксеногенных островковых клеток.
4. На основании полученных данных разработать в эксперименте оптимальный метод пролонгированной иммуносупрессии при хирургическом лечении сахарного диабета.

Объект и предмет исследования. Для реализации цели и решения поставленных задач выполнены эксперименты на 746 беспородных белых крысах массой 170-200 г. и 50 новорожденных поросятах в качестве доноров поджелудочной железы. Использовали экспериментальные модели аллоксанового и аутоиммунного сахарного диабета 1 типа. Для объективной сравнительной оценки токсичности коммерческой и микрокапсулированной форм использовали исключающую иммунные взаимодействия модель токсического сахарного диабета 1 типа - аллоксановую. Основной являлась экспериментальная модель аутоиммунного сахарного диабета 1 типа, как наиболее патогенетически сходная с сахарным диабетом 1 типа у человека.

Гипотеза. Предполагалось определить перспективы улучшения результатов лечения больных сахарным диабетом путем создания нового метода хирургического лечения сахарного диабета, заключающегося в трансплантации островковых клеток ксеногенной поджелудочной железы с последующей пролонгированной иммуносупрессией депо-лекарственными формами циклоспорина А.

Методология и методы проведенного исследования. Для решения поставленных задач проведены экспериментальные исследования с

субпариетальной трансплантацией ксеногенных островковых клеток поджелудочной железы крысам в сочетании с коммерческим циклоспорином А и разработанным нами микрокапсулированным комплексом «ксеногенные островковые клетки + иммуносупрессант». При этом использованы биохимические, иммунологические, морфологические, морфометрические, хирургические, фармакологические и статистические методы.

Научная новизна полученных результатов.

- создание экспериментальной модели аутоиммунного инсулинзависимого сахарного диабета
- создание нового, патогенетически обоснованного способа лечения инсулиизависимого сахарного диабета,
- впервые применен нами микрокапсулированный комплекс «ксеногенные островковые клетки + циклоспорин А».

Практическая значимость полученных результатов. Полученные результаты могут использоваться в области эндокринологии, хирургии, трансплантологии.

- В научно-исследовательских работах, посвященных исследованию сахарного диабета,
- полученные результаты позволяют улучшить результаты лечения и прогноз при лечении данного заболевания по сравнению с другими методами;
- получена инструкция на метод МЗ РБ №63-0301 от 27.03.01. «Трансплантация культуры островковых клеток поджелудочной железы в комплексном лечении сахарного диабета и профилактике осложнений диабетической ангиопатии»;
- по материалам работы получен патент РБ №4157 от 30.12.2001 и приоритетная справка №а 19980562 от 11.06.98 г.,
- обосновано применение нового способа пролонгированной иммуносупрессии при хирургическом лечении сахарного диабета;
- применение нового способа пролонгированной иммуносупрессии позволяет увеличить эффективность хирургического лечения сахарного диабета;
- применение нового способа пролонгированной иммуносупрессии при хирургическом лечении сахарного диабета позволяет снизить затраты на лечение сахарного диабета в 1,6 раза;
- В педагогическом процессе при чтении лекций студентам и врачам;
- В практике хирургических и эндокринологических стационаров.

Основные положения диссертации, выносимые на защиту.

Токсические побочные эффекты микрокапсулированного комплекса «ксеногенные островковые клетки + циклоспорин А» значительно ниже, чем токсичность коммерческого циклоспорина А, несмотря на большую дозу.

2. Гипогликемический эффект применения микрокапсулированного комплекса «ксеногенные островковые клетки + циклоспорин А» при ксенотрансплантации островковых клеток поджелудочной железы существенно выше солитарной ксенотрансплантации островковых клеток поджелудочной железы или ксенотрансплантации островковых клеток поджелудочной железы в сочетании с коммерческим циклоспорином А.
3. Применение микрокапсулированного комплекса «ксеногенные островковые клетки + циклоспорин А» при ксенотрансплантации островковых клеток поджелудочной железы значительно уменьшает тяжесть поражения внутренних органов при инсулинзависимом сахарном диабете и улучшает прогноз в отношении осложнений данного заболевания.
4. Применение микрокапсулированного комплекса «ксеногенные островковые клетки + циклоспорин А» при ксенотрансплантации островковых клеток поджелудочной железы снижает выраженность трансплантационного иммунитета.

Личный вклад соискателя. Все разделы диссертации выполнены автором самостоятельно на базе Центральной научно-исследовательской лаборатории Витебского медицинского университета, Центральной научно-исследовательской лаборатории Гомельского государственного медицинского института, Республиканского липидного центра метаболической терапии, Витебского филиала научно-исследовательского клинического института радиационной медицины и эндокринологии.

Исследования проводились автором самостоятельно в Центральной научно-исследовательской лаборатории Витебского медицинского университета, Центральной научно-исследовательской лаборатории Гомельского государственного медицинского института, в лабораториях Республиканского липидного центра метаболической терапии, Витебского филиала научно-исследовательского клинического института радиационной медицины и эндокринологии, кафедры топографической анатомии и оперативной хирургии Витебского медицинского университета.

Автор самостоятельно выполнил весь экспериментальный раздел работы. операции на животных, получение пролонгированных форм циклоспорина А, провел оценку и интерпретацию полученных результатов.

При выполнении ряда фрагментов работы автору оказывали помощь врачи и сотрудники указанных учреждений.

Апробация результатов диссертации. Материалы диссертации были апробированы на следующих научных конференциях: 13-я иммунологическая встреча, Амстердам, Нидерланды, 1997; 4-й Международный Симпозиум по клинической иммунологии, Амстердам, Нидерланды, 1997. Декабрьские

чтения по неотложной хирургии, Минск, 1997, Международная медицинская конференция студентов и молодых докторов, Люблин, Польша, 1998; 1 итоговая научно-практическая конференция «Современные проблемы инфекционной патологии человека (эпидемиология, вирусология и иммунология)». г.Минск, 1998; 54-научная сессия Витебского государственного медицинского института. «Фундаментальные и прикладные вопросы медицины и фармации», Витебск, 1999; Конференция «Хирургия 2000», Москва, 2000; 5-я итоговая встреча Европейского Общества Хирургов, Лювен, Бельгия, 2001.

Опубликованность результатов. По материалам исследований опубликовано 18 научных работ с общим количеством страниц 37, из них: 4 статей, из них 3 статьи в рецензируемых журналах и сборниках, 11 тезисов докладов, из них 8- в зарубежных источниках; получены 1 патент, 1 инструкция на метод.

Структура и объем диссертации. Диссертационная работа написана на русском языке, изложена на 104 страницах машинописного текста, иллюстрирована 30 рисунками, 4 таблицами. Диссертация состоит из введения, общей характеристики работы, обзора литературы, характеристики методов исследований, 2 глав собственных исследований, заключения и списков использованных источников. Библиографический указатель содержит 91 работу отечественных и 45 - зарубежных авторов.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Материалы и методы исследования. Экспериментальные исследования выполнены на 716 белых беспородных крысах и 30 новорожденных поросятах. Проведено 2 группы исследований. В 1-й группе на 406 крысах на модели экспериментального аллоксанового сахарного диабета была проведена оценка токсичности коммерческого циклоспорина А в дозе 10 мг/кг/введение в течение 10 суток и микрокапсулированного комплекса «ксеногенные островковые клетки + циклоспорин А» в дозе 100 мг/кг однократно.

Во 2-й группе на 270 животных на модели аутоиммунного сахарного диабета была проведена оценка эффективности трансплантации ксеногенных островковых клеток поджелудочной железы и микрокапсулированного комплекса «ксеногенные островковые клетки + циклоспорин А» в дозе 100 мг/кг однократно в сравнении с солитарной трансплантацией ксеногенных островковых клеток поджелудочной железы и ксенотрансплантацией островковых клеток поджелудочной железы в сочетании с ежедневным внутрибрюшинным введением коммерческого циклоспорина А в дозе 10 мг/кг/введение в течение 10 суток.

Для оценки токсичности применяемых лекарственных форм избрали

модель аллоксанового сахарного диабета, который, являясь токсическим, позволяет исключить влияние иммунных взаимодействий на результаты. Для оценки эффективности предлагаемого способа исследования избрали аутоиммунную модель сахарного диабета как наиболее патогенетически сходную с сахарным диабетом 1 типа у человека. Экспериментальную модель аллоксанового инсулинзависимого сахарного диабета воспроизводили по методике [Ефимов А.С, Гордиенко В.М., Ткачук Ю.В.,1981] однократным анутрибрюшинным введением стерильного 5% аллоксангидрата в дозе 170 мг/кг. Экспериментальную модель аутоиммунного инсулинзависимого сахарного диабета воспроизводили по разработанной нами методике на основании [Лигоненко О.В.,1997] трехкратным введением гомогенизированной смеси поджелудочных желез крыс, новорожденных поросят и адъюванта Фрейда в течение 15 суток.

У экспериментальных животных с аллоксановым инсулинзависимым сахарным диабетом проводили исследование сыворотки крови для определения уровня глюкозы, морфологические исследования поджелудочной железы, печени, селезенки и почек. Срезы окрашивали гематоксилин-эозином. Окраску препаратов поджелудочной железы производили альдегидфуксином после фиксации смесью Буэна [Граменицкий Е.М., 1963]. Препараты изучали, фотографировали под световым микроскопом. Проводили также морфометрию трансплантируемых микрофрагментов ксеногенной поджелудочной железы. У экспериментальных животных с аутоиммунным инсулинзависимым сахарным диабетом проводили все вышеуказанные методы исследования, а также определяли наличие Ig G к инсулину в сыворотке крови [Wilkin T.J.,1996].

Трансплантацию ксеногенных островковых клеток поджелудочной железы осуществляли пункционно при лапаротомии. Введение различных лекарственных форм циклоспорина А проводили внутрибрюшинно: пункционно и при лапаротомии.

Фотосъемку гистопрепаратов осуществляли при помощи цифровой фотокамеры "Olympus"- 2100.

Обработку полученного материала осуществляли на ПЭВМ Celeron - 333 и пакета программного обеспечения Microsoft Office 2000. Оценка статистической значимости показателей проведена с использованием t-теста Стьюдента. Различия считали достоверными при $p<0,05$ и высоко достоверными при $p<0,001$.

РЕЗУЛЬТАТЫ ПРОЛОНГИРОВАННОЙ ИММУНОСУПРЕССИИ ПРИ ХИРУРГИЧЕСКОМ ЛЕЧЕНИИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОГО АЛЛОКСАНОВОГО САХАРНОГО ДИАБЕТА 1 ТИПА

В качестве экспериментальной модели сахарного диабета был

ислользован аллоксановый диабет, индуцированный препаратом «Аллоксангидрат ч.» фирмы «Хемапол» (Chemapol, Praha, Чехия). Препарат был введен в форме водного раствора в дозе 170мг/кг внутрибрюшинно однократно струйно.

По нашим наблюдениям, диабет развивается у животных уже на вторые сутки после введения препарата. В каждой серии убедительная гипергликемия (более 20 ммоль/л) развивалась в среднем у 50% животных, из них на 3-4 сутки от введения препарата, как правило, погибало около 40% крыс от количества животных с высоким содержанием глюкозы в крови. Концентрация глюкозы крови у погибших животных составляла 34 и выше ммоль/л. 20% от общего количества животных имели пограничную гипергликемию (от 7 до 11 ммоль/л) и в 30% случаев уровень глюкозы оставался нормальным.

Динамика содержания глюкозы в крови экспериментальных животных. Лечение животных начинали на четвертые сутки после развития аллоксанового сахарного диабета. Критерием развития заболевания являлся подъем уровня глюкозы крови выше 11 ммоль/л.

Критерием прекращения функционирования трансплантата служил возврат гипергликемии.

На 4-е сутки с момента введения аллоксана вводили внутрибрюшинно: 1 группа - 58 животных - микрофрагменты ксеногенных островковых клеток поджелудочной железы и водный раствор коммерческого циклоспорина А, вводимый ежедневно в течение десяти суток в дозе 10 мг/кг - в общей дозе 100 мг/кг; 2 группа - 55 животных - микрофрагменты ксеногенных островковых клеток и микрокапсулы с циклоспорином А в дозе 100 мг/кг/введение - микрокапсулированный циклоспорин А вводили однократно; 3 группа - 53 животных - микрофрагменты ксеногенных островковых клеток; 4 группа - *контрольная* - вводили внутрибрюшинно изотонический раствор хлорида натрия.

У животных 1-й *группы* (рис.1) сразу после трансплантации была достигнута ремиссия, длившаяся 4,3±0,8 суток, однако уровень гликемии был крайне нестабильным 9,3±0,8 ммоль/л. С 7-х суток уровень глюкозы вырос до исходных значений 19,8±1,2 ммоль/л($p<0,01$), что свидетельствовало о прекращении функционирования трансплантата.

У животных *2-й группы* уровень гликемии снизился с 23,5 ± 1,3 ммоль/л до уровня 4,9 ± 0,2 ммоль/л на 4-е сутки. Продолжительность ремиссии составила 4,9±0,9 суток. Снижение уровня гликемии было стабильным. Уровень глюкозы в этот период был 6,3±0,2 ммоль/л. К восьмым суткам последовало резкое увеличение сахара крови до 15,2 ± 2,5 ммоль/л. Этот уровень сохранялся вплоть до вывода из эксперимента.

3-я группа: на четвертые сутки от начала эксперимента уровень глюкозы

сыворотки крови снизился до уровня 5,4 ± 0,3 ммоль/л и в течение 5,2±1,1 суток составлял 6,5±0,3 ммоль/л. Ремиссия носила стабильный характер. Затем наступил рецидив, длившийся вплоть до вывода из эксперимента/

Контрольная группа: Уровень гликемии оставался относительно стабильным с тенденцией к увеличению и находился в пределах от 22,7 ±1,1 ммоль/л до 25,8± 1,1 ммоль/л вплоть до гибели животных на 35,6 ± 1,4 сутки.

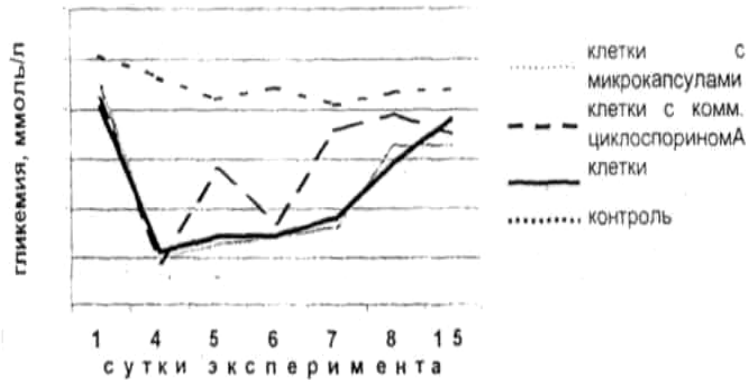

Рис.1. Динамика гликемии при различных способах лечения аллоксанового диабета.

Продолжительность жизни экспериментальных животных при различных способах лечения аллоксанового сахарного диабета.

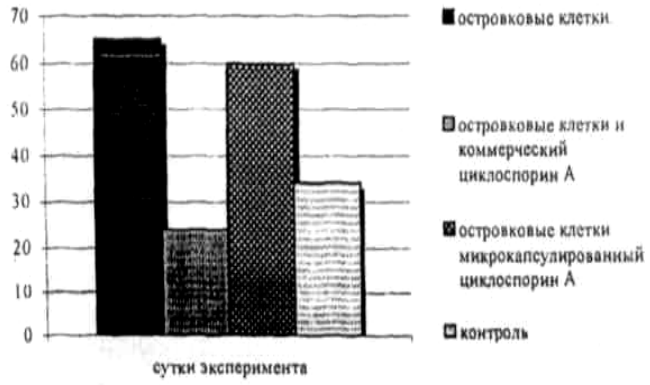

Рис.2. Летальность экспериментальных животных при различных способах лечения сахарного диабета.

.

Продолжительность жизни животных (рис.2.), получавших микрофрагменты ксеногенных островковых клеток в сочетании с

микрокапсулами с циклоспорином Л составляет 65,4 ± 3,1 суток практически не отличается от таковой у группы, которой вводили микрофрагменты ксеногенных островковых клеток поджелудочной железы (60,7 ± 2,3 суток) и почти в 2 раза больше, чем у группы, получавшей водный раствор коммерческого циклоспорина А в дозе 10 мг/кг/сутки (23,5 ± 1,3 суток).

Продолжительность жизни животных контрольной группы (с аллоксановым сахарным диабетом, не подвергавшимся лечению) составила 35,6 ± 1,2 суток.

Морфологические изменения органов и тканей при различных способах лечения аллоксанового сахарного диабета.

Морфологические изменения органов и тканей на третьи сутки эксперимента. *В передней брюшной стенке:* на третьи сутки в препаратах всех групп определяли отек и некоторое полнокровие сосудов

В поджелудочной железе: Отмечали выраженное полнокровие сосудов. Ацинусы сморщены, местами склерозированы. Определяются множественные зоны некроза ацинусов. Эпителий протоков с признаками гидропической дистрофии. Межуточная ткань отечна и резко инфильтрирована полинуклеарами. Островки Лангерганса единичны, резко уменьшены в размерах. Вокруг островков определяется разрастание соединительной ткани

В печени: на этом этапе изменения были умеренными в препаратах всех групп. В гепатоцитах выявляли признаки белковой зернистой и гидропической дистрофии. По периферии печеночных долек обнаруживали зоны микронекрозов

В почке: морфологические изменения также были выражены умеренно и сходны во всех группах. Корковое вещество: клубочки обычной формы, частично сморщены или отечны.• Размеры капсул Шумлянского-Боумена увеличены. Эпителий извитых канальцев на отдельных участках имеет некротические изменения или признаки белковой зернистой дистрофии. Прямые канальцы умеренно сужены, на отдельных участках определяются некробиотические изменения эпителия.

Морфологические изменения органов и тканей на седьмые сутки эксперимента. *В передней брюшной стенке:* Межуточная ткань диффузно инфильтрирована полинуклеарами. Ксеногенные островковые клетки не обнаруживаются. Обнаруживаются очаговые скопления полинуклеарных клеток, по-видимому, в местах, где располагались островковые клетки поджелудочной железы.

В поджлудочной железе: по сравнению с третьими сутками, характер поражения остался без изменений. Количество ацинусов снизилось еще больше, количество некротизированного эпителия возросло. Большинство островков Лангерганса замещено соединительной тканью. В клетках начали

проявляться признаки жировой дистрофии. Морфологическая картина характеризует тотальное необратимое поражение поджелудочной железы.

В печени: в препаратах *второй и третьей группы* определяли умеренное поражение печени: Структура печени изменена. Портальные факты с признаками полинуклеарной инфильтрации. Тракты расширены, в частности за счет разрастания соединительной ткани. Повсеместно визуализируется гидропическая дистрофия печени и микронекрозы.

В почке: В препаратах *первой группы* изменения были максимальны. Корковое вещество имело сильно измененную структуру. В клубочках отмечаются выраженные изменения. В эпителии извитых канальцев обнаруживаются признаки жировой дистрофии, гидропической дистрофии, некроза.

В препаратах почки *второй и третьей групп* изменения были более умеренными. Наблюдали выраженные изменения коркового слоя. В эпителии извитых канальцев определяли признаки белковой зернистой и гидропической дистрофии. Признаков жировой дистрофии не выявили, что свидетельствует об обратимом характере поражений.

РЕЗУЛЬТАТЫ ПРОЛОНГИРОВАННОЙ ИММУНОСУПРЕССИИ ПРИ ХИРУРГИЧЕСКОМ ЛЕЧЕНИИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОГО АУТОИММУННОГО САХАРНОГО ДИАБЕТА 1 ТИПА

Создание экспериментальной модели аутоиммунного сахарного диабета I типа. Для иммунизации использовали гомогенизированную смесь поджелудочных желез крыс, новорожденных поросят и адъюванта Фрейда.

Сахарный диабет индуцировали трехкратным введением в течение 15 суток вышеописанной взвесью подкожно. В месте введения смеси для иммунизации уже через один час после инъекции отмечали резкий цианоз, отек, что является клиническим проявлением феномена Артюса (некрозом ткани в месте введения аллергена).

Результаты теста с сахарной нагрузкой. На 13-е сутки с начала иммунизации был проведен тест с сахарной нагрузкой. Животным вводили per os при помощи зонда насыщенный раствор глюкозы, подогретый до 36°С. Уровень глюкозы сыворотки крови определяли за 1 час до и спустя 2, 5 и 8 часов после нагрузки. Забор крови осуществляли из ретроорбитального венозного сплетения. Исходный уровень концентрации глюкозы сыворотки крови у интактных животных и иммунизированных животных был равен и составлял 5,23 ± 0.25 ммоль/л и 5,76 ± 0,32 ммоль/л соответственно. Спустя 2 часа после нагрузки уровень гликемии контрольной группы составил 6,3 ± 0,31 ммоль/л. Гликемия у иммунизированных животных составила 10,2 ± 0,51 ммоль/л ($p<0,01$). Через 5 часов после нагрузки уровень глюкозы контрольной

группы нормализовался и составил 5,9 ± 0,29 ммоль/л. Гликемия у животных экспериментальной группы была высокой - 9,8 ± 0,46 ммоль/л.

Через 8 часов после нагрузки уровень глюкозы в обеих группах вернулся к исходному. На основании изменения теста с сахарной нагрузкой очевидно снижение толерантности к сахарной нагрузке, вызванное развитием патологического процесса в поджелудочной железе.

Результаты экспериментальной индукции аутоиммунного сахарного инсулинзависимого диабета следующие:

68,2% экспериментальной группы приобрели клинически достоверный сахарный диабет. Критерием явился уровень гликемии более 12 ммоль/л глюкозы сыворотки крови. Животных этой группы использовали в дальнейших экспериментах.

22,5% экспериментальной группы приобрели субклинический сахарный диабет, при котором, несмотря на нормальные значения гликемии (4-5,5 ммоль/л), толерантность к сахарной нагрузке оказалась снижена.

19,3% экспериментальной группы остались клинически здоровыми.

Результаты заболеваемости основаны на показателях гликемии на 20-е сутки с начала индукции экспериментального аутоиммунного сахарного диабета I типа.

Динамика концентрации глюкозы сыворотки крови экспериментальных животных. На модели аутоиммунного сахарного диабета проведены сравнительные исследования следующих методик:

Первая группа - 48 животных - пересадка внутрибрюшинно островковых клеток поджелудочной железы новорожденных поросят; вторая группа- 43 животных - пересадка внутрибрюшинно островковых клеток поджелудочной железы новорожденных поросят в сочетании с введением коммерческого циклоспорина А ежедневно в дозе 10 мг/кг; третья группа - 51 животных - пересадка внутрибрюшинно островковых клеток поджелудочной железы новорожденных поросят в сочетании с введением микрокапсулированного комплекса «ксеногенные островковые клетки поджелудочной железы + циклоспорин А»; контрольная группа состояла из животных с экспериментальным инсулинзависимым сахарным диабетом, которым внутрибрюшинно вводили изотонический раствор хлорида натрия.

Трансплантировали ксеногенные островковые клетки поджелудочной железы и различные лекарственные формы циклоспорина А в переднюю брюшную стенку забрюшинно.

Лечение начинали на 16-е сутки с момента начала индукции аутоиммунного сахарного диабета по вышеописанной методике. Лечение проводили в течение 14 суток.

Критериями эффективности лечения являлись динамика уровня глюкозы и

содержания lg G сыворотки крови экспериментальных животных.

Проведена гистологическая оценка состояния поджелудочной железы, печени, селезенки, почек по окончании эксперимента.

Динамика гликемии при различных способах лечения аутоиммунного сахарного диабета отражена на рис.3.

Первая группа: сразу после трансплантации уровень глюкозы сыворотки крови снизился до 5,2 ± 0,21 ммоль/л и в течение 5,1 ±0,9 суток находился на уровне 5,4±0,15 ммоль/л. характер ремиссии был стабильным. Затем наступил рецидив и уровень глюкозы был 9,5±1,5 ммоль/л.

Вторая группа: после начала лечения концентрация глюкозы сыворотки крови снизилась до 4,3 ± 0,19 ммоль/л и в течение 7,61,± 2 суток находилась па уровне 6,9±2,6 ммоль/л. Характер ремиссии носил нестабильный характер. Имели место «пилообразные» колебания гликемии. Затем наступил резкий подъем уровня глюкозы. До конца эксперимента гликемия сохранялась 12,8±2,3 ммоль/л, что превышало значения во всех остальных группах, включая контрольную, т.е. имело место явление «рикошета».

Третья группа: После начала лечения уровень глюкозы сыворотки крови резко снизился и составил 4,4 ±0,18 ммоль/л. ремиссия была стабильной и длилась 14,9±2,4 суток. В этот период уровень гликемии составил 6,9±1,9 ммоль/л.

Четвертая группа: в течение всего периода наблюдений уровень глюкозы составил 11,9±2,3 ммоль/л с тенденцией к слабому росту.

Рис.3. Динамика гликемии при различных способах лечения аутоиммунного сахарного диабета.

Динамика содержания lg G в сыворотке крови экспериментальных животных при различных способах лечения. Для оценки иммунологических результатов различных способов лечения экспериментального аутоиммунного инсулинзависимого сахарного диабета было использовано качественное определение содержания lg G по методике (Wilkin T.J.,1996).

Для выявления исходного содержания lg G (здесь и далее имеется в виду lg G к инсулину) в сыворотке крови интактных животных исследовали группу из 20 здоровых крыс. У 1,3% из них выявили наличие lg G в сыворотке крови.

На восьмые сутки после начала индукции аутоиммунного инсулинзависимого сахарного диабета (после второй иммунизации) количество lg G - положительных животных выросло до 27,3%. После окончания индукции на пятнадцатые сутки - сразу после третьей иммунизации - количество lg G-положительных животных составило 76,3%. Для дальнейшего лечения отбирали только lg G-положительных животных и эта группа принималась за 100% (рис.4.).

На сороковые сутки с момента начала индукции аутоиммунного инсулинзависимого сахарного диабета (двадцать четвертые сутки с начала лечения) вновь определяли наличие lg G в сыворотке крови экспериментальных животных. Результаты получили следующие:

В первой группе (трансплантировали ксеногенные островковые клетки поджелудочной железы) количество lg G-отрицательных животных составило 1,6% ($p<0,05$). По-видимому, данный факт может быть отнесен на счет погрешности метода.

Во второй группе (трансплантировали ксеногенные островковые клетки поджелудочной железы в сочетании с ежедневным введением коммерческого циклоспорина А) lg G отсутствовал в крови 5,6% животных.

В третьей группе (трансплантировали ксеногенные островковые клетки поджелудочной железы в сочетании с введением микрокапсулированного комплекса «ксеногенные островковые клетки поджелудочной железы + циклоспорин А») мы не обнаружили Ig G в сыворотке крови 20,3% животных.

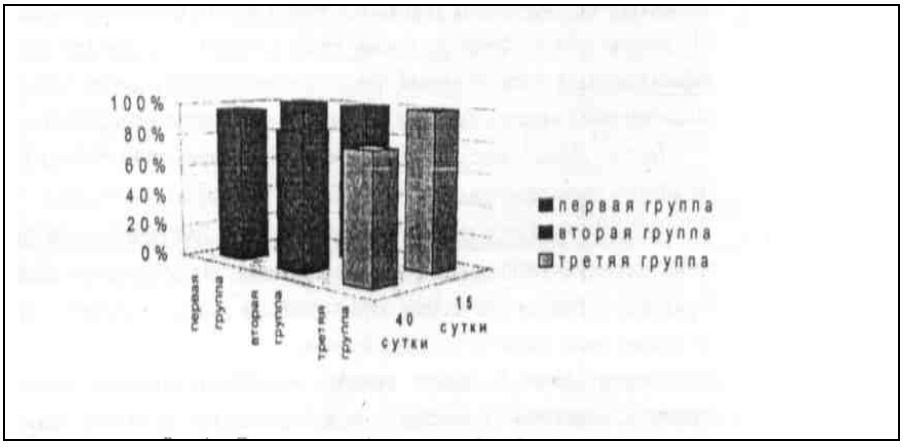

Рис.4.Динамика содержания Ig G в сыворотке крови экмпериментальных способах лечения.

Морфологические изменения органов и тканей при различных способах лечения аллоксанового сахарного диабета.

Морфологические изменения на четвертые сутки лечения. *Передняя брюшная стенка:* У животных *первой и второй групп* отмечали умеренную инфильтрацию мышечной ткани полинуклеарными клетками. *В третьей группе* полинуклеарной инфильтрации не отмечали.

Поджелудочная железа: определяется умеренно выраженное поражение поджелудочной железы, преимущественно её эндокринного отдела.

Печень. На данном этапе морфологические изменения печени сходны во всех группах экспериментальных животных. Определяются признаки умеренного обратимого поражения.

Почки. Морфологические изменения сходны. Определяются умеренные обратимые изменения преимущественно коркового слоя.

Десятые сутки лечения. *(Передняя брюшная стенка): Первая группа:* в этой группе определяется выраженная паравазальная полинуклеарная инфильтрация. Обнаруживается дистрофия, некроз и некробиоз мышечных волокон, полинуклеарная инфильтрация стромы. Трансплантированные ксеногенные островковые клетки поджелудочной железы не обнаружены.

Вторая группа: Межуточная ткань преимущественно диффузно инфильтрирована полинуклеарами. В единичных препаратах дистрофия и некробиоз мышечных волокон.

Третья группа: в препаратах этой группы преимущественно выявляется отек, диффузная и паравазальная инфильтрация стромы. Эти изменения свидетельствуют о продолжающемся функционировании трансплантатов

Печень. Первая группа: структура печени умеренно изменена. Выявлены множественные зоны некроза. Портальные тракты обычные. Капсула утолщена.

Вторая группа: структура печени резко изменена. Портальные тракты инфильтрированы полинуклеарами, резко расширены. Повсеместно признаки гидропической и жировой дистрофии. Множественные некрозы гепатоцитов.

Третья группа: капсула не изменена. Структура печени сохранена. Гепатоциты преимущественно не изменены.

Поджелудочная железа. Первая группа: Островки Лангерганса единичны, преимущественно уменьшены в размерах. Изменения указывают на тотальное поражение поджелудочной железы, характерное для сахарного диабета 1 типа на поздних сроках развития этого заболевания.

Вторая группа: В клетках ацинусов определяли признаки белковой зернистой, гидропической дистрофии, вплоть до некроза. Выявляли большие зоны некроза клеток. Привлекает внимание малое количество островков Лангерганса, они уменьшены в размерах. Изредка обнаруживаются единичные нормальные островки.

Третья группа: Островков Лангерганса много, размеры и структура их сохранены На отдельных участках визуализируется белковая зернистая дистрофия клеток ацинусов.

Почки. Первая группа: отмечали выраженные изменения преимущественно коркового слоя. Отмечаются многочисленные зоны некроза. Прямые канальцы на отдельных участках расширены, умеренно полнокровны. Выраженность изменений мозгового слоя меньше, чем клубочкового; *вторая группа:* изменения также локализуются преимущественно в корковом слое. Есть участки некроза эпителия извитых канальцев, много эпителия с признаками белковой зернистой, гидропической дистрофий. На отдельных участках мозгового слоя визуализируются признаки белковой зернистой и даже гидропической дистрофии; *третья группа:* корковое вещество: клубочки обычные, частично увеличены в размерах, некоторые сморщены. Характер изменений свидетельствует об умеренном обратимом поражении.

Содержание ксеногенных островковых меток в передней брюшной стенке на разных сроках лечения.

Максимальный темп снижения количества клеток в поле зрения отмечается в первой группе экспериментальных животных (Таб.1), а минимальный - в третьей. Данное измерение можно считать косвенным показателем выраженности реакции отторжения трансплантата. Таким образом, можно сделать вывод, что в третьей группе, где вводили ксеногенные островковые клетки и микрокапсулированный комплекс «ксеногенные островковые клетки поджелудочной железы + циклоспорин А» выраженность реакции отторжения трансплантата минимальна.

Таблица 1.

Способы лечения	Сутки лечения			
	2	5	10	14
Ксеногенные островковые клетки	26,7±2,1	14,3±2,7	-	-
Ксеногенные островковые клетки и коммерческий циклоспорин А	24,3±3,6	16,5±1,4	2,4±3,8*	-
Ксеногенные островковые клетки и микрокапсулы	27,2±4,4	20,5±2,1	18,6±1,9	16,1±3,8

Примечание: клетки считали в 5 полях зрения; * $P < 0,01$

ВЫВОДЫ

1. Токсические побочные эффекты микрокапсулированного комплекса «ксеногенные островковые клетки + циклоспорин А» значительно ниже, чем коммерческого циклоспорина А несмотря на десятикратно большую дозу [7, 10. II, 14, 15].
2. Способность индуцировать стойкую ремиссию сахарного диабета I типа

-у микрокапсулиропанного комплекса «кссеногенные островковые клетки + циклоспорин А» при ксенотрансплантации островковых клеток поджелудочной железы в 2,8 раза выше, чем при солитарной ксенотрансплантации островковых клеток поджелудочной железы и в 2 раза больше, чем при ксенотрансплантации островковых клеток поджелудочной железы в сочетании с коммерческим циклоспорином А [10, II, 15].

3. Применение микрокапсулиропанного комплекса «ксеногенные островковые клетки + циклоспорин А» при ксенотрансплантации островковых клеток поджелудочной железы значительно уменьшает тяжесть поражения внутренних органов при инсулинзависимом сахарном диабете и улучшает прогноз в отношении осложнений данного заболевания [11, 14, 15], а также при клиническом применении позволяет получить значительный экономический эффект за счет уменьшения расходов на производство и применение инсулина.

4., Применение направленного транспорта иммуносупрессантов снижает выраженность трансплантационного иммунитета на 20,3% по сравнению с 5,6% при применении коммерческой формы циклоспорина А [1,3, 4, 8, 12, 13].

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

1. Материалом для трансплантации могут служить островковые клетки поджелудочной железы новорожденных поросят, поскольку они сочетают высокую генотипическую схожесть с островковыми клетками человека и низкую иммуногенность с широкой доступностью донорского материала.

2. Пересадка ксеиогенных островковых клеток поджелудочной железы должна производиться в сочетании с разработанным нами способом пролонгированной иммуносупрессии, что позволяет достичь длительного функционирования трансплантата и снизить степень поражения внутренних органов и тяжесть осложнений.

3. Разработанная нами методика пересадки ксеиогенных островковых клеток поджелудочной железы может быть адаптирована для клинического применения при лечении сахарного диабета 1 типа при помощи малоинвазивных технологии имплантации трансплантата.

СПИСОК ОПУБЛИКОВАННЫХ МО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ РАБОТ:

1. Karpitzky AS., Рапко S.V., Anitchkin V.V., Oladko A.A., Lyzikov A.A., Sapko G.F., Taller V. Directed immunosupression therapy in tracheal transplantation": 13-th immunology meeting. - Amsterdam, The Netherlands. - 1997.-p. 1024.
2. Lyzikov A.A., Panko S.V., Panko S.S., Karpitzky A.S., Sachek M.M., Anitchkin V.V., Zhavoronok S.V., Sanin A., Tihonova L.V. Induction of immune tolerance by oral administration of drug delivery system "antigen plus immunosupressant": 13-th immunology meeting. - Amsterdam, The Netherlands. - 1997 - p. 340.
3. Panko S.V., Karpitzky A.S., Zhavoronok S.V., Sachek M.M., Anitchkin, I.N. Grishin I.N., Lyzikov A.A., Sanin A. A. New approaches in transplantation of a skin allografts: 4-th International Symposium on Clinical Immunology. - Amsterdam, The Netherlands- 1997.-p.1016.

4 Карпицкий А.С., Панько СВ., Аничкин В.В., Гришин И.Н., Таллер В.А., Сапко Г.Ф., Оладько А.А., Лызиков А.А., Вишневецкий М.Л. Аллогенная трансплантация трахеи: Декабрьские чтения по неотложной хирургии. - Минск.- 1997-С.281-284.

5. Orekhovsky P.V., Panko S.V., Matveev V.A., Alekseev N.A., Karpitzky A.S., Kiidryavtzev S.A., Fadeev V.I., Lyzikov A. A., Panko S.S. Management of urinary tract infection by microcapsulated forms of metronidazolum and rifampicinum: International medical conference for students and young doctors. - Lublin, Poland, - 1998.-P.I24.
6. Panko S.S., Panko S.V., Karpitzky A.S., Lyzikov A.A., Kiidryavtzev S.A. System "antigen plus immunosupressant" in treatment of experimental autoimmune thyroiditis.: International medical conference for students and young doctors. - Lublin, Poland - 1998.-P.96.
7. Lyzikov A.A., Panko S.V., Karpitzky A.S., Zhavoronok S.V., Sachek M.M., Anitchkin V.V., Grishin I.N., Sanin A. A. Immunosuppressants in a scin allografts transplantation: International medical conference for students and young doctors. - Lublin, Poland. - 1998.-P. 118.
8. Vishnevsky ML., A. Karpitzky, S.V. Panko, V.Anitchkin, A. Oladko, G. Sapko, A.A. Lyzikov, S.A. Kiidryavtzev. Immunosupressant treated allotrachea transplantation: International medical conference for students and young doctors. - Lublin, Poland. - 1998.-P. 156.
9. Ореховский П.В., Стебунов С.С, Кудрявцев С.А., Окулич В.К., Панько СВ., Сосинович Д.Г., Карпицкий А.С, Панько С.С, Семенидо Ю.Н., Лызиков А.А. Антибактериальные свойства депо-форм препаратов: Фундаментальные и прикладные вопросы медицины и фармации. Тезисы докладов 54-научной сессии института. – Витебск. – 1999. –С.116.
10. Лызиков А.А.Панько С.В.Подолинский С.Г. Экспериментальная апробация пролонгированной формы иммуносупрессанта при

трансплантации островковых клеток поджелудочной железы:Сборник тезисов к конференции Хирургия 2000». - Москва. - 2000. - с.35.

ll.Lyzikov A.A., Lyzikov A.N., Lobankov V.M. Prolonged forms of cyclosporin a in surgical treatment of experimental 1 type diabetes mellitus: 5-th Annual Meeting of European Society of Surgery. - Leuven, 2001 - p. 198.

12.Карпицкий А.С, Аничкин В.В., Гришин И.Н., Лызиков А.А., Санин А.В. Аллотрансплантация трахеи с направленным транспортом иммуносупрессантов: Новости хирургии. - 1996.- №2-3- С.32-36

13.Панько *С.С.,* Панько СВ., Жаворонок СВ., Сачек М.М., Гришин И.Н., Королев Б.А., Петренко СВ., Криштопенко СВ., Санин А.В., Калинин АЛ., Матвеенко В.Н., Лялик А.И., Карпицкий А.С, Лызиков А.А., Кудрявцев С.А., Вишневецкий М.Л., Мяделец О.Д., Алексеев НА., Фадеев В.И., Степанец С.А., Ковалева Т.А., Шиленок О.Г., Стояков А.М. Клинико-экспериментальное обоснование апробации нового способа иммунокоррекции по принципу "Магической ловушки": Современные проблемы инфекционной патологии человека (эпидемиология, вирусология и иммунология). Статьи и тезисы докладов 1 итоговой научно-практической конференции. - г.Минск. - 1998 г. - С.359-369.

14. Лызиков А.А., Панько СВ., Аничкин В.В., Вершинин П.10., Подолинский С.Г. Морфофункциональные изменения при хирургическом лечении сахарного диабета: «Медицинские последствия Чернобыльской катастрофы. 15 лет спустя» г. Гомель. 2001г. / Материалы международной научно-практической конференции. - Мозырь: Издательский дом «Белый ветер», 2001.-С.244-247.

15.Лызиков А.А., Панько СВ., Аничкин В.В., Вершинин П.1С, Подолинский С.Г. Использование пролонгированных форм иммуносупрессантов при хирургическом лечении сахарного диабета в эксперименте: «Медицинские последствия Чернобыльской катастрофы. 15 лет спустя» г.Гомель. 2001г. Материалы международной научно-практической конференции. - Мозырь: Издательский дом «Белый ветер», 2001. - С.248-250.

16.Патент №4157. Способ пересадки трахеи / Панько СВ., Гришин И.Н., Карпицкий А.С, Жаворонок СВ., Сачек М.М., Аничкин В.В., Чайковский В.В., Кудрявцев С.А., Алексеев Н.А., Антипов Ю.Г., Лызиков А.А., Фадеев В.И. Заявл. 10.0701997, опубл. 30.12.2001. //Официальный бюллетень / Гос. пат. ведомства Респ. Беларусь. - 2001. - №41.- с.30

17.Способ получения микрокапсул, содержащих клеточный материал // Приоритетная справка ГПВ РБ за №.al9980562 от 11.06.98 г. Панько СВ., Грищин И.Н., Кудрявцев С.А., Ореховский П.В., Алексеев Н.А., Панько С.С., Карпицкий А.С, Сачек М.М., Жаворонок СВ., Воробей А.В., Лызиков А.А., Стебунов С.С., Доценко Э.А., Никитин И.Г., Фадеев В.И.

18.Трансплантация культуры островковых клеток поджелудочной железы в комплексном лечении сахарного диабета и профилактике осложнений диабетической ангиопатии / Мартов Ю.Б., Подолинский С.Г., Лызиков А.А., Доценко Э.А. // Инструкция на метод. Утверждена МЗ РБ от 27.03.2001. №63-0301.

РЕЗЮМЭ

Лызікау Аляксей Анатол'евіч

"Пралангіраваная імунасупрэсія пры хірургічным лячэнні цукарнага дыябету"

Ключавыя словы: цукарны дыябет, ксенагенныя астрауковыя клеткі падстраунікавай залозы, цыкласпарын А, мікракапсулы, трансплантацыя.

Аб'ект даследвання: 716 белых пацукоу з эксперыментальным цукарным дыябетам.

Мэта даследвання*:* распрацоука новага хірурпчнага метаду лячэння цукарнага дыябету, заключаючагася у трансплантацыі ксенагенных астрауковых клетак падстраунікавай залозы з наступнай пралангіраванай імунасупрэсіей дэпо-лекавымі формамі цыкласпарына А.

Метады даследвання: біяхімічны, імуналагічны, марфалагічны, морфаметрычны, хірургічны, фармакалагічны і статыстычны.

Атрыманыя вынікі і іх навізна*:* навізна атрыманых вынікау ключваецца у стварэнні:

1. Новага, патагенэтічна абгрунтаванага спосабу лячэння інсулінзалеглага цукарнага дыябету, заключаючагася у ужыванні распрацаванага намі мікракапсуліраванага комплексу "ксенагенныя астрауковыя клеткі падстраунікавай залозы+цыкласпарын А", што дазваляе палепшыць вышкі лячэння і прагноз пры лячэнні гэтага захворвання у параунанні з другімі метадамі.
2. .эксперыментальнай маделі аутаіммуннага інсулінзалеглага цукарнага дыябету.

Напрамкі ужывання: у клінічнай практыцы пры лячэнні хворых інсулінзалеглым цукарным дыябетам трансплантацыйным метадам пры дапамозе малаінвазіуных методык.

Вобласць ужывання: хірургія,, трансплантalогія, эндакрыналогія.

РЕЗЮМЕ

Лызиков Алексеи Анатольевич

«Пролонгированная иммуносупрессия при хирургическом лечении сахарного диабета»

Ключевые слова: сахарный диабет, ксеногенные островковые клетки поджелудочной железы, циклоспорин А, микрокапсулы, трансплантация.

Объект исследования: 716 крыс с экспериментальным сахарным диабетом.

Цель работы: разработка нового хирургического метода лечения сахарного диабета, заключающегося в трансплантации островковых клеток ксеногенной поджелудочной железы с последующей пролонгированной иммуносупрессией депо-лекарственными формами циклоспорина А.

Методы исследования: биохимический, иммунологический, морфологический, морфометрический, хирургический, фармакологический и статистический.

Полученные результаты и их новизна*:* Новизна полученных результатов заключается в создании:

1) нового, патогенетически обоснованного способа лечения инсулинзависимого сахарного диабета, основанного на применении созданного нами микрокапсулированного комплекса «ксеногенные островковые клетки + циклоспорин А», что позволяет улучшить результаты лечения и прогноз при лечении данного заболевания по сравнению с другими методами;
2) экспериментальной модели аутоиммунного инсулинзависимого сахарного диабета.

Рекомендации по использованию*:* в клинической практике при лечении больных инсулинзависимым сахарным диабетом трансплантационным методом при помощи малоинвазивных методик. *Область применения:* хирургия, трансплантология, эндокринология.

SUMMARY

Lyzukov Alexeu Anatoluevuch

"Prolonged ummunosupressuon un surgucal treatment of duabetes mellutus"

Key words: dиabetes mellиtus, xenogenиc иslet cells of pancreas, cyclosporиn Л, mиcrocapsules, transplantatиon.

Object: 716 whите rats with experimental dиabetes mellиtus.

Aum: desиgn of new surgical treatment method consиstиng of pancreas иslet cell xenograftиng combиned with prolonged иmmunosupressиon with depot-forms of cyclosporиne A.

Applued research *methods:* биochemиcal, иmmunologиcal, morphologиcal, morphometrиc, surgиcal, pharmacologиcal and statиstиc.

Results and theur *novelty:*

1. New pathogenesиs grounded method of иnsulиndependant dиabetes mellиtus **treatment** based on applиance of new mиcrocapsulated set "xenogenиc иslet cells of **pancreas** plus cyclosporиne A"
2. Experimental model of autoиmmune иnsulиndependant dиabetes mellиtus.

Appluance recommendatиons: иn case of иnsulиndependant dиabetes mellиtus treatment with transplantatиon method by миnимally иnvasиve techniques.

Use ***fueld:*** surgery, transplantology, endocrиnology.