

МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ

УТВЕРЖДАЮ
Первый заместитель Министра

_____ Р.А.Часнойть
23 марта 2007 г.
Регистрационный № 054-0606

**ТРАНСПЛАНТАЦИЯ ОСТРОВКОВЫХ КЛЕТОК ПОДЖЕЛУДОЧНОЙ
ЖЕЛЕЗЫ В СОСТАВЕ ИМПЛАНТАЦИОННОЙ ПЛАСТИНЫ**

инструкция по применению

УЧРЕЖДЕНИЕ-РАЗРАБОТЧИК: УО «Белорусский государственный
медицинский университет»

АВТОРЫ: канд. мед. наук В.А. Горанов, д-р мед. наук, проф. С.И. Третьяк,
канд. мед. наук, доц. А.В. Прохоров, А.А. Глинник, В.П. Голубович

Минск 2007

Клеточная биомасса, необходимая для трансплантации может быть получена на базе специализированных лабораторий по биотехнологии культур клеток при высших учебных медицинских учреждениях, крупных клинических центрах, имеющих при себе виварии. В ином случае следует направлять заявку по форме № 1 в ЦНИЛ БГМУ для получения соответствующего материала (Приложение 1).

ПЕРЕЧЕНЬ НЕОБХОДИМОГО ОБОРУДОВАНИЯ, РЕАКТИВОВ, ПРЕПАРАТОВ, ИЗДЕЛИЙ МЕДИЦИНСКОЙ ТЕХНИКИ

1. Электрический термопарный термометр.
2. Автоматические микропипетки со стерильными наконечниками.
3. Весы аналитические.
4. Вытяжной шкаф с ламинарным потоком для культуры клеток (класса 2).
5. Инструменты лабораторные, хирургические: пинцеты, ножницы, зажимы.
6. Иономер (рН-121).
7. Микроскоп инвертированный.
8. Миллипоровые фильтры с диаметром пор 0,22 мкм (стерильные).
9. Пипетки стеклянные стерильные на 1, 5, 10 мл.
10. Посуда лабораторная (чашки Петри, бутылки, колбы).
11. Пробирки стерильные центрифужные с крышками.
12. CO₂-инкубатор.
13. Стеклянные предметные и покровные.
14. Стерильные плоскодонные 96-луночные пластиковые планшеты.
15. Стерильные пластиковые флаконы для культур клеток.
16. Термостат, регулируемый водяной.
17. Центрифуга на 1-5 тыс. об/мин (r 10-50 см).
18. Центрифужные пластиковые пробирки объемом 0,5-10,0 мл.
19. Шприцы.
20. Штативы для пробирок.

Реактивы

1. Агар микробиологический.
2. Антибиотики: гентамицин, пенициллин, стрептомицин.
3. Глюкоза (40% р-р).
4. Гепес.
5. Коллагеназа (тип 11), лиофилизированная.
6. Перколл (фиколл) – раствор (1200), перед употреблением доводится стерильной средой 199 до плотности 1040).
7. Диметилсульфоксид (99,9% р-р).
8. Дитизон (5% р-р).
9. Среды микробиологические в порошке: PPL0, тиогликолевая среда, среда Сабуро.
10. Среды культуральные жидкие (199, IMDM) стерильные.

11. Среда культуральная ДМЕМ сухая.
12. Сыворотка фетальная бычья для культуральных работ стерильная.
13. Трипановый синий (0,4% р-р).
14. Физиологический раствор (0,9% NaCl р-р).
15. Версен (ЭДТА) (0,02% р-р).
16. Коллаген (4 мг/мл в 0,02N HCl) для культуральных работ.
17. Гидроксид натрия (NaOH) (10M).
18. Соль тетразолия 3-(4,5-диметилтиазол)-2,5-дифенилтетразолиум бромида (МТТ) (5 мг/мл).
19. Антитела к инсулину, первичные.
20. Вторичные антитела, меченные флуоресцентной меткой (FITC).
21. Фосфатно-солевой буфер (ФСБ).
22. Полиамид плетеный медицинский с толщиной нити 5 мкм, размерами пор 5 мкм и 35 мкм.

ПОКАЗАНИЯ К ПРИМЕНЕНИЮ

Сахарный диабет I типа в случаях возникновения трудно корригируемых состояний, мало поддающихся медикаментозному лечению (частые гипогликемические состояния, гипергликемии периодически наблюдаемые на протяжении более чем 3 месяцев при условии интенсивной инсулинотерапии, прогрессирующие ангио-нейропатии) в частности показаниями для проведения манипуляции являются:

- лабильное течение инсулинозависимого сахарного диабета (ИЗСД) с частыми гипо- и гипергликемическими состояниями;
- прогрессивно нарастающая резистентность к экзогенному инсулину, при отсутствии явных либо скрытых иммунологических нарушений;
- высокая инсулинопотребность, составляющая более 45 Ед/сут;
- прогрессирующие вторичные осложнения диабета (ретинопатия, нефропатия, ангиопатия);
- панкреатогенный сахарный диабет с высокой инсулинопотребностью (более 35Ед /сут).

ПРОТИВОПОКАЗАНИЯ ДЛЯ ПРИМЕНЕНИЯ

В качестве основных критериев для исключения больных из числа реципиентов рекомендуется использовать следующие:

- беременность или лактация;
 - возраст менее 18 лет;
 - склонность к тромбообразованию любого генеза;
 - заболевания сердца, входящие по Нью-йоркской классификации в группу 3 или 4; инфаркт миокарда, перенесенный за последние 6 месяцев;
 - острые «интеркурентные» заболевания, способные нарушить проведение обследования и лечения;
 - активный алкогольный анамнез.
- Относительные противопоказания:

- сопутствующие аутоиммунные заболевания;
- острые инфекционные и воспалительные заболевания или обострение хронических;
- превышение более чем на 20% уровня цитотоксичности сыворотки крови потенциального реципиента над уровнем цитотоксичности в контроле при постановке теста биосовместимости *in vitro* (см. раздел «Методика постановки тестов биосовместимости *in vitro*»).

Мероприятия по дообследованию реципиентов перед трансплантацией

Дотрансплантационное обследование должно включать:

- лабораторные исследования: общий и биохимический анализы крови (билирубин, кальций, калий, натрий, мочевины, креатинин, глюкоза, общий белок, АСАТ, АЛАТ), общий анализ мочи, липидный спектр (холестерин, ЛПНП, ЛПВП, триглицериды), протеинограмма;
- определение концентрации в крови инсулина, гликемического профиля, фруктозамина и гликированного гемоглобина;
- определение группы крови, резус-фактора, коагулограмма и др. (по показаниям);
- УЗИ щитовидной железы, органов брюшной полости и др. (по показаниям);
- проведение тестирования по оценке качества жизни с целью определения толерантности к физической и умственной нагрузке (см. ниже);
- проведение иммунофенотипирования с использованием методов проточной цитофлюориметрии (CD3, CD4, CD8, CD16, CD25, CD71, CD95);
- электрокардиограмму;
- консультации специалистов: эндокринолога, невропатолога, офтальмолога, кардиолога, гинеколога, иммунолога с целью выявления и лечения воспалительных и др. заболеваний;
- достижение максимально возможной компенсации диабета.

Рекомендуется проведение оценки кровотока по плечевой артерии и артериям предплечья. Скорость кровотока по артериям ниже локтевого сгиба должна составлять не менее 1,2-1,3 м/с. Для трансплантации рекомендуется отбирать пациентов с хорошо визуализируемой кубитальной веной, которая после артериализации (т. е. формирования артерио-венозной фистулы) должна составить основное местообитание капсулы с имплантационной пластиной, включающей культуру островковых клеток.

Рекомендуется использовать стандартный набор критериев для выявления скрытых коагулопатий: 1) количество тромбоцитов; 2) время кровотечения; 3) активированное время рекальцификации (АВР), тромбоэластограмма (ТЭГ); 4) активированное частичное тромбопластиновое время (АЧТВ); 5) протромбиновое время (ПВ), протромбиновый индекс (ПИ); 6) концентрация фибриногена в плазме крови; 7) фибринолитическая активность (ФАК); 8) фактор XIII (при наличии в анамнезе плохого заживления ран и келоидных рубцов); 9) растворимые комплексы

фибриномономеров (РКФМ); 10) комплекс антитромбина III желательно определять перед гепаринотерапией, при наличии и анамнезе повторных тромбозов и при приеме оральных контрацептивов. Основные параметры, которые должны быть определены в клинике, включают 1, 2, 4, 5 показатели.

Для выбора реципиентов может быть рекомендовано исследование показателей иммунного статуса потенциальных реципиентов, что позволяет отобрать реципиентов с низким риском развития постоперационных реакций отторжения.

В исследованиях могут быть использованы некоторые общепризнанные иммунологические маркеры, в частности уровень CD3, CD4 и CD8-лимфоцитов, соотношение субпопуляций Т-лимфоцитов – иммунорегуляторный индекс (CD4/CD8), доля В-лимфоцитов, активационные лимфоцитарные маркеры – CD25, CD71, маркера апоптоза – CD95.

Особое внимание необходимо обращать на факт повышенного содержания CD4-лимфоцитов и особенно случаи, сопровождающиеся высоким иммунорегуляторным индексом. Следует учитывать, что уровень экспрессии активационных маркеров обычно состоит в обратной зависимости от продолжительности заболевания. В плане прогноза трансплантации должен настораживать факт обнаружения у потенциальных реципиентов повышенных уровней CD25, CD71-рецепторов, особенно если определяется одновременное увеличение указанных показателей более чем на 15% по сравнению со «здоровым» контролем. У тех лиц с диабетом, у которых отчетливо регистрируется снижение способности к Fas-опосредуемому апоптозу, могут существовать условия для персистенции аутореактивных клонов лимфоцитов. Этот факт проявляется уменьшенным количеством CD95-позитивных лимфоцитов (обычно менее 5%). Одной из адекватной в иммунологическом плане является группа пациентов с продолжительностью заболевания от 6 до 10 лет. В этой группе еще не наблюдается вторичной персистенции аутореактивных клонов лимфоцитов, возникающих при появлении вторичных осложнений основного заболевания.

Была выявлена закономерность, согласно которой пациенты с сахарным диабетом с повышенным индексом Брока имели достоверно более высокие показатели активности как свертывающей системы крови (обратное ЧТВ, ПТИ), так и иммунной (повышение CD25, CD71), по сравнению с пациентами с нормальной массой тела, в связи с чем рекомендуется отбор для трансплантации пациентов с индексом массы тела не >28.

Рекомендуется изучение параметров качества жизни с помощью анкеты и экспресс-методики NAIF (New assessment and information form to measure quality of life), разработанной в 1995 г. (см. рисунок 1)¹, с целью дальнейшего послеоперационного мониторинга изменения данных показателей.

¹ The use of the General Health Questionnaire as an indicator of mental health in occupational studies / M.H. Banks [et al.] // J. Occup. Psych. – 1995. - № 53. – P. 187-194.

На основании анкеты, заполняемой пациентом, следует оценить пять параметров качества жизни: физическая мобильность (ФМ), эмоциональное состояние сексуальная функция (ЭС/СФ), социальная функция (СоцФ), познавательная функция (ПФ).

		Ключи для подсчета баллов опросника NAIF						
		Да, очень			Совсем нет			
Физическая подвижность								
1	У меня одышка при физическом напряжении.	1	2	3	4	5	6	7
2	Я ощущаю нехватку энергии в течение дня.	1	2	3	4	5	6	7
3	Я трачу много времени на занятия моими хобби.	7	6	5	4	3	2	1
4	При выполнении повседневных нагрузок мое состояние здоровья ухудшается	1	2	3	4	5	6	7
5	Мое состояние здоровья мешает моему стремлению приобрести прибыльную работу.	1	2	3	4	5	6	7
6	Я легко подхватываю инициативу.	7	6	5	4	3	2	1
Эмоциональное состояние/ Сексуальная функция								
7	Я напряжен(а).	1	2	3	4	5	6	7
8	Я чувствую, что некому заботиться обо мне.	1	2	3	4	5	6	7
9	Мое здоровье позволяет мне осуществлять сексуальную активность в том количестве, как мне хочется.	7	6	5	4	3	2	1
10	Эта способность ухудшилась в последнее время.	1	2	3	4	5	6	7
11	Я ощущаю подавленное настроение в последнее время.	1	2	3	4	5	6	7
12	Я легко раздражаюсь.	1	2	3	4	5	6	7
Социальные функции								
13	Я активно занимаюсь спортом.	7	6	5	4	3	2	1
14	Мое состояние здоровья препятствует нормальному проведению отпуска.	1	2	3	4	5	6	7
15	Я регулярно встречаюсь с друзьями и членами семьи.	7	6	5	4	3	2	1
16	Я часто бываю дома один(одна).	1	2	3	4	5	6	7
17	Я люблю завязывать новые социальные контакты.	7	6	5	4	3	2	1
18	Я хожу в кино, театр и спортивные мероприятия.	7	6	5	4	3	2	1
Познавательная функция/Экономическое положение								
19	Я думаю, что моя память функционирует нормально.	7	6	5	4	3	2	1
20	Я могу быстро принимать решения.	7	6	5	4	3	2	1
21	Мое состояние здоровья приводит к финансовым проблемам.	1	2	3	4	5	6	7
22	Я очень быстро схватываю то, что мне говорят.	7	6	5	4	3	2	1
23	Я заметил(а) в последнее время ухудшение моих интеллектуальных возможностей.	1	2	3	4	5	6	7
24	Обычно я могу хорошо концентрироваться.	7	6	5	4	3	2	1

Рисунок 1 – Анкета для оценки качества жизни реципиентов

По сумме баллов анкеты вычисляется интегральный показатель (ИП) качества жизни. Более высокий балл соответствует лучшему состоянию здоровья (рисунок 2).

		Ключи для подсчета баллов опросника NAIF						
		Да, очень			Совсем нет			
Физическая подвижность								
1	У меня одышка при физическом напряжении.	1	2	3	4	5	6	7
2	Я ощущаю нехватку энергии в течение дня.	1	2	3	4	5	6	7
3	Я трачу много времени на занятия моими хобби.	7	6	5	4	3	2	1
4	При выполнении повседневных нагрузок мое состояние здоровья ухудшается.	1	2	3	4	5	6	7
5	Мое состояние здоровья мешает моему стремлению приобрести прибыльную работу.	1	2	3	4	5	6	7
6	Я легко подхватываю инициативу.	7	6	5	4	3	2	1
Эмоциональное состояние/ Сексуальная функция								
7	Я напряжен(а).	1	2	3	4	5	6	7
8	Я чувствую, что некому заботиться обо мне.	1	2	3	4	5	6	7
9	Мое здоровье позволяет мне осуществлять сексуальную активность в том количестве, как мне хочется.	7	6	5	4	3	2	1
10	Эта способность ухудшилась в последнее время.	1	2	3	4	5	6	7
11	Я ощущаю подавленное настроение в последнее время.	1	2	3	4	5	6	7
12	Я легко раздражаюсь.	1	2	3	4	5	6	7
Социальные функции								
13	Я активно занимаюсь спортом.	7	6	5	4	3	2	1
14	Мое состояние здоровья препятствует нормальному проведению отпуска.	1	2	3	4	5	6	7
15	Я регулярно встречаюсь с друзьями и членами семьи.	7	6	5	4	3	2	1
16	Я часто бываю дома один(одна).	1	2	3	4	5	6	7
17	Я люблю завязывать новые социальные контакты.	7	6	5	4	3	2	1
18	Я хожу в кино, театр и спортивные мероприятия.	7	6	5	4	3	2	1
Познавательная функция/Экономическое положение								
19	Я думаю, что моя память функционирует нормально.	7	6	5	4	3	2	1
20	Я могу быстро принимать решения.	7	6	5	4	3	2	1
21	Мое состояние здоровья приводит к финансовым проблемам.	1	2	3	4	5	6	7
22	Я очень быстро схватываю то, что мне говорят.	7	6	5	4	3	2	1
23	Я заметил(а) в последнее время ухудшение моих интеллектуальных возможностей.	1	2	3	4	5	6	7
24	Обычно я могу хорошо концентрироваться.	7	6	5	4	3	2	1

Рисунок 2 – Ключи для подсчета оценки качества жизни

Для облегчения восприятия полученные показатели переводили в проценты. Согласно методике NAIF, у человека с сохранными функциями, довольного всеми сторонами своей жизни интегральный показатель качества жизни равен 100% или приближается к этому уровню. Уровень показателей до 75% расценивается как незначительное снижение качества жизни, до 50% – как умеренное, до 25% – как значительное, менее 25% – как резко выраженное.

Требования, предъявляемые при работе с культурами клеток

При работе с культурами клеток следует четко выполнять методические инструкции для предотвращения микробной контаминации клеточных культур и защиты от контаминации культуральными материалами окружающего рабочего пространства. Вся работа должна проводиться в специальных стерильных помещениях или ламинарных боксах. Рабочее пространство должно быть обработано с использованием УФ-облучателей с интенсивностью не менее 10ЛК/м³/мин в течение 20 мин. Ламинарные шкафы должны быть не ниже 2 класса защиты и оснащены фильтрационными установками, обеспечивающими чистоту рабочей зоны, соответствующую содержанию микробных частиц менее 10/м³ (до облучения светом в ультрафиолетовом диапазоне). Все приготавливаемые растворы, используемые для выделения и культивирования клеток, должны быть стерилизованы путем пропускания через миллиметровые фильтры с диаметром пор 0,22 мкм.

Получение ткани поджелудочной железы

Получение клеточного материала для трансплантации производят в специализированном центре, аккредитованном для проведения работ с культурами клеток по соответствующим методикам. Выделение клеточной биомассы из тканевых фрагментов производится двумя врачами-лаборантами или научными сотрудниками, имеющими опыт работ с клеточными культурами не менее 6 месяцев.

На этапе подготовки животных для забора у них тканей следует производить тщательное ежедневное наблюдение за состоянием поголовья на протяжении 3 месяцев, находящегося в специализированном ветеринарно-техническом учреждении (виварии) для исключения возможности использования больных особей. Непосредственно перед заборами у животных тканей производят постановку полимеразной цепной реакции на ретровирусы в крови животных с помощью соответствующего ПЦР-набора. Регистрация хотя бы одного положительного результата исключает использование данного помета кроликов для получения тканей.

Приготовление посевного материала осуществляют по следующей схеме:

- новорожденных кроликов забивают путем декапитации;
- поджелудочную железу новорожденных кроликов извлекают в стерильных условиях и переносят в стерильную чашку Петри со средой 199, содержащей антибиотика (пенициллин – 100 мкг/мл, стрептомицин – 100 мкг/мл);
- удаляют капсулу, прослойки соединительной ткани с кровеносными сосудами и крупными разветвлениями протоков;
- декапсулированную железу переносят в глубокое часовое стекло и разрезают на фрагменты размером 0,1-2 мм, которые заливают 1,5%-ым раствором коллагеназы тип 11 на физиологическом растворе и инкубируют

при температуре 37°C в течение 40 мин при периодическом встряхивании (первая фракция);

- в том случае, если на дне остаются несепарированные фрагменты их повторно сепарируют с помощью 15% раствора коллагеназы при тех же условиях (вторая фракция).

Выделение очищенных островковых кластеров и клеток

Полученные фракции клеток объединяют, отмывают путем центрифугирования при 300G в течение 6 мин стерильной средой 199 два раза и переносят для дальнейшей сепарации в градиент стерильного перколла и физиологического раствора. Дальнейшее разделение клеток производят на перколе путем центрифугирования при 800G в течение 10 мин с последующим сбором клеточных элементов на границе раздела фаз (1035/1025).

Затем клетки отмывают физиологическим раствором путем центрифугирования при 300G в течение 6 мин дважды, доводят до конечной концентрации 450-550 тыс. клеток/мл с помощью соответствующего количества среды IMDM с 20% фетальной бычьей сыворотки с антибиотиками (пенициллин – 100 Ед/мл, стрептомицин – 100 мкг/мл) и помещают в культуральные пластиковые флаконы, которые затем помещают в CO₂-инкубатор (5% CO₂) и инкубируют при 37°C.

Культивирование клеток

Через 2 суток после прикрепления клеток следует сменить ростовую среду IMDM с 20% фетальной бычьей сыворотки с антибиотиками (пенициллин – 100 Ед/мл, стрептомицин – 100 мкг/мл). В дальнейшем смена среды проводится 1 раз в два дня. Культура, получаемая из поджелудочной железы новорожденных кроликов, состоит из двух основных фракций: флоатирующей и прикрепленной (ко дну культурального флакона). Прикрепленная фракция представляет собой многочисленные очаги роста агрегатов клеток, вокруг которых формируются однослойные зоны роста эпителиальных клеток (среди них большинство составляют β-клетки). Флоатирующая фракция представлена компактными сфероидными образованиями, имеющими соединительно-тканную строму и содержащими группы островковых клеток (преимущественно β-клеток) как в центральной, так и в периферической зонах. После оседания на дно культурального флакона вышедшие в среду β-клетки располагаются обычно на сети фибробластов как на подложке и начинают кооперироваться друг с другом, образуя мелкие кластеры, при этом формируется очаговый монослой с эксцентрическими зонами роста. В наружной части зоны роста располагаются преимущественно мелкие полигональные клетки, внутреннюю занимают эпителиоподобные клетки более крупной формы с множественными оптически-плотными гранулами. К моменту стабилизации монослоя (5-12 сут.) подобное соотношение морфотипов клеток во многом сохраняется. Кроме того, наблюдается независимое от их функциональной активности снижение зернистости в отдельных группах клеток. С этого момента часть культуры с помощью осторожного пипетирования может быть

отобрана для дальнейших тестов. После проведения 2-го пассажа клетки и их кластеры отбираются путем мягкой версенизации (пипетирование с 0,02% ЭДТА). Допустимо использование 0,75% раствора коллагеназы на физиологическом растворе в течение 2 мин. Полученную взвесь следует отцентрифугировать при 300G в течение 6 мин со средой 199 с 5% фетальной сыворотки и поместить внутрь имплантационной пластины.

Подготовка имплантационной пластины с клетками

Изготовление пластины, для роста и дальнейшей имплантации клеток реализуется следующим образом:

1. Приготовить среду ДМЕМ (10X) непосредственно перед иммобилизацией клеток: сухая среда ДМЕМ (17,7 г) растворяется в 100 мл дистиллированной воды и стерилизуется пропусканием через фильтр с диаметром пор 0,22 мкм.

2. Приготовить восстанавливающий буфер (10X): 2,2 г бикарбоната натрия и 4,8 г Гепес растворить в 100 мл дистиллированной воды. Стерилизуется пропусканием через фильтр с диаметром пор 0,22 мкм.

3. Охладить пипетки на ледяной бане.

4. Извлечь коллаген из холодильника и поместить на ледяную баню.

5. Смешать 0,25 мл культуральной среды ДМЕМ (10X) и 0,25 мл 10X восстанавливающего буфера, все держать на льду.

6. Осадить клетки центрифугированием и используя охлажденную пипетку осторожно добавить 2 мл раствора коллагена к клеткам из расчета $1-4 \times 10^6$ кл/мл, поворачивая пробирку, чтобы перемешать раствор. Избегать образования пузырьков воздуха.

7. Поместить сетчатую полиамидную мембрану с размером пор 35 мкм на смоченную средой чашку Петри (рекомендуется использовать сетчатую основу размерами 19X50 мм).

8. Смешать полученный раствор коллагена с клетками с 0,5 мл полученного раствора ДМЕМ и восстанавливающего буфера.

9. Добавить к раствору 10N NaOH (10мкл), для доведения уровня pH до 7,0. Об изменении pH можно судить по изменению цвета красителя фенолового красного (изменение цвета от желтого к розовому).

10. Наслоить полученный раствор с клетками на всю площадь сетчатой основы, выровнять пластмассовым шпателем вровень с сетчатой основой и удалить излишки коллагена.

11. Поместить для полимеризации в CO₂ инкубатор на 60 мин.

12. Добавить в чашку Петри, содержащую пластину, среду IMDM с 20% фетальной бычьей сывороткой и антибиотиками (пенициллин – 100 Ед/мл, стрептомицин – 100 мкг/мл), продолжить инкубацию в обычном режиме на протяжении 6 дней с ежедневной сменой культуральной среды.

13. Об эффективности влияния пластины на рост клеток свидетельствует увеличение количества клеток за 4 сут. не менее чем на 20% от момента иммобилизации и повышение уровня функциональной активности клеток в культуре, что проявляется тем, что после полной смены среды и стимуляции клеток 10 мМ глюкозой в течение суток концентрация

инсулина должна не менее чем в 1,5 раза превышать аналогичный показатель в неиммобилизованной культуре и иметь значение не менее 2000 мкЕд/мл.

Проверка культуры на микробиологическую чистоту

Микробиологический и вирусологический контроль, должен производиться в специализированной микробиологической лаборатории, аттестованной для проведения исследования медико-биологических препаратов. Может быть также дополнительно рекомендована постановка тестов на селективных средах и исследование туморогенности согласно методическим рекомендациям «Аттестация перевиваемых клеточных линий-субстратов производства и контроля медицинских и иммунобиологических препаратов» (РД 42-28-10-89, М., 1989). Для этого часть культуры и надосадочной жидкости тестируются в течение 10 дней на селективных средах:

1. Контроль культуры β -клеток на цитопатогенные вирусы производится путем внесения пробной суспензии клеток в перевиваемые культуры клеток BGM (клетки почки обезьяны) и HeLa (раковые клетки человеческого происхождения). Необходимо проведение 3 пассажей исследуемого материала на культурах для заключения об отсутствии цитопатогенных вирусов.

2. Контроль культуры на микоплазмы проводится с использованием селективной среды (PPLO) – 0,5% агар, приготовленный на ферментативном переваре сердечной мышцы.

3. Контроль культуры на бактериальные и микотические загрязнения проводят путем посева проб на питательные среды: питательный бульон с 0,3% глюкозой, тиогликолевую среду, среду Сабуро.

Тестирование культуры на туморогенность

Часть полученной суспензии клеток отбирают для тестирования на туморопластическую активность, для чего вводят циклоsporин-примированным новорожденным белым мышам подкожно и внутрибрюшинно по 0,3 мл (100 000 клеток). Контрольным животным вводят культуру клеток HeLa. Наблюдают в течение 15 сут., после чего пунктируют брюшную полость с забором асцитической жидкости (если таковая имеется). Отсутствие узелковых образований в местах введения исследуемого материала и отсутствие асцитической жидкости с недифференцированными клеточными элементами свидетельствует об отсутствии туморопластической активности культуры.

Оценка структурно-функционального состояния культуры

Идентификация β -клеток

Для идентификации β -клеток в тестируемых культурах применяют дитизон. Для этого 5% раствор реагента вносят непосредственно в емкости с культурой, предназначенные для тестирования (в последующем данные емкости нельзя использовать как источник клеток для трансплантации). В течение 5 мин получают избирательную окраску β -клеток. Краситель специфически окрашивает инсулин-содержащий гранулярный аппарат живых β -клеток, образуя в них дитизонат цинка (красная зернистость), что

наиболее выражено в кластероподобных β -клеточных структурах. Однако препарат невозможно сохранить вследствие нарушения пластических процессов в β -клетках и утраты цветности и гранулярности клеток со временем. Для сохранения максимального количества клеток, необходимых для трансплантации рекомендуется проводить окраску во флаконах, в которых определяется наличие минимального количества клеток либо в резервных флаконах. Окрашенные клетки представляют собой образования округлой формы с четкими границами и эксцентрично расположенным ядром. При большем увеличении микроскопа (X400) выявляется, что окраску воспринимает гранулярный аппарат клеток и в гораздо меньшей степени их цитоплазма.

Идентификация высоко-функциональных β -клеток

Для идентификации и подсчета высоко-функциональных β -клеток используют антитела к инсулину и вторичные антитела, меченые флуоресцентной меткой (FITC). Исследование проводят с помощью флуоресцентного микроскопа с длиной волны возбуждения 488 нм (для FITC-меченых антител). β -клетки и клеточные кластеры, иммобилизовавшиеся в процессе культивирования на покровных стеклах, аккуратно отмывают от среды физиологическим раствором. Затем стекла помещают в раствор фосфатно-солевого буфера с добавлением Гепеса 25 мМ, глюкозы 6,5 мМ, антител к инсулину в концентрациях, рекомендованных фирмой-изготовителем. После чего образцы вновь аккуратно отмывают от реагента средой 199 и сразу же исследуют с помощью микроскопа. В культуре, готовой для трансплантации, количество клеток, позитивных на инсулин, составляет не менее 30%.

Оценка функциональной активности культуры

Фактом, подтверждающим функциональную активность популяции β -клеток, являются результаты тестирования клеток на инсулин-продуцирующую активность с помощью радиоиммунного анализа культуральной жидкости с использованием набора для определения иммунореактивного инсулина ХОП ИБОХ (РИО-ИНС-ПГ I¹²⁵). В результате тестирования средняя активность инсулина в культуре (после полной смены среды и стимуляции клеток 10 мМ глюкозой в течение суток) должна составлять не менее 2000 мкЕд/мл. Что соответствует количеству островковых клеток от 30 до 140 тыс. островковых клеток и их кластеров на 1 см² площади культуральной посуды.

Оценка количества и жизнеспособности клеток

Часть культуры забирают для определения количества и контроля жизнеспособности путем микроскопии в камере Горяева с трипановым синим (0,4%)¹. При этом количество жизнеспособных клеток не должно быть меньше 90%. Данное исследование рекомендуется проводить непосредственно перед заключением клеток в макрокапсулу.

Методика постановки тестов биосовместимости in vitro

¹ Биотехнология клеток животных. – М.: Агропромиздат, 1989. – 365 с.

Согласно определению бюллетеня International Society for Cellular therapy за 2003 г. биосовместимость – возможность сосуществования биосистемы в донорском организме без угнетения с его стороны морфогенетических потенций ткани, слагаемой клетками определенного типа. Для определения биосовместимости трансплантируемых клеток и, следовательно, для определения прогноза выживаемости клеток в организме донора рекомендуется использовать постановку тестов для определения цитотоксической активности сыворотки крови потенциальных реципиентов. Соль тетразолия 3-(4,5-диметилтиазол)-2,5-дифенилтетразолиум бромида (МТТ) воспринимается клетками и преобразуется митохондриальными дегидрогеназами в нерастворимый продукт (формазан), непроницаемый для клеточных мембран, что приводит к его накоплению внутри жизнеспособных, здоровых клеток. При разрушении клеток происходит высвобождение формазана, которое может быть зафиксировано фотоколориметрическим методом. Таким образом, способность клеток преобразовывать МТТ, может быть использовано для исследования жизнеспособности, активности, пролиферации и/или количества клеток.

В качестве тестируемой культуры клеток используется культура β -клеток поджелудочной железы непосредственно после 2 пассажа. При этом клетки снимаются с поверхности культуральных флаконов раствором ЭДТА (0,02% р-р), и вносятся в 96-луночные планшеты в концентрации 2×10^5 кл/мл. Одновременно вносят в среду инкубации сыворотку крови потенциального реципиента в конечной концентрации 20% и инкубируют в течение 2 сут. в атмосфере с содержанием 5% CO_2 при 37°C. В качестве контроля принимают количество жизнеспособных клеток в образцах инкубируемых с фетальной бычьей сывороткой (20%). После окончания периода инкубации в лунки вносится МТТ (10 мкл/100 мкл среды) на 4 ч. Для разрушения клеток и растворения кристаллов красителя используется диметилсульфоксид (99,9%). Оптическая плотность определяется на планшетном фотоколориметре при длине волны 570 нм. Количество жизнеспособных клеток (индекс цитотоксичности) оценивается по сравнению с контролем по формуле:

$$(D_{\text{контроль}} - D_{\text{образец}} / D_{\text{контроль}}) \times 100\%, \quad (1)$$

где D – оптическая плотность.

В случае превышения индекса цитотоксичности более чем 20% (то есть доля погибших под действием сыворотки потенциального реципиента клеток значительно превышает количество долю погибших клеток в контроле) не рекомендуется трансплантировать островковые клетки данному реципиенту.

Помещение клеток в контейнер для трансплантации

Макрокапсулу формируют из сетчатого плетеного полиамида с размером пор 5 мкм путем сворачивания мембран в цилиндр диаметром с перекрытием краев не менее 2 мм. Затем перекрытые области сближают с

помощью прямого зажима с усилием до полного сплавления при температуре 250°C (контроль – электрический термопарный термометр).

Имплантационной пластине придают с помощью зажима цилиндрическую форму путем сворачивания таким образом, чтобы сечение данного цилиндра представляло собой спираль. При этом необходимо обеспечить минимальную площадь захвата пластины браншами зажима. В то же время диаметр цилиндра должен быть меньше диаметра макрокапсулы для имплантации. После чего свернутую в спираль имплантационную пластину помещают внутрь макрокапсулы, избегая сминания.

Для герметизации капсулы используют стандартный анатомический пинцет, бранши которого разогревают над огнем спиртовой горелки и затем охлаждают (контроль – электрический термопарный термометр) до температуры 250°C. Затем торцевые края отверстия макрокапсулы сближают с некоторым усилием до полного сплавления. Контейнер должен находиться в свежей культуральной среде до момента помещения в организм реципиента не более 20 мин.

Проведение оперативного вмешательства по введению макрокапсулы в артерио-венозный шунт

Манипуляция производится в области локтевой ямки на кубитальных артерии и вене под общим наркозом. После мобилизации сосудов, их отжатия и продольного вскрытия просвета, непрерывным швом произведено формирование задней стенки анастомоза, имплантация капсулы с культурой β -клеток в просвет формируемого артерио-венозного свища 2 П-образными швами за концы капсулы и дальнейшее формирование передней стенки артерио-венозной фистулы. Для исключения значительного сброса крови, просвет артерио-венозной фистулы не превышает 3-4 мм с сохранением достаточного кровотока по магистральным сосудам. Проводится контроль герметичности анастомоза, контроль гемостаза и послойный шов раны.

Определение эффективности трансплантации

Реципиент должен наблюдаться у эндокринолога по месту жительства в обычном режиме. В течение первого года после трансплантации необходимо обследование реципиентов через 2, 6, 9, 12 месяцев и в дальнейшем каждые полгода.

Основными критериями эффективности трансплантации являются: снижение уровня фруктозамина не менее чем на 20% от предтрансплантационного уровня в течение 4 месяцев и снижение уровня гликозилированного гемоглобина на 10% через 6 месяцев после трансплантации от предтрансплантационного уровня.

Следующие показатели должны иметь четкую тенденцию к стабилизации в течение 12 месяцев после трансплантации:

- характер течения заболевания (оценка «качества жизни», что проявляется в увеличении физической и умственной активности пациентов не менее чем на 10% по шкале NAIF, субъективном ощущении того, что симптоматика диабета не нарастает);

- степень компенсации углеводного обмена (нормализация среднесуточной гликемии, уменьшение или исчезновение эпизодов гипер- и гипогликемии);
- суточная потребность в экзогенном инсулине (ее снижение, изменение профиля, вводимых инсулинов в сторону снижения потребности в инсулинах среднего и длительного действия);
- снижение и исчезновение болевого синдрома у больных с дистальной диабетической невропатией; уменьшение выраженности клинических проявлений висцеральной невропатии;
- стабилизация и улучшение картины глазного дна и острота зрения у больных с диабетической ретинопатией.

ПЕРЕЧЕНЬ ВОЗМОЖНЫХ ОСЛОЖНЕНИЙ ИЛИ ОШИБОК ПРИ ВЫПОЛНЕНИИ И ПУТИ ИХ УСТРАНЕНИЯ

1. Недостаточная ферментация на этапе получения фетальной ткани поджелудочной железы приводит к развитию в культуре избыточного количества фибробластных элементов (что проявляется отсутствием эпителиоподобных клеток на более чем 30% площади культурального флакона и зарастание данных площадей фибробластами). Данная ошибка может быть в ряде случаев исправлена путем осторожного пипетирования и переноса эпителиоподобных клеток и их кластеров на аналогичную культуральную посуду меньшей площади (30% площади (объема) от исходной).

2. Нарушение режимов иммобилизации клеток внутри имплантационной пластины. Проявляется отсутствием пролиферации клеток или же их малой скоростью пролиферации (менее 20% от первоначального количества за 4 сут.). Данная ошибка может быть решена только путем подготовки новой культуры и иммобилизации клеток в новой пластине.

Приложение 1

Форма № 1

Отпуск материала разрешен
Руководитель учреждения

«__»_____

Бланк запроса о получении клеточного материала для клинической
трансплантации

1. Учреждение _____

2. Тип запрашиваемого клеточного материала _____

3. Цель приобретения _____

4. Количество запрашиваемого клеточного материала _____

5. Ф.И.О. потенциального
реципиента _____

6. Диагноз клинический
развернутый _____

7. Показания для трансплантации
клеток _____

8. Согласие реципиента на трансплантацию получено _____
(да, нет – вписать)

Руководитель учреждения _____
(дата, подпись)

Лицо, ответственное за проведение
манипуляций по трансплантации _____
(дата, подпись)

М.П.

Пример сопроводительной документации, прилагаемой
к культуре клеток щитовидной железы для
трансплантации в контейнерах с микропористой стенкой
согласно СТБ 1155-99

Аналитический паспорт

Культура островковых клеток поджелудочной
железы для единичной трансплантации (инкапсуляции)
(одна трансплантационная единица)

Дата получения: 05.04.06

Количество: 4 340 000 кластеризованных жизнеспособных островковых
клеток.

№	Наименование показателей	Допустимые пределы	Результат
1.	Состав	кластеризованные жизнеспособные клетки	Соответствует
2.	Описание	Однородная суспензия желтоватого цвета	Соответствует
3.	рН раствора	6,8-7,2	Соответствует
4.	Плотность раствора	1,0-1,3	Соответствует
5.	Размер частиц	Не более 300 мкм	Соответствует
6.	Микробиологическая чистота	Полное отсутствие микроорганизмов по результатам микробиологических тестов в аккредитованной микробиологической лаборатории	Соответствует
7.	Жизнеспособность	Не менее 85% жизнеспособных клеток по тесту с трипановым синим	Соответствует
8.	Количественное определение	10^6 - 10^7 клеток и их кластеров	Соответствует
9.	Транспортирование	При 37°C в герметичном контейнере	Соответствует
10.	Хранение	Экстемпоральное средство Использовать в	Соответствует

		течение 20 мин.	
11.	Основное действие	Производство инсулина не менее 2000мкЕд/мл/сут под действием 20мМ глюкозы.	Соответствует

ЗАКЛЮЧЕНИЕ: Культуры представлены кластеризованными жизнеспособными клетками. Общее количество клеток и их кластеров в имплантате составляет не менее 4 340 000. Культуры обладают выраженной инсулинпродуцирующей активностью. Культуры не контаминированы микроорганизмами по результатам микробиологических тестов, не обладают опухолеобразующей активностью.