

МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ

УТВЕРЖДАЮ
Первый заместитель Министра

_____ В.В. Колбанов
10 февраля 2006 г.
Регистрационный № 055-0504

**ТРАНСПЛАНТАЦИЯ КУЛЬТУРЫ ОСТРОВКОВЫХ КЛЕТОК
ПО МАЛОИНВАЗИВНОЙ МЕТОДИКЕ В СОСУДИСТОЕ РУСЛО**

инструкция по применению

УЧРЕЖДЕНИЕ-РАЗРАБОТЧИК: УО «Белорусский государственный
медицинский университет»

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

Минск 2007

ПЕРЕЧЕНЬ НЕОБХОДИМОГО ОБОРУДОВАНИЯ, РЕАКТИВОВ, ПРЕПАРАТОВ, ИЗДЕЛИЙ МЕДИЦИНСКОЙ ТЕХНИКИ

1. Автоклав.
2. Автоматические микропипетки со стерильными наконечниками.
3. Анализатор иммуноферментный АИФ-340, или мультискан.
4. Весы аналитические.
5. Весы торсионные.
6. Вытяжной шкаф с ламинарным потоком для культуры клеток (класса 2).
7. Инструменты лабораторные: пинцеты, ножницы, зажимы.
8. Иономер (рН-121).
9. Микроскоп инвертированный.
10. Пипетки стеклянные на 1, 5, 10 мл.
11. Посуда лабораторная (чашки Петри, бутылки, колбы).
12. Пробирки стерильные центрифужные с крышками.
13. СО₂-инкубатор.
14. Стеклянные предметные и покровные.
15. Стерильная клейкая лента для заклеивания культуральных панелей.
16. Стерильные плоскодонные 96-луночные пластиковые планшеты.
17. Стерильные стеклянные флаконы для культуры клеток.
18. Термостат, регулируемый водяной.
19. Флаконы емкостью 50, 250, 500 мл.
20. Фильтры миллиметровые для стерилизации 0,22 мкм.
21. Холодильник (- 20°C, + 4°C).
22. Центрифуга на 1-5 тыс. об/мин.
23. Центрифужные пластиковые пробирки объемом 0,5-10,0 мл.
24. Шприцы.
25. Штативы (для фиксации флаконов).

Реактивы

1. Нерес (буфер).
2. Альбумин.
3. Антибиотики: гентамицин, пенициллин, стрептомицин.
4. Глюкоза.
5. Коллаген.
6. Коллагеназа.
7. Натрия бикарбонат (сух, х/ч).
8. Натрия гидроксид (х/ч).
9. Нейтральный красный (0,1% р-р).
10. Нейтральный красный 1%.
11. Перкол (фиколл) – раствор (1020).
12. Полиамид плетёный.
13. Раствор дитизона (5%).
14. Раствор Хенкса (рН 7,4).
15. Селективные среды: PPLO, тиогликолевая среда, среда Сабуро.

16. Силиконовое масло.
17. Среды культуральные (RPMI-1640, 199, IMDM, DMEM).
18. Сыворотка крови эмбрионов крупного рогатого скота.
19. Трипановый синий.
20. Физиологический раствор.

Использование малоинвазивного метода ксенотрансплантации культуры β -клеток в сосудистое русло предполагает ряд дополнительных мероприятий как при подготовке клеточного материала, так и при отборе реципиентов.

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).

Клеточная биомасса, необходимая для трансплантации может быть получена на базе специализированных лабораторий по цитотехнологии при высших учебных медицинских учреждениях, имеющих при себе виварии, а также в цитологических лабораториях крупных клинических центров. В ином случае следует направлять заявку по форме № 1 в ЦНИЛ БГМУ для получения соответствующего материала¹ (Приложение 1).

1. Отбор реципиентов

Для проведения операции трансплантации рекомендуется отбирать реципиентов с I типом сахарного диабета в возрасте от 18 до 65 лет, болеющих не менее 3 лет, имеющих частые гипер- и гипогликемические эпизоды несмотря на активную инсулинотерапию. Также кандидат должен иметь согласие и желание представить соответствующую информацию о течении заболевания, как в пре- так и в постоперационный период.

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

- беременность или лактация;
- возраст менее 18 лет;
- медицинский или психиатрический риск, нарушающий получение нормальной информации;
- невозможность возвращения в клинику для повторного обследования;
- заболевания сердца; входящие по Нью-йоркской классификации в группу 3 или 4;
- инфаркт миокарда, перенесенный за последние 6 месяцев;
- острые «интеркурентные» заболевания, могущие нарушить проведение обследования и лечения;
- другие противопоказания к хирургическим вмешательствам;

¹ ЛБМИ, ЦНИЛ, БГМУ пр. Дзержинского 83а, Минск, Беларусь.

- активный алкогольный анамнез;
- наличие в анамнезе онкологических заболеваний.

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 культурой 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 фибринмономеров (РКФМ); 10) комплекс антитромбина III желательного 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 (Becton Dickinson kits), соотношение субпопуляций Т-лимфоцитов – иммунорегуляторный индекс (CD4/CD8), доля В-лимфоцитов, активационные лимфоцитарные маркеры (Coulter kits) – CD25, CD71, маркера апоптоза – CD95 (AMSBiotechnology kits).

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 в уменьшенном количестве 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, что, по-видимому, может быть обусловлено повреждающими эффектами в случае длительного течения 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 .

Также рекомендуется при возможности отбор потенциальных реципиентов в группе с более низкими плазменными концентрациями интерлейкина-1 и аутоантител к ТФ-2 и высоким уровнем CD95-маркера лимфоцитов позволяет снизить риск отторжения инкапсулированных донорских β -клеток, о чем свидетельствует ряд цитотоксических тестов.

2. Технология использования метода

При работе с культурами клеток следует четко выполнять методические инструкции для предотвращения микробной контаминации клеточных культур и защиты от контаминации культуральными материалами окружающего рабочего пространства¹. Вся работа должна проводиться в специальных стерильных помещениях или ламинарных боксах.

2.1. Получение материала для культивирования

На этапе подготовки животных для забора у них клеточного материала следует производить тщательное ежедневное наблюдение за состоянием поголовья. Выявление в популяции кроликов животных, подозрительных на вирусно-инфекционные заболевания, исключает возможность использования особей из данной популяции для нужд клеточной трансплантации на протяжении 3 месяцев после элиминации больных и подозрительных в плане заболеваний животных.

Новорожденных кроликов забивают путем декапитации. Их поджелудочную железу извлекают в стерильных условиях и переносят в стерильную чашку Петри, в раствор с антибиотиками (пенициллин – 100 Ед/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 15%-ым раствором коллагеназы 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 в течение 40 мин при температуре 37°C (Шумаков В.И. и др., 1981).

¹ Аттестация перевиваемых клеточных линий – субстратов производства и контроля медицинских и иммунобиологических препаратов. – М., 1989 (РД 42-28-10-89).

2.2. Выделение клеток

Вышеуказанные фракции объединяют, полученную суспензию отмывают стерильной средой 199 дважды и переносят для дальнейшей сепарации в градиент стерильного перкола. Дальнейшее разделение клеток производят на перколе путем центрифугирования при 1200G. Клетки собирают на градиенте перкола, отмывают с физиологическим раствором, доводят до конечной концентрации 450-550 тыс. клеток/мл с помощью соответствующего количества среды RPMI1640 с 10% нативной сыворотки крупного рогатого скота и помещают в культуральные пластиковые флаконы с ростовой средой которые затем помещают в CO₂-инкубатор (5% CO₂) и инкубируют при 37°C.

2.3. Культивирование клеток

Через 2 суток, после прикрепления клеток следует сменить ростовую среду. В дальнейшем смена среды проводится 1 раз в два дня или при необходимости чаще. Культура, получаемая из поджелудочной железы новорожденных кроликов, состоит из двух основных фракций: флоатирующей и прикрепленной (к дну культурального флакона). Прикрепленная фракция представляет собой многочисленные очаги прикрепления культивируемых 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. В процессе культивирования β-клетки, расположенные на периферии флоатирующих культур, имеют склонность мигрировать к свободному краю культуры и отделяться от последнего. 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 дуплеты, триплеты и кластеры, при этом формируется гнездообразный (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. Наблюдения до момента использования культуры (14-20 сут.) для трансплантации должны указывать на то, что культура во флаконах находится в стационарной фазе роста, то есть, при наблюдении в течение 3 сут. не происходит микроскопически визуализируемого изменения состава клеточных элементов. С этого момента часть культуры с помощью осторожного пипетирования может быть отобрана для дальнейших тестов и помещения в имплантационную пластину. После проведения 2-го пассажа клетки и их кластеры отбираются путем мягкой версензации. Допустимо использование раствора коллагеназы в

концентрации 0,25 мг/мл. Полученную взвесь следует отцентрифугировать при 300G в присутствии 5% фетальной сыворотки и поместить внутрь имплантационной пластины.

2.3.1. Ориентация клеток с помощью имплантационной пластины

1. Приготовить рабочее разведение культуральной среды ДМЕМ 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: 2,2 г бикарбоната натрия и Нерес (4,8 г) 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 в рабочем разведении и 0,25 мл восстанавливающего буфера, все держать на льду.

6. Осадить клетки центрифугированием и, используя охлажденную пипетку, осторожно добавить 2 мл раствора коллагена (4%) к клеткам, поворачивая пробирку, чтобы перемешать раствор. Избегать образования пузырьков воздуха.

7. Поместить плетеную полиамидную пластину на смоченную средой чашку Петри.

8. Смешать полученный в пункте 6 раствор с 0,5 мл полученного в п. 5 раствора (ДМЕМ и восстанавливающего буфера).

9. Добавить к раствору полученного в п. 8 гидроксид натрия (10 М-10 мкл).

10. Наслоить полученный раствор с клетками на всю площадь плетеной полиамидной основы, выровнять пластмассовым шпателем уровень 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, продолжить инкубацию в обычном режиме на протяжении 6 дней с ежедневной сменой культуральной среды до полной ориентации клеток на полиамидной сети и резорбции коллагена.

2.4. Проверка культуры на микробиологическую чистоту

Микробиологический и вирусологический контроль, а также контроль туморогенности проводится согласно методическим рекомендациям «Аттестация перевиваемых клеточных линий-субстратов производства и контроля медицинских и иммунобиологических препаратов» (М., 1989, РД 42-28-10-89) и приказу МЗ РБ № 31. Для этого часть культуры и надосадочной жидкости должны быть отправлены в микробиологическую лабораторию. Кроме обследования, позволяющего исключить наличие в культуре бактериальной флоры, рекомендуется постановка тестов 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 средах для заключения об отсутствии деструкции клеток под действием цитопатогенных вирусов.

2. Контроль культуры на микоплазмы проводится с использованием селективной среды (PPL0) – 0,5% агар, приготовленный на ферментативном переваре сердечной мышцы.

3. Контроль культуры на микотические загрязнения проводят путем посева проб на питательные среды: Питательный бульон с 0,3% глюкозой. Тиогликолевая среда. Среда Сабуро жидкая.

2.5. Тестирование культуры на туморогенность

Часть полученной суспензии клеток отбирают для тестирования на туморопластическую активность, для чего вводят циклоспорин-примированным новорожденным белым мышам подкожно и внутрибрюшинно по 0,1 мл (в дозе 100 000 клеток). Контроль – культура HeLa. Животных наблюдают в течение 15 сут., после чего пунктируют брюшную полость с забором асцитической жидкости (если таковая имеется). Отсутствие узелковых образований в местах введения и отсутствие асцитической жидкости с недифференцированными клеточными элементами свидетельствует об отсутствии туморогенности культуры.

2.6. Оценка структурно-функциональной состоятельности культуры

2.6.1. Идентификация β -клеток

Для дифференцировки β -клеток в тестируемых культурах применяют дитизон (Fiedor P., 1995). 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. Большое увеличение позволяет убедиться в том, что окраску воспринимает гранулярный аппарат клеток и в гораздо меньшей степени их цитоплазма.

2.6.2. Идентификация высоко-функциональных β -клеток

Для идентификации и подсчета высоко-функциональных β -клеток используют антитела к инсулину, меченые флуоресцентными метками (Rieneck K. и др., 2000). Исследование проводят с помощью конфокального микроскопа с длиной волны возбуждения 488нм (для FITS-меченых антител). β -клетки и клеточные кластеры, иммобилизовавшиеся в процессе культивирования на покровных стеклах, бережно отмывают от среды. Затем стекла помещают в раствор Перес-буфера (рН 7,4), содержащего 6,5 мМ глюкозы и меченые антитела в концентрациях, рекомендованных фирмой-изготовителем (для антител фирмы Sigma I2018 рекомендованная концентрация составляет $8,8 \times 10^9 \text{ M}^{-1}$ (в рабочем разведении 1:1000) и конъюгирующих антител F1641 – 1:32) на срок не более 30 мин. После чего образцы вновь бережно отмывают от реагента со средой и сразу же исследуют с помощью микроскопа. В сбалансированной культуре количество клеток воспринимающих зонд составляет в среднем 30%.

2.6.3. Оценка метаболической активности β -клеток

Для тестирования клеток на проточном цитофлюориметре по методике (Stassi R. и др. 1995) часть сепарированной культуры направляют в специализированную лабораторию. Тестирование позволяет идентифицировать метаболически-активные β -клетки в случае если их доля в суспензии составляет не менее 75%. Наблюдение ведется в режиме гейтирования субпопуляций, обладающих FAD-активностью. В культуре пригодной для трансплантации количество метаболически активных β -клеток должно составлять не менее 90%.

2.6.4. Оценка функциональной активности культуры

Методом, подтверждающим функциональную состоятельность популяции β -клеток, являются результаты тестирования клеток на инсулин-продуцирующую активность с помощью набора для определения иммунореактивного инсулина ХОП ИБОХ. В результате тестирования средняя активность инсулина в культуре (после полной смены среды и стимуляции клеток 20 мМ глюкозой в течение суток) должна составлять не менее 1000 нМоль/л.

2.6.5. Оценка количества и жизнеспособности клеток

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

2.7. Помещение клеток в контейнер

Клеточную пластину осторожно снимают с поверхности культуральной посуды и помещают внутрь макрокапсулы. Для герметизации капсулы используют стандартный анатомический пинцет, бранши которого разогревают над огнем спиртовой горелки и затем охлаждают (контроль – электрический термометр) до температуры 250°C. Затем 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.

3. 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 превышал 3-4 мм с сохранением достаточного кровотока по магистральным сосудам. Проводится контроль герметичности анастомоза и контроль гемостаза. Послойный шов раны.

4. Определение показателей, характеризующих компенсацию углеводного обмена

1) Степень компенсации углеводного обмена (нормализация среднесуточной гликемии, уменьшение или исчезновение эпизодов гипер и гипогликемии);

2) суточная потребность в экзогенном инсулине (ее снижение, изменение профиля, вводимых инсулинов);

3) стабилизация лабораторных показателей (одним из основных показателей является уровни фруктозамина и гликозилированного гемоглобина; показатели первого должны понизиться не менее чем на 20% в течение 2 месяцев, второго – не превышать уровня 10% через 6 месяцев после трансплантации).

Приложение 1

Форма № 1

Отпуск материала разрешён

Ректор БГМУ

Беспальчук П.И.

«__»_____

Бланк запроса для получения клеточного материала для клинической трансплантации.

(ЛБМИ, ЦНИЛ, БГМУ. пр. Дзержинского 83а, Минск, Беларусь)

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.