

TERAPIA CELULARĂ A DIABETULUI ZAHARAT TIP I

(Review)

Victoria Trifan, Alexei Corobciuc, Viorel Nacu

Laborator Inginerie tisulară și culturi celulare. USMF "Nicolae Testemițanu"

Summary

The cellular therapy of type 1 diabetes mellitus

Type 1 diabetes is an autoimmune disease in which pancreatic beta cells are destroyed. The classical method of treatment, including substituted insulin injection, creates discomfort for patients. Nowadays as alternative methods of type 1 diabetes treatment are: autogenous or alogenuous cells transplantation, embryonic stem cells, xenogenous transplantation and genetic therapy.

Rezumat

Diabetul zaharat de tip I este o maladie autoimună caracterizată prin distrugerea celulelor beta pancreatice. Terapia clasică se efectuează prin administrarea substitutivă a insulinei creând astfel un disconfort pentru bolnavi. Actualmente ca metode alternative de tratament se utilizează transplantarea autogenă, transplantul alogen, celulele stem embrionare, xenotransplantul și terapia genică.

Cuvinte cheie: Diabetul zaharat de tip I, transplant celular, terapie genică.

Actualitatea temei

Diabetul zaharat este una din problemele majore ale medicinei contemporane, deoarece este o maladie autoimună și este diagnosticată când sunt distruse deja 60-80% din celulele insulin-producătoare ale pacientului. Actualmente nu există metode eficiente de a stopa acest proces și acești bolnavi sunt nevoiți toată viața să-și administreze insulina.

Conform datelor Organizației Mondiale a Sănătății, în prezent, pe glob, peste 240 mln persoane suferă de diabet zaharat, iar potrivit prognozelor, în următorii 20 de ani acest număr va constitui 380 milioane [22].

Potrivit datelor statistice, în anul 2006 în Republica Moldova au fost înregistrate 45 845 persoane cu diabet zaharat, inclusiv 393 copii. Pe parcursul anului trecut (2007) au fost înregistrate 6 828 cazuri noi de diabet zaharat, dintre care 56 la copii. 20% din numărul total au diabet de tip I [22]. Anual, din buget, se cheltuie cel puțin 30 000 lei per bolnav.

Terapia celulară a diabetului tip I pare mai avantajoasă în comparație cu alte metode de tratament. Utilizarea celulelor cu proprietăți insulin-secretorii diminuează necesitatea administrării insulinei. Tehnologiile celulare ar putea, în caz de găsire a metodelor optime de utilizare, să diminueze, sau să excludă dereglările metabolice ce apar ca rezultat al insuficienței de insulină [4,19].

METODE DE TRATAMENT

1. Metoda clasică (administrare substitutivă de insulină)

Insulina se administrează subcutanat și numai în cazul comei diabetice la indicația medicului – intravenos. La administrarea subcutană activitatea hipoglicemică începe aproximativ peste 20-30 min de la injectare și finalizează în 6-7 ore. Pe cale intravenoasă începe imediat și se sfârșește după 90 min. De regulă, bolnavul își injectează singur insulina, de 3 ori pe zi, cu 15 min înaintea fiecărei mese. Dozele se stabilesc în dependență de toleranța la glucide [10].

O metodă modernă de administrare a insulinei este utilizarea așa numitului "pancreas artificial", care permite eliberarea continuă de insulină prin catetere plasate în țesutul subcutanat. Pancreasul artificial conține un senzor, un program computerizat și o pompă de insulină ce calculează cantitatea de insulină necesară pentru menținerea unui nivel normal de glucoză în sânge. Pentru prima dată a fost utilizat de către cercetători din Marea Britanie în ianuarie 2007, la copii cu diabet de tip I. Scopul testelor a fost de a perfecționa algoritmul programului astfel încât senzorul de glucoză să poată transmite datele pompei de insulină în mod eficient și să imite activitatea unui pancreas normal [22].

2. Grefele autologice

O lucrare de o importanță „globală” a fost publicată în anul 2003 de către grupul lui Andreea Ianus, unde a fost arătată posibila diferențiere a celulelor MO (măduvă osoasă) la șoareci în celulele beta *in vivo*. Celulele MO au fost modificate genetic în așa mod, că la inițierea sintezei insulinei ele începeau să producă și proteina fluorescentă verde (la microscopia fluorescentă „lumina în verde”). Peste 4-6 săptămâni după transplantare aproximativ 2-3% din celulele MO ale donatorului „luminau”, în cazul eficacității integrării de 70-90%. Aceste celule au fost selectate și aveau markerii caracteristici celulelor beta, sintetizau insulină și răspundeau la stimularea cu glucoză [2].

Datele recente sugerează ca celulele MO au capacitatea de a se diferenția în diferite tipuri de celule inclusiv în celule producătoare de insulină, care formează conglomerate de celule insulino-producătoare cu arhitectură similară insulelor Langerhans. Ele conțin markeri caracteristici pentru insulină, glucagon, somatostatina și polipeptidul pancreatic. Când aceste agregate au fost transplantate sub capsula renală la șoarecii hiperglicemici s-a observat micșorarea nivelului glucozei în sânge și menținerea nivelului normal al glucozei circa 90 de zile după transplantare. În afară de aceasta, la microscopia electronică s-a depistat că acest agregat are ultrastructură tipică celulelor beta mature. Aceste rezultate demonstrează că celulele mature ale MO sunt apte să se diferențieze în structuri pancreatice *in vitro* și posibil reprezintă celulele care pot fi utilizate pentru tratamentul diabetului zaharat [6, 20].

Izolarea celulelor umane a fost performată prin metoda Ricordi. Activitatea celulelor a fost confirmată prin trei metode: colorarea cu detizon (celule ce conțineau insulină se colorau în roșu-aprins); colorarea imuno-fluorescentă a chisturilor; RT-PCR-ul semicantitativ pentru insulină [8].

Susan Bonner-Weir și colegii ei au raportat, că celulele ductale primare izolate din țesutul pancreatic uman adult ar putea fi induse să diferențieze în clustere ce conțin celule ductale și endocrine. După o perioadă de 3-4 săptămâni de cultivare, celulele secretă o cantitate mică de insulină fiind expuse la o concentrație mică de glucoză și o cantitate mare de insulină fiind expuse la o concentrație mare de glucoză. S-a constatat prin metode histochimice și ultrastructurale că aceste clustere conțin celule endocrine [3]. Probabil s-ar putea, în principiu, de a extrage prin biopsie celule ductale de la pacient, ulterior cultivându-le pentru a obține cantitatea necesară de celule, după care să fie transplantate donatorului [3,11]. Cercetătorii, împreună cu o echipă de la Ixion Biotechnology, au cultivat celule ductale pluripotente de la șoareci adulți, diabetici, fără obezitate, colectate până la apariția bolii. Din țesutul extras au fost obținute celule care s-au diferențiat, pe parcursul următoarelor luni, în insule Langerhans complet funcționale, capabile de a produce insulina. Pentru a confirma funcționarea celulelor, cercetătorii au adăugat concentrații crescânde de nicotinamidă (care stimulează secreția de insulină) și glucoză, iar ca răspuns celulele au început să producă insulina. În etapa următoare, celulele s-au transplantat sub capsula renală la șoareci diabetici. Deși au fost diminuate treptat dozele de insulină folosite până la transplantare, șoarecii respectivi au rămas sănătoși. Ei au fost sacrificați la intervale diferite, timp de 55 de zile, constatându-se că celulele transplantate continuau să secrete insulina [1]. Aceste experimente preliminare arată, că transplantarea de celule pancreatice insulare, derivate din celule stem, sunt capabile să oprească diabetul la șoareci. Și o asemenea sursă de țesuturi, este mai bună decât țesutul fetal și poate duce, chiar, la realizarea de transplanturi cu țesut pancreatic autolog. Este posibil de cultivat țesutul pancreatic de la pacienții cu diabet care încă mai au celule insulare funcționale, care pot fi crescute și multiplicare pentru transplantare ulterioară. Drept urmare, nu numai că se va elimina riscul asociat de rejecția țesutului străin, ci nici nu va mai fi nevoie, probabil, de administrarea zilnică a injecțiilor cu insulină [1].

3. Celulele stem

Sângele ombilical, fiind o sursă bogată în celule stem hematopoietice și care poate fi ușor colectată fără riscuri pentru mamă și făt.

Prima lucrare despre transplantarea celulelor din sângele ombilical în cazul diabetului experimental a fost publicată în anul 2002. Ca rezultat al transplantării s-a micșorat glicemia și a crescut durata de supraviețuire a animalelor cu diabet de tip I, după introducerea sistematică a celulelor mononucleare din sânge ombilical uman. Celulele mononucleare au fost separate din sângele ombilical prin gradientul de centrifugare [9, 20].

În viitor, probabil, va fi posibil să se colecteze celule stem din sângele periferic, iar după cultivare să le reinfuzeze, dirijându-le în așa mod, ca ele să se îndrepte anume spre acel organ, care necesită regenerarea, evitându-se reacția de respingere a grefei și eliberând recipientul de necesitatea utilizării preparatelor imunosupresive. Prin utilizarea complexelor de semnale ce se conțin în pancreasul embrionar la șoarece, se stimulează celulele stem mature de a se diferenția în structuri asemănătoare insulelor pancreasului[7]. S-a dovedit că celulele stem din sângele ombilical ca și celulele stem embrionare, produc atât C-peptidul, parte a proteinei precursoră a insulinei, cât și insulina. Prezența peptidului C, demonstrează că, cel puțin parțial, insulina depistată a fost produsă de aceste celule diferențiate [17].

Melton, Nissim Benvenisty, Universitatea Hebrew din Ierusalim și Josef Itskovitz-Eldor din Technion, Haifa, Israel, sugerează că celulele stem embrionare umane pot fi manipulate în cultură ca să exprimeze gena PDX-1 – responsabilă de transcripția insulinei. Acestea au fost tratate cu diferiți factori de creștere, inclusiv cu NGF (nerve growth factor). Toate celulele, inclusiv cele care nu au fost tratate cu NGF expresau PDX-1 [12]. Aceste rezultate sugerează că celulele beta insulare probabil sunt unul din tipurile de celule care se diferențiază spontan în embrion. Cercetătorii consideră că acest factor nervos de creștere posibil este unul din semnalele cheie pentru inducerea diferențierii celulelor beta insulare [5].

O prioritate potențială a celulelor embrionare este că ele, fiind mai plastice, pot fi induse să exprimeze genele corespunzătoare și în acest caz ele nu ar fi depistate ca celule străine de sistemul imun al recipientului[7].

4. Transplant alogen

Alotransplantul este foarte bun, dar, din punct de vedere comercial nu este rentabil datorită numărului mic de potențiali donatori (persoane decedate sau cu moarte cerebrală). După care se izolează și se separă insulele Langerhans de restul pancreasului prin enzimizarea lui, suspensia obținută este prelucrată în “camera Ricordi”, un dispozitiv care, printr-o serie de procedee, chimice și mecanice separă insulele Langerhans din țesutul pancreatic[14,17].

Transplantarea se face cu anestezie locală și sedare ușoară, prin ghidare cu ultrasunete se introduce un cateter în vena portă. Similar cu o perfuzie intravenoasă, celulele purificate curg prin cateter, prin vena portă, către ficat unde se atașează și încep să producă insulină[14, 21].

Totodată s-a constatat distrugerea celulelor implantate este precedată de o creștere a markerilor ce țin de sistemul imun, proces care începe cu câteva săptămâni înainte de creșterea glicemiei. La pacienții al căror sistem imun a acceptat celulele implantate nu au prezentat o creștere a acestor markeri specifici. Astfel este necesară o monitorizare constantă a reacției sistemului imun la greafă, pentru a interveni adițional cu scop de protejare celulelor producătoare de insulină [13,14].

5. Terapia genică

Bernat Soria și colegii lui de la Universitatea Miguel Hernandez în San Juan, Alicante, Spania, au adăugat un fragment de ADN ce conține gena insulinei la celulele embrionare de la șoareci. Gena insulinei a fost lincată la o altă genă care asigură rezistența lor la antibiotice. Cultivând celulele în prezența antibioticelor, numai acele celule care activau promotorul insulinei, au supraviețuit. Celulele cultivate în prezența unei concentrații mici de glucoză au răspuns la schimbarea concentrației de glucoză, mărind secreția insulinei aproape de 7 ori. Celulele obținute au fost implantate în splina șoarecilor diabetici, după care simptomele diabetului au dispărut [8].

7. Xenotransplantul

Celulele insulinice extrase de la porcine reprezintă cel mai bun xenotransplant deoarece insulina secretată de acestea diferă de cea umana printr-un singur aminoacid. Deși această

procedură a fost deja efectuată (în Moldova N. Vicol), nu este clar cât timp aceste celule rămân funcționale în organism. Pentru prevenirea rejecției xenogrefelor au fost propuse trei metode de imunoizolare a celulelor pancreatice obținute de la alte specii: bazată pe perfuzie (proteze vasculare); difuzie cu macroincapsulare și difuzie cu microincapsulare.

Metoda cu proteza vasculară este bazată pe instalarea protezei (tub acoperit din exterior de membrana impermeabilă, iar din interior comunică cu lumenul vasului prin membrană semipermeabilă, între ele fiind plasate celulele pancreatice) pe traiectul fluxului sanguin venos sau șunturi arterio-venoase. A fost constatată o viabilitate mare ale celulelor, dar și multiple tromboze la nivel de proteză [18].

Microincapsularea este bazată pe incorporarea celulelor în acid algic, alginat (polizaharid), agaroză. Viabilitatea grefei celulare a fost de aproximativ 9 luni, moartea survine din cauza fibrozării microcapsulelor, urmată de hipoxie. Macroincapsularea include plasarea celulelor în capsule mari, reprezentând membrană semipermeabilă. Viabilitatea insulelor a durat aproximativ 4 luni. Au fost evidențiate 2 probleme: prima - agregarea celulelor în interiorul capsulei ce ducea la necroză în centrul conglomeratului din cauza hipoxiei (problema a fost soluționată prin introducerea agarozei în interiorul capsulei ce exclude formarea de conglomerate); a doua - care nu a fost soluționată, este fibrozarea capsulei[15].

Concluzii

Majoritatea metodelor precăutate au în esență transplantarea celulelor insulin-producătoare, fiecare din ele având anumite avantaje și dezavantaje. Totodată rămân multiple probleme legate de supravețuirea celulelor transplantate, adică de selectarea acelor grefe celulare cu histocompatibilitate majoră și posibilitate de integrare în organismul recipientului. Oricum, terapia celulară pare o metodă mai avantajoasă, comparativ cu metoda care utilizează insulina ca metodă de tratament.

Bibliografie

1. Abi Berger. Transplanted pancreatic stem cells can reverse diabetes in mice. *BMJ*, 2000; p.320:736.
2. Andrea Ianus, George G. Holtz, Neil D. Theise, Mehbood A. Hussain. In vitro derivation of glucose-competent pancreatic endocrine cells from bone marrow without evidence of cell fusion. *The Journal of clinical Investigation*. 2003, vol.111, no.6:843-850.
3. Bonner-Weir S., Taneja M., Weir G.C., et al. In vitro cultivation of human islets from expanded ductal tissue. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2000, 97, 7999-8004.
4. Hideto Kojima, Mineco Fujimiya, et al. Extrapancreatic insulin-producing cells in multiple organs in diabetes. *PNAS*, 2004, vol.101, no.8, 2458-2463.
5. Schuldier M., Yanuca O., et al. Effects of eight growth factors on the differentiation of cells derived from human embryonic stem cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2000, 97:11307-11312.
6. Seh-Hoo Oh, Toni M Muzzonigro, Si-hyun Bae, et al. Adult bone marrow-derived cells transdifferentiating into insulin-producing cells for the treatment of type I diabetes. *Laboratory Investigation*, 2004; 84: 607-617.
7. Soria B., Roche E., Berna G., et al. Insulin-secreting cells derived from embryonic stem cells normalize glycaemia in streptozotocin induced diabetic mice. *Diabetes*, 2000; 49: 157-162.
8. Susan Bonner-Weir, Monica Taneja, Gordon C. Weir et al. In vitro cultivation of human islets from expanded ductal tissue. *PNAS*. 2000, vol.97, no.14: 7999-8004.
9. Трансплантация моноклеарных клеток пуповинной крови снижает уровень гликемии и нормализует функцию почек при экспериментальном сахарном диабете. По материалам *Biochem Biophys Res Commun*. 2004; 321: Журнал "Клеточная трансплантология" p.168-171.
10. Bretzel R. G., Hering B. J., Brandhorst D. et al., *Diabetologia*. - 1994. -Vol. 37. - Suppl. 1, p. 38.

11. Berney Thierry, Molano R. Damaris, Cattan Pierre, et al Endotoxin mediated delayed islet graft function is associated with increased intra-islet cytokine production and islet cell apoptosis. *Transplantation*: Volume 71(1) 15 January 2001, p. 125-131
12. Drucker DJ :Glucagon-like peptides: regulators of cell proliferation, differentiation, and apoptosis. *Molecular Endocrinology* 17 (2): 161-171
13. Bouwens L, Rooman I :Regulation of pancreatic Beta Cell Mass. *Physiol. Rev.* 85: , 2005, 1255-1270
14. Alejandro R., Lehmann R., Ricordi C. et al., *Diabetes.*- 1997. Vol. 46. -P. 1983 -1989
15. Gruessner A., Sutherland D. E. R., Pancreas transplants for United States (US) and non US cases reported to International Pancreas Transplant Registry (IPTR) and to the United network for organ sharing (UNOS), In: Cecka M., Terasaki P (eds): *Clinical transplants*, 1997, Los Angeles, UCLA Tissue Typing laboratory, 1998
16. Seh-Hoon Oh, Toni M Muzzonigro, Si-Hyun Bae, Jennifer M LaPlante, Heather M Hatch and Bryon E Petersen. Adult bone marrow-derived cells trans-differentiating into insulin-producing cells for the treatment of type I diabetes *Laboratory Investigation* (2004) 84, 607–617
17. Yuval Dor, Juliana Brown, Olga I. Martinez, Douglas A. Melton Adult pancreatic β -cells are formed by self-duplication rather than stem-cell differentiation. *Nature*, Vol 249, 2004, p.41-46.
18. Todorov I.T., Schezhing K.I., Grzeisak J.J., Cruz-Aranda G., Stubban C.B et al Expansion of Functional Adult porcine Islet Cells in Vitro Using Purified Laminin 5. *Transplantation Proceedings.*, 30, 1998. p. 455
19. Hideto K., Mineko F., Kazuhiro M. and all. Extrapancratic insulin-producing cells in multiple organs in diabetes. *PNAS*, Feb. 24, 2004, Vol 101, 2008, p. 2458-2463.
20. Burt R., Oyama Yu., Traynor A., Kenyon N. Hematopoetic stem cell therapy for type 1 diabetes: induction of tolerance and islet cell neogenesis.
21. Penforis A. Langerhans Islet Preparation in Cell Transplantation. *Transfus. Sci.* Vol 18, No.2, 1997, p. 235-241.
22. www.ms.md/public/policies/diabet

ARAHNOPIAFILUM – BIOMATERIAL NOU DE SUTURARE ÎN CHIRURGIE

Radu Turchin

Catedra Chirurgie operatorie și Anatomie topografică

Summary

***Arahnopiafilum* - new biological material of suture in surgery**

A new suture biomaterial for wide surgical practice has been obtained from such anatomical underlayers as arahnoida and pia mater of the spinal cord. This suture material has improved quality characteristics: simplicity of storage and sterilization, complete resorbtion, minimal antigenic properties, high durability and elasticity, low swelling, capillarity and resistente to infection.

Rezumat

Pentru folosirea largă în chirurgie se propune un biomaterial nou de suturare *arahnoafiafilum*, obținut din arahnoidă și pia mater medulară a animalelor. Acest material de suturare are calități avansate: simplitatea obținerii și sterilizării, rezorbabilitatea completă, proprietăți antigenice minimale, durabilitate și elasticitate înaltă, imbițiție și capilaritate mică și rezistență la infecții.