

UNIVERSITATEA "TITU MAIORESCU"

FACULTATEA DE MEDICINA

TEZA DE DOCTORAT

COORDONATOR STIINTIFIC

Prof.Univ.Dr. Irinel POPESCU

DOCTORAND

Dr.Dragos George ROMANESCU

BUCURESTI

2018

UNIVERSITATEA "TITU MAIORESCU"

FACULTATEA DE MEDICINA

TEZĂ DE DOCTORAT

cu titlul:

**SITUSURI ALTERNATIVE (EXTRAHEPATICE) DE
TRANSPLANT AL INSULELOR PANCREATICE (TIP)
– POUCH-UL OMENTAL**

COORDONATOR STIINTIFIC

Prof.Univ.Dr. Irinel POPESCU

DOCTORAND

Dr.Dragos George ROMANESCU

BUCURESTI

2018

CUPRINS

CUPRINS.....	3
INTRODUCERE.....	5
DATE DIN LITERATURA DE SPECIALITATE	5
I. ISTORICUL TRANSPLANTULUI DE PANCREAS	5
II. NOTIUNI DE ANATOMIE, MORFOLOGIE ȘI FIZIOLOGIE ALE PANCREASULUI CU IMPORTANȚĂ ÎN TRANSPLANTUL DE PANCREAS INTEGRAL ȘI DE INSULE PANCREATICE	5
II.1. Aranjamentul tridimensional al celulelor pancreasului endocrin – insulele Langerhans..	5
II.2. Vascularizația și inervatia insulelor pancreatice	6
II.3. Celula β și insulina	6
III. DIABETUL ZAHARAT	6
III.1. Generalități. Prevalență. Definiție. Clasificare.....	6
III.2. Diabetul Zaharat de tip 1.....	6
III.3. Diabetul Zaharat de tip 2.....	6
III.4. Complicațiile diabetului zaharat.....	7
III.5. Tratamentul diabetului zaharat.....	7
IV. TRANSPLANTUL DE INSULE PANCREATICE	7
IV.1. Indicațiile transplantului de pancreas	7
IV.2. Efectele TIP asupra complicațiilor secundare ale diabetului	7
IV.3. Tipuri de transplant de insule pancreatice.....	7
IV.3.1. Autotransplantul de insule pancreatice	7
IV.3.2. Alotransplantul de insule pancreatice la pacienți cu DZ tip 1.....	8
IV.3.3. Alotransplantul de insule pancreatice la pacienți cu DZ tip 2.....	8
IV.3.4. Alotransplantul de insule pancreatice simultan cu transplantul de ficat sau de rinichi	8
IV.4. Puncte cheie în supraviețuirea și funcționalitatea insulelor greftate	8
IV.4.1. Neovascularizația grefei insulare	8
IV.4.2. Situsuri naturale de implantare a insulelor pancreatice	10
IV.4.3. Situsuri artificiale de implantare a insulelor: încapsulate și neincapsulate	11
IV.4.4. Noțiuni despre apoptoza celulei β și regenerarea celulei β ; Insulita	11
IV.4.5. Co-culturi ale insulelor pancreatice cu celule mezenchimale, celule endoteliale, factori de creștere.....	11
IV.4.6. Obținerea celulelor β prin transdiferențiere	12
IV.4.7. Xenogrefele insulare	12
IV.4.8. Imunosupresia în TIP.....	12
CONTRIBUȚIA PERSONALĂ	13
V. MATERIAL ȘI METODĂ	13

V.1. RECOLTAREA ȘI PREZERVAREA PANCREASULUI DE LA DONATOR AFLAT ÎN MOARTE CEREBRALĂ	13
V.1.1. Caracterizare grup.....	14
V.1.2. Detalii tehnice chirurgicale ale prelevării	14
V.1.3. Prezervarea și transportul pancreasului.....	16
V.2. IZOLAREA, CULTIVAREA ȘI INFUZAREA INSULELOR PANCREATICE	17
V.2.1. Caracterizarea insulelor	18
V.2.2. Avantajele și dezavantajele etapei de purificare a insulelor	18
V.3. NOȚIUNI CHIRURGICALE CU IMPLICAȚIE ÎN AUTOTRANSPLANTUL DE INSULE PANCREATICE	19
V.3.1. Pancreatectomia totală și autotransplantul de insule pancreatice la pacienții cu pancreatită cronică	19
V.3.2. Selecția pacienților	20
V.3.3. Opțiuni tehnice în pancreatectomia totală în vederea autotransplantului de insule pancreatice.....	20
VI. REZULTATE. TRANSPLANTUL CLINIC DE INSULE PANCREATICE	21
VI.1. CAZUL 1 – AUTOTRANSPLANTUL DE INSULE PANCREATICE LA O PACIENTĂ CU PANCREATECTOMIE TOTALĂ PENTRU PANCREATITĂ CRONICĂ.....	21
VI.1.1. Pancreatectomia totală – considerații tehnice chirurgicale	22
VI.1.2. Izolarea insulelor, evaluarea și infuzarea lor	22
VI.1.3. Evoluția postoperatorie imediată și la distanță.....	23
VI.2. CAZUL 2 – PRIMUL ALLOTRANSPLANT DE INSULE PANCREATICE DIN ROMÂNIA REALIZAT ÎN INSTITUTUL CLINIC FUNDENI	24
VI.2.1. Indicația de transplant	24
VI.2.2. Recoltarea în bloc ficat-pancreas de la donator aflat în moarte cerebrală	25
VI.2.3. Evoluția postoperatorie imediată și la distanță.....	26
VI.2.4. Imunosupresia.....	27
VI.3. EXPERIMENT PE ȘOARECI DIABETICI	27
VI.3.1. Material și metodă	27
VI.3.2. Tehnica histologică	28
VI.3.3. Discuții	28
VII. DISCUȚII	29
VIII. CONCLUZII	37
X. BIBLIOGRAFIE	38

INTRODUCERE

Transplantul de pancreas a evoluat de la procedurile experimentale asociate cu o rată a mortalității și a morbidității crescute, iar ca și număr, de la 200 pe an, în 1987, la aproximativ 1.000 pe an în 1998. De asemenea, creșterea numărului și a calității agenților imunosupresori au avut o contribuție substanțială la supraviețuirea grefelor pancreatice și, bineînțeles, a pacienților transplantați [1-3].

Diabetul zaharat rămâne una dintre cele mai costisitoare boli, fiind o povară a sistemului medical din țările dezvoltate și cele în continuă dezvoltare, atât prin numărul mare de pacienți, cât și prin costul tratamentelor, al controlului metabolic periodic, cât și al complicațiilor sale. Diabetul zaharat este una din cauzele principale de orbire, de intervenții chirurgicale, de amputație, de neuropatie, impotență, insuficiență renală sau boli cardiovasculare [4-6].

DATE DIN LITERATURA DE SPECIALITATE

I. ISTORICUL TRANSPLANTULUI DE PANCREAS

După descoperirea insulinei din anii 1920 s-a observat că după manifestarea a 15-20 de ani de hiperglicemie persistentă apar și complicațiile [7, 8].

Din momentul în care s-a identificat legătura dintre pancreas și diabetul zaharat, s-a întrezărit și ideea de transplant pancreatic. Primele încercări în stabilirea tehnicii chirurgicale au fost la animale, între 1920 și 1960, mai ales la câine [9-11].

Primul transplant de pancreas uman a fost efectuat în 1966 de către Dr. William D. Kelly și Dr. Richard Lillihei [12]. De la câteva intervenții sporadice, s-a evoluat către dezvoltarea terapiei imunosupresive, cât și a tehnicilor chirurgicale moderne, în egală măsură, conștientizând importanța similară a lor în succesul pe termen lung al transplantului [13-16].

Primul transplant de insule pancreatice la om fost efectuat în 1990 de către grupul de la Universitatea St. Louis, dar până în anul 2000, dintr-un total de 355 cazuri, doar 11% au atins statusul de insulino-independență la 1 an, cel mai mult durând peste 6 ani, într-un caz de transplant simultan de insule și de rinichi [1, 17, 18].

În 1980 se înființează Registrul Internațional de Transplant Pancreatic (IPTR) [19, 20], care se scindează în 1989 în IPTR și International Islet Transplant Registry (ITR), urmând ca, anual să se emită rapoarte ale organizației înființate. Numarul transplantelor raportate a crescut odată cu îmbunătățirea tehnicilor de prelevare, a imunosupresiei, a tehnicilor chirurgicale de implantare, ajungând la aproape 50.000 cazuri în 2018, iar CITR raportează 1055 cazuri de transplant de insule allogeneice, cele mai multe fiind ITA (858), iar IAK și SIK – 197 cazuri, cu o rată a insulino-independenței variabilă de la un grup la altul [21].

II. NOTIUNI DE ANATOMIE, MORFOLOGIE ȘI FIZIOLOGIE ALE PANCREASULUI CU IMPORTANȚĂ ÎN TRANSPLANTUL DE PANCREAS INTEGRAL ȘI DE INSULE PANCREATICE

II.1. Aranjamentul tridimensional al celulelor pancreasului endocrin – insulele Langerhans

Pancreasul este un organ situat retroperitoneal de dimensiuni mici cu o greutate medie de 80-100 g, care are două componente majore: pancreasul **exocrin** care reprezintă marea majoritate a acestuia și pancreasul **endocrin** care reprezintă doar 1 - 2% din masa organului. Unitatea morfofuncțională a pancreasului endocrin este **insula Langerhans** [22-24].

Proporția celulară a insulelor pancreatice umane a fost studiată, din care se poate face o medie, anume: celule β -57,1%, celule α -32,6%, iar celule δ -10,2%. Din totalul insular

pancreatic de 2.02 cm^3 , celulele β au un volum de 1.15 cm^3 (aproximativ 2.6% din totalul volumului pancreatic) [22-24].

II.2. Vascularizația și inervatia insulelor pancreatice

Vascularizația insulelor Langerhans este extrem de bogată, deși volumul lor este foarte mic în întregul pancreas, acestea primesc 20% din debitul total al pancreasului.

Microvascularizația insulară este de o foarte mare importanță deoarece asigură, pe lângă aportul de oxigen, și secreția de hormoni insulari, adaptată să răspundă prompt nevoilor organismului [23]. Fluxul sanguin insular este reglat prin mecanisme complexe autonome, prin interacțiunea sistemului nervos, a metaboliților secretați de celulele β , a mediatorilor endoteliali și a hormonilor [25].

Inervația insulelor Langerhans. Sistemul nervos autonom este de tip parasimpatic (colinergic), simpatic (adrenergic) și peptidergic [22-24, 26]. Secreția de insulină este stimulată de nervul vag, este inhibată de simpatic prin norepinefrina eliberată în terminații și prin catecolaminele ce se găsesc în circulație. Sistemul simpatic stimulează și secreția de glucagon care la rândul lui inhibă secreția de insulină [22-24].

II.3. Celula β și insulina

Celula β a fost identificată de Lane [27] în 1908 și a fost certificată experimental în 1939 [28] la câinele cu diabet indus prin extract hipofiză anterioară, când s-a observat faptul că după diabetizare unele celule și anume cele β au suferit un proces de distrucție sau de degranulare. Fiecare celulă Langerhans conține între 2.500 și 3.000 de celule β [28, 29].

Insulina este principalul hormon anabolizant ce intervine în metabolismul carbohidraților, lipidelor și al proteinelor. Insulina are 2 acțiuni importante: anabolizantă și anticatabolizantă [5, 26, 30].

III. DIABETUL ZAHARAT

III.1. Generalități. Prevalență. Definiție. Clasificare.

Diabetul zaharat, a devenit în ultimele decenii o adevărată problemă de sănătate publică, estimându-se ca în anul 2040 prevalența bolii aproape să se dubleze: de la 415 milioane la nivel global, în 2015, la 642 milioane diabetici în 2040 [31]. Fiind o boală progresiv-evolutivă, diabetul zaharat conduce la apariția complicațiilor, determinate în principal de un control metabolic precar. Povara costurilor unei persoane diabetice este de aproximativ 2.3 ori mai mare decât a unei fără diabet [5, 32-37]. Mortalitatea este foarte crescută la pacienții diabetici, 5 milioane, mai mare decât mortalitatea asociată HIV/SIDA sau tuberculoză, 1,5 milioane [31].

III.2. Diabetul Zaharat de tip 1

Denumit anterior și insulinodependent, cuprinde 5-10% din totalul pacienților diabetici. Este denumit insulinodependent deoarece procesul de distrucție a celulelor pancreatice face ca administrarea insulinei exogene să fie indispensabilă [5, 38, 39].

III.3. Diabetul Zaharat de tip 2

Denumit și neinsulinodependent, cuprinde 90-95% din totalul pacienților diabetici. În acest tip, deficitul de insulină este asociat în diferite grade cu insulinoresistență [40]. Deficiența β -celulară constă în asocierea dintre reducerea masei β -celulare și degradarea funcției β -celulare [30].

III.4. Complicațiile diabetului zaharat

Complicații acute pot fi: coma diabetică cetoacidotică [26, 37], coma hiperglicemică hiperosmolară [30, 37], coma hipoglicemică [30, 37], acidoza lactică [26, 30].

Complicații cronice pot fi: nefropatia diabetică, retinopatia diabetică, neuropatia diabetică, gangrena diabetică, macroangiopatia diabetică, afectarea cutanată, osteoartropatia diabetică (piciorul Charcot), hepatopatia dismetabolică și infecțiile [30].

III.5. Tratamentul diabetului zaharat

Obiectivele tratamentului sunt complexe și includ menținerea unui echilibru metabolic optim ce are drept scop ameliorarea calității vieții și prevenirea complicațiilor acute și cronice. Tratamentul adecvat al diabetului zaharat cuprinde dieta, efort fizic, medicație orală și/sau insulină exogenă [30, 36, 37].

IV. TRANSPLANTUL DE INSULE PANCREATICE

IV.1. Indicațiile transplantului de pancreas

Categoriile de transplant al insulelor pancreatice sunt:

Transplant de insule la pacienți cu diabet zaharat tip 1, cu vârste cuprinse între 18 și 65 ani, care deja sunt imunosupresați pentru un alt tip de transplant:

- după transplant renal (IAK) sau simultan insule-rinichi (SIK);
- Transplant de insule pentru pacienții cu diabet zaharat, care necesită transplant de ficat (pentru ciroza cu HTP, hemocromatoză, fibroză chistică);
- Transplant de insule la pacienții cu fibroză chistică care dezvoltă diabet zaharat tip 2 și necesită grefa insulară ce poate fi combinată cu transplant pulmonar sau de ficat;

Transplant de insule la pacienți cu instabilitate metabolică (ITA);

- numărul de episoade hipoglicemice sau cetoacidotice (2 episoade ce au necesitat internare în spital în ultimele 12 luni);
- creșterea amplitudinii medii a oscilațiilor glicemice (MAGE) > 6.6 mmol/l;
- profil haotic al glicemiilor, cu monitorizarea glicemiei de 4 ori/zi și alterarea stilului de viață, cu punerea în pericol al vieții;

Transplant de insule pancreatice (ITA) la pacienți cu complicații secundare diabetice cu potențial de reversie: nefropatie progresivă, neuropatie documentată de neurolog și retinopatie proliferativă;

Autotransplant de insule la pacienții cu rezecții pancreatice majore;

Allotransplant de insule la pacienții la care autotransplantul de insule a eșuat [41, 42].

IV.2. Efectele TIP asupra complicațiilor secundare ale diabetului

Complicațiile diabetului se împart în acute și cronice. Cele acute includ hiperglicemia, cetoacidoza și hipoglicemia cauzată de tratamentul cu insulină exogenă.

Complicațiile cronice includ complicații microvasculare ca retinopatia, nefropatia și neuropatia sau complicații legate de boala macrovasculară și ateroscleroză, ca infarctul miocardic, accidentul vascular sau gangrena periferică.

Alte complicații includ: leziuni dermatologice (dermopatia diabetică sau ulcerări ale pielii), leziuni ale oaselor și ale articulațiilor (artropatia diabetică) sau infecții (fasciita necrozantă, miozita necrozantă) [1, 2].

IV.3. Tipuri de transplant de insule pancreatice

IV.3.1. Autotransplantul de insule pancreatice

Insulele pancreatice transplantate intrahepatic pot reface funcția pancreasului endocrin și să reinstaleze homeostazia glucozei. Totuși studiile au arătat că este o diferență în ceea ce

privește rezultatul TIP în funcție de scopul de a preveni diabetul sau de a trata un diabet vechi, decompensat [15, 43-45].

Autotransplantul de insule se practică cel mai frecvent la pacienții care au suferit o rezecție majoră de pancreas pentru pancreatita cronică, în scopul de a preveni instalarea diabetului secundar.

IV.3.2. Alotransplantul de insule pancreatice la pacienți cu DZ tip 1

Insulele pancreatice sunt transplantate cel mai frecvent în ficat, la pacienți cu DZ tip 1 sau 2, care necesită imunosupresie pentru un transplant anterior sau simultan de rinichi (IAK sau SIK). Microangiopatia diabetică interferează cu revascularizarea insulelor. Pierderile de grefă prin procese inflamatorii sunt augmentate de climatul de boală autoimună a diabeticilor. De asemenea, secreția de glucagon, care menține starea de hiperglicemie la pacienții cu DZ tip 1, reprezintă un challenge pentru insulele transplantate, iar regimurile de imunosupresie sunt diabetogene, în special steroizii, ciclosporina A și tacrolimusul [46, 47].

O strategie de a îmbunătăți supraviețuirea de lungă durată a grefei, este aceea de a reduce rezistența la insulină a recipientului, pentru a diminua cererea metabolică a celulelor transplantate prin administrarea de metformin [48, 49].

IV.3.3. Alotransplantul de insule pancreatice la pacienți cu DZ tip 2

Transplantul simultan de ficat și insule pancreatice se poate face la pacienți la care se efectuează pancreatectomie și hepatectomie pentru cancer (în cazuri selecționate) sau la cei cu indicație de transplant de ficat și DZ tip 2. Celulele transplantate se confruntă cu rejețul imunologic sau cu toxicitatea dată de imunosupresie. La 60% din pacienții transplantați, insulele transplantate au fost viabile la 1 an posttransplant [46].

IV.3.4. Alotransplantul de insule pancreatice simultan cu transplantul de ficat sau de rinichi

Există studii care demonstrează că pacienții cu ciroză hepatică și diabet preoperator au o rată mai mare a mortalității și morbidității după transplant hepatic ortotopic decât pacienții cirofici non-diabetici [50, 51]. La acești pacienți transplantul hepatic nu este suficient să refacă rezerva funcțională a celulelor β afectată progresiv în timp. În plus, regimurile de imunosupresie cresc deficitul funcțional al celulelor β , exacerband diabetul. Singura soluție în acest caz o constituie transplantul combinat de ficat și insule pancreatice. Au fost raportate în literatură doar 14 cazuri, în 1/3 din cazuri fiind vorba de allotransplant de insule după exenterație abdominală superioară și transplant de ficat [12, 52].

IV.4. Puncte cheie în supraviețuirea și funcționalitatea insulelor grefate

IV.4.1. Neovascularizația grefei insulare

În mod normal există o corelație între fluxul sanguin insular și fluxul pancreatic total, dar în timpul episoadelor de hiperglicemie, răspunsurile acestora se disociază. Nu există diferențe în ceea ce privește aportul sanguin al insulelor din regiunea capului de pancreas (mai bogate în celule PP) care este vascularizat din artera mezenterică superioară și cele din regiunea corpului și cozii (mai bogate în celule secretoare de glucagon) care primesc aportul sanguin din trunchiul celiac. Măsurători prin tehnica microsferelor au indicat că doar 10% din totalul insulelor sunt responsabile de răspunsul la glucoză, prin creșterea fluxului sanguin. Acest lucru arată că subgrupul de insule mai slab vascularizat reprezintă o rezervă funcțională capabilă să-și crească fluxul sanguin în funcție de necesarul de insulină, iar pe de altă parte reprezintă și o măsură de prevenție a eliberării excesive de insulină [50, 53].

Factorii care intervin în reglarea fluxului sanguin ca răspuns la nevoia eliberării de insulină sunt: (1)-factori metabolici eliberați de celulă β (adenozina și ADP); (2)-sistemul nervos prin nervul vag, nervii simpatici și sistemul nervos autonom; (3)-factori derivați din endoteliu (NO); (4)-hormoni: insulari, incretine și adipokine [15].

S-au descris tehnici de măsurare a fluxului sanguin al pancreasului endocrin (al insulelor endogene) care sunt folosite în studiile în vivo pe animale: (1)-microscopia în vivo; (2)-tehnica microsferelor; (3)-clearance-ul hidrogenului; (4)-radiologice (MRI, PET).

Există similar și tehnici de măsurare a fluxului pe insulele transplantate: (1)-microscopia în vivo prin particule de radioizotopi sau fluorescente introduse în circulație și măsurate în organ, pe secțiuni histologice; (2)-laser flowmetria Doppler; (3)-tehnica microsferelor [15].

Nu există metode de măsurare a fluxului la oameni [15].

În cazul transplantului de insule pancreatice, în cursul procesului de izolare, sistemul vascular este distrus, iar spre deosebire de transplantul de organ integral, unde revascularizația este restabilită imediat prin anastomozarea surselor arteriale și venoase, restabilirea fluxului sanguin se face în câteva zile, printr-un proces complex de neovasculoгенезă. În perioada imediat post transplant, datorită ischemiei sau fluxului inadecvat, o parte importantă de insule mor [54].

Studiile recente au arătat că celulele endoteliale sunt responsabile de apariția unor vase de neoformație. Aceste celule provin din trei surse: prima o reprezintă celulele endoteliale de la nivelul situsului de implantare; a doua sursă o reprezintă celulele endoteliale intrainsulare, iar a treia sursă o reprezintă celulele endoteliale derivate din măduva osoasă. Există factori care stimulează angiogeneza, cel mai important fiind VEGF-A, dar și factori antiangiogenetici. De aceea există mai multe metode de a stimula angiogeneza: prin stimularea factorilor de creștere, prin inhibarea factorilor antiangiogenetici sau prin stimularea factorilor stimulatori ai proliferării, migrării și maturării celulelor endoteliale [25].

Studii legate de dezvoltarea embriologică a pancreasului au arătat că există o semnalizare reciprocă endotelial-endocrină; într-o primă etapă, factori de semnalizare de la nivelul celulelor endoteliale induc dezvoltarea insulelor pancreatice în adiacență vaselor, apoi, în cea de-a doua etapă, insulele induc celulele endoteliale să formeze o rețea capilară în jurul și în interiorul insulelor, interconectându-se la sistemul vascular [55].

Deoarece în timpul izolării insulelor pentru grefare, numărul celulelor endoteliale diminuează, atât prin condițiile de cultivare in vitro, cât și prin dediferențierea lor, se poate afirma că noile vase sunt produse de o mixtură de celule cu originea atât în celulele donorului, cât și ale receptorului [53].

Studii in vitro au demonstrat că co-culturile celulelor mezenchimale pluripotente cu celule endoteliale și insule pancreatice induc migrarea celulelor endoteliale exogene către insulele cultivate, pe care le îmbracă și stimulează formarea structurilor vasculare, asigurând o rețea ce interconectează celulele endoteliale intra-insulare cu cele exogene. Aceste celule mezenchimale pot fi izolate folosind diverse tehnici (de exemplu markeri de suprafață), din diverse alte țesuturi, cum ar fi țesutul adipos sau dermal [56].

În timpul procesului de izolare a insulelor, celulele endoteliale pierd suportul vascular extern. Procesul de formare a noilor capilare în timpul revascularizatiei posttransplant implică digestia prin intermediul proteazelor a peretelui vascular, migrarea, proliferarea și diferențierea noilor celule endoteliale. EC produc o serie de factori chemotactici, cum ar fi factorul derivat de creștere plachetar, care atrag alte celule suportive, cum sunt MSCs, ce se pot diferenția în pericite. MSCs contribuie și la creșterea expresiei angiopoietinei și a VEGF-A la nivelul ECS, crescând astfel angiogeneza și stabilitatea vascularizației. Alt factor important în angiogeneza este reprezentat de factorul de creștere fibroblastica bFGF [51, 57, 58].

IV.4.2. Situsuri naturale de implantare a insulelor pancreatice

Numeroase situsuri de implantare au fost investigate ca potențial ideal situs, luându-se în calcul ușurința abordului chirurgical, eficiența implantării, adică gradul de obținere a statusului normoglicemic, precum și numărul și gradul complicațiilor [1, 14, 15, 59].

Cel mai uzitat situs este vena portă, care însă comportă atât complicații ale infuziei (sângerări, tromboze), eficiența scăzută datorită pierderii unei părți importante a masei insulare infuzate printr-o reacție inflamatorie acută și prin expunerea la o presiune sangvină crescută, cât și ale imposibilității de eliminare a grefei și deteriorării progresive a funcției datorită deficitului de grefare.

În cadrul mecanismului de implantare a insulelor în parenchimul hepatic, insulele aderă la peretele vascular portal și vor fi acoperite de fibrină și plachete prin activarea cascadei complementului și a coagulării din cadrul reacției inflamatorii acute mediată imun, rezultând o structură trombo-like. Lumenul vascular se va recanaliza, iar insulele vor fi vascularizate din vasa vasorum [60]. Deși infuzia de celule este de 10 ori mai mare decât cea necesară obținerii statusului normoglicemic, aproximativ 2/3 din ele vor muri în zilele imediat post transplant, datorită lipsei matricei extracelulare, saturației scăzute în O₂, expunerii la concentrații crescute ale glucozei, toxinelor, metaboliților sau medicamentelor.

Alte situsuri alternative investigate au fost capsula renală, peritoneul, pouch-ul omental, mușchiul scheletic, țesutul subcutanat, splină, submucoasa gastrică, pancreasul, etc.

Există din ce în ce mai multe studii în vivo pe animale, care propun ca principal situs extrahepatic pouch-ul omental. Principalul dezavantaj al situsurilor de transplant îl constituie revascularizația inadecvată a grefei în primele zile post transplant. Acest lucru, împreună cu rejetul acut mediat imun, constituie principalele cauze ce duc la disfuncția și moartea celulelor grefate. Supraviețuirea grefei imediat post transplant depinde de difuzia de oxigen și nutrienți din capilarele situsului de implantare, de la periferia insulelor. Omentul reprezintă unul din situsurile ideale extrahepatice pentru transplantul de insule pancreatice [61, 62].

În omentul nativ vascularizația este de 4 ori mai mare în țesutul non-adipos decât în cel adipos. În omentul activat, țesutul non-adipos nou conține vascularizație de asemenea de 3-4 ori mai bogată decât în cel adipos. Acest fapt a fost măsurat prin tehnici de imunostaining a collagenului de tip IV [61, 63]. Abilitatea omentului activat de a forma noi vase de sânge, care să se anastomozeze cu cele ale organului lezat, a fost folosită în tehnicile de regenerare tisulară embrionară sau ca situsuri de implantare a insulelor pancreatice sites [64].

Există necesitatea unui suport tridimensional care să asigure supraviețuirea insulelor imediat post transplant. Acest suport structural previne pe de-o parte expunerea directă a insulelor la circulația sangvină, din care rezultă răspunsul inflamator acut și pe de altă parte permite co-transplantarea cu alte tipuri de celule imunoprotective, cum ar fi celulele Sertoli, celule cu efect protector față de rejetul allogeneic sau xenogeneic sau față de distrucția autoimună [65, 66]. Există studii în vivo pe animale care au folosit suport tridimensional biodegradabil, implantat la nivelul omentului [61, 67], care au arătat în primul rând viabilitatea insulelor cultivate pe acest suport, apoi funcționalitatea insulelor transplantate. Situsul de implantare pentru suportul tridimensional poate fi pouch-ul omental, din mai multe considerente: are drenaj portal, fără însă o expunere directă la drogurile imunosupresoare, la complexul coagulării și cel al complementului, este fezabil pentru un volum mare tisular implantat, iar grefa poate fi extrasă relativ ușor [61].

Au fost imaginate și create diverse matrice îmbogățite cu medii de cultură sau factori de creștere, pe care au fost însămânțate insule pancreatice singure sau în co-culturi cu celule endoteliale, celule mezenchimale sau imunoprotective [15, 68].

IV.4.3. Situsuri artificiale de implantare a insulelor: încapsulate și neîncapsulate

S-au imaginat device-uri încapsulate în care au fost însămânțate insule pancreatice, cultivate pe un mediu de cultură constând dintr-o membrană poroasă unidirecțională, pentru a evita contactul direct al insulelor cu mediatorii răspunsului imun din sângele circulant. Aceste capsule se pot implanta în grăsimea subcutanată, pentru un acces facil asupra mediului de cultură ce trebuie îmbogățit periodic cu oxigen [7].

Există în prezent 3 modalități de încapsulare, toate bazându-se pe difuzia pasivă extravasculară:

1-macroîncapsularea (macrocapsule) care înseamnă camere de difuziune conținând un volum mare de insule, în care difuzia oxigenului și a nutrienților se face pasiv, prin membrana selectiv permeabilă. Avantajul lor este acela de a fi ușor de implantat, printr-o procedură chirurgicală minimă, problema rămâne limitarea difuziei de oxigen și a nutrienților, cât și eliberarea de insulină datorită inhibiției date de nivelurile crescute ale glicemiei;

2- microîncapsularea înseamnă crearea unor capsule sferice, cu un număr mai mic de insule, care pot fi injectate la nivelul situsurilor de implantare, unde vor forma clustere limitând difuzia de oxigen spre centrul acestora. Aceste microcapsule au totuși un volum de cca 27 ori mai mare decât cel al insulelor transplantate (150 microni);

3-coating technique în care insulele sunt învelite fie într-o membrană polimerică, fie cu celule endoteliale, care vor îmbogăți histocompatibilitatea insulelor grefate.

Imediat post transplant, răspunsul imun mediat inflamator, constând în activarea cascadei coagulării, agregarea plachetară, activarea cascadei complementului, activarea monocitelor și infiltrarea cu neutrofile granulocite, este responsabil de pierderea a până la 70% din masa insulară grefată [69].

De un mare interes, având în vedere avansarea ca tehnologie în ceea ce privește încapsularea, este perspectiva xenotransplantului de insule încapsulate [7].

IV.4.4. Noțiuni despre apoptoza celulei β și regenerarea celulei β ; Insulita

Toate studiile au arătat că reducerea masei absolute de celule β joacă un rol important în dezvoltarea diabetului zaharat de tip 1 și 2 și din acest motiv regenerarea celulelor pancreatice in vivo sau ex vivo reprezintă cheia unei potențiale terapii a bolii [70]. Insulita este patognomonică pentru diabetul tip 1 și se caracterizează printr-un infiltrat limfocitar (limfocite T și B), acompaniat de un răspuns umoral, prin autoanticopri anti-celulă β . Acest proces va duce la distrucția a peste 75% din masa celulelor β în momentul debutului clinic [71, 72].

Procesul de insulită va dispărea odată cu distrucția celulelor β . La pacienții tineri, cu debut clinic al bolii sub 1 lună, doar 34% din insule conțin celule β , din care doar 33.6% sunt afectate de procesul de insulită [73], în timp ce la pacienții în vârstă, cu debut recent, din totalul de 63% insule ce conțin celule β , doar 18.3% sunt cuprinse de procesul de insulită. Acest lucru arată că în prima lună de la debutul clinic, există o rezervă substanțială de celule β neafectate, mai mare în cazul pacienților în vârstă [74].

IV.4.5. Co-culturi ale insulelor pancreatice cu celule mezenchimale, celule endoteliale, factori de creștere

Insulele pancreatice cu dimensiuni de peste 150 μ au o rată mică de supraviețuire în culturi, dar co-culturile cu celule stem mezenchimale au arătat o creștere a ratei de supraviețuire și a funcției insulare [75]. Celulele stem mezenchimale MSCs par a fi o soluție bună, în acest scop. Ele derivă din mai multe tipuri de țesut adult: măduva osoasă, țesutul adipos sau sângele periferic. Au fost imaginat diverse medii de co-cultură a celulelor mezenchimale cu celulele insulare, fie placi solide, fie suspensii, în contact direct sau co-culturi indirecte [76].

IV.4.6. Obținerea celulelor β prin transdiferențiere

O alternativă de a obține celule β producătoare de insulină este aceea de a reprograma celulele hepatice pentru transdiferențiere în celule β . Această opțiune are ca background faptul că atât celulele hepatice, cât și celulele β au aceleași celule progenitoare. Conversia celulelor hepatice în celule pancreatice endocrine se face fie prin transdiferențiere mai întâi în celule stem pluripotente, fie prin reprogramare directă, prin inducerea expresiei factorilor de transcripție (PDX-1) [77, 78].

IV.4.7. Xenogrefele insulare

După mai multe studii ale xenotransplantului de la porc la primat și la om, insulele obținute de la anumite specii de porci, par să reprezinte cea mai viabilă alternativă. O dată cu îmbunătățirea metodelor de izolare și purificare a insulelor, un număr mai mare de insule au fost obținute de la porci, deși există încă dezbateri pe tema izolării insulelor de la feteșii porci, nou-născuți sau porci adulți [79, 80]. În ceea ce privește xenorejetul, izolarea graftului de sistemul imun al gazdei se poate face prin tehnici de micro- și macroincapsulare [81].

I.4.4.8. Imunosupresia în TIP

Principalele imunosupresoare folosite în protocolul de la Edmonton sunt Tacrolimusul și Sirolimusul, iar mai recent introduse – MMF (michofenolat mofetil), Belatacept sau Efalizumab [46-48]. În cazul pacienților cu TIP fără un alt transplant în antecedente, inițierea imunosupresiei se face cu ATG, iar menținerea imunosupresiei se face cu MMF și Tacrolimus [46-48]. În cazul celui de-al doilea transplant, inducția se face cu Basiliximab[47], iar menținerea se face cu MMF și Tacrolimus [46, 48, 82].

CONTRIBUȚIA PERSONALĂ

V. MATERIAL ȘI METODĂ

V.1. RECOLTAREA ȘI PREZERVAREA PANCREASULUI LA DONATOR AFLAT ÎN MOARTE CEREBRALĂ

Această lucrare analizează recoltarea de pancreas folosit pentru procesul de izolare de insule pancreatice și transplant între anii 2007-2012 la Institutul Clinic Fundeni. Procesul de izolare a fost efectuat în Laboratorul de Terapii Celulare din cadrul Institutului Clinic Fundeni. Procesul de izolare de insule pancreatice s-a făcut după mai multe protocoale, cu scopul obținerii unui număr cât mai mare de insule. Insulele obținute s-au folosit în studii in vitro și in vivo, pe animale.

Principalul scop a fost acela de a forma o echipă calificată pentru recoltare de pancreas și izolare de insule. Experiența echipei de recoltare a fost dublată de experiența ei în recoltarea de ficat. Având o echipă unitară de recoltare de ficat și pancreas, orice dificultate legată de variante anatomice de vascularizație a putut fi depășită, iar atunci când s-a impus recoltarea în bloc ficat-pancreas aceasta s-a făcut menajând ambele organe, care au fost separate pe back-table și folosite pentru transplanturi de ficat și respectiv de pancreas. Avantajul institutului nostru a fost și acela că aici se pot face simultan transplanturi de ficat, pancreas și rinichi.

Echipa de recoltare de pancreas este constituită din 3 medici chirurghi și o asistentă de sală, iar echipa de izolare de insule are 3 medici chirurghi, 2 biochimisti și 2 tehnicieni de laborator.

Cu experiența acumulată în acești ani, s-a trecut la o etapă superioară, aceea a TIP la om, în 2 cazuri: 1 caz de allotransplant simultan cu transplantul hepatic, la un pacient cu ciroză hepatică și diabet zaharat, iar al doilea este cel al unui autotransplant de insule pancreatice, la o pacientă cu pancreatită cronică.

Criteriile de excludere a potențialului donator de pancreas, aflat în moarte cerebrală, au fost în acord cu Registrul Internațional de Transplant de Pancreas (tabel 1):

Tabelul 1. Criterii de excludere pentru un potențial donator pancreatic cadaveric

- Vârsta > 65 sau < 5 ani
- condiții preexistente, cum ar fi: serologie hepatică pozitivă A, B sau C; SIDA; pozitiv HIV-I sau HIV-II; HTLV-III; encefalita virală; sifilis; Boala Creutzfeldt-Jacob; rabie; tuberculoză activă; diabetul zaharat tip 1 și 2; neoplazia (cu excepția tumorilor cutanate sau primare cerebrale); infecție sistemică acută; demență; tratament cu hormon de creștere hipofizar
- Abuzul cronic de alcool
- Abuz recent de droguri intravenoase
- Antecedente semnificative cu risc crescut de boli infecțioase sau transmisibile
Traumă Pancreatică
Istoric de diabet zaharat, pancreatită necrotizantă acută, pancreatită cronică sau chirurgie pancreatică anterioară
Contaminare intra-abdominală semnificativă
- episod prelungit de hipotensiune arterială care determină modificări biochimice semnificative (niveluri sanguine ale creatininei > 1,5 x N sau niveluri sanguine ale transaminazelor > 2 x N)
- Stop cardiac > 5 minute, cu instabilitate hemodinamică, necorectată în primele 48 de ore sau cu modificări biochimice semnificative
- Staționare în terapie intensivă (ICU stay) > 7 zile

- Sodiu > 160 mmol/l
- Amilază > 380 U/l sau Lipază > 480 U/l
- Noradrenalină > 0,05 microg/kgBW/min sau Dobuta- /dopamină > 10 microg/kgBW/min

Au fost 20 de recoltări în bloc spleno-pancreatico-duodenale, în cadrul recoltărilor multiorgan, din care, în 2 cazuri s-a recoltat în acest bloc și ficatul. Indicația pentru acest din urmă tip de recoltare a fost existența unei artere hepatice drepte accesorie, cu originea în artera mezenterică superioară. Separarea organelor a fost făcută în mod adecvat pe back-table, cele 2 organe fiind folosite la transplantul hepatic, respectiv pancreatic.

În celelalte 18 cazuri, pancreasul a fost recoltat după ficat și înainte de recoltarea de rinichi.

V.1.1. Caracterizare grup

Grupul a fost studiat din punct de vedere al vârstei, sexului, apartenenței unui grup sanguin, al indicelui de masă corporală și al cauzei morții cerebrale.

Vârsta donatorului a fost între 12 și 61 ani, cu o mediană de 35 ani, 3 donatori având vârsta sub 20 ani, iar unul fiind peste 50 ani (61 ani). Ca și împărțire pe sexe, donatorii au fost 9 femei și 11 bărbați. Împărțirea pe grupe sanguine arată astfel: 11 cazuri de A(II), 7 cazuri de O(I) și 2 cazuri de B(III). Indicele de masă corporală s-a situat între 15.6 și 27.8, cu o mediană de 24.1.

Cauzele morții cerebrale au fost: traumatism cerebral - 8 cazuri, ruptură de anevrism - 7 cazuri și accident vascular cerebral - 5 cazuri.

V.1.2. Detalii tehnice chirurgicale ale prelevării

În afară de acești factori care țin de donator, calitatea țesutului recoltat este influențată și de experiența echipei de recoltare și de protocolul folosit pentru prezervare și transport.

Experiența echipei de recoltare se bazează pe cunoștințele solide de variante anatomice ale vascularizației intraabdominale, cu importanță majoră în tehnica recoltării multiorgan. Tehnicile avansate de recoltare combinată de ficat, rinichi și pancreas au condus la rezultate bune, indiferent de variantele anatomice ale vascularizației. Aceste tehnici se adaptează variantelor anatomice și stabilității hemodinamice ale donatorului și se bazează pe identificarea, disecția și canularea principalilor pediculilor vasculari.

Toate aceste tehnici impun evitarea contactului direct cu capsula pancreatică, a cărei injurie ar duce la pierderi ale soluției de perfuzie enzimatică din timpul digestiei enzimatice. Au fost descrise 3 tehnici de recoltare a pancreasului: cea clasică (warm dissection), intermediară și cea rapidă (cold dissection) [83, 84].

Tehnica rapidă este preferată în cazul donatorului instabil, al recoltării în bloc ficat-pancreas sau al donatorului non heart beating și începe direct cu canularea aortei infrarenale. Timpul operator scade foarte mult [83, 84].

Tehnica clasică începe cu disecția principalilor pediculi vasculari înaintea perfuzării cu soluția de prezervare. Are dezavantajul injuriilor multiple ale parenchimului sau vaselor organelor recoltate, știut fiind faptul că disecția înaintea perfuziei poate crea vasospasm, cu creșterea consecutivă a consumului de oxigen. Există și un alt risc, legat de torsiunea de pedicul. De aceea calitatea țesutului recoltat nu este cea mai bună [84].

Tehnica intermediară, adoptată și în clinica noastră implică identificarea fără disecția completă a pediculului hepatic (disecția doar a laturii drepte ale venei porte pentru identificarea unei posibile ramuri accesorii din artera mezenterică superioară) și disecția incompletă a originii trunchiului celiac, înainte de canularea aortei, cu completarea ei pe back table. Alegerea uneia dintre aceste tehnici se face cu scopul de a reduce la maximum timpii de ischemie caldă și rece [83, 84].

Operațiile de prelevare au debutat cu sternotomia și incizia mediană xifo-pubiană. Sternotomia s-a practicat nu numai pentru recoltarea cordului. Atunci când aceasta s-a efectuat, ci și pentru un acces mai facil și un control mai bun al aortei intratoracice.

Tehnică folosită a fost în toate cazurile „no touch technique” [25, 84], iar splina a servit drept suport mecanic pentru mobilizarea pancreasului.

Primul pas important și obligatoriu în prelevarea de organe este explorarea cavității abdominale și identificarea variantelor de vascularizație ale abdomenului superior (ramuri hepatice accesorii din artera gastrică stângă sau din artera mezenterică superioară). Aceste variante ale vascularizației au o importanță mai mare în recoltarea pancreasului în vederea transplantului integral [85].

Mobilizarea pancreasului începe cu mobilizarea splinei, prin incizia reflecției peritoneale laterale și posterioare ale splinei și a ligamentului spleno-colic. Pancreasul este retractat spre medial prin disecția în plan și detașarea sa de rinichiul stâng, glanda suprarenală stângă și aorta abdominală. Artera mezenterică superioară, artera splenică și artera gastroduodenală sunt menajate pentru o perfuzare adecvată a pancreasului până în momentul explantării sale. Se ligaturează artera gastrică stângă, cu menajarea arterei hepatice accesorii din aceasta, când există. Aorta abdominală infrarenală și vena cavă inferioară se disecă până la bifurcația acestora. Aorta infrarenală se lățuiește în apropierea bifurcației, după ligaturarea și secționarea prealabilă a arterei mezenterice inferioare și a eventualelor artere lombare și este pregătită pentru canulare. Pentru „cross clamping” aorta subdiafragmatică este lățuită, după disecția și incizia pilierului diafragmatic și a seroasei periaortice. În cazul donatorului instabil, clamparea aortei subdiafragmatice se face după o incizie a diafragmului și a pericardului [85].

Următoarea etapă o constituie staplarea duodenului la nivelul primei porțiuni și a duodenului IV, după un lavaj prealabil cu betadină al duodenului, prin sondă nazogastrică. Se canulează apoi aorta infrarenală și vena portă - via vena mezenterică inferioară. Etapa următoare este foarte importantă, fiind aceea a cross-clamping-ului (ligaturarea aortei infrarenale, ligaturarea aortei subdiafragmatice, secționarea venei cave inferioare infrarenale), care reprezintă începutul ischemiei calde. După heparinizarea sistemică cu heparină 25,000 unități sau 300 unități/kg corp, începe perfuzarea sistemică prin canule cu soluția de preservare Custodiol la 40 Celsius (Histidina-Triptofan-Ketoglutarat -HTK), 5000 ml în aortă și 3000 ml în vena portă [85, 86].

Pancreasul este împachetat în gheață sterilă pentru răcirea lui rapidă. Imediat după inițierea perfuziei cu Custodiol, rădăcina mezenterului împreună cu vasele mezenterice superioare se staplează. La sfârșitul infuzării soluției de preservare, arterele gastroduodenală și splenică sunt ligaturate (artera splenică cât mai aproape de originea ei din trunchiul celiac). Vena portă este secționată chiar deasupra pancreasului, spre deosebire de recolarea în vederea efectuării de transplant de pancreas integral, unde secționarea se face la jumătatea distanței dintre pancreas și hilul hepatic. După explant, pancreasul este transportat în soluție rece de Custodiol, într-un container răcit permanent cu gheață.

Prepararea pancreasului pe back-table și procedura de digestie enzimatică și izolare de insule, a fost efectuată în Laboratorul de Terapii Celulare, în condiții de acreditare GMP. Prepararea pancreasului pe back-table înseamnă curățarea lui de țesutul gras peripancreatic și de țesutul vascular, detașarea de duoden și de splină printr-o disecție blândă, cu mare grijă de a nu leza capsula pancreatică. În 2 cazuri în care recoltarea pancreasului s-a făcut în bloc cu ficatul, separarea celor 2 organe s-a făcut în sala de operație de transplant hepatic.

Timpul de ischemie rece a fost situat între 1.5 și 8 ore, cu o valoare mediană de 5 ore.

18 organe au fost folosite în scopul obținerii de insule pancreatice prin diferite protocoale de izolare, iar 2 organe au fost folosite la transplantul integral de pancreas: pancreasul de la un

donator de 38 ani, cu un BMI de 27.8 și scor Vinkers de 13 a fost folosit pentru transplant integral (pancreas transplant alone - PTA), iar celălalt recoltat de la un pacient de 22 ani, cu un BMI de 25.7 și Vinkers scor de 9, a fost transplantat la un pacient care a primit și un transplant de rinichi (simultaneous pancreas and kidney transplantation- SPK) [85]. Pancreasul recoltat nu a prezentat injurii vizibile, chiar și atunci când au existat nivele crescute ale amilazelor și lipazelor.

V.1.3. Prezervarea și transportul pancreasului

Valoarea mediană a scorului Vinkers calculat pe grupul meu de lucru a fost de 11. Cel mai înalt scor calculat a fost 16, într-un singur caz.

Un factor important în procesul de izolare și de obținere de insule de calitate îl constituie durata timpilor de ischemie rece și caldă. Ischemia caldă aduce injurii pancreasului recoltat, mai mult decât cea rece, cu repercursiuni mai mari asupra calității procesului de izolare. De aceea există soluții de prezervare, care, împreună cu împachetarea cu gheață sterilă, facilitează răcirea rapidă a pancreasului și deci reduce timpul ischemiei calde. Lakey *et al* [48, 87] au demonstrat că este foarte important ca pe perioada recoltării, prezervării și transportului, pancreasul să aibă temperatura sub 10 grade Celsius. De aceea, imediat după cross clamping, înainte de stopul cardiac, pancreasul este perfuzat cu soluție rece de prezervare (Custodiol, Celsior, University of Wisconsin UW) [85, 88, 89].

Autorii japonezi au dezvoltat propriul sistem de răcire regională în situ, folosit în special pentru donorii non heart beating. Sistemul este unul adaptat de la cel de perfuzie renală, și se realizează prin intermediul a 2 catetere: primul cateter, cu 2 balonașe, se înseră în aortă, prin artera femurală, plasându-se un balon deasupra trunchiului celiac, iar al doilea sub nivelul arterei renale. Al doilea se înseră în vena cavă inferioară prin vena femurală. Se infuzează soluție Ringer rece, imediat după instalarea stopului cardiac, timp de 3 minute, pentru a diminua vasospasmul indus de concentrația crescută de potasiu care poate să apară la perfuzarea cu soluție de prezervare UW [86, 89].

Timpul de ischemie rece acceptat pentru transplantul de pancreas integral este de 18-24 ore, iar pentru transplantul de insule – de 8-12 ore, cu un timp optimal de sub 8 ore.

În timpul recoltării și transportului se folosesc ca tipuri de soluții de prezervare: UW, Celsior, Custodiol, M-Kyoto, dar UW rămâne gold standardul pentru recoltarea de pancreas.

Unele studii demonstrează obținerea unui număr mai mare de IEQ, prin infuzarea directă în ductul pancreatic a soluției de MK, imediat după explantare (1 ml/g pancreas). Rezultatul este justificat prin activitatea inhibitorie a soluție MK asupra tripsinei și prin activitatea redusă de inhibare a collagenazei. Altfel activitatea tripsinei duce la injurii ale sistemului ductal pancreatic, cu efect negativ asupra eficienței perfuzării în timpul digestiei enzimatice [90].

În cazul unui timp de ischemie rece prelungit, s-a descris metoda „two layer”, care înseamnă prezervarea pancreasului prin perfuzare de soluție UW, concomitent cu oxigenarea normobarică și soluție perfluorocarbon (PFC) ca și căraș al oxigenului. Pentru aceasta, pancreasul este plasat între 2 medii nemiscibile, cu 2/3 din suprafață acoperită de soluție PFC. Există și o controversă legată de această metodă: Papas *et al* [91, 92] arată că penetrarea oxigenului în parenchiul pancreatic se face până la 1 mm profunzime, depinzând de grosimea țesutului peripancreatic, care trebuie excizat înainte de folosirea metodei [90].

În afară de injuriile mecanice pe care insulele le suferă în timpul izolării, ele sunt deprivat de mediul lor nutrițional, prin devascularizare, denervare și hipoxie. De aceea insulele au nevoie de o perioadă scurtă de revigorare înainte de transplant, prin care dispar leucocitele pasagere, dar și căile de semnalizare intracelulare ale stresului, cu implicații în allorejet. Acest lucru se întâmplă prin incubația și cultivarea lor.

Având în vedere criteriile stricte ale alocării pancreasului în vederea transplantului, donatorii sunt insuficienți pentru candidații aflați pe listele de așteptare. De aceea o metodă de a crește numărul de donatori este aceea de a accepta donorii marginali, cei non heart beating și donatorii în viață [47, 93].

Datorită sensibilității crescute a parenchimului pancreatic la ischemie, recoltarea de la donatori NHB este dificilă. Japonezii au imaginat un sistem de răcire adaptat de la recoltarea de rinichi, care a scăzut mult timpul de ischemie caldă [47, 93].

Referitor la donatorii marginali, o recentă meta-analiză a arătat o creștere a numărului de IEQ prin metoda TLM, folosită de o echipă specializată de recoltare. Rezultate mai puțin bune au fost raportate de echipe neexperimentate, în cazuri cu indicație improprie sau în cazul neatenției la detalii [47, 93].

În ceea ce privește donatorii în viață, primul transplant de insule din pancreasul recoltat de la un donator în viață, a fost efectuat de autorii japonezi, după o pancreatectomie distală. Transplantul s-a făcut la un pacient cu diabet instabil. Un număr suficient de IEQ a fost izolat, iar pacientul transplantat a devenit insulino-independent. Donatorul a avut nivele normale ale hemoglobinei glicozilate și ale peptidului C. Efectul metabolic al insulelor izolate din pancreasul distal recoltat a fost similar celui obținut prin izolarea a 2 sau mai multe organe recoltate, acest lucru sugerând un potențial mai mare al insulelor recoltate de la donator viu, decât de la donatorul cadaveric [47, 93].

V.2. IZOLAREA, CULTIVAREA ȘI INFUZAREA INSULELOR PANCREATICE

În transplantul clinic de insule pancreatice este necesar un număr mare de IEQ pentru obținerea statusului normoglicemic, insulino-independent. Numărul de insule obținute care urmează a fi transplantate se exprimă ca echivalenți de insule (IEQ), care reprezintă insulele cu diametrul de 150 μ . În general este nevoie de o cantitate de 900.000 IEQ pentru transplant. Calitatea preparatului de infuzat se exprimă prin procentul de puritate al insulelor și prin procentul insulelor înconjurate de țesut acinar [7, 47, 92].

Puritatea reprezintă procentul de insule comparativ cu țesutul total prezent în preparat (insule, celule acinare și ductale), determinat prin microscopia optică a unei mostre reprezentative de preparat. Procentul de insule acoperite de țesut acinar din numărul total de insule libere sau acoperite se calculează tot prin microscopie optică. Insulele libere sunt considerate cele care au mai puțin de 25% din margini atașate de țesutul acinar, iar cele acoperite reprezintă insulele cu peste 25% din margini atașate țesutului acinar [49, 81, 94].

Procesul de izolare de insule pancreatice s-a realizat prin metoda automată Ricordi [95] modificată, cu și fără purificarea insulelor, în Laboratorul de Terapii Celulare al Institutului Clinic Fundeni.

Prima etapă a constat în decontaminarea pancreasului scos din soluția de prezervare și curățarea țesutului gras peripancreatic cu grijă de a nu leza capsula pancreatică.

A doua etapă a constat în împărțirea pancreasului în 2 jumătăți, cea a capului și cea formată din corp și coadă. Cele două jumătăți au fost canulate cu cateter de 16G și conectate la mașina de perfuzie Biorep. Țesutul pancreatic a fost astfel destins cu soluție enzimatică perfuzată, conținând: 20U/g pancreas GMP grade NB1 collagenază și 0,6 U/g pancreas neutral protează (Serva Electrophoresis, GmbH, Germany), timp de 12 minute.

Astfel începe etapa de digestie enzimatică. Rezultatul ei se cuantifică printr-o bună distensie a țesutului pancreatic. Pancreasul astfel detins este tăiat în 11 bucăți și transferat în camera de digestie Ricordi, conectată la un sistem circulator închis, încălzit la 37 grade. Etapa de digestive enzimatică continuă și se suprapune celei de disociație mecanică, prin activarea unui shaker blând. Datorită fazei de predigestie, această etapă a fost de obicei scurtă (3-10

minute). Periodic s-au recoltat probe cu volume de 1 ml soluție, prin intermediul portului de probe, cu o seringă, iar acestea au fost supuse colorării cu ditizonă (DTZ) și studiate la microscopul optic. Faza de digestie enzimatică a fost oprită în momentul detectării la microscop a insulelor pancreatice libere și viabile, folosind soluție de spălare rece (40 grade C) (Mediatech, Herndon, VA), introdusă în circuit cu rolul de diluție a soluției enzimaticice. Etapa de digestie reprezintă timpul necesar pentru eliberarea unui număr suficient de insule din țesutul acinar. Produsul obținut a fost colectat și spălat cu un mediu îmbogățit în albumină umană. S-a obținut astfel produsul fresh, nepurificat și necultivat.

A urmat etapa de purificare a insulelor pe bază de gradient (în 3 cazuri) și procesul s-a încheiat cu etapă de cultivare a insulelor pe mediu Miami, timp de 3 zile (excepție au făcut 2 cazuri de transplant de insule fresh, nepurificate și necultivate: unul în cazul unui autotransplant de insule și al doilea în cazul unui allotransplant simultan cu transplantul de ficat).

V.2.1. Caracterizarea insulelor

Insulele au fost caracterizate după colorarea cu dithizonă și observarea lor la microscopul optic. Numărul de IEQ a fost determinat folosind mașina și metoda de numărare automată Biorep [96]. Puritatea a fost determinată prin comparația țesutului insular colorat cu dithizonă față de cel exocrin necolorat.

Viabilitatea insulelor a fost evaluată folosind colorarea cu fluorescein diacetat (FDA) și propidium iodide (PI), cu vizualizarea simultană a celulelor vii (colorate în verde) și a celor moarte (colorate în roșu).

Observarea insulelor izolate la microscopia optică a arătat o calitate bună acestora prin lipsa reacției de aglutinare și de înlănțuire a acestora.

Toate insulele au fost testate din punct de vedere al sterilității, cu rezultat pozitiv în toate cazurile.

V.2.2. Avantajele și dezavantajele etapei de purificare a insulelor

Preparatul nepurificat combină insule libere de țesut acinar, clustere de insule, țesut acinar și ductal. În studiul meu aproximativ 40% din celulele izolate au fost atașate de țesut acinar, însemnând o puritate scăzută. În timpul transplantării preparatului nepurificat, o dată cu celulele endocrine, se transplantează și o serie de celule nonendocrine, cele mai frecvente fiind celule acinare și ductale. Aceste celule nonendocrine pot fi benefice pentru supraviețuirea de lungă durată a insulelor. Există o serie de publicații care sugerează că precursorii de celule pancreatice ductale pot reprezenta o sursă de neogeneza a insulelor pancreatice. Acest fapt a fost demonstrat prin biopsiile a 3 pacienți cu autotransplant de insule pancreatice, raportate de Soltani SM [97]. Aceste structuri islet-like sunt pozitive pentru secreția de insulină și glucagon.

Matsumoto [49] a demonstrat că purificarea insulelor se impune atunci când volumul preparatului este mare, reducând astfel riscul complicațiilor date de presiunea crescută în vena portă.

Pe de altă parte, marele dezavantaj al etapei purificării este acela că aproximativ 40% din masa de insule se pierde în timpul procesului. Purificarea nu se face atunci când țesutul pancreatic exocrin este limitat, că în cazul pacienților cu autotransplant după pancreatectomie totale pentru pancreatita cronică [45, 98].

V.3. NOȚIUNI CHIRURGICALE CU IMPLICAȚIE ÎN AUTOTRANSPLANTUL DE INSULE PANCREATICE

V.3.1. Pancreatectomia totală și autotransplantul de insule pancreatice la pacienții cu pancreatită cronică

Pancreatita cronică este o boală inflamatorie progresivă care induce modificări ireversibile la nivelul pancreasului interesând atât componenta exocrină cât și cea endocrină, mergând până la malnutriție și diabet [97, 99].

Principalul obiectiv în pancreatita cronică este remisiunea sindromului algic și a dependenței de narcotice și prevenirea episoadelor recurente de pancreatită acută. Un al doilea obiectiv este acela de preservare a cât mai mult din parenchimul pancreatic neafectat și de corectare a insuficienței metabolice care apare post intervenției chirurgicale.

Rezecțiile pancreatice sunt indicate la pacienții cu duct pancreatic nedilatat sau la cei la care alte proceduri endoscopice sau chirurgicale de drenaj nu au dat rezultate. Există 3 metode de prevenire a diabetului indus chirurgical: autotransplantul de pancreas segmentar, allotransplantul de insule pancreatice sau autotransplantul de insule. Primul se aplică unui număr mic de pacienți, iar al doilea necesită terapie imunosupresoare, cu complicațiile ce rezidă din această.

Prognosticul fără intervenție chirurgicală arată o mortalitate de 50% în 20-25 ani de la debutul bolii. Intervenția chirurgicală se alege în funcție de funcția endocrină și exocrină a pancreasului, de formă de pancreatită cronică (cu duct larg sau calcifiant sau cu duct îngust) și de intensitatea durerii.

Uneori însă pancreatectomia totală este singura opțiune care oferă o remisiune totală a sindromului algic. Deși este asociată cu o mortalitate și o morbiditate crescute, totuși remisiunea durerii prevalează asupra celorlalte complicații, ca diabetul sau insuficiența exocrină. În ultimele 3 decade, mortalitatea în centre cu volum mare, a scăzut de la 22% la 3%, prin îmbunătățirea tehnicilor operative [59]. Buchler MW *et al* [100] au demonstrat că ratele mortalității și morbidității după PT selectivă nu sunt mai mari decât în duodenopancreatetomia cu preservare de pilor. Prin această operație nu doar întregul pancreas este rezecat, dar și zonele de inflamație a nervilor. Una din complicațiile majore este reprezentată de deficiența în secreția de insulină și glucagon, dând naștere diabetului indus chirurgical. Pentru a preveni acest lucru este recomandat autotransplantul de insule pancreatice, care chiar și cu necesarul suplimentar de insulina exogenă, asigură un control mai eficient al diabetului prin secreția de lungă durată a insulinei și peptidului C.

Se practică mai frecvent intervenția simultană de PT și AIT decât PT urmată de transplant allograft programat. Acesta din urmă va necesita introducerea tratamentului de imunosupresie, cu efectele sale secundare. Conform Registrului Internațional al Transplantului de Pancreas [19], acest tratament a fost ales în mai puțin de 0.1% din totalul transplantului de insule allograft.

Calitatea țesutului pancreatic recoltat la pacienții cu pancreatită cronică este inferioară celor cu pancreas normal, țesutul endocrin și exocrin fiind înlocuit cu fibroză, calcificări și chiste, pe perioada inflamației cronice. Kobayashi *et al* [101] au demonstrat, datorită corelației inverse între fibroză pancreatică și numărul de IEQ obținut prin izolare, că, cu cât pacientul cu pancreatita cronică se prezintă pentru operație mai repede, cu atât complicațiile legate de abuzul de narcotice și șansa de a se prezerva și de a se izola o cantitate mai mare de insule viabile, este mai mare.

Factorii care se corelează cu obținerea statusului insulino-independent includ sexul feminin, BMI < 28 și numărul de IEQ infuzați/kg corp.

Primul autotransplant de insule s-a efectuat la Universitatea din Minnesota, în 1977 [102], la un pacient cu pancreatita cronică cu duct îngust și sindrom alergic refractar, iar rezultatul a fost remisiunea completă a sindromului alergic și obținerea statusului insulino-independent. Cele mai recente publicații au arătat că din 1977 până în prezent s-au efectuat peste 500 AIP. Recent Sutherland *et al* [20, 103] au raportat cea mai mare serie de pancreatectomie totală și autotransplant de insule la Universitatea din Minnesota, cu peste 409 cazuri raportate. Remisiunea sindromului alergic este atinsă în 80% din cazuri, iar statusul insulino-independent în 30-40% din cazuri, iar 70% din recipienți rămân insulino-independenți la > 2 ani, mai ales dacă numărul de IEQ > 300.000 [88, 104].

V.3.2. Selecția pacienților

Nu întotdeauna severitatea sindromului alergic se corelează cu modificările histologice ale pancreasului, iar diagnosticul de pancreatită cronică se stabilește pe baza simptomatologiei, a modificărilor metabolice, radiologice sau endoscopice.

Etiologia durerii în pancreatită cronică nu este pe deplin cunoscută. Există studii care arată că printre factorii cauzali se numără hiperpresiunea intraductală, inflamația nervilor intrinseci (neurita) sau chiar cauză centrală.

Pacienții cu episoade repetate de pancreatită acută sunt candidați la pancreatectomie totală urmată de autotransplant de insule, dacă episoadele sunt frecvente, chiar dacă au perioade „pain free” între ele. Evoluția acestor episoade va fi către o pancreatită cronică, mai ales dacă nivelele de amilaze și lipaze se mențin crescute o lungă perioadă de timp și dacă durerea persistă după remisiunea celorlalte simptome.

Pentru pacienții non diabetici, care primesc ca tratament analgetice majore, dar care au criterii minore de pancreatită cronică, sunt autori care recomandă pancreatectomia totală și AIP.

O altă categorie de pacienți cu pancreatită cronică prezintă diabet de la prima înfățișare la medic. În acest caz, decizia de a se efectua PT cu AIP este mai ușoară, în special dacă există deja și insuficiență exocrină.

Majoritatea pacienților cu pancreatită cronică nu au diabet la momentul diagnosticării. Pentru această categorie PT cu AIP reprezintă o soluție pentru remisiunea sindromului alergic sau utilizarea a cât mai puține analgetice postoperator.

Asocierea dintre pancreatita cronică și cancerul de pancreas este bine cunoscută. Cancerul poate să apară pe un pancreas cu pancreatită cronică, indiferent de etiologia acesteia, după o evoluție de lungă durată, de peste 30-40 ani. Cel mai mare risc îl au pacienții fumători sau cu componentă genetică.

La acești pacienți pancreatectomia totală elimină riscul evoluției unui cancer ocult, iar autotransplantul de insule scade și mai mult acest risc, în primul rând prin scăderea volumului pancreasului. Deși înaintea autotransplantului se efectuează sampling multiplu, totuși riscul unor rezultate fals negative este foarte mare, datorita imposibilității efectuării acestor biopsii din întreaga glandă.

Totuși, studiile pe largi serii de autotransplant au arătat că riscul de apariție a cancerului după autotransplant este foarte mic.

V.3.3. Opțiuni tehnice în pancreatectomia totală în vederea autotransplantului de insule pancreatice

Principalul obiectiv al pancreatectomiei totale îl reprezintă remisiunea totală a sindromului alergic, dar marele avantaj rămâne prevenirea fistulei anastomotice.

Există mai multe tehnici chirurgicale practicate de diferitele centre de excelență în chirurgia pancreasului, dar există aspecte general comune, foarte importante în succesul autotransplantului.

De o foarte mare importanță este menținerea, în timpul disecției, pentru cât mai mult timp posibil, a vascularizației pancreatice intacte. Acest lucru va duce la reducerea timpului de ischemie caldă. Acest obiectiv este atins prin menajarea vascularizației arteriale și venoase ale pancreasului, până la excizia totală a organului. În timpul disecției o atenție deosebită trebuie acordată hemostazei, deoarece riscul de sângerare este mare la acești pacienți, în primul rând deoarece se lucrează într-o zonă hipervascularizată, în al doilea rând datorită procesului zonal de inflamație și nu în ultimul rând datorită timpului de administrare de heparină, obligatoriu în timpul infuziei preparatului de insule, pentru a preveni hipertensiunea portală și tromboza de vena portă.

În timpul disecției, trebuie evitate injuria capsulei sau a parenchimului pancreatic, deoarece acest lucru împieteează digestia enzimatică și obținerea unui număr suficient de insule pentru autotransplant.

Există și particularități anatomice cu un mare impact asupra succesului izolării de insule, pe care echipa operatorie trebuie să le cunoască: pancreas divisum, pancreasul anular, splinele accesorii sau lipomatoza pancreatică.

Pancreas divisum este cea mai frecventă anomalie a pancreasului, care nu are un impact negativ asupra calității distensiei pancreatice din faza enzimatică a izolării de insule, doar că în acest caz metoda canularii trebuie modificată datorită faptului că ductul Wirsung este mai îngust decât Santorini.

Splinele accesorii sunt frecvent găsite, la 10% din populație și se pot situa oriunde în cavitatea abdominală. Pancreasul este al doilea cel mai frecvent loc al splinei accesorii, cu o frecvență de 1 la 5 spline accesorii. Este bine de știut că aceste spline accesorii nu trebuie rezecate înainte de terminarea etapei de distensie, deoarece ele sunt situate profund în parenchimul pancreatic și excizia lor poate cauza injurie a parenchimului.

Pancreasul lipomatos este caracterizat prin înlocuirea țesutului exocrin cu țesut adipos sau infiltrat gras. Există câteva condiții asociate cu pancreasul lipomatos, cum sunt obezitatea, vârsta înaintată, obstrucția ductului pancreatic sau boli metabolice. Trebuie făcută însă diferența dintre infiltratul lipomatos și grăsimea peripancreatică, ultima fiind facil de disecat de parenchim fără lezarea sa. Sunt studii care arată că succesul unei izolări de calitate se corelează cu conținutul înalt în țesut adipos al pancreasului.

VI. REZULTATE. TRANSPLANTUL CLINIC DE INSULE PANCREATICE

VI.1. CAZUL 1 – AUTOTRANSPLANTUL DE INSULE PANCREATICE LA O PACIENTĂ CU PANCREATECTOMIE TOTALĂ PENTRU PANCREATITĂ CRONICĂ

Pacienta în vârstă de 53 ani, cu o greutate de 60 kg și un BMI de 22, colecistectomizată în 1997, diagnosticată cu pancreatită cronică cu afectarea întregului organ, fără dilatație ductală, clinic cu sindrom algic refractar la terapia medicamentoasă și episoade repetate de pancreatită acută.

Diagnosticul de pancreatită cronică a fost pus pe baza analizelor de laborator și a imagisticii:

- teste de laborator: HbA1C 6.3% (valori normale 4.8-6.0%) și glicemia
- examenele CT și RMN au arătat prezenta pancreatitei cronice, cu duct îngust și chiste pancreatice în întreg parenchimul.

Indicația chirurgicală de rezecție pancreatică a fost sindromul algic permanent, refractar la antalgice majore și episoadele de pancreatită acută recurente.

VI.1.1. Pancreatectomia totală – considerații tehnice chirurgicale

Intervenția chirurgicală a constat în pancreatectomie totală, cu preservarea duodenului și a splinei și canularea venei mezenterice inferioare pentru infuzarea insulelor în sistemul port. Pe parcursul intervenției chirurgicale, vascularizația pancreasului a fost menajată cât mai mult posibil, pentru a minimiza timpul de ischemie caldă a insulelor pancreatice. În mod tipic, mobilizarea s-a început dinspre porțiunea distală, de-a lungul arterei și venei splenice, la nivelul venei mezenterice superioare.

Disecția s-a făcut cu atenție deosebită la hemostază, datorită riscului de sângerare crescut dat de heparinizarea dinaintea infuziei de insule, știut fiind faptul că infuzia determină hipertensiune portală temporară.

Imediat după rezecția pancreatică s-a început administrarea de insulină pe injectomat, cu menținerea glicemiei la valori de sub 120 mg/dl, pentru a preveni toxicitatea glucozei la nivelul insulelor, demonstrat fiind efectul negativ al hiperglicemiei asupra graftului insular.

Rezultatul examenului histopatologic intraoperator nu a decelat celule maligne. Intervenția chirurgicală a decurs fără incidente.

VI.1.2. Izolarea insulelor, evaluarea și infuzarea lor

Preservarea pancreasului s-a făcut în soluție rece de Custodiol. Timpul de ischemie rece a fost sub 8 ore. Pancreasul a fost cântărit (80 g) și apoi decontaminat. Testele de contaminare au fost negative.

Procesul de izolare de insule pancreatice a avut loc în Laboratorul de Terapii Celulare din cadrul Institutului Clinic Fundeni, în conformitate cu legislația română privind terapiile celulare. Consimțământul informat a fost semnat de pacientă înainte de începerea intervenției chirurgicale.

Procesul de izolare s-a efectuat folosind metoda automată Ricordi modificată, constând în:

- Decontaminarea pancreasului, îndepărtarea tesului gras peripancreatic și secționarea sa în 2 părți (porțiunea capului și corpul și coadă) apoi canularea ductului fiecărei jumătăți cu canula de 16G conectată la aparatul de perfuzie automată Biorep.
- Distensia bună a pancreasului folosind soluție enzimatică conținând 20U/g GMP collagenază NB1 (Serva, USA) și 0.6 U/g neutral protează (Serva Electrophoresis, GmbH, Germany).
- Secționarea pancreasului destins în 11 bucăți și transferat în camera Ricordi, conectată la un circuit cu tubulatură închis, prin care circulă soluția enzimatică încălzită la 37 grade celsius și un shaker blând (digestie enzimatică și mecanică). Periodic s-au recoltat probe de 1 ml cu ajutorul unei seringi, prin portul special pentru probe din circuit, care s-au colorat cu ditizona (dyphenylthiocarbazone, Sigma St Louis, UȘA) și au fost analizate la microscopul optic. Puritatea insulelor a fost estimată prin comparația dintre țesutul colorat cu ditizona și cel necolorat reprezentat de țesut acinar. Viabilitatea insulelor a fost evaluată folosind folosind colorația dublă cu florescein diacetat (FDA) și propidium iodat (PI) și observarea simultană la microscop a celulelor viabile (colorate în verde) și a celor neviabile (colorate în roșu). Durata procesului de digestie reprezintă timpul necesar pentru a fi eliberate un număr suficient de insule de țesutul acinar și, în acest caz a fost de 12 minute.
- O dată ce au fost detectate la microscop insule libere de țesut exocrin, procesul de digestie a fost oprit prin răcirea rapidă a soluției enzimatice cu soluție de diluție la 4 grade celsius (Mediatech, Herndon, VA).

- Produsul de digestie a fost colectat și spălat într-un mediu îmbogățit cu albumină umană. Insulele au fost numărate prin metoda automată Biorep, iar numărul a fost convertit în IEQ (insule cu diametrul standardizat de 150 microni). Totalul IEQ a fost de 280.000, 3000 IEQ/g pancreas, volumul pellet-ului a fost de 40 ml. Durata întregului proces de izolare a fost de 5 ore.

- După efectuarea testului de sterilitate, produsul nepurificat a fost resuspendat în pungi speciale de infuzie, în mediu de transplant CMRL (Mediatech, Inc), albumină umană 5% și heparină (70U/kg, pentru a preveni aglutinarea intraportală a insulelor) și transportat în sala de operație. Timpul de infuzare a insulelor prin cateterul montat intraoperator în vena mezenterică inferioară a fost de 40 minute, după heparinizare a cateterului cu 5000u heparina pentru a preveni tromboza portală. În timpul infuziei a fost monitorizată presiunea arterială și venoasă centrală, precum și selectiv presiunea din venă portă dependentă de volumul de insule infuzat. Cateterul a fost suprimat a 2-a zi în sala de operație, sub anestezie totală. Nu au existat complicații legate de infuzie (hemoragice sau trombotice).

VI.1.3. Evoluția postoperatorie imediată și la distanță

Funcția insulelor transplantate a fost urmărită monitorizând: glicemia zilnică măsurată la interval de 4 ore (glucose-oxydase method), HbA1c (HPLC method), peptidul C și insulinemia (metoda ELISA) și indexul HOMA-IR și HOMA-B, calculate din glicemia a jeun și insulinemie.

În perioada postoperatorie imediată a fost inițiată infuzia continuă de insulină pe injectomat, pentru a menține nivelul glicemiei între 70-140 mg/dl. Apoi necesarul de insulină s-a redus treptat. Nivelurile glicemiei s-au situat între 97-160 mg/dl. Pacienta a atins niveluri normale ale peptidului C după 3 zile, apoi, după 14 zile, infuzia de insulină nu a mai fost necesară, fiind înlocuită de ingestia de biguanidă (Metformin - Siofor 1g: ½ cp x 2/zi), datorită unor valori mai mari ale glicemiei.

Statusul insulino-independent se definește ca valori pozitive ale peptidului C, cu valori ale glicemiei de până la 140 mg/dl, fără terapie cu insulină.

Parametru	2 săptămâni	3 luni	9 luni	1 an	1.5 ani
Glicemie	129	109	117	100	108
HbA1c *	6.1	6.21	6.08	6.08	5.88
Insulinemie	4.19	3.68	2.76	4.20	2.27
Peptid-C	1.36	1.43	1.05	1	0.889

*Valori normale: 4.8-6.0%

Succesul greșării și funcția insulelor transplantate au fost calculate prin HOMA index (homeostasis model assessment). Acest index este predictiv pentru homeostazie luând în calcul funcția celulelor β și rezistența la insulină.

HOMA-IR (rezistența la insulină) și funcția celulelor β se calculează pe baza valorilor glucozei a jeun și a nivelurilor insulinei plasmaticice.

HOMA-B estimează masa de celule β funcționale. În formula sa intră și concentrația de insulină plasmatică și de aceea nu poate evalua funcția la pacienții ce primesc insulină exogenă.

Din acest motiv, unii autori calculează indexul SUITO (Matsumoto, Unit of islet transplant objects), în a cărei formula intră nivelurile glicemiei și ale peptidului C: [fasting c-peptide (ng/ml)/fasting blood glucose (mg/dl)-63] x 1500.

Parametru	2 săptămâni	3 luni	9 luni	1 an	1.5 ani
HOMA-B	60	68	48	40.8	49.9

HOMA-IR	1.1	1.1	0.8	1.04	0.7
SUITO	29.7	46.65	29.25	40.65	29.61

Din punct de vedere al sindromului algic acesta a fost estimat conform unei scale de la 0 (fără durere) la 10 (durere severă).

Statusul normal exocrin a fost manageriat prin suplimentarea de enzime pancreatice (Creon 10.000 unități x 3/zi în timpul principalelor mese) și estimat prin calitatea și cantitatea scaunelor.

În cursul urmăririi postoperatorie, pacienta a fost diagnosticată imagistic cu formațiuni nodulare multiple intrasplenice, cu dimensiuni infracentimetrice, care au fost monitorizate imagistic din punct de vedere al numărului și dimensiunilor acestora între anii 2012-2014. Consultul hematologic ridică suspiciunea unui limfom cu determinare splenică și recomandă splenectomia, deși puncția medulară este în repetate rânduri negativă.

În septembrie 2014 se intervine chirurgical și se practică splenectomia totală, rezultatul histopatologic fiind de limfom non Hodgkin folicular grad 3A.

Evoluția postoperatorie este agravată de apariția unei tromboze extinse la nivelul confluentului spleno-mezenteric, al trunchiului portal și al ramului posterior al porții drepte, pentru care se instituie tratament cu heparină și antiagregant plachetar, cu remisiunea completă a acesteia. În februarie 2016 pacienta începe tratamentul specific chimioterapic R-CHOP, cu evoluție favorabilă, până în 2017, când este diagnosticată imagistic cu formațiune tumorală prevezicală, pentru care se intervine chirurgical în octombrie 2017 și se practică excizia formațiunii tumorale prevezicale, în bloc cu rezecție parțială de vezica urinară. Rezultatul HP: imfom non-Hodgkin difuz cu celula B folicular grad 3A, cu interesare vezicală. Pacienta continuă tratamentul chimioterapic R-GemOx.

În prezent, la 7 ani posttransplant, pacienta este în viață, cu un control glicemic bun, insulino-independent, cu glicemii a jeun de 150 mg/dl și valori medii de 115 mg/dl, sub tratament cronic cu Siofor în schema 1cp dimineata-1/2 cp pranz-1cp seara. Indicele HOMA-B calculat este de 48 %.

VI.2. CAZUL 2 – PRIMUL ALLOTRANSPLANT DE INSULE PANCREATICE DIN ROMÂNIA REALIZAT ÎN INSTITUTUL CLINIC FUNDENI

Ca și etapă în realizarea unui program coerent de transplant de insule pancreatice, voi prezenta cazul primului allotransplant de insule pancreatice realizat în Institutul Clinic Fundeni, în cadrul unui transplant combinat de ficat și de insule pancreatice, la un pacient în vârstă de 40 ani, cirotic, cu diabet zaharat insulino-dependent.

VI.2.1. Indicația de transplant

Pacientul având greutatea de 85 kg și un BMI de 24.5 kg/m² a fost diagnosticat în 1995 cu hepatită cronică cu virus hepatitic C, genotip 1, pentru care a urmat tratament cu Interferon și Ribavirina timp de 12 luni, cu recădere după oprirea tratamentului. Pacientul este urmărit în Clinica de gastroenterologie, iar în anul 2002 este diagnosticat cu ciroză hepatică VHC și este introdus pe lista de așteptare pentru transplantul hepatic, întrunind criteriile minime: scor Child Pugh 8, scor MELD 17, cu viremie HCV RNA de 1.840.000 IU/ml. Tratamentul continuă cu doze mici de interferon Pegasys 90 μg/săptămână și Ribavirina (Copegus) 1000 mg/zi. După o lună de tratament, doză de Pegasys crește la 180 μg/săptămână. După 24 săptămâni de tratament viremia a scăzut la 3.700 UI/ml, drept pentru care se continuă cu o doză de menținere de Pegasys de 90 μg/săptămână.

Începând cu 1999, în cadrul analizelor uzuale pentru urmărirea afecțiunii hepatice, testele glicemiei au arătat valori crescute (vezi tabel 2):

Tabelul 2. Evoluția valorilor glicemice

An/ glicemie	Glicemie (mg/dl)	HBA1C (%)	Necesar insulina
iulie1999	105		
Noiembrie 1999	152		
Fenruarie 2000	176		
Mai 2000	293	8.2	26U/zi Humalog
2002		8.6	26 U/zi
2003 – 2004		9.1	40U/zi
2005		7.5	64 U/zi

În 2005 are loc o creștere a viremiei la 1.220.000 UI/ml, cu decompensarea ușoară a funcției hepatice, cu creșterea concomitentă a transaminazelor de 2-2.5 ori normalul, sub tratament cu interferon în doze de întreținere. Concomitent cu progresia afecțiunii hepatice, din anul 2000, până în 2005, necesarul de insulină crește de la 26 la 64 U/zi.

Riscul de decompensare hepatică și scorul MELD de 14 au impus urgentarea transplantului hepatic, iar datorită concomitenței diabetului insulino-dependent în doze crescânde, s-a decis efectuarea transplantului simultan de ficat și insule pancreatice, care a fost realizat în septembrie 2005.

VI.2.2. Recoltarea în bloc ficat-pancreas de la donator aflat în moarte cerebrală

Ficatul și pancreasul au fost recoltate în bloc, de la un donator aflat în moarte cerebrală alocate după criterii de compatibilitate în sistemul ABO și crossmatch (cl I și II) negativ.

Ca și variante anatomice ale vascularizației ficatului donatorului, a existat o arteră hepatică dreapta accesorie, ram din artera mezenterică superioară și o arteră stânga accesorie pentru segmentul IV, ram din artera coronară, care au fost prezervate în cursul prelevării, motiv pentru care recoltarea s-a făcut în bloc ficat-pancreas, iar split-ul s-a efectuat în blocul operator din Institutul Clinic Fundeni.

Timpul de ischemie rece a fost de 8 ore, iar soluția de prezervare a fost Custodiol, la 4 grade Celsius.

S-a efectuat transplant hepatic ortotopic cu ficat întreg având ca anastomoze: cavo-cavoanastomoza latero-laterală, porto-portoanastomoza T-T, artera hepatică comună receptor – trunchi celiac reconstruit donator și coledoco-coledocoanastomoza T-T. La sfârșitul intervenției s-a montat un cateter angio- de 16 Fr în vena portă, prin vena mezenterică inferioară, pentru infuzarea de insule pancreatice în vena portă și s-au confecționat 2 buzunărașe în marele epiploon cateterizate de asemenea separat cu alte 2 catetere exteriorizate transparietal, pentru infuzarea de insule pancreatice în oment.

Procesul de izolare a insulelor s-a efectuat în Laboratorul Spitalului Județean Constanța, folosind metoda de dublă digestie: enzimatică și mecanică. Insulele obținute au fost incubate timp de 72 ore în mediu CMRL 1066 (Sigma-Aldrich), îmbunătățit cu ITS (insulin transferin and selenium), acid linoleic, albumina umană, nicotinamida, vitamina E (Sigma-Aldrich), în atmosfera de 5% CO₂ și 95% aer, la 37 grade în primele 24 ore, apoi la 24 grade, până la 72 ore.

Numărul total de echivalenți de insule pancreatice a fost de 284.000, iar după incubare, la testul de viabilitate 80% din insule au fost viabile, iar testele de sterilitate microbiologică au fost negative.

După incubare, insulele au fost resuspendate în mediu de transplant CMRL (Mediatech, Inc), îmbunătățit cu albumină umană în concentrație finală de 5% și heparină (70U/kg, pentru a preveni aglutinarea intraportală a insulelor) și transportat în secția de ATI a Institutului Clinic Fundeni, unde au fost infuzate încet (în 30 minute), 100 ml în cateterul intraportal

preheparinat și 30 ml în cele 2 catetere montate în cele 2 buzunărașe de epiploon. Presiunea venoasă portală a fost măsurată înainte de infuzie și la fiecare 5 minute în timpul infuziei și a variat în limite normale, între 19 și 23 (6 determinări). Pacientul a tolerat bine procedura și nu au existat incidente.

În ziua 4 postoperator s-a reintervenit chirurgical pentru un hematom voluminos subhepatic, pentru controlul sursei de sângerare, ocazie cu care s-au suprimat și cele 3 catetere de infuzie a insulelor pancreatice.

VI.2.3. Evolutia postoperatorie imediată și la distanță

În ziua a 4-a postoperator a avut loc o creștere a valorilor enzimelor de hepatocitoliză considerate în relație cu infuzarea insulelor pancreatice.

Pentru a se exclude un rejet acut, în ziua 13 postoperator s-a practicat biopsie hepatică percutanată ecoghidată, iar rezultatul histopatologic a confirmat reacția la infuzia de insule pancreatice: parenchim hepatic cu arhitectură prezervată, cu minim infiltrat celular inflamator al spațiului intraportal.

După 2 săptămâni, nivelurile enzimelor de hepatocitoliză au scăzut progresiv, cu normalizarea lor în ziua a 20-a.

Din punct de vedere al transplantului hepatic, nivelul transaminazelor s-a menținut în limite normale, cu creșterea însă progresivă a viremiei până la valori de 6.300.000 UI/ml, cu biopsie hepatică în luna a 6-a, ce a arătat recăderea infecției VHC, iar în luna a 10 -a posttransplant nivelurile transaminazelor de 4x normalul și ale ARN HVC de 36.700.000 UI/ml au impus reînceperea terapiei cu interferon (Pegasys, Roche, Basel, Switzerland) 180 microg/sapt și Ribavirina (Copegus, Roche, Basel, Switzerland) 100 mg/zi timp de 3 luni, cu scăderea inițială în prima lună până la valori de 1.500.000 UI/ml, dar creșterea la 2.850.000 UI/ml, respectiv 2.129.000 UI/ml, ceea ce a impus stoparea tratamentului datorită ineficienței.

Evaluarea graftului insular s-a făcut prin monitorizarea nivelurilor glicemiei (glicemia a jeun și la 2 ore postprandial), a nivelurilor peptidului C și a hemoglobinei glicozilate.

O monitorizare continuă a glicemiei timp de 72 ore (Medtronic MiniMed Continuous Glucose Monitoring System - CGMS), efectuată la 2 luni posttransplant a arătat o medie de 115.8±32 mg/dl, o singură determinare având o valoare de 200 mg/dl, dar cu multiple episoade hipoglicemice, cu valori sub 70 mg/dl, iar nivelurile glicemiei a jeun au fost sub 126 mg/dl.

Valorile glicemiei au scăzut progresiv, în paralel cu cele ale HbA1c, iar necesarul de insulină a scăzut de la 64 U/zi pretransplant la 40 U/zi în februarie 2006 și la 20 U/zi în septembrie 2006.

Încercarea de reducere la 16U/zi insulina exogenă a dus la creșteri ale glicemiei la peste 150 mg/dl și a HbA1c de 7.5%, ceea ce a impus corectarea insulinei la 20 U/zi cu stabilizarea glicemiei la < 130 mg/dl și a HbA1c la 6.9%.

Parametru	Feb 2006	Iun 2006	Sep 2006	2007
HbA1c	6.1	7.5	7.8	6.9
Peptid C	0.17		0.11	1.04
Proinsulina			10.2	8.3
Necesar insulină exogenă	40	16	20	20
Glicemia	115±38	150	130	

În februarie 2007, în luna a 14-a posttransplant pacientul este diagnosticat cu tuberculoză pulmonară, pentru care se inițiază tratamentul triplu medicamentos, cu decompensarea subsecventă a funcției hepatice.

Pacientul este relistat pentru retransplant, dar decedează în luna mai 2007.

VI.2.4. Imunosupresia

S-a folosit imunosupresia steroid-free conform protocolului de la Edmonton ținând cont și de efectele acestuia asupra pacienților cu transplant hepatic, inițiat imediat posttransplant cu Daclizumab (Zenapax) ca și terapie de inducție, 1 mg/kg, 5 doze la interval de 14 zile posttransplant și Sirolimus (Rapamycin) și doze scăzute de Tacrolimus (Prograf) ca și terapie de menținere.

Concentrația de Sirolimus în sânge a fost menținută între 12-15 ng/ml, în primele 3 luni și 8-10 ng/ml după aceea, iar tacrolinemia a fost menținută între 3-6 ng/ml.

Din luna a 10-a, o dată cu creșterea viremiei și a rezultatului biopsiei hepatice, care a arătat creșterea fibrozei și a infiltratului inflamator portal și periportal, s-a luat decizia de a se înlocui Sirolimusul cu Mycophenolat mofetil (MMF, Roche), datorită efectului antifibrotic și antiinflamator dovedit la recipienții cu HVC. Nivelul tacrolinemiei a fost menținut între 2-4 ng/ml.

VI.3. EXPERIMENT PE ȘOARECI DIABETICI

VI.3.1. Material și metodă

Implantarea țesutului pancreatic uman la șoareci diabetici s-a efectuat în laboratorul de cercetare experimentală din cadrul Institutului Ștefan Nicolau. Recoltarea unui fragment cu dimensiuni de 1/1 cm dintr-un insulinom benign pancreatic corporeal s-a efectuat în Institutul Clinic Fundeni, după rezecția pancreatică centrală pentru insulinom, la o pacientă de 40 ani, G.I.

Recoltarea s-a făcut în mediu steril, iar transportul a fost efectuat în containere sterile, fără mediu de transport sau fixare.

Fragmentul cu greutate de 0.7 g a fost împărțit în 4 părți relativ egale, sub hota cu flux laminar, iar fragmentele au fost cântărite astfel:

Fragment	1	2	3	4
Greutate (g)	0.14	0.13	0.19	0.17

Țesutul pancreatic fresh a fost implantat la un lot format din 4 șoareci diabetici BKS^{db}, având mutația spontană Lepr^{db} (leptin receptor), care manifestă obezitate morbidă, hiperglicemie cronică, atrofie de masă de celule β și care devin hipoinsulinemici. Obezitatea apare în săptămânile 3-4 de viață. Niveluri plasmatice crescute ale insulinei apar la 10-14 zile, iar niveluri crescute ale glicemiei al 4-8 săptămâni. În timp severitatea bolii duce la niveluri crescute ale glicemiei necontrolate prin administrarea de insulină exogenă, iar masa de celule β producătoare de insulină scade dramatic. Apar neuropatia diabetică și boala cardiacă, cu deces la 10 luni de viață.

Lotul de șoareci a fost uniform, format din masculi, având 100 g fiecare.

Situsurile de implantare au fost în 2 cazuri bursa omentală, iar în alte 2 cazuri intramuscular în coapsă (tabel 3):

Tabelul 3. Situsurile de implantare la șoareci

Șoareci/Parametru	N1	N2	G1	G2
Greutate tesut (G)	0.19	0.17	0.14	0.13
Situs implantare	intraperitoneal	intramuscular	intraperitoneal	intramuscular

Nivelurile glicemiilor fasting recoltate timp de 5 săptămâni au fost comparate cu cele ale lotului martor, format din 2 șoareci, denumiți M1 și M2 și sunt notate în tabelul 4:

Tabelul 4. Nivelurile glicemiilor fasting recoltate timp de 5 săptămâni

Glicemie (g/dl)/ Zi post implant	N1	N2	G1	G2	M1	M2
Z0	168	125	183	183	124	125
Z3	114	109	Exitus	149	119	126
Z5	182	116		135		
Z12	223	136		140	125	128
Z14	240	103		194	131	145
Z19	161	200		153	125	108
Z21	151	163		167	164	145
Z 28	178	183		246	144	140
Z 34	158	134		136	123	117
Z38	144	103		139		
Valori medii	171.9	137.4	0	164.2	131.8	129.25

Glicemiile din ziua Z0 sunt măsurate anterior implantării fragmentelor de insulinom. Pentru măsurarea glicemiei, șoarecii au fost înfometați timp de 1h și 30 minute. Glicemia a fost măsurată cu glucometrul SHL-G800. La 5 săptămâni după implant, cei 3 șoareci transplantați au fost sacrificați, recoltându-se ficatul, pancreasul, splina, marele epiploon și mușchiul striat al coapsei.

VI.3.2. Tehnica histologică

Etapele tehnicii de prelucrare uzuală au fost: orientarea pieselor operatorii, fixarea, includerea în parafină, secționarea, deparafinarea, colorarea, montarea.

VI.3.3. Discuții

Studii similare au arătat o creștere progresivă a hipoglicemiilor la 2-4 luni după transplant, cu rebound al hiperglicemiilor la 24 ore după extragerea tumorii.

Deși aceste experimente cu insulinoame aduc spre analiză țesut pancreatic bogat, totuși celulele predominante nu sunt clare, insulinemia fiind scăzută, iar colorațiile pentru insulină sunt negative.

Animalele nu au arătat corecții ale glicemiilor, fie și tranzitorii, dar nici modificări ale valorilor acestora față de lotul martor. Insulinemia nu a putut fi măsurată, deci funcția graftului nu a putut fi estimată.

Preparatele HP și IHC au pus în evidență insule viabile migrate pe calea circulației portale în ficat și splină, dar și în marere epiploon, în cazul implantării în bursa omentală și la nivelul mușchiului striat, în cazul implantării în mușchiul striat. Nu s-au pus în evidență modificări inflamatorii de rejet al graftului.

La șoarecii cu graft muscular s-au identificat celule endocrine viabile atât la nivelul mușchiului striat, unde se găsesc în număr mare, cât și la nivel splenic și hepatic, în număr foarte mic.

În ceea ce privește insulele pancreatice din pancreasul gazdei, ele nu se pot deosebi morfologic pe aceste preparate de cele ale graftului, acestea din urmă putând fi identificate doar prin legarea cu anticorpi anti-HLA uman sau anti-insulină umană. Totuși, pe acest preparat se poate vedea numărul mic de insule pancreatice caracteristic tipului de șoareci folosiți.

În cazul implantării tesutului pancreatic în bursa omentală, preparatele au dovedit insule viabile în număr mare, situate la nivelul ficatului, splinei și tesutului adipos din marele epiploon.

Animalele nu au arătat corecții ale glicemiilor, fie și tranzitorii, dar nici modificări ale valorilor acestora față de lotul martor.

Histologic și la microscopia electronică s-au descris celule endocrine funcționale, viabile, fără a se putea estima funcția acestora. Având în vedere paucitatea insulelor pancreatice identificate în țesutul pancreatic și faptul că masa de celule β este în continuă degradare la acești șoareci, probabil că insulele graftului au fost funcționale, deoarece nivelul glicemiilor a rămas constant.

Insulele transplantate în bursa omentală s-au regăsit în număr mult mai mare atât în marele epiploon, cât și migrate prin circulația portală, în ficat și splină, mult mai multe decât în cazul grefării lor în mușchiul striat al coapsei.

VII. DISCUȚII

Criterii de alocare și matching pentru TIP

TIP reprezintă o metodă sigură și eficientă, care implică o intervenție chirurgicală relativ ușoară, cu o morbiditate scăzută și o mortalitate aproape de 0, în comparație cu transplantul de pancreas integral. Totuși, această metodă depinde de calitatea procesului de izolare a insulelor, un proces complex și care implică costuri mari [1, 3, 95, 105, 106].

Principalul obiectiv al TIP este acela de obține statusul normoglicemic sau un control mai bun al glicemiei și de a preveni sau chiar trata complicațiile secundare ale diabetului, obținându-se astfel o calitate mai bună a vieții pacientului. Deși la 5 ani post transplant doar 15% din pacienți rămân insulino-independenți, această metodă oferă totuși un bun control al glicemiei [1, 3, 106, 107].

Principalul dezavantaj al acestei metode îl reprezintă faptul că în timpul procesului de izolare și în perioada imediat post transplant, o mare parte din insule se pierde, astfel încât este necesară o cantitate mai mare de insule, recoltate de la mai mulți donatori, pentru a se asigura reușita transplantului, adică statusul insulino-independent. Raportul standard între donator și receptor este de 2-4:1, în comparație cu cel de 1:1 în transplantul de pancreas integral. Un pancreas uman normal conține un număr de aproximativ $0.3-1.5 \times 10^6$ insule, dintre care doar 30-50% se vor putea izola, cu o viabilitate post proces de izolare de doar 65%. Având în vedere deficitul de pancreas donat, există un număr limitat de candidați care ar putea beneficia de TIP [1].

Rezultatele sunt influențate și de regimurile de imunosupresie, atât prin efectul lor direct diabetogen, cât și prin creșterea susceptibilității la infecții sau neoplazii sau prin deteriorarea funcției renale.

De aceea, o mai atentă selecție și matching în ceea ce privește donorul și receptorul, cât și o îmbunătățire a tehnicii de izolare, a tehnicii de transplant și a regimurilor de imunosupresie, au dus la rezultate încurajatoare prin folosirea unui singur donator la un singur receptor, singura metodă prin care s-ar putea substitui transplantul integral cu TIP [108].

Rezultatele unui studiu recent al grupului de la Minnesota arată o creștere a ratei de grefare, cu peste 50% din pacienții transplantați insulino-independenți la 5 ani post transplant, similare cu cele ale transplantului de pancreas integral [109].

Transplantul allograft de insule pancreatice poate vindeca diabetul zaharat de tip 1 și a fost folosit chiar și fără imunosupresie, tinzând astfel să devină o metodă de elecție pentru pacienții diabetici copii [17, 18].

Alocarea pancreasului de la donator aflat în moarte cerebrală trebuie să urmeze 2 scopuri principale: să reducă la minimum morbiditatea și să deservească un număr cât mai mare de recipienți. Cele 2 metode, cea a transplantului de pancreas integral și cea de transplant de insule pancreatice, sunt mai degrabă complementare, decât în competiție, fiecare având indicații specifice pentru anume receptori [1].

Succesul transplantului depinde apoi de un bun matching cu receptorul și de calitatea procesului de prelevare, preservare și transport ale pancreasului, precum și de cel de izolare a insulelor din pancreasul recoltat [1].

Unul dintre factorii importanți de predicție a numărului de celule β transplantate necesare pentru obținerea statusului insulino-independent, îl constituie necesarul zilnic de insulină. Cu cât acesta este mai mic, cu atât numărul de celule β necesar pentru a fi transplantat este mai mic, iar șansa de a folosi un singur donator la un recipient este mai mare. Cu cât necesarul de insulină este mai mare, cu atât numărul de celule β necesar este mai mare și deci se vor folosi mai mulți donatori pentru un singur receptor. Acești pacienți sunt candidații ideali pentru transplantul de pancreas integral. Atunci când acești pacienți au comorbidități care cresc riscul chirurgical, iar necesarul de insulină este foarte mare, TIP poate fi considerat o soluție, chiar dacă acesta va trebui repetat de mai multe ori până la obținerea statusului insulin-free.

Calitatea țesutului recoltat depinde de o serie de factori care țin de donator: vârsta donatorului, indicele de masă corporală (BMI), cauza morții, dozele vasopresoarelor folosite în ATI, stabilitatea hemodinamică, durata spitalizării în ATI și alți parametri sangvini, cum sunt glicemia, nivelul transaminazelor și al creatininei.

Multiple studii au arătat un impact negativ al vârstei donatorului asupra deteriorării funcției celulelor β , ceea ce conduce spre o scădere a toleranței glucozei și apariția diabetului zaharat tip 2. Potențialii donatori, cu istoric de DZ tip 1 sau 2 sunt excluși. De asemenea se exclud și cei cu istoric de pancreatită cronică [110-112].

Donatorii cu vârsta sub 50 ani sunt optimați pentru recoltarea de pancreas în vederea transplantului de insule și obținerea statusului insulino-independent dintr-un singur organ donat. Proporțional cu vârsta donatorului crește și necesarul de insule care trebuie izolate și transplantate pentru a obține acest status. Același donator de peste 50 ani este suboptimal pentru transplantul de pancreas integral, deoarece rata de supraviețuire a grefei la 5 ani este mai mică decât la donatorii cu vârste între 18 și 34 ani (60% versus 73 %). De aceea donatorul de peste 50 ani poate fi luat în considerație pentru transplantul de insule. Având în vedere numărul mic de potențiali donatori, chiar și cei de 65–70 ani pot fi considerați donatori marginali pentru transplantul de insule, cu condiția obținerii unui număr mai mare de insule (IEQ) sau a donatorilor multipli pentru un singur recipient [1].

În contrapartidă, donatorii pediatriци și cei tineri, cu vârste de 18-20 ani, sunt considerați optimați pentru transplantul de pancreas integral și mai puțin optimați pentru transplantul de insule datorită existenței unei matrice extracelulare mult mai dense, care creează probleme în etapa de digestie enzimatică, prima etapă din procesul de izolare de insule pancreatice. Există totuși centre care folosesc donatori tineri și care au rezultate bune [1].

În ceea ce privește corelația cu BMI, este recunoscut faptul că donatorii obezi (BMI peste 30), fără istoric de diabet, reprezintă un grup mai bun de potențiali donatori de insule decât pacienții slabi, datorită faptului că masă de celule β crește paralel cu necesarul de insulină asociat cu obezitatea. Masa de celule izolate este proporțională cu masă corporală a donatorului. În majoritatea recomandărilor pentru donatorii de insule, BMI trebuie să fie mai mare ca 22. O dată cu avansarea tehnologiei de izolare a insulelor, o cantitate mai mare de insule viabile este obținută dacă se folosesc inhibitori ai apoptozei. Aceste rezultate încurajatoare dau speranță obținerii unui număr cât mai mare de insule de la un donator cu BMI din ce în ce mai mic. A fost demonstrat faptul că se poate obține un număr mai mare de insule de la un donator mai în vârstă cu BMI mare, datorită deficitului de matrice extracelulară a acestora, dar aceasta nu înseamnă și o mai bună funcționalitate a insulelor. Funcționalitatea insulelor scade o dată cu vârsta, fapt demonstrat prin măsurarea cantității de insulină produsă și expresiei genei PDX-1. De aceea în majoritatea programelor de transplant de insule, cut-off-ul de vârstă este 60. Oricum, o primă inspecție a organului înainte de recoltare este foarte

utilă, cunoscută fiind asocierea dintre obezitate, vârstă, obstrucția ductului pancreatic și prezența bolilor congenitale și pancreasul degenerat lipomatos.

Factori care se corelează cu calitatea scăzută a țesutului recoltat sunt: internarea în ATI > 7 zile, stopul cardiac > 5 minute, Na seric > 160mmol/l, amilaze > 390 U/L, lipaze >480 U/L, administrarea de noradrenalină > 0.05 microg/kg/min sau Dobutamină și Dopamină > 10 microg/kg/min. Bazându-se pe toate aceste criterii, Vinkers a stabilit un scor, în funcție de care pancreasul va fi sau nu acceptat ca donor. Acest scor trebuie să fie > 17 (tabel 5).

Tabel 5. Scorul Vinkers pentru criteriile de selecție ale donatorului de pancreas

Parameter	1 point	2 points	3 points
Age (years)	<30	30-40	>40
BMI (kg/m ²)	<20	20-25	>25
Serum sodium (mmol/l)	<155	155-160	>160
ICU stay (days)	<3	3-7	>7
Cardiac arrest (min)	No	<5	>5
Amylase (U/L) or	<130	130-390	>390
Lipase (U/L)	<160	160-480	>480
Noradrenaline (μg/KgBW/min)	No	<0.05	>0.05
Dobutamine/dopamine (μg/KgBW/min)	No	<10	>10

DISCUȚII ALE CAZURILOR CLINICE

Insulele pancreatice transplantate intrahepatic pot reface funcția pancreasului endocrin și să reinstaleze homeostazia glucozei. Totuși studiile au arătat că este o diferență în ceea ce privește rezultatul TIP în funcție de scopul de a preveni diabetul sau de a trata un diabet vechi, decompensat.

Autotransplantul de insule se practică cel mai frecvent la pacienții care au suferit o rezecție majoră de pancreas, pentru pancreatita cronică, în scopul de a preveni instalarea unui diabet. Autotransplantul oferă o bună ocazie de a studia funcția insulelor transplantate, eliminându-se o serie de factori care ar influența supraviețuirea și funcția acestora, cum ar fi: rejetul imun al insulelor transplantate, recurența distrugerii autoimune a masei de celule β (insulită) sau imunosupresia cu efect diabetogen. S-a studiat importanța calității și a purității insulelor. În ceea ce privește purificarea lor, aceasta pare să nu joace un rol important în succesul grefei, infuzia a până la 50 ml țesut digestiv în vena portă nefiind asociată cu efecte adverse majore, atât timp cât este monitorizată presiunea intraportală. 50% din pacienții transplantați sunt insulino-independenți la 1 an posttransplant, iar 35% rămân insulino-independenți cu susținere, unii rămânând astfel și la 7 ani posttransplant. Numărul de insule transplantate este cel mai important factor de predicție a succesului, cu peste 74% pacienți insulino-independenți la 2 ani, dacă se transplantează mai mult de 300.000 echivalenți de insule (IEQ). Masa de celule β transplantate își pierde capacitatea de replicare în ficat, iar apoptoza nu este compensată.

În cazul allotransplantului de insule pancreatice, insulele pancreatice sunt de obicei transplantate în ficat, la pacienții cu DZ tip 1 sau 2, care au efectuat un transplant anterior sau simultan de rinichi (IAK sau SIK) și care necesită imunosupresie posttransplant. Pacienții sunt diabetici vechi și au modificări metabolice și vasculare, care au impact negativ asupra celulelor transplantate. Ei sunt de obicei rezistenți la insulină, ca și consecință a hiperglicemiei cronice și tratamentului cronic cu insulină. Rezistența la insulină va duce în final la epuizarea funcțională a celulelor β, prin creșterea metabolismului lor.

Microangiopatia diabetică interferează cu revascularizarea insulelor. Pierderile de grefă prin procese inflamatorii sunt augmentate de climatul de boala autoimună a diabeticilor.

Numeroase situsuri de implantare au fost investigate ca potențial ideal situs, luându-se în calcul ușurința abordului chirurgical, eficiența implantării, adică gradul de obținere a statusului normoglicemic, precum și numărul și gradul complicațiilor.

Cel mai uzitat situs este vena portă, care însă comportă atât complicații ale infuziei (sângerări, tromboze), eficiență scăzută datorită pierderii unei părți importante a masei insulare infuzate printr-o reacție inflamatorie acută și prin expunerea la o presiune sangvină crescută, cât și a imposibilității de eliminare a grefei și deteriorării progresive a funcției datorită deficitului de grefare.

Insulele transplantate în ficat, în vena portă, au o capacitate limitată de a penetra peretele venular, după blocarea ramurilor sistemului port datorită dimensiunilor lor mari. Fluxul sanguin mare din jurul insulelor nu oferă posibilitatea unei concentrații mari de factori de creștere FGF sau VEGF-A, secretați de insule și care permit stimularea penetrării vaselor de neoformație în peretele venelor sistemului port.

În cadrul mecanismului de implantare a insulelor în parenchimul hepatic, insulele aderă la peretele vascular portal și vor fi acoperite de fibrină și plachete prin activarea cascadei complementului și a coagulării din reacția inflamatorie acută mediată imun, rezultând o structură trombo-like. Lumenul vascular se va recanaliza, iar insulele vor fi vascularizate din vasa vasorum [60].

Deși infuzia de celule este de 10 ori mai mare decât cea necesară obținerii statusului normoglicemic, aproximativ 2/3 din ele vor muri în zilele imediat post transplant, datorită lipsei matricei extracelulare, saturației scăzute în O₂, expunerii la concentrații crescute ale glucozei, toxinelor, metaboliților sau medicamentelor.

Alte situsuri alternative investigate au fost capsula renală, peritoneul, pouch-ul omental, mușchiul scheletic, țesutul subcutanat, splina, submucoasa gastrică, pancreasul, etc.

Există autori care au raportat transplant allograft în capsula renală, cu rezultate slabe însă datorită faptului că această structură nu este suficient de elastică pentru a crea un spațiu ce poate primi un volum mare de celule infuzate, iar grefa se contaminează ușor.

Mușchiul scheletal are avantajul unui abord chirurgical mai simplu sau chiar a unei rute miniinvazive, dar rezultatele nu au fost foarte bune, datorită potențialului angiogenic scăzut, ceea ce necesită un volum infuzat mai mare și o reluare mai întârziată a funcției insulare.

Bazându-se pe rezultatele bune ale autotransplantului de țesut paratiroidian în mușchiul scheletic al antebrațului, sunt autori care au folosit același situs și au efectuat TIP la copii, dar rezultatele slabe nu au dus la implementarea acestei metode la scară largă.

Există din ce în ce mai multe studii in vivo pe animale, care propun ca principal situs extrahepatic pouch-ul omental. Principalul dezavantaj al situsurilor de transplant îl constituie revascularizația inadecvată a grefei în primele zile post transplant. Acest lucru, împreună cu rejetul acut mediat imun, constituie principalele cauze ce duc la disfuncția și moartea celulelor grefate. Supraviețuirea grefei imediat post transplant depinde de difuzia de oxigen și nutrienți din capilarele situsului de implantare, de la periferia insulelor.

Omentul reprezintă unul din situsurile ideale extrahepatice pentru transplantul de insule pancreatice.

În omentul nativ vascularizația este de 4 ori mai mare în țesutul non adipos decât în cel adipos. În omentul activat, țesutul non-adipos nou conține vascularizație de asemenea de 3-4 ori mai bogată decât în cel adipos. Acest fapt a fost măsurat prin tehnici de imunostaining a collagenului de tip IV.

VEGF, care este cel mai puternic agent mitogen pentru celulele endoteliale, este de 10-100 ori mai prezent la nivelul omentului decât în orice alt organ adult, la șoarece, după Zhang *et al.* 1977, iar concentrația de VEGF în omentul activat este de 3.5 ori mai mare decât în cel nativ. Abilitatea omentului activat de a forma noi vase de sânge, care să se anastomozeze cu cele ale organului lezat, a fost folosită în tehnicile de regenerare tisulară embrionară sau ca și situsuri de implantare a insulelor pancreatice.

Este general acceptată ideea că insulele pancreatice au nevoie de o matrice extracelulară care să le asigure supraviețuirea și funcționalitatea și că aceasta matrice nativă este distrusă în timpul procedurii de izolare a insulelor.

Există necesitatea unui suport tridimensional care să asigure supraviețuirea insulelor imediat post transplant. Acest suport structural previne pe de-o parte expunerea directă a insulelor circulație sangvine din care rezultă răspunsul inflamator acut și pe de altă parte permite co-transplantarea cu alte tipuri de celule imunoprotective, cum ar fi celulele Sertoli, celule cu efect protector față de rețetul allogeneic sau xenogeneic sau față de distrucția autoimună.

Există studii în vivo pe animale care au folosit suport tridimensional biodegradabil, implantat la nivelul omentului, care au arătat în primul rând viabilitatea insulelor cultivate pe acest suport, apoi funcționalitatea insulelor transplantate. Situsul de implantare pentru suportul tridimensional poate fi pouch-ul omental, din mai multe considerente: are drenaj portal, fără însă o expunere directă la drogurile imunosupresoare, la complexul coagulării și cel al complementului, este fezabil pentru un volum mare tisular implantat, iar grea poate fi extrasă relativ ușor.

Au fost create matrice îmbogățite cu medii de cultură sau factori de creștere, pe care au fost înșămânțate insule pancreatice singure sau în co-culturi cu celule endoteliale, celule mezenchimale sau imunoprotective.

Principalul obiectiv al TIP este acela de obține statusul normoglicemic sau un control mai bun al glicemiei și de a preveni sau chiar trata complicațiile secundare ale diabetului, obținându-se astfel o calitate mai bună a vieții pacientului. Deși la 5 ani post transplant doar 15% din pacienți rămân insulino-independenți, această metodă oferă totuși un bun control al glicemiei.

Principalul dezavantaj al acestei metode îl reprezintă faptul că în timpul procesului de izolare și în perioada imediat post transplant, o mare parte din insule se pierde, astfel încât este necesară o cantitate mai mare de insule recoltate de la mai mulți donatori, pentru a se asigura reușita transplantului, adică statusul insulino-independent. Raportul standard între donator și receptor este de 2-4:1, în comparație cu cel de 1:1 în transplantul de pancreas integral. Un pancreas uman normal conține un număr de aproximativ $0.3-1.5 \times 10^6$ insule, dintre care doar 30-50% se vor putea izola, cu o viabilitate post proces de izolare de doar 65%. Având în vedere deficitul de pancreas donat, există un număr limitat de candidați care ar putea beneficia de TIP.

Rezultatele sunt influențate și de regimurile de imunosupresie, atât prin efectul lor direct diabetogen, cât și prin creșterea susceptibilității la infecții sau neoplazii sau prin deteriorarea funcției renale.

De aceea, o mai atentă selecție și matching în ceea ce privește donatorul și receptorul, cât și o îmbunătățire a tehnicii de izolare, a tehnicii de transplant și a regimurilor de imunosupresie, au dus la rezultate încurajatoare prin folosirea unui singur donator la un singur receptor, singura metodă prin care transplantul integral s-ar putea înlocui cu TIP.

În transplantul clinic de insule pancreatice este necesar un număr mare de IEQ pentru obținerea statusului normoglicemic, insulino-independent. Numărul de insule obținute care urmează a fi transplantate se exprimă ca echivalenți de insule (IEQ), care reprezintă insulele cu diametrul de 150μ. În general este nevoie de o cantitate de 900.000 IEQ pentru transplant.

Calitatea preparatului de infuzat se exprimă prin procentul de puritate al insulelor și prin procentul insulelor înconjurate de țesut acinar.

Puritatea reprezintă procentul de insule comparativ cu țesutul total prezent în preparat (insule, celule acinare și ductale), determinat prin microscopia optică a unei mostre reprezentative de preparat. Procentul de insule acoperite de țesut acinar din numărul total de insule libere sau acoperite se calculează tot prin microscopie optică. Insulele libere sunt considerate cele care au mai puțin de 25% din margini atașate de țesutul acinar, iar cele acoperite reprezintă insulele cu peste 25% din margini atașate țesutului acinar.

Preparatul nepurificat combină insule libere de țesut acinar, clustere de insule, țesut acinar și ductal. În studiul meu aproximativ 40% din celulele isolate au fost atașate de țesut acinar, însemnând o puritate scăzută. În timpul transplantării preparatului nepurificat, o dată cu celulele endocrine, se transplantează și o serie de celule nonendocrine, cele mai frecvente fiind celule acinare și ductale. Aceste celule nonendocrine pot fi benefice pentru supraviețuirea de lungă durată a insulelor. Există o serie de publicații care sugerează că precursorii de celule pancreatice ductale pot reprezenta o sursă de neogeneză a insulelor pancreatice. Acest fapt a fost demonstrat prin biopsiile a 3 pacienți cu autotransplant de insule pancreatice, raportate de Solani SM. Aceste structuri islet-like sunt pozitive pentru secreția de insulină și glucagon.

Matsumoto a demonstrat că purificarea insulelor se impune atunci când volumul preparatului este mare, reducând astfel riscul complicațiilor date de presiunea crescută în vena portă.

Pe de altă parte marele dezavantaj al etapei purificării este acela că aproximativ 40% din masa de insule se pierde în timpul procesului. Purificarea nu se face atunci când țesutul pancreatic exocrin este limitat, că în cazul pacienților cu autotransplant după pancreatectomii totale pentru pancreatita cronică.

Pancreatita cronică reprezintă o boală dificil de manageriat. Terapia medicală include dieta hipolipidică, droguri atropin-like și analgetice. Managementul chirurgical al pancreatitei cronice include metode de decompresie a ductului pancreatic și metode rezecționale.

Pancreatectomia totală are ca obiectiv îmbunătățirea calității vieții pacienților cu sindrom algic refractar prin pancreatita cronică, care îi face dependenți de analgetice majore. Acest lucru înseamnă exereza completă a pancreasului afectat, reducând total sindromul algic.

Aproximativ 15-20% din pacienții cu pancreatita cronică au deja diabet, iar peste 50% din pacienții cu rezecții totale de pancreas dezvoltă postoperator diabet insulino-dependent.

Avantajul față de rezecțiile parțiale pancreatice și față de alte proceduri chirurgicale de drenaj, îl reprezintă lipsa potențialului de fistula pancreatică și de apariție a cancerului pancreatic.

De aceea pancreatectomia totală urmată de autotransplant de insule pancreatice reprezintă o bună opțiune în tratarea pancreatitei cronice, în special formă cu duct îngust, secreția peptidului C având un rol protector asupra unor complicații ale diabetului. Pentru autotransplantul de insule, timpul de ischemie rece este mai scurt decât în cazul allotransplantului. Totuși ischemia caldă din timpul pancreatectomiei poate deteriora calitatea țesutului recoltat. De aceea, vascularizația pancreasului trebuie preservată cât mai mult în timpul disecției, pentru a minimiza timpul de ischemie caldă a insulelor.

De asemenea obținerea statusului insulino-independent depinde de masa de insule infuzate (IEQ, IEQ/g pancreas, IEQ/kg corp).

Pe baza protocolului de la Edmonton markerul de predicție pentru obținerea homeostaziei glicemice era transplantarea a peste 10.000 IEQ/Kg.

Mai târziu, colectivul de la Universitatea din Minnesota publică un studiu pe un lot de pacienți cu pancreatectomie totală sau pancreatectomie aproape totală, operați între 2000 și

2004, în care arată că necesarul unei mase de insule pancreatice transplantate este de 5.118 ± 587 IEQ/Kg pentru obținerea statusului insulino-independent.

O dată cu îmbunătățirea tehicii de izolare, Gruessner *et al.* au arătat într-o publicație recentă, pe o serie de 112 pancreatectomii totale urmate de autotransplant de insule, că 39% din pacienți au rămas insulino-independenți, atunci când au fost transplantate mai mult de 2500 IEQ/Kg.

În cazul pacientei noastre am obținut o masă de insule de 4700 IEQ/Kg.

Un alt marker de predicție pentru succesul autotransplantului este indexul SUITO, care trebuie să fie mai mare de 26 în allotransplant și peste 24 în autotransplant. Levy a publicat recent un raport în care arată ca o masă de insule de 2559 IEQ/Kg sau un SUITO index de 24 sunt necesare pentru obținerea statusului insulin free după autotransplant.

SUITO index este 100 pentru persoanele normale, sănătoase și 0 pentru pacienții cu diabet tip 1, care nu au abilitatea de a secreta insulină. După transplantul de insule pancreatice, pacienții care ating statusul insulino-independent secretă mai mult peptid C decât cei care nu obțin acest status, la aceleași nivele ale glicemiei, rezultând un index mai înalt. Peptidul C este eliberat din insulele distruse la 1 zi de la infuzarea lor, însemnând că nivelul de peptid C nu reflectă funcționalitatea celulelor imediat după transplant. Deci nu se folosesc nivelele de peptid C pentru calcularea SUITO index în primele 2 zile post transplant. Într-un studiu pe 27 pacienți cu autotransplant de insule pancreatice, indexul SUITO la grupul insulino-independent a fost semnificativ mai mare (24.6 ± 3.4 vs 14.9 ± 2.0 ; p value < 0.02). Deci SUITO este un predictor foarte bun în prima lună post transplant (exceptând primele 2 zile). În cazul prezentat SUITO a fost în prima lună de 29.7.

Sutherland a demonstrat recent că autotransplantul de insule este mai eficient decât allotransplantul și că cu o masă mai mică de insule poate fi atins statusul insulin free.

După transplantarea insulelor, acestea încep să secrete insulină. Totuși administrarea de insulină continuă timp de câteva luni pentru a menaja graftul insular. Chiar și după obținerea statusului insulino-independent, pacienții sunt încurajați să folosească insulină atunci când nivelul glicemiei este mare, pentru a proteja insulele transplantate. De aceea, indexul HOMA-B poate să nu reflecte abilitatea secretorie a insulelor transplantate. În cazul prezentat am folosit insulină timp de 14 zile, apoi aceasta a fost înlocuită cu administrarea orală de biguanidă (metformin). Deci HOMA index a fost calculat în prima lună, după primele 14 zile și a fost de 60. HOMA index < 40 arată o degradare a funcției insulare.

În ceea ce privește rezistența la insulină, sunt studii care arată că HOMA-IR < 1.6 este normal, iar valori de > 2.5 înseamnă rezistența la insulină. HOMA-IR s-a menținut < 1.6 , iar HOMA-B a scăzut la 1 an, de la 68 la 40.8.

Există studii care arată corelații între diverși factori și statusul insulino-independent: sexul feminin, greutatea, BMI < 28 , IEQ/Kg corp sau necesarul de insulină din primele 24 ore post transplant (dacă pacientul necesită mai puțin de 15 U insulină/ primele 24 ore, înseamnă o rată înaltă a insulino-dependenței).

Primele 24 ore de funcționare a graftului insular poate fi de asemenea un factor de predicție pentru succesul transplantului.

Nivelele peptidului C cresc cu timpul după un test de toleranță la glucoză, arătând o ușoară deteriorare a funcției insulelor transplantate.

Purificarea insulelor înainte de transplant nu aduce o îmbunătățire a șansei de obținere a statusului insulino-independent.

În ceea ce privește discuțiile referitoare la transplantul simultan de ficat și allotransplantul de insule pancreatice la pacienți cu ciroză hepatică și diabet zaharat se poate spune că relația dintre infecția cu virus hepatitic C și apariția diabetului zaharat este complexă, pe de-o parte datorită influenței VHC asupra funcției celulelor β , prin creșterea rezistenței la insulină, dar și

prin distrucția masei de celule β asociată cu steatoza și creșterea citokinelor proinflamatorii, iar pe de altă parte, datorită efectului diabetogen al tratamentului antiviral (în special al interferonului). În 60-80% din cazuri rezistența la insulină se asociază cu un sindrom hiperglicemic, în timp ce în 20% din cazuri apare diabetul zaharat.

Rezistența la insulină este parțial compensată de o hipersecreție insulinică a celulelor β . În timp însă funcția secretorie a acestora se degradează și apare intoleranță la glucoză. La acești pacienți transplantul hepatic nu este suficient să refacă rezerva funcțională a celulelor β afectată progresiv în timp. În plus, regimurile de imunosupresie cresc deficitul funcțional al celulelor β , exacerbând diabetul.

Există serii limitate raportate în literatură de transplant combinat de ficat și insule pancreatice, o treime din acestea făcându-se după exenterație abdominală superioară cu transplant hepatic.

Ideea unanimă este că mortalitatea și morbiditatea sunt mai mari în cazul pacienților transplantați hepatic care au asociat și diabet zaharat.

VIII. CONCLUZII

Alocarea pancreasului de la donator aflat în moarte cerebrală pentru transplantul integral vs transplantul de insule pancreatice, trebuie să se facă cu un bun matching al criteriilor donatorului cu cele ale recipientului.

Piatra de temelie a succesului transplantului de insule pancreatice rămâne calitatea țesutului (organului) recoltat.

Experiența echipei de recoltare și o bună cunoaștere a anatomiei pancreasului și a tehnicilor chirurgicale sunt foarte importante în obținerea unui timp optimal de ischemie rece și caldă.

Recentele cunoștințe acumulate în TIP, că utilizarea non heart beating donor, single donor, living-donor sunt bazate pe îmbunătățirea recoltării, prezervării și transportului pancreasului și metodelor de izolare a insulelor pancreatice.

Unul din cele mai importante rezultate ale acestui studiu a fost formarea unei echipe calificate de prelevare a pancreasului cu înalte cunoștințe în procesul de izolare a insulelor pancreatice, care reprezintă primul pas în implementarea clinică a unui Program Național de Transplant de insule pancreatice.

Allotransplantul de insule pancreatice este doar unul dintre scopurile acestui program, un altul la fel de important este autotransplantul de insule pancreatice.

Pancreatectomia totală combinată cu autotransplantul de insule este o metodă fezabilă doar în centre înalt specializate, cu facilități de laborator și de echipa chirurgicală. În primul rând, rezultatele pancreatectomiilor totale în aceste centre (cum este și Institutul Clinic Fundeni) sunt excelente, cu o rată a mortalității perioperatorii de 2%.

Unul din scopurile pancreatectomiei totale este de a crește calitatea vieții prin remisiunea sindromului algic, care face ca pacienții să fie dependenți de analgetice opioide.

Pancreatectomia totală cu AIT depinde de fiecare din fiecare aspect al TIP, astfel încât abilitatea de a izola eficient și sigur insulele pancreatice este de o mare importanță. Tehnicile de izolare a insulelor din țesutul pancreatic normal sunt aceleași și în cazul pancreasului fibrotic al pacienților cu pancreatită cronică.

Autotransplantul de insule pancreatice reprezintă o metodă promițătoare de management al pancreatitei cronice.

Rezultatele acestui studiu se datorează centrelor mari din lume, care arată că se poate obține un număr suficient de echivalenți din țesutul inflamator cronic și din cel fibrotic.

Cel mai comun situs de implantare rămâne ficatul, via infuzia intraportală. Controlul glicemic după AIT este în legătură cu caracteristicile și masa celulelor insulare. Numărul echivalenților izolați din țesutul pancreatic fibrozat depinde de o serie de factori: extensia fibrozei pancreatice, antecedentele de rezecții pancreatice și de proceduri de drenaj pancreatic.

Deși doar 10% din pacienții cu AIT ating statusul insulino-independent la 5 ani, metodă este foarte bună pentru menținerea unei bune homeostazii ale glicemiei, acest lucru crescând calitatea vieții pacientului.

Rezultatele acestui studiu sunt promițătoare și situează și România pe harta țărilor care au ca preocupare folosirea transplantului de insule pancreatice în managementul diabetului zaharat și al pancreatitei cronice.

Ele constituie o încununare a unor proiecte conexe, cum ar fi crearea laboratorului de terapii celulare și acreditarea GMP a acestuia sau programul de transplant hepatic și reprezintă un punct de plecare pentru proiecte viitoare în acest domeniu.

X. BIBLIOGRAFIE

1. Cravedi P, Ruggerenti P, Remuzzi A, Remuzzi G. Current Status of Islet Transplantation.
2. Gliedman ML, Tellis VA, Soberman R, Rifkin H, Veith FJ. Long-term effects of pancreatic transplant function in patients with advanced juvenile-onset diabetes. *Diabetes care*. 1978;1(1):1-9.
3. Ikemoto T, Noguchi H, Shimoda M, Naziruddin B, Jackson A, Tamura Y, et al. Islet cell transplantation for the treatment of type 1 diabetes in the USA. *Journal of hepato-biliary-pancreatic surgery*. 2009;16(2):118-23.
4. ADA. Introduction: Standards of Medical Care in Diabetes—2018. *Diabetes Care*. 2018;41(Supplement 1):S1. doi: <https://doi.org/10.2337/dc18-Sint01>.
5. Alberti KG ZP. Definition, diagnosis and classification of diabetes mellitus and its complications. Part 1: diagnosis and classification of diabetes mellitus provisional report of a WHO consultation. *Diabet Med* 15: 539-553, . 1998.
6. Basdevant A G-GB. *Medicine de l'obesite*. . JM. O, editor. Paris: Editions Flammarion; 2004
7. Scharp DW, Marchetti P. Encapsulated islets for diabetes therapy: history, current progress, and critical issues requiring solution. *Advanced drug delivery reviews*. 2014;67-68:35-73.
8. Song H, Xue Y, Li X, al. e. py: history, current progress, and critical issues requiring solution. *Elsevier Advanced Drug Delivery Rev* 2014; 67-68:35-73 2014.
9. Gayet R, Guillamie M. La regulation de la secretion interne pancreatique par un processus humoral, demonstree par des transplantations de pancreas. *Experiences sue des animaux normaux Coll Roy Soc Biol*. 1927;97:1613-14.
10. Brooks JR, Giford GH, al. e. Pancreatic homotransplantation. Total pancreatic allografts in pancreatectomized dogs. *Transplant Bull Arch Surg* 90. 1965;1959:521-6.
11. Idezuki Y, Feemster JA, Dietzman RH, Lillehei RC. Experimental pancreaticoduodenal preservation and transplantation. *Surgery, gynecology & obstetrics*. 1968;126(5):1002-14.
12. Kelly WD, Lillehei RC, Merkel FK, Idezuki Y, Goetz FC. Allotransplantation of the pancreas and duodenum along with the kidney in diabetic nephropathy. *Surgery*. 1967;61(6):827-37.
13. Calne RY, Rolles K, White DJ, Thiru S, Evans DB, McMaster P, et al. Cyclosporin A initially as the only immunosuppressant in 34 recipients of cadaveric organs: 32 kidneys, 2 pancreases, and 2 livers. *Lancet (London, England)*. 1979;2(8151):1033-6.
14. Sutherland DE. Pancreas and islet transplantation. I. Experimental studies. *Diabetologia*. 1981;20(3):161-85.
15. Sutherland DE. Pancreas and islet transplantation. II. Clinical trials. *Diabetologia*. 1981;20(4):435-50.
16. Starzl TE, Todo S, Fung J, Demetris AJ, Venkataramman R, Jain A. FK 506 for liver, kidney, and pancreas transplantation. *Lancet (London, England)*. 1989;2(8670):1000-4.
17. Socci C, Falqui L, Davalli AM, Ricordi C, Braghi S, Bertuzzi F, et al. Fresh human islet transplantation to replace pancreatic endocrine function in type 1 diabetic patients. Report of six cases. *Acta diabetologica*. 1991;28(2):151-7.
18. Scharp DW, Lacy PE, Santiago JV, McCullough CS, Weide LG, Falqui L, et al. Insulin independence after islet transplantation into type I diabetic patient. *Diabetes*. 1990;39(4):515-8.
19. Sutherland DE. International human pancreas and islet transplant registry. *Transplantation proceedings*. 1980;12(4 Suppl 2):229-36.

20. Sutherland DE. Pancreas and islet transplant registry statistics. Transplantation proceedings. 1984;16(3):593-8.
21. Noel J, Rabinovitch A, Olson L, Kyriakides G, Miller J, Mintz DH. A method for large-scale, high-yield isolation of canine pancreatic islets of Langerhans. Metabolism: clinical and experimental. 1982;31(2):184-7.
22. Brissova M, al. e. Assessment of human pancreatic islet architecture and composition by laser scanning confocal microscopy. J Histochem Cytochem. 2005;53:1087-97.
23. Bonner-Weir S, Sullivan BA, Weir GC. Human Islet Morphology Revisited: Human and Rodent Islets Are Not So Different After All. The journal of histochemistry and cytochemistry : official journal of the Histochemistry Society. 2015;63(8):604-12. Epub 2015/01/20. doi: 10.1369/0022155415570969. PubMed PMID: 25604813.
24. Eriksson AU, al. e. Near infrared optical projection tomography for assessments of β - cell mass distribution in diabetes research. J Vis Exp. 2013;71:e50238
25. Jansson L, Barbu A, Bodin B, Drott CJ, Espes D, Gao X, et al. Pancreatic islet blood flow and its measurement. Upsala journal of medical sciences. 2016;121(2):81-95. Epub 2016/04/28. doi: 10.3109/03009734.2016.1164769. PubMed PMID: 27124642.
26. Serban V. Tratat Roman de Boli Metabolice. Timisoara: Ed. Brumar; 2010.
27. Lane M.A. The cytological characters of the areas of Langerhans. . Am J Anat 1908;(7):409-22.
28. Gomori G. A differential stain for cell types in the pancreatic islets. . Am J Pathol 1939;15:497-9.
29. Baskin DG. A Historical Perspective on the Identification of Cell Types in Pancreatic Islets of Langerhans by Staining and Histochemical Techniques. The journal of histochemistry and cytochemistry : official journal of the Histochemistry Society. 2015;63(8):543-58. Epub 2015/07/27. doi: 10.1369/0022155415589119. PubMed PMID: 26216133.
30. Ionescu-Tirgoviste C, Lichiardopol R., Guja C. Diabetul zaharat. Manual pentru studenti, medici de familie si rezidenti. Bucuresti: Ed. Ilex; 2007.
31. IDF Diabetes Atlas. Seventh Edition. 2015.
32. Boyle, et al. Population Health Metrics 2010.
33. Prompers L., Huijberts M., Schaper N., al. e. Resource utilisation and costs associated with the treatment of diabetic foot ulcers. Prospective data from the Eurodiale Study. Diabetologia 2008;51:1826–34.
34. Prowse SJ, Lafferty CJ, Simeonovic M, Agostino KM, Bowen EJ, Steele KJ. The reversal of diabetes by pancreatic islet transplantation. Diabetes Suppl 4. 31 SRC - BaiduScholar:30-7.
35. Roxburgh MA VN, New J. Using large cohorts from population based diabetes registers to develop risk equations for type 2 diabetes. . Diabetologia 2000;43(Suppl1):A1.
36. Group. UPDSU. Intensive blood-glucose control with sulphonylureas or insulin compared with conventional treatment and risk of complications in patients with type 2 diabetes. . Lancet 1998;352:837-53.
37. K. U. Diabetes Study (UKPDS) Group. Intensive blood-glucose control with sulphonylureas or insulin compared with conventional treatment and risk of complications in patients with type 2 diabetes. Lancet. 1998;352:837-53.
38. Meier JJ. Beta cell mass in diabetes: a realistic therapeutic target? Diabetologia. 2008;51(5):703-13.
39. Mezza T, Muscogiuri G, Sorice GP, Clemente G, Hu J, Pontecorvi A, et al. Insulin resistance alters islet morphology in nondiabetic humans. Diabetes. 2014;63(3):994-1007. Epub 2014/02/13. doi: 10.2337/db13-1013. PubMed PMID: 24215793.

40. Pandey A, Chawla S, Guchhait P. Type-2 diabetes: Current understanding and future perspectives. *IUBMB Life*. 2015;67(7):506-13. doi: 10.1002/iub.1396.
41. Popescu I. TRATAT DE CHIRURGIE, VOL. IX, partea a II-a. București: Editura Academiei Române; 2009.
42. Popescu I. TRATAT DE CHIRURGIE, VOL. IX, partea a II-a. Simona Dima, Bogdan Dorobantu. Capitol 50. Transplantul de insule pancreatice București: Editura Academiei Române; 2009.
43. Najarian JS, Sutherland DE, Baumgartner D, Burke B, Rynasiewicz JJ, Matas AJ, et al. Total or near total pancreatectomy and islet autotransplantation for treatment of chronic pancreatitis. *Annals of surgery*. 1980;192(4):526-42.
44. Helling TS. Surgical management of chronic pancreatitis and the role of islet cell autotransplantation. *Current surgery*. 2003;60(4):463-9.
45. Sutton JM, Schmulewitz N, Sussman JJ, Smith M, Kurland JE, Brunner JE, et al. Total pancreatectomy and islet cell autotransplantation as a means of treating patients with genetically linked pancreatitis. *Surgery*. 2010;148(4):676-85; discussion 85.
46. Jeong J-H, Yook S, Lee H, Ahn C-H, Lee DY, Byun Y. Effects of surface camouflaged islet transplantation on pathophysiological progression in a db/db type 2 diabetic mouse model. *Biochemical and biophysical research communications*. 2013;433(4):513-8.
47. Anazawa T, Saito T, Goto M, Kenmochi T, Uemoto S, Itoh T, et al. Long-term outcomes of clinical transplantation of pancreatic islets with uncontrolled donors after cardiac death: a multicenter experience in Japan. *Transplantation proceedings*. 2014;46(6):1980-4.
48. Shapiro AM, Lakey JR, Ryan EA, Korbitt GS, Toth E, Warnock GL, et al. Islet transplantation in seven patients with type 1 diabetes mellitus using a glucocorticoid-free immunosuppressive regimen. *The New England journal of medicine*. 2000;343(4):230-8.
49. Matsumoto S, Takita M, Chaussabel D, Noguchi H, Shimoda M, Sugimoto K, et al. Improving Efficacy of Clinical Islet Transplantation with Iodixanol-Based Islet Purification, Thymoglobulin Induction, and Blockage of IL-1 β and TNF- α . *Cell Transplantation*. 2011;20(10):1641-7. doi: 10.3727/096368910X564058.
50. Ricordi C, Tzakis AG, Carroll PB, Zeng YJ, Rilo HL, Alejandro R, et al. Human islet isolation and allotransplantation in 22 consecutive cases. *Transplantation*. 1992;53(2):407-14.
51. Kornberg A, Kupper B., Barthel E., Tannapfel A., Muller U.A., Thrum K., et al. Combined en-bloc liver-pancreas transplantation in patients with liver cirrhosis and insulin-dependent type 2 diabetes mellitus. *Transplantation*. 2008;87:542-5.
52. Lillehei RC, Simmons RL, Najarian JS, Weil R, Uchida H, Ruiz JO, et al. Pancreatico-duodenal allotransplantation: experimental and clinical experience. *Annals of surgery*. 1970;172(3):405-36.
53. Sigrist S, Mechine-Neuville A, Mandes K, Calenda V, Legeay G, Bellocq JP, et al. Induction of angiogenesis in omentum with vascular endothelial growth factor: influence on the viability of encapsulated rat pancreatic islets during transplantation. *Journal of vascular research*. 2003;40(4):359-67.
54. Menger MD, Yamauchi J, Vollmar B, al. e. Revascularization and microcirculation of freely grafted islets of Langerhans. *World J Surg*. 2001;21:509–15.
55. Singh AK, Gudehithlu KP, Patri S, Litbarg NO, Sethupathi P. Impaired integration of endothelial progenitor cells in capillaries of diabetic wounds is reversible with vascular endothelial growth factor infusion. *Translational Research*. 2007;149(5):282-91.
56. Brissova M, Powers AC. Revascularization of transplanted islets: can it be improved? *Diabetes*. 2008;57(9):2269-71.
57. White SA, Shaw J.A., D.E.R. S. Pancreas transplantation. *Lancet*. 2009;373:1808-17.

58. Sener A, Cooper M., S.T. B. Is there a role for pancreas transplantation in type 2 diabetes mellitus? Transplantation. 2010;90:121-3.
59. Hakim NS, Stratta RJ, Derek G, Peter F, Alan C. Pancreas, islet & stem cell transplantation for the cure: Oxford University Press; 2002.
60. Korsgren O, Lundgren T., Felldin M., Foss A., Isaksson B., Permet J., et al. Optimising islet engraftment is critical for successful clinical islet transplantation. Diabetologia. 2008;51:227-32.
61. Litbarg NO, Gudehithlu KP, Sethupathi P, *et al.* Activated omentum becomes rich in factors that promote healing and tissue regeneration. Cell Tissue Res 2007;328:487. doi: <https://doi.org/10.1007/s00441-006-0356-4>.
62. Chaffanjon PCJ, Kenyon C, Ricordi NS, . KNM. Omental anatomy of non-human primates. SpringerVerlag Surgical and Radiologic Anatomy. 2005 SRC - BaiduScholar.
63. Giddings FD. Surgical Knots and Suturing Techniques, second edition (Spiral-bound): Giddings Studio Publishing; 2002. 44 p.
64. Naji A, Silvers WK, Plotkin SA, Dafoe D, Barker CF. Successful islet transplantation in spontaneous diabetes. Surgery. 1979;86(2):218-26.
65. Selawry HP, Cameron DF. Sertoli cell-enriched fractions in successful islet cell transplantation. Cell transplantation. 1993;2(2):123-9.
66. Valdés-González RA, Dorantes LM, Garibay GN, Bracho-Blanchet E, Mendez AJ, Dávila-Pérez R, et al. Xenotransplantation of porcine neonatal islets of Langerhans and Sertoli cells: a 4-year study. Eur J Endocrinol. 2005 153(3):419-27.
67. Sarlak AY, Tosun L, Buluc A, Cubuktu JB. A comparison of two omental lengthening techniques by the pedicled omentum to close a knee disarticulation defect: a case report. Eur Surg. 2008;30 SRC - BaiduScholar:239-43.
68. Lacy PE, Kostianovsky M. Method for the isolation of intact islets of Langerhans from the rat pancreas. Diabetes. 1967;16(1):35-9.
69. Moore SJ, Gala-Lopez BL, Pepper AR, Pawlick RL, Shapiro AJ. Bioengineered stem cells as an alternative for islet cell transplantation. World journal of transplantation. 2015;5(1):1-10. Epub 2015/03/24. doi: 10.5500/wjt.v5.i1.1. PubMed PMID: 25815266.
70. Aaron Bender, Stewart. AF. Good news for the ageing β -cell. Diabetologia. 2014 February 57(2):265–9. doi: doi:10.1007/s00125-013-3114-7.
71. Wilcox NS, Rui J, Hebok M, Herold KC. Life and death of β cells in Type 1 diabetes: A comprehensive review. Journal of autoimmunity. 2016;71:51-8. Epub 2016/03/24. doi: 10.1016/j.jaut.2016.02.001. PubMed PMID: 27017348.
72. In't Veld P. Insulitis in human type 1 diabetes. Islets. 2011;3(4):131-8. doi: 10.4161/isl.3.4.15728.
73. Foulis AK, Liddle CN, Farquharson MA, Richmond JA, RS. W. The histopathology of the pancreas in type 1 (insulin-dependent) diabetes mellitus: a 25-year review of deaths in patients under 20 years of age in the United Kingdom. . Diabetologia 1986;29:267-74.
74. Foulis AK, Farquharson MA, R. H. Aberrant expression of class II major histocompatibility complex molecules by B cells and hyperexpression of class I major histocompatibility complex molecules by insulin containing islets in type 1 (insulin-dependent) diabetes mellitus. Diabetologia 1987;30:333-43.
75. Rawal S, Williams SJ, Ramachandran K, Stehno-Bittel L. Integration of mesenchymal stem cells into islet cell spheroids improves long-term viability, but not islet function. Islets. 2017;9(5):87-98. doi: 10.1080/19382014.2017.1341455.
76. Rackham CL, Dhadda PK, Chagastelles PC, Simpson SJS, Dattani AA, Bowe JE, et al. Pre-culturing islets with mesenchymal stromal cells using a direct contact configuration is beneficial for transplantation outcome in diabetic mice. Cytotherapy. 2013;15(4):449-59.

77. Berneman-Zeitouni D, Molakandov K, Elgart M, Mor E, Fornoni A, Domínguez MR, et al. The temporal and hierarchical control of transcription factors-induced liver to pancreas transdifferentiation. *PloS one*. 2014;9(2):e87812-e. doi: 10.1371/journal.pone.0087812. PubMed PMID: 24504462.
78. Scuteri A, Donzelli E, Rodriguez-Menendez V, Ravasi M, Monfrini M, Bonandrini B, et al. A double mechanism for the mesenchymal stem cells' positive effect on pancreatic islets. *PloS one*. 2014;9(1):e84309-e. doi: 10.1371/journal.pone.0084309. PubMed PMID: 24416216.
79. Figliuzzi M, Cornolti R, Plati T, Rajan N, Adobati F, Remuzzi G, et al. Subcutaneous xenotransplantation of bovine pancreatic islets. *Biomaterials*. 2005;26(28):5640-7.
80. Weber C, Weil R, McIntosh R, Hogle H, Warden G, Reemtsma K. Xenotransplantation of piscine islets into hyperglycemic rats. *Surgery*. 1975;77(2):208-15.
81. Zhu H-T, Wang W-L, Yu L, Wang B. Pig-islet xenotransplantation: recent progress and current perspectives. *Frontiers in surgery*. 2014;1:7-. doi: 10.3389/fsurg.2014.00007. PubMed PMID: 25593932.
82. Shin S, Jung CHM, Choi JY, Kwon HW, Jung JH, Kim YH, et al. Long-term Metabolic Outcomes of Functioning Pancreas Transplants in Type 2 Diabetic Recipients. *Transplantation*. June 2017 101(6):1254–60. doi: doi: 10.1097/TP.0000000000001269.
83. Kuhlreiber WM, Ho A, Kamireddy JAW, Yacoub DW, Muller YD, Gupta P, et al. Islet Isolation from human pancreas with extended cold ischemia time (CIT) S. E. Truchenet Morphological and immunological analysis of transplanted human pancreatic islets after long-term insulin independence.
84. Schuetz C, Markmann JF. Islet cell transplant: Update on current clinical trials. *Current transplantation reports*. 2016;3(3):254-63. Epub 2016/05/17. doi: 10.1007/s40472-016-0103-z. PubMed PMID: 28451515.
85. Kin T, Shapiro AMJ. Surgical aspects of human islet isolation. *Islets*. 2010;2(5):265-73.
86. Noguchi M, Shimoda D, Chujo K, all Se. One hundred human pancreatic islet isolations at Baylor Research Institute. *Proc Bayl Univ Med Cent Breit*. 2010;23(4 SRC - BaiduScholar):341-8.
87. T. B. Murdoch, D. McGhee-Wilson, A. M. J. Shapiro a, Lakey. JRT. Methods of Human Islet Culture for Transplantation. *Cell Transplantation*. 2004;13:605–17.
88. Robertson RP. Islet transplantation a decade later and strategies for filling a half-full glass. *Diabetes*. 2010;59(6):1285-91. doi: 10.2337/db09-1846. PubMed PMID: 20508222.
89. Noguchi H, Miyagi-Shiohira C, Kurima K, Kobayashi N, Saitoh I, Watanabe M, et al. Islet Culture/Preservation Before Islet Transplantation. *Cell medicine*. 2015;8(1-2):25-9. doi: 10.3727/215517915X689047. PubMed PMID: 26858905.
90. Iwanaga Y, Sutherland DE, Harmon JV, Papas KK. Pancreas preservation for pancreas and islet transplantation. *Current opinion in organ transplantation*. 2008;13(4):445-51. doi: 10.1097/MOT.0b013e328303df04. PubMed PMID: 18685343.
91. Scott WE, 3rd, Weegman BP, Ferrer-Fabrega J, Stein SA, Anazawa T, Kirchner VA, et al. Pancreas oxygen persufflation increases ATP levels as shown by nuclear magnetic resonance. *Transplantation proceedings*. 2010;42(6):2011-5. doi: 10.1016/j.transproceed.2010.05.091. PubMed PMID: 20692395.
92. Komatsu H, Kandeel F, Mullen Y. Impact of Oxygen on Pancreatic Islet Survival. *Pancreas*. 2018;47(5):533-43. Epub 2018/04/04. doi: 10.1097/MPA.0000000000001050. PubMed PMID: 29621044.

93. Takita M, Matsumoto S, Noguchi H, Shimoda M, Chujo D, Sugimoto K, et al. One hundred human pancreatic islet isolations at Baylor Research Institute. *Proceedings (Baylor University Medical Center)*. 2010;23(4):341-8.
94. Salamone M, Seidita G, Cuttitta A, Rigogliuso S, Mazzola S, Bertuzzi F, et al. A new method to value efficiency of enzyme blends for pancreatic tissue digestion. *Transplantation proceedings*. 2010;42(6):2043-8.
95. Ricordi C, Lacy PE, Finke EH, Olack BJ, Scharp DW. Automated method for isolation of human pancreatic islets. *Diabetes*. 1988;37(4):413-20.
96. Buchwald P, Bernal A, Echeverri F, Tamayo-Garcia A, Linetsky E, Ricordi C. Fully Automated Islet Cell Counter (ICC) for the Assessment of Islet Mass, Purity, and Size Distribution by Digital Image Analysis. *Cell Transplantation*. 2016;25(10):1747-61. doi: 10.3727/096368916X691655.
97. Soltani SM, O'Brien TD, Loganathan G, Bellin MD, Anazawa T, Tiwari M, et al. Severely fibrotic pancreases from young patients with chronic pancreatitis: evidence for a ductal origin of islet neogenesis. *Acta diabetologica*. 2013;50(5):807-14. Epub 2011/07/20. doi: 10.1007/s00592-011-0306-9. PubMed PMID: 21773756.
98. Cameron JL, Mehigan DG, Broe PJ, Zuidema GD. Distal pancreatectomy and islet autotransplantation for chronic pancreatitis. *Annals of surgery*. 1981;193(3):312-7.
99. Naziruddin B, Matsumoto S, Noguchi H, Takita M, Shimoda M, Fujita Y, et al. Improved pancreatic islet isolation outcome in autologous transplantation for chronic pancreatitis. *Cell transplantation*. 2012;21(2-3):553-8.
100. Kleeff J, Diener MK, Z'Graggen K, Hinz U, Wagner M, Bachmann J, et al. Distal pancreatectomy: risk factors for surgical failure in 302 consecutive cases. *Annals of surgery*. 2007;245(4):573-82. doi: 10.1097/01.sla.0000251438.43135.fb. PubMed PMID: 17414606.
101. Kobayashi N. The current status of islet transplantation and its perspectives. *The review of diabetic studies : RDS*. 2008;5(3):136-43. Epub 2008/11/10. doi: 10.1900/RDS.2008.5.136. PubMed PMID: 19099085.
102. Mirchovitch V. M. Campiche. Absence of diabetes in dogs after total pancreatectomy and intrasplenic autotransplantation of pancreatic tissue. *Transplant Proc*. 1977;9 SRC - BaiduScholar:321-3.
103. Gruessner AC, DE. S. Analysis of United States (US) and non-US pancreas transplants reported to the United network for organ sharing (UNOS) and the international pancreas transplant registry (IPTR) as of October 2001. *Clin Transpl*. 2001:41-72.
104. Farney AC, Sutherland DE, EC. O. Evolution of Islet Transplantation for the Last 30 Years. *Pancreas* 2016;45(1):8-20. doi: 10.1097/MPA.0000000000000391.
105. Ricordi C, Finke EH, Lacy PE. A method for the mass isolation of islets from the adult pig pancreas. *Diabetes*. 1986;35(6):649-53.
106. Socci P, Maffi MV, Taglietti L, Falqui F, Bartuzzi P, Nittis L, et al. Islet transplantation in IDDM patients *Diabetologia*. 1997;40(2):225-31.
107. Ricordi C, Gray DW, Hering BJ, Kaufman DB, Warnock GL, Kneteman NM, et al. Islet isolation assessment in man and large animals. *Acta diabetologica latina*. 1990;27(3):185-95.
108. Gruessner AC, Sutherland DE. Analyses of pancreas transplant outcomes for United States cases reported to the United Network for Organ Sharing (UNOS) and non-US cases reported to the International Pancreas Transplant Registry (IPTR). *Clinical transplants*. 1999:51-69.
109. Garcia-Roca R, Humar A, Sturdevant M, Kobayashi T, Dunn T, Kandaswamy R, et al. Orthotopic placement of a segmental pancreas graft for transplant: a case report. *Clinical transplantation*. 2010;24(3):424-8.

110. Uemoto T, et al. Long-term outcomes of Clinical Transplantation of pancreatic islets with uncontrolled donors after cardiac death: a multicenter experience in Japan. *Elsevier Transplantation Proc* 2014;(46):1980-4.
111. Warnock GL, Kneteman NM, Ryan EA, Rabinovitch A, Rajotte RV. Long-term follow-up after transplantation of insulin-producing pancreatic islets into patients with type 1 (insulin-dependent) diabetes mellitus. *Diabetologia*. 1992;35(1):89-95.
112. Anazawa T, Saito T, M. Goto, T. Kenmochi, S. Uemoto, T. Itoh et al. Long-term outcomes of Clinical Transplantation of pancreatic islets with uncontrolled donors after cardiac death: a multicenter experience in Japan. *Elsevier Transplantation Proc* 2014;(46):1980-4.