

УДК 616.43/.45-089.843:611.018.72:612.43/.45.018

**І.П. Пастер, І.А. Балла, А.Є. Коваленко, Я.Г. Бальон, В.В. Марков,
Н.В. Сологуб, О.Я. Родіонова, Л.А. Кузьминська, Н.І. Левчук,
О.А. Стаценко, С.В. Гулеватий, М.Д. Тронько**

*ДУ «Інститут ендокринології та обміну речовин ім. В.П. Комісаренка
АМН України», м. Київ*

ПЕРСПЕКТИВИ ПРОВЕДЕННЯ АЛО- І КСЕНОТРАНСПЛАНТАЦІЇ ТКАНИН ЕНДОКРИННИХ ЗАЛОЗ БЕЗ НЕОБХІДНОСТІ ПРИЗНАЧЕННЯ ІМУНОСУПРЕСИВНОЇ ТЕРАПІЇ

Показано, що мікроінкапсульовані тканини прищитоподібної та щитоподібної залоз людини, а також мікроінкапсульована тканина кори надниркової залози людини зберігають основні морфологічні властивості, що свідчить про перспективність їх застосування для компенсації гіпофункціонального стану відповідної системи.

Ключові слова: ендокринні залози, мікроінкапсульовані тканини, трансплантація.

Одним з альтернативних методів терапії стійких гіпофункціональних станів ендокринних залоз є трансплантація відповідних тканин або клітин. Виключити необхідність застосування імуносупресивної терапії можна за допомогою методу мікроінкапсуляції тканини або клітин у капсули з напівпроникними мембранами, які створюють імунологічний бар'єр між трансплантатом та організмом реципієнта при можливості необмеженої дифузії гормонів, поживних речовин, кисню, месенджерів і метаболітів [1].

Отримані позитивні результати експериментальних досліджень з використанням мікроінкапсульованих гормонпродуруючих клітин, а також розпочаті клінічні випробування ефективності трансплантації мікроінкапсульованих острівців підшлункової залози [2–4].

Метою нашої роботи було дослідити основні морфологічні характеристики мікроінкапсульованих тканин прищитоподібної та щитоподібної залоз людини, а також мікроінкапсульованої тканини кори надниркової залози людини за умов *in vitro* та *in vivo*.

Матеріал і методи. Для проведення експериментальних досліджень тканини прищитоподібної та щитоподібної залоз людини, а також тканину кори надниркової залози людини отримували в хірургічному

відділі клініки Інституту. Кожну ендокринну тканину промивали декілька разів стерильним 0,9 % розчином хлориду натрію з антибіотиками (з розрахунку 100 од. бензилпеніциліну натрієвої солі та 100 мкг стрептоміцину сульфату на 1 мл розчину), очищали від жирової та сполучної тканин, після чого сікли на шматочки розміром до 1 мм³ та знову промивали декілька разів стерильним 0,9 % розчином хлориду натрію з антибіотиками.

Шматочки ендокринної тканини людини переносили в 1,0–1,5 % розчин альгінату («Fluka», Норвегія), після чого здійснювали мікроінкапсуляцію тканини за стандартним методом [5]. Для цього через перший канал генератора мікрокапсул пропускали розчин альгінату з рівномірно розподіленими шматочками ендокринної тканини; через другий канал — повітря зі швидкістю 6–10 л/хв. З вихідного отвору генератора мікрокапсули з тканиною потрапляли в гелеутворюючий розчин хлориду кальцію («Sigma», США) з концентрацією 100 ммоль/л для перехресного зв'язування карбоксильних груп мануронової та гулууронової кислот альгінату, в якому їх інкубували протягом 15–30 хв і промивали кілька разів 0,9 % розчином хлориду натрію.

Мікроінкапсульовану ендокринну тканину людини культивували по 3–5 мікро-

капсул у флакончиках з 1 мл середовища RPMI-1640 («Sigma», США), яке містило 10 % сироватки новонародженого теляти («Sigma», США) і антибіотики, при температурі 37 °С. Частина проб з тиреоїдною та адренокортикальною тканинами містила також відповідно тироген (тиротропін альфа для ін'єкцій, «Genzyme», США) в кінцевій концентрації 5 мкг/мл і синактен-депо («Novartis», Німеччина) в кінцевій концентрації 0,1 Од/мл. Середовище культивування змінювали через день.

На етапі мікроінкапсуляції, а також в різні строки культивування і після трансплантації для гістологічного дослідження відбирали альгінатні мікрокапсули з ендокринною тканиною людини, які фіксували в рідині Буена протягом 18 годин, двічі відмивали у 40° етиловому спирті, зневоднювали у спиртах зростаючої концентрації (40°, 50°, 60°, 70°, 80°, 90°, 96°), двічі просвітлювали у ксилолі по 5 хв та заливали у Paraplast X-tra («Sigma», USA) при температурі 55 °С. Мікротомні зрізи завтовшки 5 мкм забарвлювали гематоксилін-еозином, після чого проводили стандартні гістологічні дослідження за допомогою мікроскопа «Біолам» («ЛОМО», Росія).

В різні строки культивування і після трансплантації відбирали аліквоти середовища і сироватки крові, які заморожували при температурі -20 °С для подальшого кількісного визначення рівнів паратгормону, тироксину і кортизолу імунорадіометричним методом з використанням відповідних наборів реактивів «hPTH-120 min IRMA» («BioSource Europe S.A.», Бельгія), «TT4 RIA kit» («Immunotech», Чехія) і «Cortisol RIA kit» («Immunotech», Чехія) та вимірюванням поглинання на лічильнику «Beckmann 5500B» («Beckmann», США).

До початку дослідження було отримано позитивне рішення комісії з етики ДУ «Інститут ендокринології та обміну речовин ім. В.П. Комісаренка АМН України», а також інформована згода від кожного пацієнта.

Обробка отриманих даних здійснена стандартними методами варіаційної статистики.

Результати та їх обговорення. Результати макроскопічного дослідження показали, що альгінатні мікрокапсули зі шматочками ендокринних тканин людини мають розміри приблизно 1–2 мм у діаметрі, однорідну структуру переважно правильної округлої або іноді дещо продовгуватої форми. Мікрокапсули мають, як правило, рівну поверх-

ню, рівномірну товщину стінки з усіх боків від ендокринної тканини і щільно прилягають до неї. Шматочки тканини розміщуються в альгінатних мікрокапсулах як по центру, так і дещо ексцентрично, що не впливає на морфофункціональні властивості ендокринної тканини [6].

Деформація АМ, яка спостерігається на рисунках у різні строки культивування або після трансплантації, є наслідком нерівномірного видалення води в процесі гістологічної обробки препаратів [7].

Характеристика мікроінкапсульованої тканини прищитоподібної залози людини.

In vitro. Гістологічні дослідження показали, що більшість фрагментів паратиреоїдної тканини людини мали у своєму складі залозисті клітини прищитоподібної залози, а також сполучну тканину. Паратиреоцити були округлої, інколи полігональної форми із світлою цитоплазмою, нормо- та гіперхромними кулястими ядрами та утворювали різні за розміром групи клітин. У фрагментах ендокринної тканини зустрічалися також відокремлені прошарками сполучної тканини тиреоїдні фолікули, які містили колоїд з резорбційними вакуолями.

На 7-му добу культивування мікроінкапсульована тканина прищитоподібної залози людини була цілком життєздатною, проте в деяких секреторних клітинах цитоплазма ставала вакуолізованою і з'являлися поодинокі клітини з пікнотичними ядрами. На 15-ту добу культивування спостерігалось зростання кількості паратиреоцитів з вакуолізованою цитоплазмою, гіперхромними та ексцентрично розташованими ядрами, а також почали зустрічатися без'ядерні клітини. На 18-ту добу культивування дещо зменшувалася кількість секреторних клітин за рахунок пікнотизації ядер паратиреоцитів та їх десквамації.

Функціональні дослідження встановили достатню гормональну активність мікроінкапсульованої тканини прищитоподібної залози людини в динаміці культивування. Так, кількісне визначення паратгормону в культуральному середовищі показало, що його базальний рівень на 4-ту добу культивування становив (30,11±3,81) пг/мл (n=3), на 7-му добу — (25,34±13,66) пг/мл (n=3), на 11-ту добу — (31,94±24,65) пг/мл (n=3), на 13-ту добу — (20,93±11,09) пг/мл (n=3), на 15-ту добу — (16,34±7,25) пг/мл (n=3) і на 18-ту добу — (27,25±21,76) пг/мл (n=2).

In vivo. Результати макроскопічного дослідження показали, що альгінатні мікро-

капсули залишалися цілими протягом всього періоду спостереження після ксенотрансплантації щурам з експериментальним гіпопаратиреозом як у підшкірну жирову основу черевної стінки, так і внутрішньочеревно.

Гістологічні дослідження показали, що більшість фрагментів паратиреоїдної тканини людини мали у своєму складі залозисті клітини, а також сполучну тканину. Паратиреоцити були округлої, інколи полігональної форми із світлою цитоплазмою, нормо- і гіперхромними кулястими ядрами та утворювали різні за розміром групи клітин. У фрагментах ендокринної тканини зустрічалися також відокремлені прошарками сполучної тканини і тиреоїдні фолікули, які містили колоїд з резорбційними вакуолями. Альгінатні мікрокапсули щільно прилягали до ендокринної тканини, мали хвилясту поверхню і досить пористу неоднорідну будову.

На 7-му добу після ксенотрансплантації мікроінкапсульювана тканина прищитоподібної залози людини була представлена досить неоднорідною, однак життєздатною та функціонально активною секреторною паренхімою. Паратиреоцити полігональної та округлої форми із світлою цитоплазмою та з чіткими клітинними межами тісно прилягали один до одного. Округлі ядра були нормохромними або дещо гіперхромними. Альгінатні мікрокапсули мали чисту поверхню і склалися з досить «пухкого» полімерного шару, однак фрагменти тканини не сполучалися з навколишнім середовищем.

На 14-ту добу після ксенотрансплантації мікроінкапсульювана тканина складалася з життєздатних функціонально активних паратиреоцитів з великою світлою цитоплазмою і округлими ядрами. Альгінатні мікрокапсули мали вільну від сполучної тканини поверхню, тісно прилягали до фрагментів тканини, однак будова їх стінки була неоднорідною, «пухкою» і мала досить великі пори.

На 26-ту добу після ксенотрансплантації мікроінкапсульювана тканина містила досить велику кількість функціонально активних паратиреоцитів, межі між якими ставали більш чіткими та хвилястими. Подекуди починали зустрічатись явища каріолізу та, як наслідок, без'ядерні секреторні клітини. Альгінатні мікрокапсули мали нерівну поверхню з розташованими в ній великими порами.

На 43-тю добу після ксенотрансплантації в мікроінкапсульюваній тканині змен-

шувалася загальна кількість життєздатних паратиреоцитів, які були представлені як невеликими групами, так і окремими клітинами. Ядра більшості паратиреоцитів були гіперхромними, однак зростала кількість без'ядерних секреторних клітин. Альгінатні мікрокапсули мали нерівну розгалужену поверхню і розшаровану структуру.

На 69-ту добу після ксенотрансплантації в мікроінкапсульюваній тканині переважна частина паратиреоцитів, які були розташовані здебільшого невеликими групами, зберегла життєздатність. Інша частина секреторних клітин містила вакуолізовану цитоплазму з асиметрично розташованими ядрами. Спостерігалось подальше зростання каріопікнозу. Альгінатні мікрокапсули залишалися без видимих змін.

У функціональних дослідженнях встановили достатню гормональну активність мікроінкапсульюваної тканини прищитоподібної залози людини у віддалені строки після ксенотрансплантації щурам з експериментальним гіпопаратиреозом. Так, кількісне визначення паратгормону в крові тварин-реципієнтів показало, що його рівень на 7-му добу становив $(49,08 \pm 8,38)$ пг/мл ($n=3$), на 14-ту добу — $(29,40 \pm 8,08)$ пг/мл ($n=2$), на 26-ту добу — $(20,49 \pm 3,61)$ пг/мл ($n=3$), на 36-ту добу — $(24,23 \pm 8,68)$ пг/мл ($n=3$), на 43-тю добу — $(32,93 \pm 10,15)$ пг/мл ($n=3$) і на 69-ту добу — $(32,01 \pm 4,98)$ пг/мл ($n=5$).

Характеристика мікроінкапсульюваної тканини щитоподібної залози людини.

Результати гістологічного дослідження показали, що мікроінкапсульювана тканина щитоподібної залози людини нормофолікулярної будови з однорядним епітелієм і щільним колоїдом. Тиреоцити кубічної, іноді сплющеної форми з світлою цитоплазмою і округлими монотипними ядрами. Міжклітинні контакти не порушені, а клітинний детрит відсутній.

Після 2-ї доби культивування альгінатні мікрокапсули однорідної структури, дещо неправильної форми, нерівномірної товщини і з пологими інвагінаціями не досить щільно прилягають до мікроінкапсульюваної тканини щитоподібної залози людини. Тиреоїдна тканина переважно нормофолікулярної будови з однорядним епітелієм, однак з'являються ділянки з мікрофолікулярною будовою. Тиреоцити кубічної форми з світлою цитоплазмою і округлими світлими ядрами. Міжклітинні контакти не порушені, однак спостерігається незначна кількість клітинного детриту.

У 5-добовій культурі альгінатні мікрокапсули не зазнають суттєвих змін порівняно з показником на 2-гу добу, однак спостерігається незначне відшарування біополімеру від тиреоїдної тканини. Сама тканина переважно нормофолікулярної будови з однорядним епітелієм і ознаками кістозної трансформації. Тиреоцити кубічної форми з світлою цитоплазмою і дрібними, щільними ядрами. Спостерігається часткове порушення міжклітинних контактів.

На 8-му добу культивування переважна більшість альгінатних мікрокапсул однорідної структури, дещо неправильної форми і з нерівною поверхнею. Тиреоїдна тканина переважно нормофолікулярної будови з деякими ознаками кістозної трансформації та частковим порушенням міжклітинних контактів. Зростає кількість клітинного детриту.

На 11-ту добу культивування альгінатні мікрокапсули не зазнають подальших видимих змін. Тканина щитовидної залози набуває ознак часткової будови за рахунок проростання в біополімерну капсулу і появи сполучної тканини в периферичній зоні. Тиреоїдна тканина нормо- або мікрофолікулярної будови з поодинокими ділянками фіброзу і деструкції. Тиреоцити переважно кубічної форми зі світлою цитоплазмою і дрібними, щільними ядрами.

Кількісне визначення загального тироксину в культуральному середовищі показало, що його базальний рівень на 2-гу добу культивування мікроінкапсульованої тканини щитоподібної залози людини становив $(16,89 \pm 2,18)$ нмоль/л ($n=3$), на 5-ту добу — $(17,24 \pm 0,77)$ нмоль/л ($n=3$), на 8-му добу — $(18,78 \pm 1,07)$ нмоль/л ($n=3$) і на 11-ту добу — $(17,27 \pm 0,59)$ нмоль/л ($n=3$). В ці ж строки базальний рівень загального тироксину в культуральному середовищі культивування нативної тканини щитоподібної залози людини становив відповідно $(19,17 \pm 5,33)$ нмоль/л ($n=3$), $(18,54 \pm 0,76)$ нмоль/л ($n=3$), $(16,24 \pm 0,25)$ нмоль/л ($n=3$) і $(16,79 \pm 0,95)$ нмоль/л ($n=3$).

Культивування мікроінкапсульованої тканини щитоподібної залози людини з ти-

рогеном (5 мкг/мл) приводило до вірогідного зростання рівня загального тироксину в середовищі на 5-ту, 8-му і 11-ту добу відповідно на 49,2; 73,9 і 34,2 % порівняно з базальними показниками цього ж терміну.

Характеристика мікроінкапсульованої тканини кори надниркової залози людини.

У гормональних дослідженнях встановили наявність функціональної активності як нативної, так і мікроінкапсульованої тканини кори надниркової залози людини в динаміці культивування. Кількісне визначення кортизолу в культуральному середовищі показало, що його базальний рівень на 4-ту добу культивування мікроінкапсульованої тканини кори надниркової залози людини становив $(543,10 \pm 27,18)$ нмоль/л ($n=3$), на 8-му добу — $(506,27 \pm 40,93)$ нмоль/л ($n=3$), на 12-ту добу — $(276,67 \pm 42,56)$ нмоль/л ($n=3$), на 16-ту добу — $(199,43 \pm 91,53)$ нмоль/л ($n=3$), на 20-ту добу — $(92,36 \pm 30,72)$ нмоль/л ($n=3$), на 24-ту добу — $(86,00 \pm 29,79)$ нмоль/л ($n=3$) і на 28-му добу — $(81,19 \pm 28,57)$ нмоль/л ($n=3$).

Для порівняння, в ці ж строки базальний рівень кортизолу в культуральному середовищі культивування нативної тканини кори надниркової залози людини становив відповідно $(546,45 \pm 161,65)$ нмоль/л ($n=2$), $(320,45 \pm 71,95)$ нмоль/л ($n=2$), $(282,05 \pm 52,65)$ нмоль/л ($n=2$), $(97,29 \pm 14,41)$ нмоль/л ($n=2$), $(48,87 \pm 5,56)$ нмоль/л ($n=2$), $(26,06 \pm 1,27)$ нмоль/л ($n=2$) і $(34,62 \pm 13,94)$ нмоль/л ($n=2$).

Культивування нативної та мікроінкапсульованої тканини кори надниркової залози людини з синактен-депо (0,1 Од/мл) приводило до зростання рівня кортизолу в середовищі відповідно на 58,6 і 71,2 % порівняно з базальними показниками.

Таким чином, мікроінкапсульовані тканини прищитоподібної та щитоподібної залоз людини, а також мікроінкапсульована тканина кори надниркової залози людини зберігають основні морфофункціональні властивості, що свідчить про перспективність їх застосування для компенсації гіпофункціонального стану відповідної системи.

Список літератури

1. *Uludag H.* Technology of mammalian cell encapsulation / H. Uludag, P. De Vos, P. A. Tresco // *Adv. Drug. Deliv. Rev.* — 2000. — V. 42, № 1–2. — P. 29–64.
2. *Islet transplantation in rodents. Do encapsulated islets really work?* / Y. E. Souza, E. Chaib, P. G. Lacerda [et al.] // *Arq. Gastroenterol.* — 2011. — V. 48, № 2. — P. 146–152.
3. *Microencapsulated pancreatic islet allografts into nonimmunosuppressed patients with type I diabetes* / R. Calafiore, G. Basta, G. Luca [et al.] // *Diabetes Care.* — 2006. — V. 29, № 1. — P. 137–138.

4. Live encapsulated porcine islets from a type 1 diabetic patient 9.5 yr after xenotransplantation / R. B. Elliott, L. Escobar, P. L. Tan [et al.] // Xenotransplantation. — 2007. — V. 14, № 2. — P. 157–161.
5. Biocompatibility and function of microencapsulated pancreatic islets / M. Figliuzzi, T. Plati, R. Cornolti [et al.] // Acta Biomaterialia. — 2006. — V. 2, № 2. — P. 221–227.
6. A novel class of amitogenic alginate microcapsules for long-term immunoisolated transplantation / U. Zimmermann, F. Thirmer, A. Jork [et al.] // Ann. N. Y. Acad. Sci. — 2001. — V. 944. — P. 199–215.
7. *De Vos P.* Considerations for successful transplantation of encapsulated pancreatic islets / P. De Vos, A. F. Hamel, K. Tatarkiewicz // Diabetologia. — 2002. — V. 45, № 2. — P. 159–173.

И.П. Пастер, И.А. Балла, А.Е. Коваленко, Я.Г. Бальон, В.В. Марков, Н.В. Сологуб, А.Я. Родионова, Л.А. Кузьминская, Н.И. Левчук, А.А. Стаценко, С.В. Гулеватый, Н.Д. Тронько

ПЕРСПЕКТИВЫ ПРОВЕДЕНИЯ АЛЛО- И КСЕНОТРАНСПЛАНТАЦИИ ТКАНЕЙ ЭНДОКРИННЫХ ЖЕЛЕЗ БЕЗ НЕОБХОДИМОСТИ НАЗНАЧЕНИЯ ИММУНОСУПРЕССИВНОЙ ТЕРАПИИ

Показано, что микроинкапсулированные ткани паращитовидной и щитовидной желез человека, а также микроинкапсулированная ткань коры надпочечной железы человека сохраняют основные морфофункциональные свойства, что свидетельствует о перспективности их применения для компенсации гипофункционального состояния соответствующей системы.

Ключевые слова: эндокринные железы, микроинкапсулированные ткани, трансплантация.

I.P. Pasteur, I.A. Balla, A.Ye. Kovalenko, Ya.G. Balyon, V.V. Markov, N.V. Sologub, O.Ya. Rodionova, L.A. Kuzminska, N.I. Levchuk, O.A. Stazenko, S.V. Gulevaty, M.D. Tronko

PROSPECTS OF ALLO- AND XENOTRANSPLANTATION OF ENDOCRINE GLANDS WITHOUT THE NEED FOR PRESCRIBING IMMUNOSUPPRESSIVE THERAPY

It is shown, that the microencapsulated tissues of human parathyroid and thyroid glands, as well as of human adrenal cortex, maintain their main morphofunctional properties, which makes promising their use for the purpose of compensation of hypofunctional state of the respective system.

Key words: endocrine glands, microencapsulated tissues, transplantation.