

І. П. Пастер

Секреція кортизолу мікроінкапсульованою тканиною кори надниркової залози людини в динаміці культивування

(Представлено членом-кореспондентом НАН України М. Д. Троньком)

Мікроінкапсульована тканина кори надниркової залози людини зберігає здатність секретувати кортизол протягом 28 діб культивування, а також адекватно реагувати на стимуляцію адренкортикотропним гормоном, що свідчить про перспективність її застосування для компенсації гіпофункціонального стану адренкортикальної системи в експериментах на тваринах.

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].

На сьогодні отримані позитивні результати експериментальних досліджень з використанням мікроінкапсульованих тироїдної тканини [2], клітин гіпофіза [3], клітин Сертолі [4], хромафінних клітин медулярного шару надниркових залоз (ННЗ) [5] і ряду інших типів гормонпродукуючих клітин. Розпочаті клінічні випробування ефективності трансплантації мікроінкапсульованих паратиреоїдної тканини [6] і острівців підшлункової залози [7].

Запропоновано використання мікроінкапсульованих клітин ННЗ для пригнічення неспецифічної реакції відторгнення, яка спостерігається навколо полімерного імплантата [8]. Експериментальні дослідження показали, що, на відміну від імплантації порожніх мікрокапсул, при трансплантації мікрокапсул з клітинами ННЗ значно зменшується популяція Т-лімфоцитів, знижується відсоток субпопуляцій клітин CD4+ і CD8+, зникає маркер активації макрофагів, а оточуюча фіброзна тканина стає менш виразною і не настільки щільною.

Були розпочаті експериментальні дослідження функціональної активності мікроінкапсульованих клітин кори ННЗ поросят [9], однак вони не знайшли подальшого продовження через негативне ставлення до трансплантації донорського матеріалу ксеногенного походження.

У той же час періодично з'являються повідомлення про клінічне застосування методу алотрансплантації кори ННЗ (КННЗ) людини. Перше з них стосувалося трьох випадків гетеротопічної алотрансплантації ННЗ на судинній ніжці [10].

Для терапії стероїдного дефіциту пропонувалося проводити алотрансплантацію КННЗ плода, як простий і ефективний метод [11]. Так, людині, яка потерпала від двосторонньої карциноми ННЗ, була виконана тотальна адреналектомія та призначена замісна терапія стероїдами. Через 1,5 місяця КННЗ плода була підсаджена до великого сальника пацієнта. Імуносупресивна терапія не призначалася. З 4-го місяця була поступово зменшена доза екзогенних стероїдів, а на 5-й місяць після трансплантації замісна терапія була припинена.

У пацієнта не спостерігалось жодної ознаки дефіциту стероїдів і всі лабораторні показники були в межах норми. Через 7 місяців пацієнт вмер від метастазів карциноми. Патологоанатомічна експертиза показала, що значна кількість КННЗ регенерувала у великому сальніку.

Також повідомлялось про одномоментну алотрансплантацію ННЗ та нирки з терапевтичною метою [12, 13]. Так, через 13 місяців після двосторонньої нефректомії з приводу двосторонньої карциноми нирок із залученням обох ННЗ 46-річній людині була виконана одномоментна алотрансплантація ННЗ та нирки. Імуносупресивна терапія базувалась на азатіоприні, антилімфоцитарному глобуліні, циклоспорині та преднізолоні. Функція ниркового алотрансплантата залишалась стабільною протягом 5 років (до моменту смерті пацієнта від множинних метастазів в підшлункову залозу). Клінічні, біохімічні, радіологічні та гістологічні показники свідчили про функцію алотрансплантата ННЗ. Дослідники вважають, що алотрансплантація ННЗ є виправданою тільки у випадках, коли надниркова недостатність існує на кінцевій стадії ураження органа і потребує трансплантації та відповідної імуносупресивної терапії.

Нещодавно з'явилося повідомлення про успішну внутрішньом'язову трансплантацію ННЗ з тривалим ефектом як засіб лікування хронічної надниркової недостатності [14]. Так, 5-річній дівчинці з наднирковою недостатністю після блискавичної менінгококцемії через 10 місяців після початку хвороби одномоментно було трансплантовано нирку і ННЗ від рідної матері. Для цього алотрансплантат ННЗ попередньо сікли на шматочки розміром 1 мм³ і імплантували в штучно утворені кармани в прямому м'язі живота пацієнтки. Через 3 роки після операції трансплантат залишався повністю функціональним, добре реагував на стимуляцію адренкортикотропним гормоном, а пацієнтка не потребувала додаткового призначення будь-яких стероїдних або мінералокортикоїдних препаратів. Дослідники припускають, що цей випадок є першим описом успішного функціонування внутрішньом'язового алотрансплантата ННЗ як засобу лікування надниркової недостатності.

На жаль, до теперішнього часу не розроблено метод мікроінкапсуляції тканини або клітин КННЗ людини, який можна було б застосовувати для захисту трансплантаційного матеріалу замість імуносупресивної терапії при компенсації сталого гіпокортицизму.

У даному повідомленні наведено результати дослідження здатності до секреції кортикостероїдів мікроінкапсульованою тканиною КННЗ людини в динаміці культивування.

Для проведення експериментальних досліджень тканину КННЗ людини отримували в хірургічному відділі клініки Державної установи "Інститут ендокринології та обміну речовин ім. В. П. Комісаренка АМН України". Адренкортикальну тканину промивали декілька разів стерильним 0,9%-м 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%-м розчином хлориду натрію з антибіотиками.

Шматочки тканини КННЗ людини переносили в 1%-й розчин альгінату ("Fluka", Норвегія), який безпосередньо перед застосуванням стерилізували фільтрацією через фільтр з порами 0,45 мкм ("Filtron", Німеччина), після чого здійснювали мікроінкапсуляцію тканини КННЗ за стандартним методом [15]. Для цього через перший канал генератора мікрокапсул пропускали 1%-й розчин альгінату з рівномірно розподіленими шматочками адренкортикальної тканини, через другий канал — повітря зі швидкістю 8–10 л/хв. З вихідного отвору генератора мікрокапсули з тканиною потрапляли в гелеутворюючий розчин хлори-

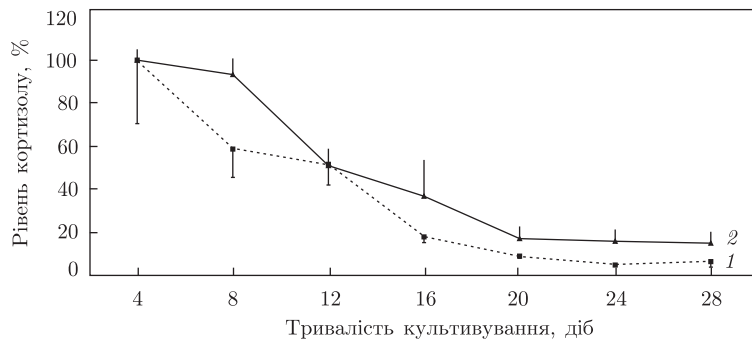


Рис. 1. Рівень кортизолу в середовищі культивування нативної (1) та мікроінкапсульованої (2) тканини кори надниркової залози людини

ду кальцію ("Sigma", США) з концентрацією 100 ммоль/л для перехресного зв'язування карбоксильних груп мануранової та гулуранової кислот альгінату, в якому їх інкубували протягом 30 хв і промивали кілька разів 0,9%-м розчином хлориду натрію.

Мікроінкапсульовану тканину КННЗ людини культивували по три мікрокапсули у флакончиках з 1 мл середовища RPMI-1640 ("Sigma", США), яке містило 10% сироватки новонародженого теляти ("Sigma", США) і антибіотики, при постійному обертанні з частотою 10–12 об/год та температурі 37 °С. Частина проб містила також синактен-депо ("Novartis", Німеччина) в кінцевій концентрації 0,1 Од/мл. Середовище культивування змінювали через день. При цьому аліквоти середовища відбирали та заморожували при –20 °С для наступного визначення рівня кортизолу.

На етапі мікроінкапсуляції та в динаміці культивування здійснювали макроскопічний контроль стану альгінатних мікрокапсул за допомогою мікроскопа "Біолам" ("ЛОМО", Росія). Кількісне визначення рівня кортизолу в аліквотах середовища культивування проводили імунорадіометричним методом з використанням набору реактивів "Cortisol RIA kit" ("Immunotech", Угорщина) та вимірюванням поглинання на лічильнику "Beckmann 5500B" ("Beckmann", США).

До початку дослідження було отримано позитивне рішення Комісії з етики Державної установи "Інститут ендокринології та обміну речовин ім. В. П. Комісаренка АМН України", а також інформовану згоду від кожного пацієнта.

Обробку отриманих даних здійснювали стандартними методами варіаційної статистики.

За результатами гормональних досліджень встановлено наявність функціональної активності як нативної, так і мікроінкапсульованої тканини КННЗ людини в динаміці культивування (рис. 1). Кількісне визначення кортизолу в культуральному середовищі показало, що його базальний рівень на 4-ту добу культивування мікроінкапсульованої тканини КННЗ 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: у ці ж строки базальний рівень кортизолу в культуральному середовищі культивування нативної тканини КННЗ 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 ($n = 2$).

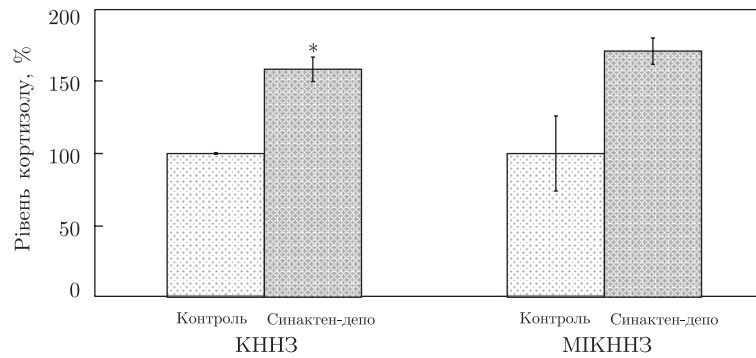


Рис. 2. Вплив синактен-депо на рівень кортизолу в середовищі культивування нативної (КННЗ) та мікроінкапсульованої (МКННЗ) тканини кори надниркової залози людини. * — $P < 0,05$ у порівнянні з відповідним контролем

Культивування нативної та мікроінкапсульованої адренкортикальної тканини людини з синактен-депо (0,1 Од/мл) призводило до зростання рівня кортизолу в середовищі відповідно на 58,6 і 71,2% порівняно з базальними показниками, прийнятими за 100% (рис. 2).

Експериментальні дослідження функціональної активності клітин КННЗ поросят, які були попередньо мікроінкапсульовані в тришарові альгінат-полілізін-альгінатні мембрани за допомогою електростатичного генератора мікрокапсул, показали адекватну секрецію кортизолу у відповідь на стимуляцію адренкортикотропним гормоном, яка була порівняною з результатами специфічної стимуляції вільних адренкортикоцитів [9].

Таким чином, мікроінкапсульована тканина кори надниркової залози людини зберігає здатність секретувати кортизол у динаміці культивування, а також адекватно реагувати на стимуляцію адренкортикотропним гормоном, що свідчить про перспективність її застосування для компенсації гіпофункціонального стану адренкортикальної системи в експериментах на тваринах.

1. Zimmermann U., Cramer H., Jork A. et al. Microencapsulation-based cell therapy // *Biotechnology* / Eds. H.-J. Rehm, G. Reed. – Weinheim: Wiley-VCH, 2001. – P. 547–571.
2. Chen G. X., Peng Y., Lou P. L., Liu J. P. Bioartificial thyroid. The in vitro culture of microencapsulated rabbit thyroid tissue // *ASAIO Trans.* – 1991. – **37**, No 3. – P. M439-M440.
3. Chen Z. P., Bao Y. D. Study of microencapsulated pituitary transplantation. Preparation of the capsule and its property // *Chin. Med. J. (Engl.)*. – 1994. – **107**, No 3. – P. 200–204.
4. Luca G., Calvitti M., Nastruzzi C. et al. Encapsulation, in vitro characterization, and in vivo biocompatibility of Sertoli cells in alginate-based microcapsules // *Tissue Eng.* – 2007. – **13**, No 3. – P. 641–648.
5. Kim Y. M., Kwak K. H., Lim J. O., Baek W. Y. Reduction of allodynia by intrathecal transplantation of microencapsulated porcine chromaffin cells // *Artif. Organs.* – 2009. – **33**, No 3. – P. 240–249.
6. Hasse C., Klöck G., Schlosser A. et al. Parathyroid allotransplantation without immunosuppression // *Lancet.* – 1997. – **350**, No 9087. – P. 1296–1297.
7. Elliott R. B., Escobar L., Tan P. L. et al. Live encapsulated porcine islets from a type 1 diabetic patient 9.5 yr after xenotransplantation // *Xenotransplantation.* – 2007. – **14**, No 2. – P. 157–161.
8. Cadic C., Vitiello S., Gin H. et al. Embedded adrenal cells graft reduced local and early nonspecific inflammatory phenomena which follow agarose beads implantation // *Cell Transplant.* – 1992. – **1**, No 5. – P. 349–354.
9. Abobakr A. M. Free and microencapsulated adrenal cortical cells produce similar cortisol responses when stimulated by ACTH: an in vitro study // *Int. J. Artif. Organs.* – 1994. – **17**, No 3. – P. 171–174.
10. Chen Z. H., Xia S. S. Heterotopic allotransplantation of adrenal gland with vascular pedicle (report of 3 cases) // *Acta Acad. Med. Wuhan.* – 1985. – **5**, No 4. – P. 220–225.
11. Wang P., Zhang G., Yang T. Allotransplantation of fetal adrenal capsules for treating steroid deficiency // *Zhonghua Wai Ke Za Zhi.* – 1996. – **34**, No 12. – P. 723–725.

12. *Dubernard J. M., Cloix P., Feitosa-Tajra L. C. et al.* Simultaneous allotransplantation of the adrenal gland and the kidney // *Chirurgie*. – 1996. – **121**, No 3. – P. 181–185.
13. *Dubernard J. M., Cloix P., Tajra L. C. et al.* Simultaneous adrenal gland and kidney allotransplantation after synchronous bilateral renal cell carcinoma: a case report // *Transplant. Proc.* – 1995. – **27**, No 1. – P. 1320–1321.
14. *Grodstein E., Hardy M. A., Goldstein M. J.* A case of human intramuscular adrenal gland transplantation as a cure for chronic adrenal insufficiency // *Amer. J. Transplant.* – 2010. – **10**, No 2. – P. 431–433.
15. *Figliuzzi M., Plati T., Cornolti R. et al.* Biocompatibility and function of microencapsulated pancreatic islets // *Acta Biomaterialia*. – 2006. – **2**, No 2. – P. 221–227.

*Державна установа “Інститут ендокринології
та обміну речовин ім. В. П. Комісаренка
АМН України”, Київ*

Надійшло до редакції 15.10.2010

I. P. Pasteur

Cortisol secretion by microencapsulated human adrenal cortex tissue in culture

Microencapsulated human adrenal cortex tissue preserves the ability to secrete cortisol for 28 days of cultivation and also to react adequately on the stimulation by adrenocorticotropin, that suggests the good prospects to use this tissue for the compensation of a hypofunctional state of the adrenocorticotropin system in experimental animals.