

Член-кореспондент НАН України М. Д. Тронько, І. А. Балла,  
І. П. Пастер

## Морфологічна характеристика мікроінкапсульованої тканини аденоми прищитоподібної залози людини в умовах *in vitro*

*Показана висока життєздатність і морфофункціональна активність мікроінкапсульованої тканини аденоми прищитоподібної залози людини в умовах *in vitro*, що свідчить про можливість її використання як трансплантата при компенсації гіпофункціонального стану паратиреоїдної системи в експерименті на тваринах.*

Однією з найбільш важливих проблем трансплантології є запобігання реакції відторгнення трансплантата організмом реципієнта, для чого застосовують як супресивну терапію, так і метод мікроінкапсуляції фрагментів тканини або суспензії клітин в альгінатні мікрокапсули з напівпроникними мембранами [1, 2]. Такі капсули проникні для гормонів, поживних речовин, метаболітів і кисню, але не проникні для основних компонентів імунної системи [3].

У роботі наведено морфологічну характеристику мікроінкапсульованої тканини аденоми прищитоподібної залози людини в умовах *in vitro*.

Аденома прищитоподібної залози людини була отримана в хірургічному відділенні клініки Державної установи “Інститут ендокринології та обміну речовин ім. В. П. Комісаренка АМН України”. Паратиреоїдну 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 мм<sup>3</sup> та знову промивали декілька разів стерильним 0,9%-м розчином хлориду натрію з антибіотиками.

Шматочки тканини прищитоподібної залози людини переносили в робочий розчин альгінату, який попередньо готували за розробленим нами методом [4]. Мікроінкапсуляцію паратиреоїдної тканини в альгінатні мікрокапсули проводили за стандартним методом, розробленим для мікроінкапсуляції ендокринних тканин (зокрема, підшлункової та прищитоподібної залоз) [5], у нашій модифікації [6]. Після завершення процедури мікроінкапсуляції альгінатні мікрокапсули з шматочками паратиреоїдної тканини людини повторно промивали кілька разів 0,9%-м розчином хлориду натрію і культивували по 5 мікрокапсул в культуральних флакончиках з 2 мл середовища RPMI-1640 (“Sigma”, США), яке містило 10% інактивованої нагріванням сироватки новонародженого теляти (“INC Biomedicals GmbH”, Німеччина) і антибіотики, при постійному обертанні з частотою 10–12 об/год і температурі 37 °С. Зміну середовища культивування проводили через добу.

На 1-шу, 3-тю, 5-ту, 7-му і 9-ту добу культивування для гістологічного дослідження відбирали альгінатні мікрокапсули з паратиреоїдною тканиною людини, які фіксували в рідині Буена протягом 18 год, двічі відмивали в 40° етиловому спирті, зневоднювали в спиртах зростаючої концентрації (40°, 50°, 60°, 70°, 80°, 90°, 96°), двічі просвітлювали в ксилолі по 5 хв та заливали в Paraplast X-tra (“Sigma”, США) при 55 °С. Мікротомні зрізи завтовшки 5 мкм забарвлювали гематоксиліном-еозином, після чого проводили стандартні гістологічні

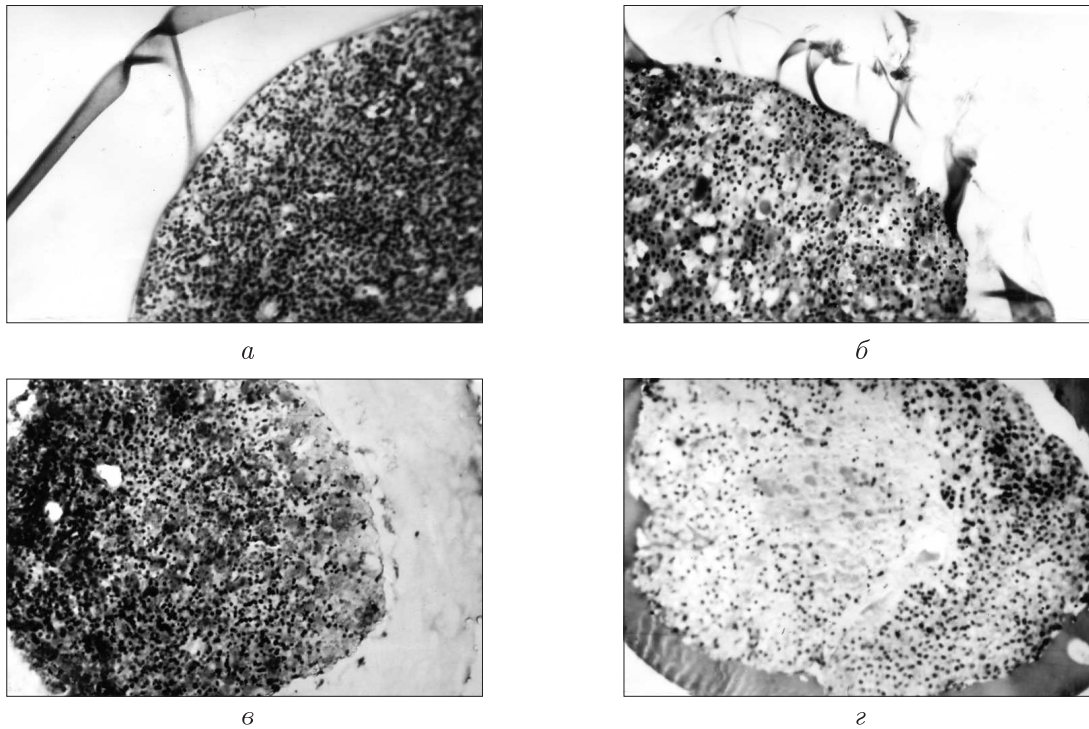


Рис. 1. Мікроінкапсульована тканина аденоми прищитоподібної залози людини на 1-шу (а), 3-тю (б), 7-му (в) та 9-ту (г) добу культивування. Забарвлення гематоксиліном-еозином. Об. 20, ок. 10

дослідження, вимірювали товщину альгінатних мікрокапсул та оцінювали відносний розмір життєздатної залозистої паренхіми тканини прищитоподібної залози за допомогою гвинтового окуляра-мікрометра і окулярної вставки-сітки відповідно.

Результати наших досліджень показали, що альгінатні мікрокапсули, всередині яких містяться шматочки тканини аденоми прищитоподібної залози людини, мають досить пружну консистенцію, переважно сферичну (іноді краплиноподібну) форму та розміри 1–2 мм у діаметрі. Товщина стінки мікрокапсули, як правило, рівномірна і не перевищує 0,2 мм з усіх сторін від шматочка паратиреоїдної тканини. Гелеподібна мікрокапсула щільно прилягає до тканини прищитоподібної залози і заповнює заглибини, утворені за рахунок нерівностей країв шматочків тканини.

Мікроінкапсульована тканина аденоми прищитоподібної залози людини складається здебільшого з паратиреоцитів полігональної та округлої форми, в яких світла дрібнозерниста та еозинофільна цитоплазма містить кулеподібні нормохромні та світлі ядра. Також зустрічаються безядерні клітини з нечіткими межами, гомогенно забарвленою еозинофільною цитоплазмою та пікнотичними ядрами.

Гістологічні дослідження свідчать про те, що після 1-ї доби культивування однорідна альгінатна мікрокапсула з рівним краєм і пологими інвагінаціями щільно прилягає до паратиреоїдної тканини. Паратиреоцити полігональної та округлої форми зі світлою дрібнозернистою та еозинофільною цитоплазмою з кулеподібними нормохромними та світлими ядрами. Розшарування клітин всередині шматочків тканини свідчить про незначний набряк. По периферії шматочка спостерігається тонкий шар клітинного детриту (рис. 1, а).

У 3-добовій культурі альгінатні мікрокапсули не зазнають істотних змін, однак поверхневий шар біополімеру подекуди має розшарування. Мікрокапсули мають чіткі хвилясті зовнішні межі, а їх внутрішній шар щільно прилягає до паратиреоїдної тканини людини, яка починає зазнавати деяких змін. Так, паратиреоцити щільно прилягають один до одного, а їх межі стають більш чіткими і хвилястими. Всередині великих шматочків тканини помітні групи клітин з нечіткими межами та каріолізисом, має місце еозинофілія цитоплазми, що свідчить про звичайну для культивованої тканини ішемію. Однак більша частина паратиреоїдної тканини залишається життєздатною (див. рис. 1, б).

На 5-ту добу культивування в переважній частині мікрокапсул альгінат щільно прилягає до тканини та має щільний поверхневий шар. Однак в одиничних мікрокапсулах утворюються незначні щілини між біополімером та фрагментом тканини. У цей термін спостерігається подальше зростання кількості клітин з еозинофільною гомогенною цитоплазмою та пікнотичними ядрами. Проте близько 2/3 площі зрізу шматочків ендокринної тканини представлені паратиреоцитами з круглими нормохромними ядрами та світлою цитоплазмою, об'єм якої дещо зменшується порівняно з попередніми строками.

На 7-му добу культивування будова стінки альгінатних мікрокапсул видимих змін порівняно з попереднім строком не зазнає. Мікроінкапсульована паратиреоїдна тканина людини на 1/3 складається зі світлих полігональних паратиреоцитів з мозаїчно розташованими деструктивно зміненими клітинами. У всіх тканинних фрагментах зустрічаються зони центрального некрозу, так само як і в неінкапсульованій тканині (див. рис. 1, в).

9-добова культура мікроінкапсульованої тканини аденоми прищитоподібної залози людини представлена розташованими досить широкою смугою по зовнішньому краю фрагментами життєздатної паренхіми зі світлими паратиреоцитами та нормохромними ядрами (див. рис. 1, г). Для внутрішньої частини шматочків паратиреоїдної тканини характерні еозинофілія цитоплазми та пікнотизація ядер паратиреоцитів без чітких меж. Незначний набряк у цій частині паратиреоїдної тканини свідчить про її початкове ішемічне ураження, яке, однак, істотно не відрізняється від аналогічного процесу в неінкапсульованих фрагментах контрольних зразків цієї ж тканини і цього ж строку культивування.

Відомо, що нативна та мікроінкапсульована тканина прищитоподібної залози людини мають близький рівень життєздатності в умовах *in vitro* [7]. Результати наших попередніх досліджень показали високу функціональну активність (зокрема, здатність інтенсивно продукувати паратгормон та адекватно реагувати на вплив позаклітинного кальцію) мікроінкапсульованої тканини аденоми прищитоподібної залози людини в умовах *in vitro* [8], що робить її придатною для використання як трансплантата при компенсації гіпофункціонального стану паратиреоїдної системи.

Деформація альгінатних мікрокапсул, яка спостерігається в різні строки культивування (див. рис. 1), є наслідком нерівномірного видалення води в процесі гістологічної обробки препаратів [9]. За допомогою розроблених нами способів дослідження фізичних властивостей альгінатних мікрокапсул [10, 11] була показана пряма залежність їх механічної та осмотичної стійкості від концентрації біополімеру [12]. Відомо, що найбільш механічно резистентними є біополімерні мікрокапсули, які виготовлені з альгінату з високим вмістом гулуранової кислоти [13] та мають суцільну структуру [14, 15].

Таким чином, показана висока життєздатність і морфофункціональна активність мікроінкапсульованої тканини аденоми прищитоподібної залози людини в умовах *in vitro*, що свідчить про можливість її використання як трансплантата при компенсації гіпофункціонального стану паратиреоїдної системи в експерименті на тваринах.

1. *Smidsrød O., Skjåk-Bræk G.* Alginate as immobilization matrix for cells // Trends Biotechnol. – 1990. – **8**, No 3. – P. 71–78.
2. *Zimmermann U., Mimiets S., Zimmermann H. et al.* Hydrogel-based non-autologous cell and tissue therapy // BioTechniques. – 2000. – **29**, No 3. – P. 564–581.
3. *Zimmermann U., Cramer H., Jork A. et al.* Microencapsulation-based cell therapy // Biotechnology / Ed. by H.-J. Rehm, G. Reed. – Weinheim: Wiley-VCH, 2001. – P. 548–571.
4. *Пат. 20265 Україна, МПК7 C 12 N 11/10.* Процес приготування водного розчину альгінату, призначеного для виготовлення мікрокапсул / І. П. Пастер, М. Д. Тронько. – Опубл. 15.01.2007, Бюл. № 1.
5. *Zimmermann U., Hasse C., Rothmund M., Kühtreiber W.* Biocompatible encapsulation materials: fundamentals and application // Cell encapsulation technology and therapeutics / Eds. by W. M. Kühtreiber, R. P. Lanza, W. L. Chick. – Boston: Birkhäuser, 1999. – P. 40–52.
6. *Пат. 27283 Україна, МПК7 C 12 N 1/00, C 12 N 5/00.* Процес мікроінкапсуляції клітин і тканини прищитоподібної залози в альгінатні мікрокапсули / І. П. Пастер, М. Д. Тронько. – Опубл. 25.10.2007, Бюл. № 17.
7. *Lee C. H., Wang Y. J., Kuo S. M., Chang S. J.* Microencapsulation of parathyroid tissue with photosensitive poly(L-lysine) and short chain alginate-co-MPEG // Artif. Organs. – 2004. – **28**, No 6. – P. 537–542.
8. *Пастер І. П.* Функціональна характеристика мікроінкапсульованої тканини аденоми паращитовидної залози людини в умовах *in vitro* // Доп. НАН України. – 2007. – № 9. – С. 174–179.
9. *de Vos P., Hamel A. F., Tatarkiewicz K.* Considerations for successful transplantation of encapsulated pancreatic islets // Diabetologia. – 2002. – **45**, No 2. – P. 159–173.
10. *Пат. 15729 Україна, МПК 7 G 01 N 33/15, C 12 N 5/00, A 61 B 10/00.* Процес визначення механічної стійкості альгінатних капсул, призначених для мікроінкапсуляції тканин або клітин / І. П. Пастер, М. Д. Тронько. – Опубл. 17.07.2006, Бюл. № 7.
11. *Пат. 15730 Україна, МПК 7 G 01 N 33/15, C 12 N 5/00, A 61 B 10/00.* Процес визначення осмотичної стійкості альгінатних капсул, призначених для мікроінкапсуляції тканин або клітин / І. П. Пастер, М. Д. Тронько. – Опубл. 17.07.2006, Бюл. № 7.
12. *Тронько М. Д., Пастер І. П.* Залежність механічної та осмотичної стабільності альгінатних капсул від концентрації полімеру // Доп. НАН України. – 2006. – № 11. – С. 167–171.
13. *Martinsen A., Skjåk-Bræk G., Smidsrød O.* Alginate as immobilization material: I. Correlation between chemical and physical properties of alginate gel beads // Biotechnol. and Bioeng. – 1989. – **33**, No 1. – P. 79–89.
14. *Orive G., Hernández R. M., Gascón A. R. et al.* Survival of different cell lines in alginate-agarose microcapsules // Eur. J. Pharmaceutical Sci. – 2003. – **18**, No 1. – P. 23–30.
15. *Van Raamsdonk J. M., Chang P. L.* Osmotic pressure test: a simple, quantitative method to assess the mechanical stability of alginate microcapsules // J. Biomed. Mater. Res. – 2001. – **54**, No 2. – P. 264–271.

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

Надійшло до редакції 23.12.2008

Corresponding Member of the NAS of Ukraine **M. D. Tronko, I. A. Balla, I. P. Pasteur**

### **Morphological characteristic of microencapsulated human adenoma parathyroid tissue *in vitro***

*A high viability and a morphofunctional activity of microencapsulated human adenoma parathyroid tissue are shown under *in vitro* conditions, which suggests its possible use as a graft in the presence of a compensated hypofunctional state of the parathyroid system experimentally on animals.*