ДОПОВІДІ
НАЦІОНАЛЬНОЇ
АКАДЕМІЇ НАУК
УКРАЇНИ

6 • 2009

МЕДИЦИНА

УДК 577.34:611.018.72:616.447-089.87-092.9

© 2009

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

Морфологічна характеристика мікроінкапсульованої тканини аденоми прищитоподібної залози людини за умови ксенотрансплантації щурам з експериментальним гіпопаратиреозом

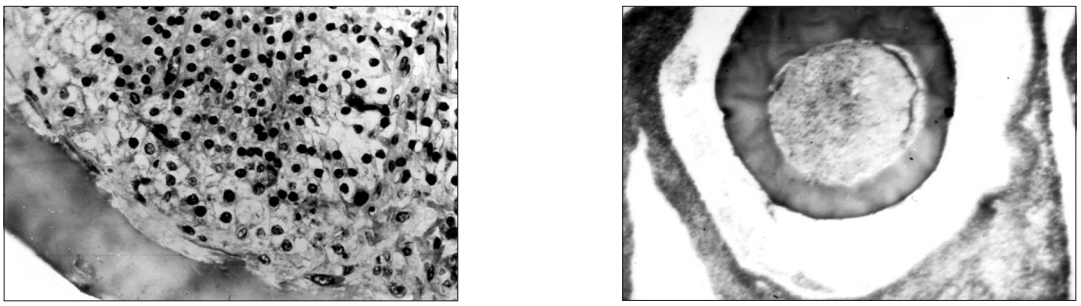
Показана висока життєздатність і морфофункціональна активність мікроінкапсульованої тканини аденоми прищитоподібної залози людини за умов ксенотрансплантації щурам з експериментальним гіпопаратиреозом, що свідчить про перспективність її використання як трансплантата при компенсації гіпофункціонального стану паратиреоїдної системи в клінічній практиці.

Одним з перспективних методів запобігання реакції відторгнення трансплантата організмом реципієнта є попередня мікроінкапсуляція фрагментів тканини або суспензії клітин в альгінатні мікрокапсули, мембрани яких проникні для гормонів, поживних речовин, метаболітів і кисню, але не проникні для основних компонентів імунної системи [1].

У даному повідомленні наведено результати дослідження морфологічної характеристики мікроінкапсульованої тканини аденоми прищитоподібної залози людини за умов ксенотрансплантації щурам з експериментальним гіпопаратиреозом.

Аденома прищитоподібної залози людини була отримана в хірургічному відділенні клініки Державної установи "Інститут ендокринології та обміну речовин ім. В. П. Комісаренка АМН України". Тиреоїдну 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^3 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 [2]. Мікроінкапсуляцію паратиреоїдної тканини в альгінатні мікрокапсули здійснювали за стандартним методом, розробленим для мікроінкапсуляції ендокринних тканин (зокрема, підшлункової та прищи-



а *б*

Рис. 1. Мікроінкапсульована тканина аденоми прищитоподібної залози людини через 3 доби після ксенотрансплантації щурам: *а* — власне тканина; *б* — сполучнотканинна капсула. Забарвлення гематоксиліном-еозином. Об. 20, ок. 10

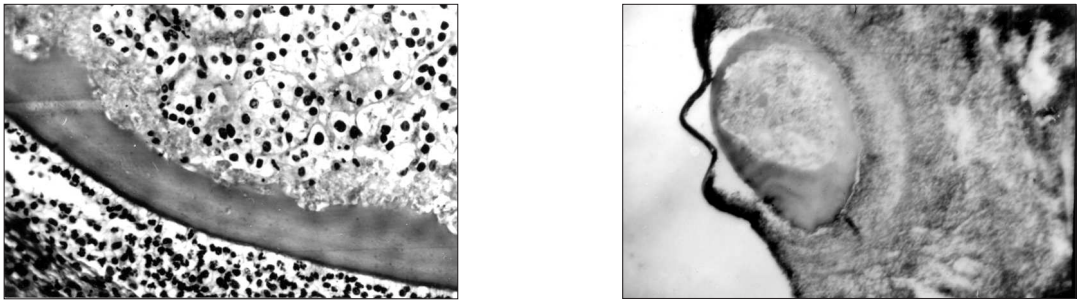
топодібної залоз) [1], у нашій модифікації [3]. Після завершення процедури мікроінкапсуляції альгінатні мікрокапсули з шматочками паратиреоїдної тканини людини повторно промивали кілька разів 0,9%-м розчином хлориду натрію і проводили трансплантацію в 2,0 мл стерильного 0,9%-го розчину хлориду натрію внутрішньочеревно або в підшкірну жирову основу черевної стінки щурів під ефірним наркозом.

Для створення моделі експериментального гіпопаратиреозу у щурів-самців масою тіла 120–150 г, яких утримували в звичайних умовах віварію на стандартному раціоні харчування, в асептичних умовах під ефірним наркозом і під контролем стереомікроскопа МБС-1 при 8-кратному збільшенні видаляли прищитоподібні залози разом з прилеглою частиною щитоподібної залози, що пов'язано з анатомічними особливостями розташування цих залоз і найбільш повно відповідає клінічній практиці розвитку сталого гіпопаратиреозу як одного з можливих ускладнень радикальної операції на щитоподібній залозі.

На 3-тю, 7-му і 14-ту добу після ксенотрансплантації 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 дослідження, а за допомогою гвинтового окуляр-мікрометра і окулярної вставки-сітки вимірювали товщину альгінатних мікрокапсул та оцінювали відносний розмір життєздатної залозистої паренхіми тканини прищитоподібної залози відповідно.

Результати наших досліджень показали, що макроскопічно трансплантат мікроінкапсульованої тканини аденоми прищитоподібної залози людини визначається у черевній порожнині щурів-реципієнтів у вигляді альгінатних мікрокапсул, які знаходяться у вільному стані або прикріплені до сальника.

За даними гістологічних досліджень, на 3-тю добу після ксенотрансплантації структура мікроінкапсульованої тканини аденоми прищитоподібної залози людини досить однорідна (рис. 1, *а*). Фрагменти представлені життєздатною функціонально активною секреторною паренхімою, яка складається з паратиреоцитів полігональної форми із світлою, іноді дрібнозернистою, цитоплазмою, з чіткими клітинними межами, які тісно прилягають одна до одної. Ядра округлі, дещо гіперхромні або нормохромні, з помірною кількістю гетерохроматинових зерен та нерівними контурами. Деякі ядра містять ядерця.



а *б*

Рис. 2. Мікроінкапсульована тканина аденоми прищитоподібної залози людини через 7 діб після ксенотрансплантації щурам: *а* — власне тканина; *б* — сполучнотканинна капсула. Забарвлення гематоксиліном-еозином. Об. 20, ок. 10

Краї тканинних фрагментів тісно прилягають до біополімерної мікрокапсули, стінки якої утворені щільним однорідним шаром без отворів, і не сполучаються з оточуючим середовищем. Більша частина альгінатних мікрокапсул має чисту поверхню, навколо інших спостерігається відносно тонка сполучнотканинна капсула, яка складається переважно з поліморфноядерних лейкоцитів, молодих фібробластичних елементів та хаотично орієнтованих колагенових волокон (див. рис. 1, *б*).

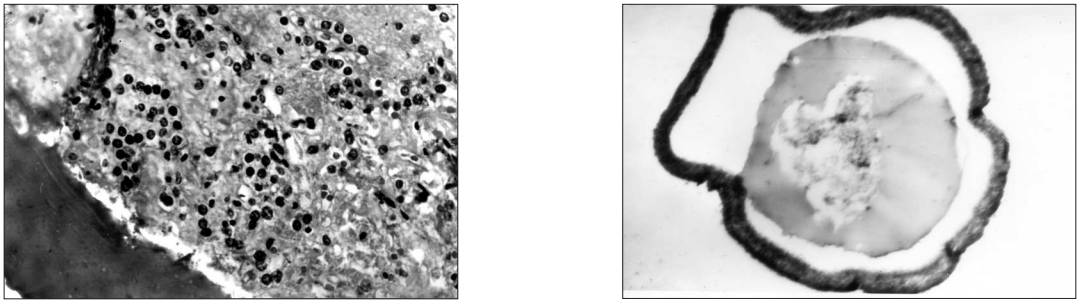
На 7-му добу після ксенотрансплантації мікроінкапсульовані фрагменти аденоми прищитоподібної залози людини складаються з великої кількості життєздатних функціонально активних паратиреоцитів з великою світлою або дрібнозернистою цитоплазмою і округлими нормохромними ядрами (рис. 2, *а*). Однак на відміну від попереднього строку дослідження по периферії та в центрі тканинних фрагментів виявляються еозинофільні безядерні прошарки та острівці клітинного детриту, поряд з якими паратиреоцити мають дещо більші розміри, ніж у центрі.

Усі альгінатні мікрокапсули цілі, однак зовсім незначна їх частина має чисту поверхню. Більшість мікрокапсул вкрита сполучнотканинною капсулою, внутрішня поверхня якої складається з поліморфноядерних лейкоцитів (див. рис. 2, *б*). Основу сполучнотканинної капсули складають різнонаправлені незрілі колагенові волокна, серед яких виявляється велика кількість лімфоїдних елементів, плазматичних клітин, макрофагальних елементів та активних фібробластів.

На 14-ту добу після ксенотрансплантації в мікроінкапсульованих фрагментах аденоми прищитоподібної залози людини стають більш помітними деструкція частини епітелію, зменшення кількості секреторних клітин і збільшення площі клітинного детриту (рис. 3, *а*). Крім цього, деяка частина життєздатних паратиреоцитів людини спостерігається в біополімерній мікрокапсулі.

Поверхня всіх альгінатних мікрокапсул вкрита досить щільним шаром сполучної тканини, який складається переважно з фібробластичних елементів та орієнтованих вздовж поверхні мікрокапсул колагенових волокон (див. рис. 3, *б*). Порівняно з попереднім строком сполучна тканина стає більш зрілою, а кількість лімфоїдних елементів зменшується. У товщі сполучнотканинної капсули спостерігається значна кількість кровоносних судин.

Результати наших попередніх досліджень показали високу функціональну активність мікроінкапсульованої тканини аденоми прищитоподібної залози людини за умови ксенотрансплантації щурам з експериментальним гіпопаратиреозом (зокрема, здатність інтен-



а *б*

Рис. 3. Мікроінкапсульована тканина аденоми прищитоподібної залози людини через 14 діб після ксенотрансплантації щурам: *а* — власне тканина; *б* — сполучнотканинна капсула. Забарвлення гематоксилін-еозином. Об. 20, ок. 10

сивно продукувати паратгормон та виразно позитивно впливати на рівень загального та вільного кальцію в сироватці крові тварин-реципієнтів) [4], що робить її придатною для використання як трансплантата при компенсації гіпофункціонального стану паратиреоїдної системи.

Відомо, що мікроінкапсульована тканина прищитоподібної залози людини успішно демонструвала життєздатність після ксенотрансплантації тваринам з експериментальним гіпопаратиреозом [5]. Так, електронномікроскопічне дослідження 40-тижневого ксенотрансплантата клітин прищитоподібної залози новонароджених поросят у черевній порожнині щурів з тотальною паратиреоїдектомією показало, що на відміну від контрольної групи, в якій відбувається відторгнення трансплантата, у групі з мікроінкапсульованими клітинами майже всі трансплантовані альгінат-полілізин-альгінатні мікрокапсули інтактні [6]. Мікроінкапсульовані паратиреоцити та їх ядра мають неправильну форму, однак мембрани клітини та ядер без видимих змін. Життєздатність паратиреоцитів становить близько 65%, що забезпечує нормальний рівень паратгормону і загального кальцію в крові щурів-реципієнтів протягом усього експерименту.

Деформація альгінатних мікрокапсул, яка виявляється в різні строки після ксенотрансплантації (див. рис. 1–3), є наслідком нерівномірного видалення води в процесі гістологічної обробки препаратів [7]. Раніше було показано, що поверхня тришарових альгінат-полілізин-альгінатних мікрокапсул з тканиною прищитоподібної залози залишається інтактною та вільною від фіброзного обростання протягом трьох місяців після імплантації в перитонеальну порожнину паратиреоїдектомованим щурам [6, 8].

Таким чином, показана висока життєздатність і морфофункціональна активність мікроінкапсульованої тканини аденоми прищитоподібної залози людини за умови ксенотрансплантації щурам з експериментальним гіпопаратиреозом, що свідчить про перспективність її використання як трансплантата при компенсації гіпофункціонального стану паратиреоїдної системи в клінічній практиці.

1. *Zimmermann U., Hasse C., Rothmund M., Kühtreiber W.* Biocompatible encapsulation materials: fundamentals and application / Cell encapsulation technology and therapeutics / Eds. W. M. Kühtreiber, R. P. Lanza, W. L. Chick. – Boston: Birkhäuser, 1999. – P. 40–52.
2. *Пат. 20265 Україна, МПК7 C12 N11/10.* Процес приготування водного розчину альгінату, призначеного для виготовлення мікрокапсул / І. П. Пастер, М. Д. Тронько. – Опубл. 15.01.2007, Бюл. № 1.

3. *Пат. 27283 Україна, МПК7 C12 N1/00, C12 N5/00.* Процес мікроінкапсуляції клітин і тканини прищитоподібної залози в альгінатні мікрокапсули / І. П. Пастер, М. Д. Тронько. – Опубл. 25.10.2007, Бюл. № 17.
4. *Пастер І. П., Балла І. А., Коваленко А. Є.* Функціональна характеристика мікроінкапсульованої тканини аденоми прищитоподібної залози людини за умови ксенотрансплантації щурам з експериментальним гіпопаратиреозом // Журн. АМН України. – 2007. – **13**, № 3. – С. 579–587.
5. *Hasse C., Schrezenmeir J., Stinner B. et al.* Successful allotransplantation of microencapsulated parathyroids in rats // World J. Surg. – 1994. – **18**, No 4. – P. 630–634.
6. *Lemin L., Song Y., Song C. et al.* Successful xenotransplantation of microincapsullated newborn pig parathyroid cells in the treatment of hypoparathyroidism in rats // Chin. Med. J. – 2003. – **16**, No 8. – P. 1161–1165.
7. *de Vos P., Hamel A. F., Tatarkiewicz K.* Considerations for successful transplantation of encapsulated pancreatic islets // Diabetologia. – 2002. – **45**, No 2. – P. 159–173.
8. *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.

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 after xenotransplantation to rats with experimental hypoparathyroidism

The authors have shown a high viability and a morphofunctional activity of microencapsulated human adenoma parathyroid tissue under conditions of xenotransplantation to rats with experimental hypoparathyroidism, which suggests good prospects of using this tissue as a graft in the presence of a compensated hypofunctional state of the parathyroid system in clinical practice.