

**І. П. Пастер**

## **Експериментальне обґрунтування перспективності застосування мікроінкапсульованої тканини прищитоподібної залози людини для терапії сталого післяопераційного гіпаратиреозу**

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

*Показано, що мікроінкапсульована тканина прищитоподібної залози людини зберігає високу гормональну активність при тривалому культивуванні та після ксенотрансплантації щурам з експериментальним гіпаратиреозом, що свідчить про перспективність її застосування для компенсації гіпофункціонального стану паратиреоїдної системи в клінічній практиці.*

Однією з найбільш актуальних проблем трансплантації ендокринних тканин залишається пошук способів запобігання реакції відторгнення трансплантата без необхідності призначення імуносупресивної терапії, застосування якої протягом тривалого часу може призводити до зростання частоти випадків інфекційних захворювань та злоякісних новоутворень. Запобігти можливим негативним наслідкам пересадки донорського матеріалу можна за допомогою методу мікроінкапсуляції тканини або клітин у капсули з біосумісними напівпроникними мембранами, які при збереженні можливості вільної дифузії малих поживних речовин, гормонів, месенджерів і метаболітів створюють фізичний бар'єр для імунної системи реципієнта та виключають можливість проникнення лімфоцитів, лейкоцитів, імуноглобуліну та комплементу [1]. Для виготовлення мікрокапсул найчастіше застосовують біополімер альгінат, який отримують з морських водоростей або вирощують у біореакторі з використанням бактерій [2].

Уперше нова технологія була застосована для трансплантації імуноізолюваних острівців Лангерганса підшлункової залози щурам зі стрептозотоциніндукованим цукровим діабетом, що забезпечувало життєздатність і функціонування ендокринної тканини, а також дозволяло досягти зворотного розвитку діабетичного стану у тварин протягом 2–3 тижнів [3].

Позитивні результати експериментальних досліджень знайшли підтвердження в клінічній практиці. Так, внутрішньочеревні ксенотранспланти мікроінкапсульованих неонатальних острівців підшлункової залози поросят показали високу функціональну активність (зменшення дози інсуліну для ін'єкцій на 34%, яке супроводжувалося зростанням рівня свинячого сироваткового С-пептиду) до двох років спостереження у двох дорослих пацієнтів із цукровим діабетом першого типу, один з яких додатково отримував імуносупресивну терапію [4].

Через 9,5 років після ксенотрансплантації проведення перорального тесту толерантності до глюкози у пацієнта призводило до невеликого збільшення в сироватці крові рівня свинячого імунореактивного інсуліну (за даними вискоефективної рідинної хроматографії) [5]. При лапароскопії були виявлені численні мікрокапсули, які містили групи живих клітин (за даними флюоресцентної мікроскопії) з дифузною розсіяним інсуліном і помірною кількістю

глюкогону (за даними імуногістологічного дослідження), а при інкубації видалених мікрокапсул з живими клітинами в середовищі з високою концентрацією глюкози зафіксована продукція невеликої кількості інсуліну.

У 1997 р. були опубліковані результати першого клінічного застосування методу ало-трансплантації мікроінкапсульованої тканини прищитоподібної залози людини у пацієнтів з післяопераційним гіпаратиреозом [6]. Для компенсації симптомів гіпокальціємії пацієнтам внутрішньовенно вводили кальцій у дозах 4–8 г щодобово, а також давали високі дози вітаміну D. Починаючи з першої доби після імплантації паратиреоїдної тканини без призначення імуносупресивної терапії щодобові дози кальцію та вітаміну D були зменшені наполовину, а в момент виписування зі стаціонару вони становили 0,6 г і 0,25 мкг відповідно. При цьому рівень паратгормону людини, який до імплантації не визначався в сироватці крові жодного пацієнта, зріс до величини понад 20 пг/мл, а рівень загального кальцію перевищував значення в 2,0 ммоль/л, що супроводжувалося відсутністю будь-яких симптомів гіпокальціємії.

Незважаючи на позитивні результати компенсації гіпофункціонального стану паратиреоїдної системи за допомогою трансплантації мікроінкапсульованої тканини прищитоподібної залози, ці дослідження не мали подальшого продовження. Причинами цього могли бути багатоступінчата процедура мікроінкапсуляції, яка підвищувала ризик мікробної контамінації, а також використання як гелеутворюючого катіона вільних іонів барію, які здатні пригнічувати калієві канали в інкапсульованих клітинах і, як наслідок, приводити до загибелі останніх [2].

Мета проведеного дослідження полягала у вивченні гормональної активності мікроінкапсульованої (з використанням як гелеутворюючого катіона вільних іонів кальцію) тканини прищитоподібної залози людини за умови тривалого культивування і ксенотрансплантації щурам з експериментальним гіпаратиреозом.

Отриману в хірургічному відділі клініки ДУ “Інститут ендокринології та обміну речовин ім. В. П. Комісаренка АМН України” тканину прищитоподібної залози людини 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.

Мікроінкапсуляцію паратиреоїдної тканини проводили за стандартним методом [7], для чого через перший канал генератора мікрокапсул пропускали стерильний 1%-й розчин альгінату (“Fluka”, Норвегія) з рівномірно розподіленими шматочками тканини, через другий канал — повітря зі швидкістю 8–10 л/хв. З вихідного отвору генератора мікрокапсули з тканиною потрапляли в гелеутворюючий розчин хлориду кальцію (100 ммоль/л, “Sigma”, США), в якому їх інкубували протягом 30 хв і промивали кілька разів 0,9%-м розчином хлориду натрію.

Мікроінкапсульовану паратиреоїдну тканину культивували по 5 мікрокапсул у флакончиках з 2 мл середовища RPMI-1640 (“Sigma”, США), яке містило 10% сироватки новонародженого теляти (“INC Biomedicals GmbH”, Німеччина) і антибіотики, при постійному обертанні з частотою 10–12 об/год та температурі 37 °С. Зміну середовища культивування проводили через день. На 4-ту, 7-му, 11-ту, 13-ту, 15-ту і 18-ту добу культивування відбирали аліквоти середовища та заморожували при –20 °С для наступного визначення рівня паратгормону людини.

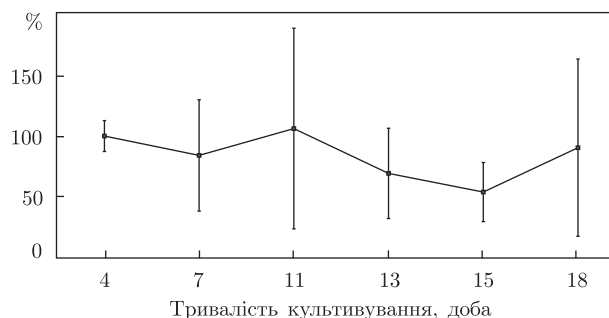


Рис. 1. Рівень паратиреоїдного гормону в середовищі культивування мікроінкапсульованої тканини прищитоподібної залози людини

Для створення моделі експериментального гіпаратиреозу у щурів-самців масою тіла 100–150 г, які утримувалися на стандартному раціоні харчування, в асептичних умовах під ефірним наркозом видаляли прищитоподібні залози разом з прилеглою частиною щитоподібної залози.

Ксенотрансплантацію мікроінкапсульованої паратиреоїдної тканини людини в 2,0 мл стерильного 0,9%-го розчину хлориду натрію проводили тваринам у підшкірну жирову основу черевної стінки або внутрішньочеревно під ефірним наркозом. На 7-му, 14-ту, 26-ту, 36-ту, 43-тю і 69-ту добу після імплантації у щурів відбирали аліквоти сироватки крові та заморожували при  $-20^{\circ}\text{C}$  для наступного визначення рівня паратгормону людини.

Кількісне визначення рівня паратгормону людини в аліквотах середовища культивування та сироватки крові тварин проводили імунорадіометричним методом з використанням набору реактивів “hPTH-120 min IRMA” (“BioSource Europe S. A.”, Бельгія).

До початку дослідження було отримано позитивне рішення Комісії з етики Інституту, а також інформована згода від кожного пацієнта. Усі маніпуляції з тваринами проводилися відповідно до положень “Європейської конвенції про захист хребетних тварин, які використовуються для експериментальних та інших наукових цілей” (Страсбург, 1985 р.) і національних норм з біоетики (I Національний конгрес з біоетики, Київ, 2001 р.).

Обробку даних здійснювали стандартними методами варіаційної статистики із застосуванням критерію  $t$  Стьюдента.

За результатами проведених досліджень встановлено наявність високої гормональної активності мікроінкапсульованої тканини прищитоподібної залози людини в динаміці тривалого культивування (рис. 1). Так, базальний рівень паратгормону в культуральному середовищі зазнавав певних коливань і становив на 4-ту, 7-му, 11-ту, 13-ту, 15-ту і 18-ту добу культивування відповідно  $(30,11 \pm 3,81)$  пг/мл ( $n = 3$ ),  $(25,34 \pm 13,66)$  пг/мл ( $n = 3$ ),  $(31,94 \pm 24,65)$  пг/мл ( $n = 3$ ),  $(20,93 \pm 11,09)$  пг/мл ( $n = 3$ ),  $(16,34 \pm 7,25)$  пг/мл ( $n = 3$ ) і  $(27,25 \pm 21,76)$  пг/мл ( $n = 2$ ).

Ксенотрансплантація мікроінкапсульованої паратиреоїдної тканини людини супроводжувалася появою паратгормону людини в крові щурів, рівень якого на 7-му добу становив  $(49,08 \pm 8,38)$  пг/мл ( $n = 3$ ), на 14-ту —  $(29,40 \pm 8,08)$  пг/мл ( $n = 2$ ), на 26-ту —  $(20,49 \pm 3,61)$  пг/мл ( $n = 3$ ), на 36-ту —  $(24,23 \pm 8,68)$  пг/мл ( $n = 3$ ), на 43-тю —  $(32,93 \pm 10,15)$  пг/мл ( $n = 3$ ) і на 69-ту —  $(32,01 \pm 4,98)$  пг/мл ( $n = 5$ ) (рис. 2).

В останні роки експериментальні та клінічні дослідження з використанням мікроінкапсульованих ендокринних тканин значно активізувалися. Так, Міністерство охорони здоров'я Італії офіційно схвалило технічні протоколи на процедуру очищення альгінату для

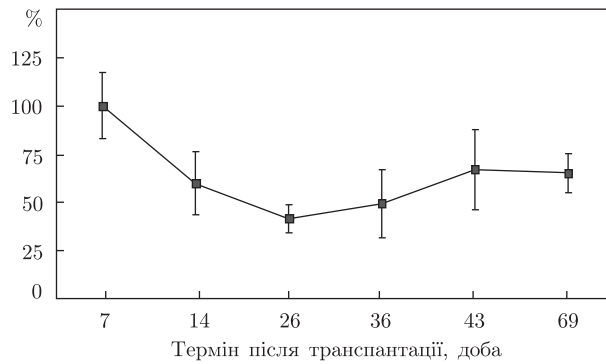


Рис. 2. Рівень паратиреоїдного гормону в сироватці крові щурів після ксенотрансплантації мікроінкапсульованої тканини прищитоподібної залози людини

клінічного застосування, спосіб іммобілізації острівців підшлункової залози людини в альгінатних мікрокапсулах та мінімально інвазивну техніку імплантації мікроінкапсульованих острівців Лангерганса людини в черевну порожнину реципієнта, а також дало дозвіл на проведення першої фази клінічного дослідження ефективності трансплантації мікроінкапсульованих острівців підшлункової залози людини 10 пацієнтам з цукровим діабетом першого типу без застосування імуносупресії [8].

Попередні результати першої фази пілотного клінічного дослідження алотрансплантації мікроінкапсульованих острівців підшлункової залози людини пацієнтам з довготривалим (20–25 років) цукровим діабетом першого типу, які отримували інтенсивну інсулінотерапію і у яких не визначався сироватковий С-пептид, без застосування імуносупресивних препаратів показали, що через декілька тижнів після імплантації у всіх реципієнтів відбувається поступове зниження споживання екзогенного інсуліну, покращення показників середнього щоденного рівня глюкози крові, поява та підвищення рівня сироваткового С-пептиду, зниження рівня глікованого гемоглобіну, що супроводжується зникненням випадків тяжких гіпоглікемій [9]. Саму процедуру трансплантації проводили внутрішньочеревно пункцією під місцевою анестезією та ехографічним контролем, що робить її простою, неінвазивною, безболісною та виключає побічні місцеві ефекти.

Таким чином, використання як гелеутворюючого катіона іонів кальцію при проведенні процедури мікроінкапсуляції дозволяє імуноізолюваній тканині прищитоподібної залози людини зберігати високу гормональну активність при тривалому культивуванні та після ксенотрансплантації щурам з експериментальним гіпопаратиреозом, що свідчить про перспективність її застосування для компенсації гіпофункціонального стану паратиреоїдної системи в клінічній практиці.

*Автор висловлює щире подяку дослідникам М. Rothmund, С. Hasse, Т. Bohrer з Philipps-University (м. Марбург, Німеччина) за матеріально-технічне та науково-методичне забезпечення впровадження оригінальної методики в ДУ "Інститут ендокринології та обміну речовин ім. В. П. Комисаренка АМН України".*

1. Uludag H., De Vos P., Tresco P. A. Technology of mammalian cell encapsulation // *Adv. Drug. Deliv. Rev.* – 2000. – **42**, No 1–2. – P. 29–64.
2. 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. 547–571.
3. Lim F., Sun A. M. Microencapsulated islets as bioartificial endocrine pancreas // *Science.* – 1980. – **210**, No 4472. – P. 908–910.

4. Elliott R. B., Escobar L., Garkavenko O. et al. No evidence of infection with porcine endogenous retrovirus in recipients of encapsulated porcine islet xenografts // Cell Transplant. – 2000. – **9**, No 6. – P. 895–901.
5. 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.
6. Hasse C., Klöck G., Schlosser A. et al. Parathyroid allotransplantation without immunosuppression // Lancet. – 1997. – **350**, No 9087. – P. 1296–1297.
7. Figliuzzi M., Plati T., Cornolti R. et al. Biocompatibility and function of microencapsulated pancreatic islets // Acta Biomater. – 2006. – **2**, No 2. – P. 221–227.
8. Calafiore R., Basta G., Luca G. et al. Standard technical procedures for microencapsulation of human islets for graft into nonimmunosuppressed patients with type I diabetes mellitus // Transplant. Proc. – 2006. – **38**, No 4. – P. 1156–1157.
9. Calafiore R., Basta G., Luca G. et al. Microencapsulated pancreatic islet allografts into nonimmunosuppressed patients with type I diabetes // Diabetes Care. – 2006. – **29**, No 1. – P. 137–138.

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

*Надійшло до редакції 12.02.2009*

**I. P. Pasteur**

### **Experimental justification of the prospects of using a microencapsulated human parathyroid tissue for treatment of persistent postoperative hypoparathyroidism**

*Microencapsulated human parathyroid tissue preserves the high ability to secrete parathormone in long-term culture and after transplantation to rats with experimental hypoparathyroidism, which suggests good prospects of using this tissue in the presence of the compensated hypofunctional state of the parathyroid system in clinical practice.*