

І.П.Пастер, І.А.Балла, А.Є. Коваленко, М.Д.Тронько

Гістологічна і гормональна характеристика мікроінкапсульованої тканини паращитоподібної залози людини при тривалому культивуванні

Мікроінкапсульована тканина паращитоподібної залози людини зберігає життєздатність і високу гормональну активність при тривалому культивуванні, що свідчить про перспективність подальшого дослідження ефективності її застосування для компенсації гіпофункціонального стану паратиреоїдної системи в експерименті на тваринах.

Ключові слова: паращитоподібна залоза, мікроінкапсуляція, культивування, гістологія, паратгормон.

ВСТУП

Найбільш серйозним ускладненням радикального хірургічного втручання на щитоподібній або паращитоподібних залозах (ПЩЗ) є сталий післяопераційний гіпопаратиреоз [15], який супроводжується суттєвим погіршенням якості життя пацієнтів [3]. Замісна терапія з використанням паратгормону людини або його синтетичних аналогів знаходиться на стадії клінічного випробування [19], а стандартне призначення препаратів кальцію і вітаміну D не завжди здатне достатньо компенсувати захворювання та ускладнення, що пов'язані з гіпопаратиреозом [2]. Одним з альтернативних методів терапії сталого гіпопаратиреозу, що дає змогу адекватно реагувати на гормональні зміни в організмі, є трансплантація паратиреоїдної тканини або клітин [14]. Хоча ефективність цього методу доведена в експериментальних дослідженнях і в клінічній практиці, однак актуальною залишається проблема запобігання реакції відторгнення трансплантату без необхідності призначення імуносупресивної терапії, застосування якої протягом тривалого часу може призводити до зростання частоти

випадків інфекційних захворювань та злоякісних новоутворень.

Попередити можливі негативні наслідки пересадки донорського матеріалу можна за допомогою методу мікроінкапсуляції тканини або клітин в біополімерні мікрокапсули з напівпроникними мембранами, які при збереженні вільної дифузії малих поживних речовин, гормонів, месенджерів і метаболітів створюють фізичний бар'єр для імунної системи реципієнта та виключають можливість проникнення у мікрокапсули лімфоцитів, лейкоцитів, макромолекул імуноглобуліну та комплекменту [16].

У 1980 р. Lim і Sun [10] першими впровадили нову технологію трансплантації імуноізованих у мікрокапсулах острівців Лангерганса підшлункової залози щурам із стрептозотоциніндукованим цукровим діабетом, що забезпечувало життєздатність і функціонування ендокринної тканини, а також дало змогу досягти зворотного розвитку діабетичного стану у тварин протягом 2–3 тиж.

Для виготовлення мікрокапсул використовують різні групи біополімерів, основними представниками яких є альгінат, агароза та желатин. Найбільш перспективним є засто-

сування альгінату, який отримують з морських водоростей або вирощують у біореакторі з використанням спеціальних бактерій [21]. Альгінат складається з нерозгалужених подвійних гомо- і гетерополімерних 1-4-зв'язаних β -D-мануранової та α -L-гулуранової кислот – різноманітних за складом і послідовністю залежно від джерела походження [13, 20]. Функціональні властивості альгінату як матрикса для іммобілізації фрагментів тканин і клітин жорстко корелюють з його складом і структурою [13]. Вивчення властивостей альгінатних мікрокапсул, а також мікроінкапсульованих біологічних об'єктів із застосуванням сучасних методів дослідження активно продовжується.

Метою нашої роботи було дослідити гістологічну і гормональну характеристику мікроінкапсульованої тканини ПЩЗ людини при тривалому культивуванні.

МЕТОДИКА

Для проведення експериментальних досліджень тканину ПЩЗ людини отримували в хірургічному відділі 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 мм³ і знову промивали декілька разів стерильним 0,9%-м розчином хлориду натрію з антибіотиками.

Шматочки тканини ПЩЗ людини переносили в 1%-й розчин альгінату (“Fluka”, Норвегія), який готували за розробленим нами методом. Стисло, в 0,9%-й розчин хлориду натрію при перемішуванні на магнітній мішалці з частотою 180–240 об/хв і температурою 35–40 °С поступово вносили альгінат до отримання однорідного

розчину необхідної концентрації. Після оцінки однорідності кінцевого розчину в цілому візуально та окремих його крапель за допомогою світлового мікроскопа розчин альгінату зберігали для подальшого використання при 4 °С не більше ніж 15–20 діб.

Безпосередньо перед застосуванням розчин альгінату стерилізували, пропускаючи через фільтр з порами 0,45 мкм (“Filtrop”, Німеччина), що дало змогу також видалити з розчину біополімеру деякі забруднюючі речовини, такі, як білки і поліфеноли, та досягти високої прозорості кінцевого розчину [13]. При необхідності з розчину альгінату видаляли бульки повітря центрифугуванням при 2000 об/хв протягом 5 хв або відстоюванням розчину при кімнатній температурі протягом декількох годин.

Мікроінкапсуляцію тканини ПЩЗ людини здійснювали за стандартним методом [8], для чого через перший канал генератора мікрокапсул пропускали 1,0%-й розчин альгінату з рівномірно розподіленими шматочками паратиреоїдної тканини; через другий канал – повітря зі швидкістю 8–10 л/хв. З вихідного отвору генератора мікрокапсули з тканиною ПЩЗ потрапляли в гелеутворювальний розчин хлориду кальцію (“Sigma”, США) з концентрацією 100 ммоль/л для перехресного зв'язування карбоксильних груп мануранової та гулуранової кислот альгінату, в якому їх інкубували протягом 15–30 хв і промивали кілька разів 0,9%-м розчином хлориду натрію.

Час інкубації в гелеутворювальному розчині залежав від діаметра альгінатних мікрокапсул і концентрації біополімера та підбирався експериментально [13]. Всі сольові розчини, які використовувалися в процесі мікроінкапсуляції, готували з рН 7,2 і осмоляльністю 290 мосмоль/л додаванням хлориду натрію до необхідної величини та контролем за допомогою автоматичного осмомата (“Dig. L Knauer”, Німеччина), після чого їх стерилізували, пропускаючи через фільтри з порами 0,45 мкм (“Filtrop”, Німеччина).

Мікроінкапсульовану паратиреоїдну тканину людини 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 37 °С. Середовище культивування змінювали через добу.

На 3, 7, 11, 15, 18-ту добу культивування для гістологічного дослідження відбирали альгінатні мікрокапсули з паратиреоїдною тканиною людини, які фіксували в рідині Буена протягом 18 год, двічі відмивали у 40°-му етиловому спирті, зневоднювали у спиртах зростаючої концентрації, двічі просвітлювали у ксилолі по 5 хв і заливали у 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-мікромметра і окулярної вставки сітки вимірювали товщину альгінатних мікрокапсул та оцінювали відносний розмір життєздатної залозистої паренхіми паратиреоїдної тканини відповідно.

На 4, 7, 11, 13, 15 і 18-ту добу культивування мікроінкапсульованої тканини ПЩЗ людини відбирали аліквоти середовища та заморожували при -20°C для наступного визначення вмісту паратгормону людини імунорадіометричним методом з використанням набору реактивів “hPTH-120 min IRMA” (“BioSource Europe S.A.”, Бельгія) та вимірюванням поглинання на лічильнику “Beckmann 5500B” (“Beckmann”, США).

Одразу після використання генератор мікрокапсул ретельно промивали 0,9%-м розчином хлориду натрію до повного видалення залишків розчину альгінату і стерилізували автоклавуванням. Безпосередньо перед наступним використанням усі поверхні генератора, які стикалися з розчином альгінату, послідовно промивали 96%-м розчином етанолу і стерильним 0,9%-м розчином хлориду натрію до повного видалення слідів етанолу.

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 інформована згода від кожного пацієнта.

Обробка результатів здійснена стандартними методами варіаційної статистики.

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Результати макроскопічного дослідження показали, що альгінатні мікрокапсули, які виготовлені за стандартним методом [8], мали розміри 1–2 мм у діаметрі, однорідну структуру переважно правильної округлої форми, однак іноді утворювали мікрокапсули дещо продовгуватої форми (рис. 1). Товщина стінки мікрокапсул зазвичай була рівномірною і становила 0,1–0,2 мм з усіх боків від паратиреоїдної тканини. Альгінатні мікрокапсули щільно прилягали до тканини ПЩЗ і заповнювали заглибини, утворені за рахунок нерівностей її країв. Шматочки паратиреоїдної тканини розміщувалися в мікрокапсулах як по центру, так і дещо ексцентрично, що не впливає на морфофункціональні властивості ендокринної тканини [22].

Гістологічні дослідження показали, що більшість фрагментів паратиреоїдної тканини людини мали у своєму складі залозисті клітини ПЩЗ, 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 ПЩЗ людини була цілком життєздатною, проте в деяких секреторних клітинах цитоплазма ставала вакуолізованою і з’являлися поодинокі клітини

ни з пікнотичними ядрами (рис. 2,а). На 15-ту добу культивування спостерігалось збільшення кількості паратиреоцитів з вакуолізованою цитоплазмою, гіперхромними та ексцентрично розташованими ядрами, а також почали зустрічатися безядерні клітини (див. рис. 2,б). На 18-ту добу культивування дещо зменшувалася кількість секреторних клітин внаслідок пікнотизації ядер паратиреоцитів та їх десквамації (див. рис. 2,в).

На 3-тю добу культивування альгінатні мікрокапсули щільно прилягали до паратиреоїдної тканини, мали дещо неоднорідну пористу будову та утворювали хвилясту зовнішню поверхню з чіткими контурами (рис. 3,а). На 7-му добу культивування в частині мікрокапсул з'являлися невеликі за розміром щілини між біогелем та фрагментами тканини (див. рис. 3,б). На 11-ту добу культивування мікрокапсули ставали більш "пухкими" порівняно з попередніми строками спостереження (див. рис. 3,в).

Раніше було показано, що інтактна та мікроінкапсульована тканина ПЩЗ людини зберігали близький рівень життєздатності (так, життєздатність мікроінкапсульованих в тришарові альгінат-полілізин-альгінатні мікрокапсули клітин ПЩЗ людини через 48 год, 15 діб і 3 міс культивування становила 90, 70 і 60 % відповідно) [9, 11].

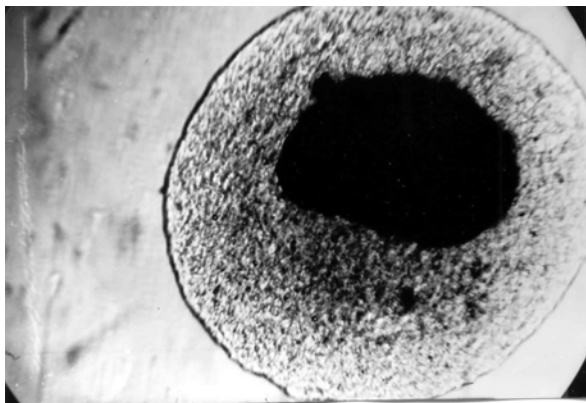
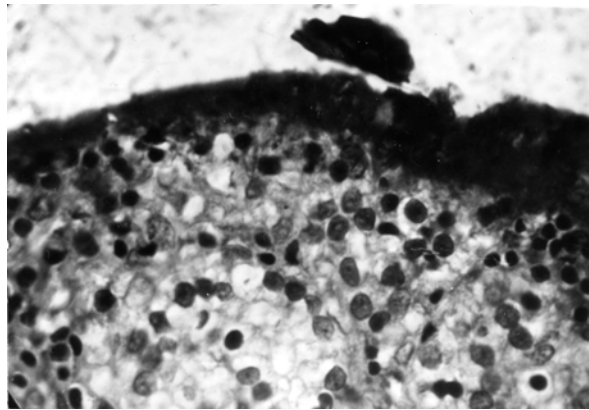
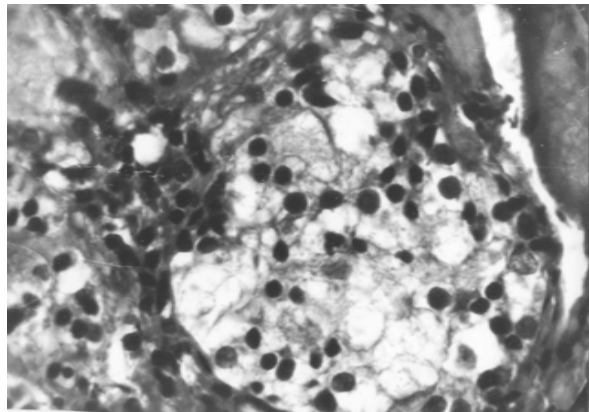


Рис. 1. Альгінатна мікрокапсула з тканиною парашитоподібної залози людини

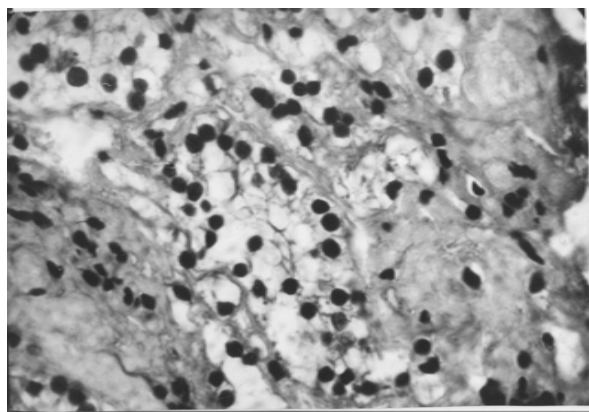
Деформація альгінатних мікрокапсул, яка спостерігається на рисунках у різні строки культивування, є наслідком нерівно-



а



б

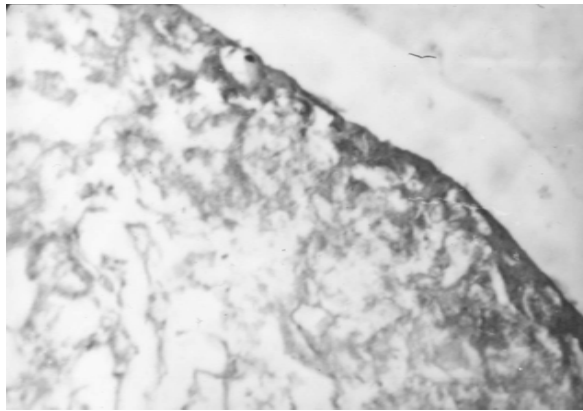


в

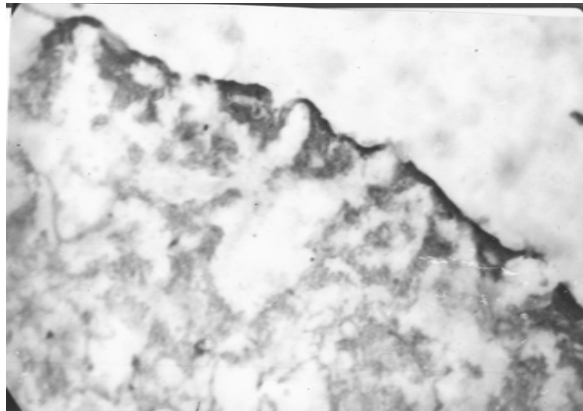
Рис. 2. Мікроінкапсульована тканина парашитоподібної залози людини на 7-му (а), 15-ту (б) і 18-ту (в) добу культивування. Забарвлення гематоксиліном-еозинном. х 600

мірного видалення води в процесі гістологічної обробки препаратів [6].

Функціональні дослідження встановили достатню гормональну активність мікроін-



а



б



в

Рис. 3. Будова альгінатної мікрокапсули навколо тканини парашитоподібної залози людини на 3-тю (а), 7-му (б) та 11-ту (в) добу культивування. Забарвлення гематоксиліном-еозином. х 600

капсульованої тканини ПЩЗ людини в динаміці тривалого культивування (рис. 4). Так, кількісне визначення вмісту паратгормону у культуральному середовищі показало, що його базальний рівень на 4-ту добу культивування становив $30,11 \text{ пг/мл} \pm 3,81 \text{ пг/мл}$ ($n=3$), на 7-му добу – $25,34 \text{ пг/мл} \pm 13,66 \text{ пг/мл}$ ($n=3$), на 11-ту добу – $31,94 \text{ пг/мл} \pm 24,65 \text{ пг/мл}$ ($n=3$), на 13-ту добу – $20,93 \text{ пг/мл} \pm 11,09 \text{ пг/мл}$ ($n=3$), на 15-ту добу – $16,34 \text{ пг/мл} \pm 7,25 \text{ пг/мл}$ ($n=3$) і на 18-ту добу – $27,25 \text{ пг/мл} \pm 21,76 \text{ пг/мл}$ ($n=2$).

Дані наших попередніх досліджень показали високу функціональну активність (зокрема, здатність інтенсивно продукувати паратгормон та адекватно реагувати на вплив позаклітинного кальцію) мікроінкапсульованої тканини аденоми ПЩЗ людини в умовах *in vitro* [1].

Відомо, що рівень секреції паратгормону у середовище культивування вірогідно не відрізнявся для нативної та мікроінкапсульованої тканини ПЩЗ людини для широкого діапазону концентрацій кальцію в середовищі ($1,62\text{--}3,20 \text{ ммоль/л}$) [9].

На відміну від тканини щитоподібної залози, де для продукування гормонів потрібен повноцінний тиреоїдний фолікул (як мінімальна одиниця для забезпечення тиреоїдної функції), структуру якого складають фолікулярні клітини, фолікулярний колоїд, базальна мембрана і капілярні

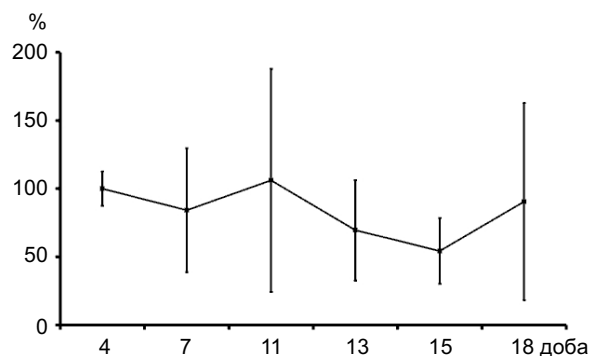


Рис. 4. Вміст паратиреоїдного гормону в середовищі культивування мікроінкапсульованої тканини парашитоподібної залози людини

судини, клітини ПЩЗ забезпечують функціональну здатність продукувати паратгормон в кожному паратиреоциті. Водночас з технічної точки зору, приготування органної культури ПЩЗ замість приготування культури паратиреоцитів є більш зручною процедурою. Тим більше, що первинна культура клітин ПЩЗ швидко втрачає чутливість до позаклітинного кальцію: кальційопосередковане пригнічення секреції паратгормону усе ще спостерігається через 24 год культивування, однак повністю зникає вже через 6 діб [4].

Відомо, що низька концентрація гелю в альгінатних мікрокапсул суттєво впливає на їх здатність набухати та, відповідно, на їх стабільність [12], що призводить до дезінтеграції капсул у сольовому розчині протягом декількох діб [20]. Зв'язування води спричиняє не тільки набухання альгінатних мікрокапсул, але також має вкрай важливе значення для життєздатності, проліферації та секреторних властивостей мікроінкапсульованих клітин і тканин [22].

Для поліпшення стабільності альгінатних мікрокапсул застосовують багато методів, зокрема продукування багатошарових капсул [20–22], додаткове введення в розчин альгінату ембріональної сироватки крові теляти [20–22], альбуміну сироватки людини [12] або фотополімерів [5, 18], підбір мультивалентних катіонів для зв'язування полімеру за ступенем спорідненості [13, 17] тощо.

Однак використання альгінату в фармацевтичній та/або біомедичній галузях вимагає також обов'язкової відповідності всіх компонент мікрокапсул критеріям безпеки, зокрема American Society for Testing and Materials та US Food and Drug Administration [7]. Дослідження в цьому напрямку продовжуються.

Таким чином, мікроінкапсульована тканина ПЩЗ людини зберігає життєздатність і високу гормональну активність при тривалому культивуванні та може бути

рекомендована для подальшого дослідження ефективності компенсації гіпофункціонального стану паратиреоїдної системи в експерименті на тваринах.

Подяка

Автори висловлюють щирі подяку дослідникам Т.Bohrer, С.Hasse і М.Rothmund з Philipps-University (м. Марбург, Німеччина) за матеріально-технічне та науково-методичне забезпечення впровадження оригінальної методики в Державній установі “Інститут ендокринології та обміну речовин ім. В.П.Комісаренка АМН України”.

И.П. Пастер, И.А. Балла, А.Е. Коваленко, Н.Д. Тронько

ГИСТОЛОГИЧЕСКАЯ И ГОРМОНАЛЬНАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА МИКРОИНКАПСУЛИРОВАННОЙ ТКАНИ ПАРАЩИТОВИДНОЙ ЖЕЛЕЗЫ ЧЕЛОВЕКА ПРИ ДЛИТЕЛЬНОМ КУЛЬТИВИРОВАНИИ

Микроинкапсулированная ткань паращитовидной железы человека сохраняет жизнеспособность и высокую гормональную активность при длительном культивировании, что свидетельствует о перспективности дальнейшего изучения эффективности её применения для компенсации гиподисфункционального состояния паратиреоидной системы в эксперименте на животных.

Ключевые слова: паращитовидная железа, микроинкапсуляция, культивирование, гистология, паратгормон.

I.P.Pasteur, I.A.Balla, A.Ye. Kovalenko, M.D.Trunko

HISTOLOGICAL AND HORMONAL CHARACTERISTIC OF MICROENCAPSULATED HUMAN PARATHYROID TISSUE IN LONG-TERM CULTURE

Microencapsulated human parathyroid tissue preserves the viability and high ability to secrete parathormone in long-term culture that indicates on perspective to further study the efficiency of using this tissue in the presence of compensated hypofunctional state of parathyroid system in experimental animals.

Key words: parathyroid, microencapsulation, cultivation, histology, parathormone.

State Institution “V.P. Komisarenko Institute of Endocrinology and Metabolism of the AMS of Ukraine”, Kyiv

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Пастер І.П. Функціональна характеристика мікроінкапсульованої тканини аденоми паращитовидної залози людини в умовах *in vitro* // Доп. НАН України. – 2007. – № 9. – С. 174–179.
2. Arlt W., Fremerey C., Callies F. et al. Well-being, mood and calcium homeostasis in patients with hypoparathyroidism receiving standard treatment with calcium and vitamin D // *Eur. J. Endocrinol.* – 2002. – **146**, № 2. – P. 215–222.
3. Bohrer T., Pasteur I., Lyutkevych O. et al. Permanenter hypoparathyreoidismus infolge von schilddrusenkarzinomoperationen nach Tschernobyl in der Ukraine // *Dtsch. Med. Wochenschr.* – 2005. – **130**, № 44. – P. 2501–2506.
4. Brown A.J., Zhong M., Ritter C. et al. Loss of calcium responsiveness in cultured bovine parathyroid cells is associated with decreased calcium receptor expression // *Biocem. Biophys. Res. Commun.* – 1995. – **212**, № 3. – P. 861–867.
5. Chang S.J., Lee C.H., Hsu C.Y. and Wang Y.J. Biocompatible microcapsules with enhanced mechanical strength // *J. Biomed. Mater. Res.* – 2002. – **59**, № 1. – P. 118–126.
6. De Vos P., Hamel A.F., Tatarkiewicz K. Considerations for successful transplantation of encapsulated pancreatic islets // *Diabetologia.* – 2002. – **45**, №2. – P. 159–173.
7. Dornish M., Kaplan D., Skaugrud Ø. Standards and guidelines for biopolymers in tissue-engineered medical products: ASTM alginate and chitosan standard guides // *Ann. N. Y. Acad. Sci.* – 2001. – **944**. – P. 388–397.
8. Figliuzzi M., Plati T., Cornolti R. et al. Biocompatibility and function of microencapsulated pancreatic islets // *Acta Biomaterialia.* – 2006. – **2**, №2. – P. 221–227.
9. 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**, №6. – P. 537–542.
10. Lim F., Sun A. M. Microencapsulated islets as bioartificial endocrine pancreas // *Science.* – 1980. – **210**, №4472. – P. 908–910.
11. Picariello L., Benvenuti S., Recenti R. et al. Microencapsulation of human parathyroid cells: an “*in vitro*” study // *J. Surg. Res.* – 2001. – **96**, №1. – P. 81–89.
12. Schneider S., Feilen P., Cramer H. et al. Beneficial effects of human serum albumin on stability and functionality of alginate microcapsules fabricated in different ways // *J. Microencapsul.* – 2003. – **20**, №5. – P. 627–636.
13. Smidsrød O., Skjåk-Bræk G. Alginate as immobilization matrix for cells // *Trends Biotechnol.* – 1990. – **8**, №3. – P. 71–78.
14. Testini M., Rosato L., Avenia N. et al. The impact of single parathyroid gland autotransplantation during thyroid surgery on postoperative hypoparathyroidism: a multicenter study // *Transplant. Proc.* – 2007. – **39**, №1. – P. 225–230.
15. Thomusch O., Machens A., Sekulla C. et al. The impact of surgical technique on postoperative hypoparathyroidism in bilateral thyroid surgery: a multivariate analysis of 5846 consecutive patients // *Surgery.* – 2003. – **133**, №2. – P. 180–185.
16. Uludag H., De Vos P., Tresco P. A. Technology of mammalian cell encapsulation // *Adv. Drug. Deliv. Rev.* – 2000. – **42**, №1–2. – P. 29–64.
17. 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**, №2. – P. 264–271.
18. Wang M.S., Childs R.F., Chang P.L. A novel method to enhance the stability of alginate-poly-L-lysine-alginate microcapsules // *J. Biomater. Sci. Polymer Edn.* – 2005. – **16**, №1. – P. 91–113.
19. Winer K. K., Ko C. W., Reynolds J. C. et al. Long-term treatment of hypoparathyroidism: a randomized controlled study comparing parathyroid hormone-(1-34) versus calcitriol and calcium // *J. Clin. Endocrinol. Metab.* – 2003. – **88**, №9. – P. 4214–4220.
20. Zimmermann U., Mimietz S., Zimmermann H. et al. Hydrogel-based non-autologous cell and tissue therapy // *Biotechniques.* – 2000. – **29**, №3. – P. 564–581.
21. Zimmermann U., Cramer H., Jork A. et al. Microencapsulation-based cell therapy // In.: *Biotechnology*. Edited by Rehm H.-J. and Reed G. Weinheim: Wiley-VCH, 2001. – P. 547–571.
22. Zimmermann U., Thürmer F., Jork A. et al. A novel class of amitogenic alginate microcapsules for long-term immunoisolated transplantation // *Ann. N. Y. Acad. Sci.* – 2001. – **944**. – P. 199–215.

ДУ “Ін-т ендокринології та обміну речовин
ім. В.П. Комісаренка АМН України”, Київ
E-mail: pasteur@bigmir.net

Матеріал надійшов до
редакції 30.06.2009