



УДК 616.447-006.55:611.447.018.72:579:233

© 2007

І. П. Пастер

### Функціональна характеристика мікроінкапсульованої тканини аденоми паращитовидної залози людини в умовах *in vitro*

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

*The microencapsulated tissue of human parathyroid adenoma keeps a high functional activity in vitro (in particular, the ability for active parathormone secretion and an adequate reaction to extracellular calcium) that makes it suitable for using it as a transplant in the compensation of the hypofunctional state of the parathyroid system.*

Одним з перспективних методів запобігання реакції відторгнення і продовження терміну функціонування ало- або ксенотрансплантата паращитовидної залози в організмі реципієнта зі сталим гіпопаратиреозом без необхідності призначення імуносупресивної терапії є мікроінкапсуляція ендокринної тканини в біополімерні капсули з напівпроникними мембранами, які проникні для гормонів, поживних речовин і кисню, але не проникні для компонентів імунної системи [1]. Для виготовлення мікрокапсул найчастіше застосовують біополімер альгінат, який отримують з морських водоростей або вирощують у біореакторі з використанням бактерій [1].

У даному повідомленні наведено результати дослідження функціональної характеристики мікроінкапсульованої тканини аденоми паращитовидної залози людини в умовах *in vitro*.

Аденома паращитовидної залози людини отримана в хірургічному відділенні клініки Інституту ендокринології та обміну речовин ім. В. П. Комісаренка АМН України. 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 паратиреоїдної тканини рівномірно розподіляли в робочому розчині альгінату, який готували за розробленим нами методом [2]. Стисло: у стерильний 0,9%-й розчин

хлориду натрію при перемішуванні на магнітній мішалці з частотою 180–240 об./хв та температурі 35–40 °С поступово вносили натрієву сіль альгінової кислоти (“Fluka”, Норвегія) 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 при 4 °С не більше 15–20 діб.

Безпосередньо перед застосуванням розчин альгінату стерилізували, пропускаючи через фільтр з порами 0,45 мкм (“Filtron”, Німеччина) та при необхідності ретельно перемішували з попередньо інактивованою нагріванням стерильною ембріональною сироваткою крові телят (“INC Biomedicals GmbH”, Австралія) у пропорції 9 : 1. Процедура стерильної фільтрації дозволяє також видалити з розчину альгінату деякі контамінуючі речовини, такі як білки та поліфеноли, та досягти високої прозорості кінцевого розчину [3]. При необхідності з розчину альгінату видаляли бульбашки повітря шляхом центрифугування при 2000 об./хв протягом 5 хв або відстоювання розчину при кімнатній температурі протягом 12 год.

Мікроінкапсуляцію паратиреоїдної тканини в двошарові альгінатні мікрокапсули проводили за стандартним методом, розробленим для мікроінкапсуляції ендокринних тканин (зокрема, підшлункової та паразитовидної залози) [1], у нашій модифікації [4]. Стисло: через перший канал триканального генератора мікрокапсул виробництва Університету Філіппса (м. Марбург, Німеччина) пропускали 1,30%-й розчин альгінату зі швидкістю 0,03 мл/хв для формування серцевини капсул; через другий канал — 1,50%-й розчин альгінату, що містив 10% ембріональної сироватки крові, зі швидкістю 0,3 мл/хв для формування зовнішнього шару капсул; через третій канал — повітря зі швидкістю 8 л/хв. Через вихідний отвір генератора мікрокапсули потрапляли в один з двох гелеутворювальних розчинів для перехресного зв’язування карбоксильних груп мануронової та гулууронової кислот: у розчин хлориду кальцію (100 ммоль/л) для інкубації протягом 30 хв (1-й варіант) або в розчин хлориду барію (20 ммоль/л) для інкубації протягом 15 хв, після чого їх промивали кілька разів 0,9%-м розчином хлориду натрію та додатково інкубували в розчині сульфату натрію (6 ммоль/л) протягом 30 хв для преципітації надлишку вільних іонів  $Ba^{2+}$ , які здатні пригнічувати калієві канали в інкапсульованих клітинах і, як наслідок, призводити до загибелі останніх [1] (2-й варіант).

Після завершення процедури мікроінкапсуляції альгінатні мікрокапсули з шматочками паратиреоїдної тканини повторно промивали кілька разів 0,9%-м розчином хлориду натрію і культивували по 5 мікрокапсул у флакончиках з 2 мл середовища RPMI-1640 (“Sigma”, США), яке містило 10% ембріональної сироватки і антибіотики, у барабані з частотою 10–12 об./хв у термостаті при 37 °С. Зміну середовища культивування проводили через день. Починаючи з 1, 3 та 6-ї доби культивування в частину проб додатково вносили розчин хлориду кальцію (“Sigma”, США) у кінцевій концентрації 2,0 ммоль/л. На 3-тю, 6-ту і 9-ту добу культивування відбирали аліквоти середовища культивування і заморожували при –20 °С для наступного визначення рівня паратгормону людини імуноферментним методом з використанням набору реактивів фірми “Diagnostic Systems Laboratories, Inc.” (США). На всіх етапах мікроінкапсуляції та в динаміці культивування паратиреоїдної тканини проводили світломікроскопічний контроль за допомогою мікроскопа “Біолам” (“ЛЮМО”, Росія).

Генератор мікрокапсул стерилізували автоклавуванням. Безпосередньо перед застосуванням усі поверхні генератора, які стикаються з розчином альгінату, послідовно промивали 96%-м розчином етанолу і стерильним 0,9%-м розчином хлориду натрію до повного видалення слідів етанолу.

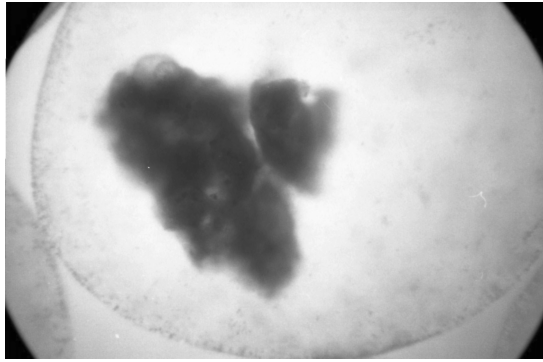


Рис. 1. Альгінатна мікрокапсула з тканиною аденоми паращитовидної залози людини

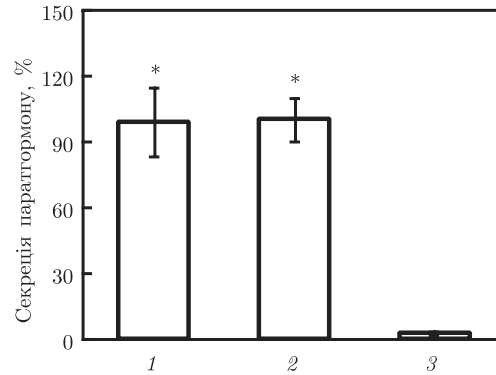


Рис. 2. Рівень паратгормону в середовищі культивування тканини аденоми паращитовидної залози людини: 1 — нативна тканина; 2 — мікроінкапсульована тканина; 3 — контроль середовища. \* —  $P < 0,001$  відносно контролю

Отримані дані обробляли методами варіаційної статистики із застосуванням критерію *t* Стьюдента.

За даними макроскопічного дослідження, при стандартній процедурі мікроінкапсуляції альгінатні мікрокапсули мають однорідну структуру переважно правильної округлої форми, однак іноді утворюються капсули дещо продовгуватої форми (рис. 1). Шматочки тканини паращитовидної залози розміщуються в мікрокапсулах як по центру, так і ексцентрично, що не впливає на їх морфофункціональні властивості [1].

Результати функціональних досліджень:

перша серія: базальний рівень секреції паратгормону в культуральне середовище на 3-тю добу культивування інтактної та мікроінкапсульованої тканини аденоми паращитовидної залози людини становить відповідно  $(5906 \pm 585)$  пг/мл ( $n = 3$ ) і  $(5828 \pm 934)$  пг/мл ( $n = 3$ ) (рис. 2). Для порівняння: базальний рівень паратгормону в середовищі культивування без паратиреоїдної тканини є вкрай низьким і становить тільки  $(148 \pm 47)$  пг/мл ( $n = 3$ );

друга серія: базальний рівень паратгормону в культуральному середовищі на 3-тю добу культивування мікроінкапсульованої тканини аденоми паращитовидної залози людини становить  $(5828 \pm 934)$  пг/мл ( $n = 3$ ), після чого поступово, однак не вірогідно знижується і становить на 6-ту і 9-ту добу культивування відповідно 83,2%  $((4851 \pm 589)$  пг/мл,  $n = 3$ ) і 72,1%  $((4200 \pm 793)$  пг/мл,  $n = 3$ ) порівняно з показником за 3-тю добу, що прийнятий за 100% (рис. 3);

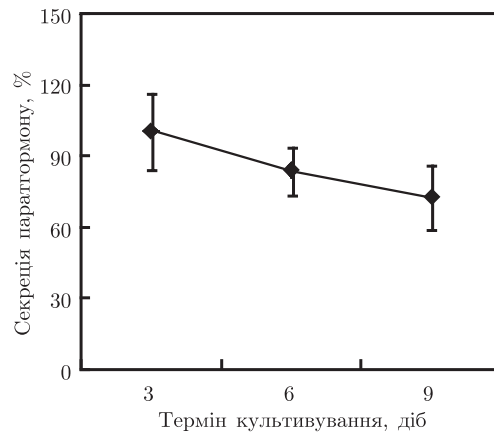


Рис. 3. Секреція паратгормону мікроінкапсульованою тканиною аденоми паращитовидної залози людини

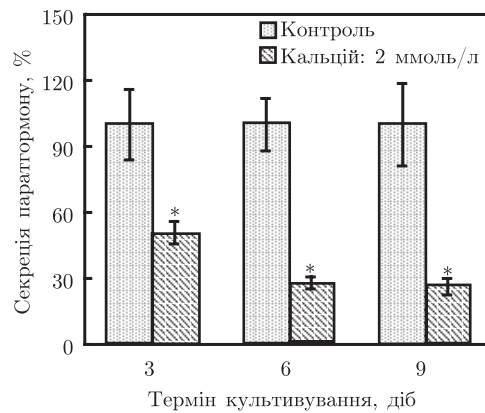


Рис. 4. Вплив надлишку вільного кальцію (2,0 ммоль/л) на секрецію паратгормону мікроінкапсульованою тканиною аденоми паращитовидної залози людини. \* —  $P < 0,05$  відносно відповідного контролю

третя серія: культивування мікроінкапсульованої тканини аденоми паращитовидної залози людини з надлишковою концентрацією вільного кальцію (2,0 ммоль/л) призводить до вірогідного ( $P < 0,05$ ) зниження рівня паратгормону в живильному середовищі на 3-тю, 6-ту і 9-ту добу відповідно на 49,4, 72,0 і 73,6% порівняно з базальними показниками цього ж терміну, що прийняті за 100% (рис. 4).

Відомо, що технологія мікроінкапсуляції дозволяє регулювати розміри альгінатних мікрокапсул залежно від розмірів шматочків тканини, які підлягають мікроінкапсуляції [3]. Так, показана прямо пропорційна залежність розміру альгінатних мікрокапсул від концентрації в них біополімеру, а також обернено пропорційна залежність розміру мікрокапсул від швидкості подачі повітря в генератор мікрокапсул та відстані між вихідним отвором генератора мікрокапсул і поверхнею гелеутворювального розчину [3, 5]. Раніше нами були запропоновані методи визначення механічної та осмотичної стійкості альгінатних мікрокапсул, призначених для мікроінкапсуляції тканин або клітин, які дозволяють забезпечити відбір стабільних мікрокапсул, а також показана пряма залежність стабільності альгінатних мікрокапсул від концентрації в них біополімеру [6].

Результати наших досліджень підтвердили численні повідомлення про здатність нативної та мікроінкапсульованої тканини паращитовидної залози людини активно продукувати

паратгормон в умовах *in vitro* [1, 7–9]. Рівень секреції паратгормону в середовище культивування вірогідно не відрізняється для нативної та мікроінкапсульованої тканини паразитовидної залози людини для широкого діапазону концентрацій кальцію в середовищі (1,62–3,2 ммоль/л) [9]. Враховуючи високі абсолютні значення гормональної активності досліджуваної нами аденоми в умовах *in vitro* (зокрема, середнє значення рівня паратгормону в середовищі культивування мікроінкапсульованої тканини паразитовидної залози становить  $(5828 \pm 934)$  пг/мл), цього цілком достатньо для ефективного використання органної культури паратиреоїдної тканини людини, у тому числі і тієї, що міститься в напівпроникних мікрокапсулах, у трансплантології при лікуванні сталого гіпаратиреозу. Для порівняння: рівень паратгормону в крові пацієнтів з хронічною недостатністю нирок і вторинним гіперпаратиреозом становить  $(1211 \pm 541)$  пг/мл [10].

Збільшення концентрації вільного кальцію в культуральному середовищі від 0,5 до 3,0 ммоль/л призводить до пригнічення секреції паратгормону тканиною паразитовидної залози пацієнтів з гіперпаратиреозом приблизно на 50% [11]. 24-годинна інкубація культури паратиреоцитів людини з 2 ммоль/л  $\text{CaCl}_2$  призводить до зниження секреції паратгормону на 50% для нативних клітин і на 70% для мікроінкапсульованих клітин [12]. У той же час паратгормон, який паратиреоцити секретують у культуральне середовище та інтенсивність метаболізму якого з певних причин знижена, може чинити негативний вплив на подальшу секрецію гормону цими клітинами [13].

Вплив позаклітинного іонізованого кальцію на функціональну активність паратиреоцитів реалізується через специфічні рецептори кальцію, які знаходяться на клітинах [14]. Головна роль рецепторів кальцію полягає в безперервному щохвилинному контролі синтезу і секреції паратгормону залежно від концентрації іонів  $\text{Ca}^{2+}$ , однак механізм цього процесу до кінця ще не відомий [14, 15]. При тривалих термінах спостереження рецептори кальцію відіграють також істотну роль у регуляції проліферації паратиреоцитів [15].

Таким чином, показана висока функціональна активність мікроінкапсульованої тканини аденоми паразитовидної залози людини в умовах *in vitro* (зокрема, здатність активно секретувати паратгормон та адекватно реагувати на вплив позаклітинного кальцію), що робить її придатною для використання як трансплантата при компенсації гіпофункціонального стану паратиреоїдної системи.

1. Zimmermann U., Thürmer F., Jork A. et al. A novel class of amitogenic alginate microcapsules for long-term immunisolated transplantation // Ann. N. Y. Acad. Sci. – 2001. – 944. – P. 199–215.
2. Пат. 20265 Україна, МПК7 C12N 11/10. Процес приготування водного розчину альгінату, призначеного для виготовлення мікрокапсул / І. П. Пастер, М. Д. Тронько. – Опубл. 15.01.2007, Бюл. № 1.
3. Smidsrød O., Skjåk-Bræk G. Alginate as immobilization matrix for cells // Trends Biotechnol. – 1990. – 8, No 3. – P. 71–78.
4. Пат. 20743 Україна, МПК7 C12N 11/10. Процес виготовлення альгінатних капсул / І. П. Пастер, М. Д. Тронько. – Опубл. 15.02.2007, Бюл. № 2.
5. Пастер І. П. Залежність розміру альгінатних капсул від умов їх приготування // Доп. НАН України. – 2006. – № 10. – С. 149–152.
6. Тронько М. Д., Пастер І. П. Залежність механічної та осмотичної стабільності альгінатних капсул від концентрації полімеру // Доп. НАН України. – 2006. – № 11. – С. 167–171.
7. Hasse C., Klock G., Zielke A. et al. Transplantation of parathyroid tissue in experimental hypoparathyroidism: in vitro and in vivo function of parathyroid tissue microencapsulated with a novel amitogenic alginate // Int. J. Artif. Organs. – 1996. – 19, No 12. – P. 735–741.
8. Hasse C., Zielke A., Klock G. et al. First successful xenotransplantation of microencapsulated human parathyroid tissue in experimental hypoparathyroidism: long-term function without immunosuppression // J. Microencapsul. – 1997. – 14, No 5. – P. 617–626.

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**, No 6. – P. 537–542.
10. Neyer U., Hoerandner H., Haid A. et al. Total parathyroidectomy with autotransplantation in renal hyperparathyroidism: low recurrence after intra-operative tissue selection // *Nephrol. Dial. Transplant.* – 2002. – **17**, No 4. – P. 625–629.
11. Ridefelt P., Nygren P., Hellman P. et al. Regulation of parathyroid hormone release in normal and pathological parathyroid cells exposed to modulators of protein kinase C // *Acta Endocrinol.* – 1992. – **126**, No 6. – P. 505–509.
12. Picariello L., Benvenuti S., Recenti R. et al. Microencapsulation of human parathyroid cells: an “in vitro” study // *J. Surg. Res.* – 2001. – **96**, No 1. – P. 81–89.
13. Fujimi T., Baba H., Fukase M., Fujita T. Direct inhibitory effect of amino-terminal parathyroid hormone fragment [PTH(1–34)] on PTH secretion from bovine parathyroid primary cultured cells in vitro // *Biochem. and Biophys. Res. Commun.* – 1991. – **178**, No 3. – P. 953–958.
14. Brown E. M., MacLeod R. J. Extracellular calcium sensing and extracellular calcium signaling // *Physiol. Rev.* – 2001. – **81**, No 1. – P. 239–297.
15. Parfitt A. M. The hyperparathyroidism of chronic renal failure: a disorder of growth // *Kidney Int.* – 1997. – **52**. – P. 3–9.

*Інститут ендокринології та обміну речовин  
ім. В. П. Комісаренка АМН України, Київ*

*Надійшло до редакції 26.03.2007*