

ГОРМОНАЛЬНА АКТИВНІСТЬ МІКРОІНКАПСУЛЬОВАНОЇ ТКАНИНИ КОРИ НАДНИРКОВОЇ ЗАЛОЗИ ЛЮДИНИ ЗА УМОВ *IN VITRO*

І. П. Пастер*

Державна установа «Інститут ендокринології та обміну речовин
ім. В. П. Комісаренка АМН України», м. Київ, 04114, Україна

Привабливою альтернативою тривалій гормональній терапії стійких гіпофункціональних станів при ендокринопатіях є трансплантація відповідних тканин або клітин [1]. Попередити можливі негативні наслідки пересадки донорського матеріалу, а також виключити необхідність застосування імуносупресивної терапії можна за допомогою методу мікроінкапсуляції тканини або клітин в капсули з напівпроникними мембранами, які створюють імунологічний бар'єр між трансплантатом та організмом реципієнта при можливості необмеженої дифузії гормонів, поживних речовин, кисню, месенджерів і метаболітів [2,3].

На сьогоднішній день отримані позитивні результати експериментальних досліджень з використанням мікроінкапсульованих тироїдної тканини [4], клітин гіпофіза [5], клітин Сертолі [6], хромафінних клітин медулярного шару надниркових залоз [7] і ряду інших типів гормонпродукуючих клітин. Розпочаті клінічні випробування ефективності трансплантації мікроінкапсульованих паратироїдної тканини [8] і острівців підшлункової залози [9].

Активно досліджується можливість використання хромафінних клітин медулярного шару надниркової залози (ННЗ), які здатні синтезувати і секретувати нейроактивні речовини (зокрема, катехоламіни та опіюїдні пептиди), для терапії нестерпного болю при онкологічних захворюваннях [10].

Запропоновано використання мікроінкапсульованих клітин ННЗ для пригнічення неспецифічної реакції відторгнення, яка спостерігається навколо полімерного імплантату [11]. Експериментальні дослідження показали, що на відміну від імплантації порожніх мікрокапсул, при трансплантації мікрокапсул з клітинами ННЗ значно зменшується популяція Т-лімфоцитів, знижується відсоток субпопуляцій клітин CD4+ і CD8+, зникає маркер активації макрофагів, а оточуюча фіброзна тканина стає менш виразною і не настільки щільною [11].

Були розпочаті експериментальні дослідження функціональної активності мікроінкапсульованих клітин кори ННЗ поросят [12], однак вони не знайшли подальшого продовження через негативне ставлення до трансплантації донорського матеріалу ксеногенного походження.

На жаль, до теперішнього часу не розроблено метод мікроінкапсуляції тканини або клітин кори ННЗ людини, який можна було б застосовувати для імуноізоляції трансплантаційного матеріалу при терапії сталого гіпокортицизму.

Метою роботи було дослідити гормональну активність мікроінкапсульованої тканини кори ННЗ людини за умов *in vitro*.

*Адреса для листування (Correspondence): ДУ «Інститут ендокринології та обміну речовин ім. В. П. Комісаренка АМН України», вул. Вишгородська, 69, м. Київ, 04114, Україна; E-mail: pasteur@bigmir.net

Матеріали і методи

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.

Для проведення експериментальних досліджень в хірургічному відділі клініки Інституту отримували візуально незмінену тканину кори ННЗ людини після адреналектомії з приводу доброякісних новоутворень. Адренокортикальну тканину промивали декілька разів стерильним 0,9 % розчином хлориду натрію з антибіотиками (з розрахунку 100 од. бензилпеніциліну натрієвої солі і 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 % розчином хлориду натрію з антибіотиками.

Шматочки тканини кори ННЗ людини переносили в 1 % розчин альгілату («Fluka», Норвегія), який безпосередньо перед застосуванням стерилізували фільтрацією через фільтр з порами 0,45 мкм («Filtron», Німеччина), що дозволяє також видалити з розчину альгілату деякі забруднюючі речовини, такі як білки і поліфеноли, та досягти високої прозорості кінцевого розчину [13], після чого здійснювали мікроінкапсуляцію тканини кори ННЗ за стандартним методом [14].

Для цього через перший канал генератора мікрокапсул пропускали 1,0 % розчин альгілату з рівномірно розподіленими шматочками адренокортикальної тканини; через другий канал – повітря зі швидкістю 8-10 л/хв. З вихідного отвору генератора мікрокапсули з тканиною потрапляли в гелеутворюючий розчин хлориду кальцію («Sigma», США) з концентрацією 100 ммоль/л для перехресного зв'язування карбоксильних груп мануранової та гулуранової кислот альгілату, в якому їх інкубували протягом 30 хв і промивали кілька разів 0,9 % розчином хлориду натрію.

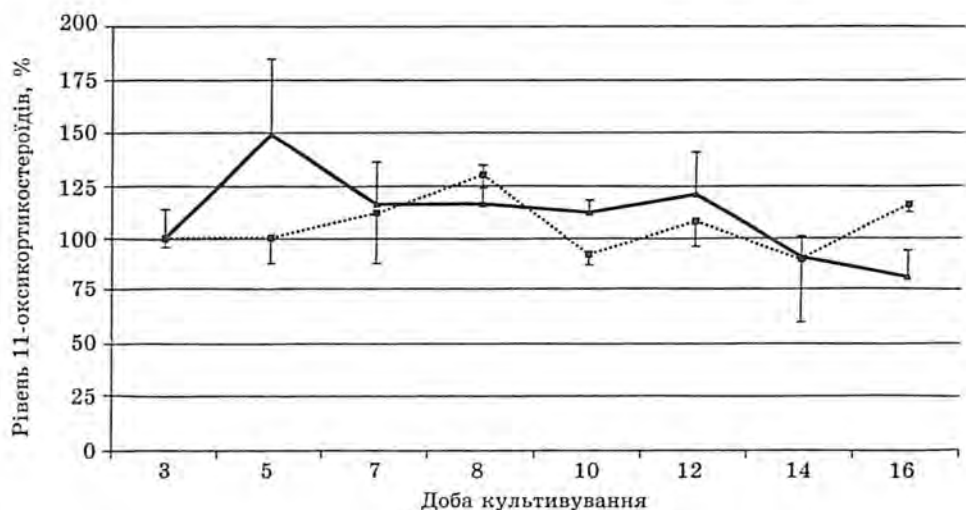
Мікроінкапсульовану тканину кори ННЗ людини культивували по 5 мікрокапсул у флакончиках з 1 мл середовища RPMI-1640 («Sigma», США), яке містило 10 % сироватки новонародженого теляти («INC Biomedicals GmbH», Німеччина) і антибіотики, при постійному обертанні з частотою 10-12 об/год і температурі 37 °С. Частина проб містила також синактен-депо («Novartis», Німеччина) в кінцевій концентрації 0,1 Од/мл. Середовище культивування змінювали через кожний день. На 3-, 5-, 7-, 8-, 10-, 12-, 14- і 16-добу культивування відбирали аліквоти середовища і заморожували при температурі -20 °С для наступного визначення в ньому вмісту 11-оксикортикостероїдів (11-ОКС).

На всіх етапах мікроінкапсуляції і в динаміці культивування здійснювали макроскопічний контроль стану альгілатних мікрокапсул за допомогою мікроскопу «Біолам» («ЛОМО», Росія). Кількісне визначення 11-ОКС в аліквотах середовища культивування робили флюориметричним методом [15] на спектрофлюориметрі «Hitachi MPF-4» («Hitachi», Японія) з використанням як стандарту кристалічного кортизолу («Reanal», Угорщина).

Обробка отриманих даних здійснена стандартними методами варіаційної статистики.

Результати і їх обговорення

Гормональні дослідження встановили наявність функціональної активності як нативної, так і мікроінкапсульованої тканини кори ННЗ людини в динаміці культивування (мал. 1). Кількісне визначення 11-ОКС в культуральному середовищі показало, що його базальний рівень на 3-, 5-, 7-, 8-, 10-, 12-, 14- і 16-добу культивування мікроінкапсульованої тканини кори ННЗ людини становив відповідно 13,20±1,77 мкг/мл (n=5), 19,67±4,70 мкг/мл (n=3), 15,33±2,60 мкг/мл (n=3), 15,33±2,40 мкг/мл (n=3), 14,80±0,80 мкг/мл (n=5), 16,00±2,52 мкг/мл (n=3), 12,00±1,15 мкг/мл (n=3) і 10,67±1,67 мкг/мл (n=3).



Мал. 1. Рівень 11-оксикортикостероїдів в середовищі культивування нативної (пунктирна лінія) і мікроінкапсульованої (суцільна лінія) тканини кори надниркової залози людини.

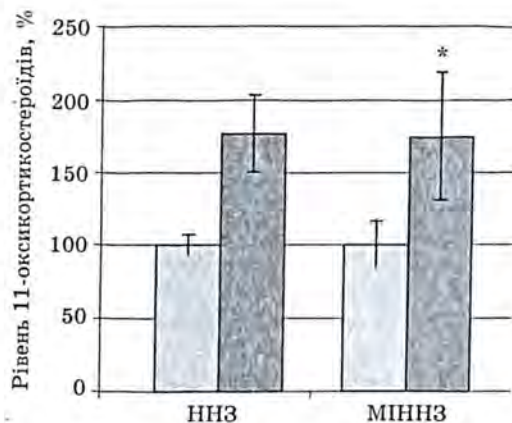
Для порівняння, в ці ж строки базальний рівень 11-ОКС в культуральному середовищі культивування нативної тканини кори ННЗ людини становив відповідно $12,50 \pm 0,50$ мкг/мл ($n=2$), $12,50 \pm 1,50$ мкг/мл ($n=2$), $14,00 \pm 3,00$ мкг/мл ($n=2$), $16,25 \pm 0,75$ мкг/мл ($n=4$), $11,50 \pm 0,64$ мкг/мл ($n=4$), $13,50 \pm 1,50$ мкг/мл ($n=2$), $13,50 \pm 4,50$ мкг/мл ($n=2$) і $14,50 \pm 0,50$ мкг/мл ($n=2$).

Культивування нативної і мікроінкапсульованої адренокортикальної тканини людини з синактен-депо (0,1 Од/мл) призводило до зростання рівня 11-ОКС в середовищі відповідно на 77,3 % і 75,0 % порівняно з базальними показниками, прийнятими за 100 % (мал. 2).

Експериментальні дослідження функціональної активності клітин кори ННЗ поросят, які були попередньо мікроінкапсульовані в тришарові альгінат-полілізін-альгінатні мембрани за допомогою електростатичного генератора мікрокапсул, показали адекватну секрецію кортизолу у відповідь на стимуляцію адренокортикотропним гормоном, яка була зіставлена з результатами специфічної стимуляції вільних адренокортикоцитів [12].

Висновок

Мікроінкапсульована тканина кори надниркової залози людини зберігає гормональну активність за умови *in vitro*, що свідчить про перспективність її застосування для компенсації гіпофункціонального стану адренокортикальної системи у тварин з експериментальним гіпокортицизмом.



Мал. 2. Вплив синактен-депо на рівень 11-оксикортикостероїдів в середовищі культивування нативної (ННЗ) і мікроінкапсульованої тканини кори надниркової залози (МІННЗ) людини. Контроль – світлі стовпчики, синактен-депо – темні стовпчики. * – $P < 0,05$ – у порівнянні з відповідним контролем.

Подяка

Автор висловлює щиру подяку Левчук Наталії Іванівні, науковому співробітникові лабораторії патофізіології радіаційних уражень відділу патофізіології ендокринної системи ДУ «Інститут ендокринології та обміну речовин ім. В. П. Комісаренка АМН України», за допомогу у визначенні рівня 11-оксикортикостероїдів.

Література

1. Турчин І. С. Проблема трансплантації культур клітин і тканин залоз внутрішньої секреції хворим з різними формами ендокринопатії // Ендокринологія. 1996, 1, N 2, 6-13.
2. Uludag H., De Vos P., Tresco P. A. Technology of mammalian cell encapsulation // Adv. Drug. Deliv. Rev. 2000, 42, N 1-2, 29-64.
3. Zimmermann U., Cramer H., Jork A. et al. Microencapsulation-based cell therapy / In.: H.-J. Rehm and G. Reed (eds.). Biotechnology. Weinheim, Wiley-VCH, 2001, 547-571.
4. Chen G. X., Peng Y., Lou P. L., Liu J. P. Bioartificial thyroid. The in vitro culture of microencapsulated rabbit thyroid tissue // ASAIO Trans. 1991, 37, N 3, M439-M440.
5. Chen Z. P. and Bao Y. D. Study of microencapsulated pituitary transplantation. Preparation of the capsule and its property // Chin. Med. J. (Engl.). 1994, 107, N 3, 200-204.
6. Luca G., Calvitti M., Nastruzzi C. et al. Encapsulation, in vitro characterization, and in vivo biocompatibility of Sertoli cells in alginate-based microcapsules // Tissue Eng. 2007, 13, N 3, 641-648.
7. Kim Y. M., Kwak K. H., Lim J. O., Baek W. Y. Reduction of allodynia by intrathecal transplantation of microencapsulated porcine chromaffin cells // Artif. Organs. 2009, 33, N 3, 240-249.
8. Hasse C., Klöck G., Schlosser A. et al. Parathyroid allotransplantation without immunosuppression // Lancet. 1997, 350, N 9087, 1296-1297.
9. 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, N 2, 157-161.
10. Moustafa T., Girod S., Tortosa F. et al. Viability and functionality of bovine chromaffin cells encapsulated into alginate-PLL microcapsules with a liquefied inner core // Cell Transplant. 2006, 15, N 2, 121-133.
11. Cadic C., Vitiello S., Gin H. et al. Embedded adrenal cells graft reduced local and early nonspecific inflammatory phenomena which follow agarose beads implantation // Cell Transplant. 1992, 1, N 5, 349-354.
12. Abobakr A. M. Free and microencapsulated adrenal cortical cells produce similar cortisol responses when stimulated by ACTH: an in vitro study // Int. J. Artif. Organs. 1994, 17, N 3, 171-174.
13. Smidsrød O. and Skjåk-Bræk G. Alginate as immobilization matrix for cells // Trends Biotechnol. 1990, 8, N 3, 71-78.
14. Figliuzzi M., Plati T., Cornolti R. et al. Biocompatibility and function of microencapsulated pancreatic islets // Acta Biomaterialia. 2006, 2, N 2, 221-227.
15. Балашов Ю. Г. Флюориметрический микрометод определения кортикостероидов: сравнение с другими методами // Физиол. журн. СССР. 1990, 76, N 2, 280-283.

(Надійшла 20.01.2010)