

І.П.Пастер, Н.І.Левчук, М.Д.Тронько

## Характеристика мікроінкапсульованої тканини кори надниркової залози людини при тривалому культивуванні

*Мікроінкапсульована тканина кори надниркової залози людини зберігає здатність секретувати 11-гідроксикортикостероїди протягом 51 доби культивування, а також адекватно реагувати на стимуляцію адренокортикотропним гормоном та пригнічення хлодитаном, що свідчить про перспективність її застосування для компенсації гіпофункціонального стану адренокортикальної системи в експериментах на тваринах.*

*Ключові слова:* кора надниркової залози, мікроінкапсуляція, культивування, 11-оксикортикостероїди, адренокортикотропний гормон, хлодитан.

### ВСТУП

Одним з альтернативних методів терапії стійких гіпофункціональних станів ендокринних залоз є трансплантація відповідних тканин або клітин. 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 [17, 18, 21]. Для виготовлення мікрокапсул найчастіше застосовують біополімер альгінат, який отримують з морських водоростей або вирощують в біореакторі з використанням бактерій [22].

Також метод мікроінкапсуляції тканини або клітин дає змогу вирішити одну з основних проблем трансплантології: відсутність достатньої кількості донорського матеріалу [15, 20]. Багато дослідників намагаються вирішити це питання, вважаючи, що ксенотрансплантація (пересадка органів і

тканин від тварин людині) є цілком реальним виходом з цього становища. Крім основного призначення, альгінатні мікрокапсули слугують також перешкодою можливій передачі патогенних агентів, зокрема ендогенних ретровірусів, при ксенотрансплантації ендокринних тканин або клітин поросят [9]. Не виключена також перспектива трансплантації в мікрокапсулах тканин аденом ендокринних залоз, оскільки зберігається технічна можливість повного їх видалення у разі злоякісного переродження.

Нині отримані позитивні результати експериментальних досліджень і клінічних випробувань з використанням мікроінкапсульованих ендокринних тканин і клітин, в тому числі клітин надниркових залоз (НЗ) [13, 14]. Зокрема, запропоновано використання мікроінкапсульованих клітин НЗ для пригнічення неспецифічної реакції відторгнення, яка спостерігається навколо полімерного імплантата [6]. Показано, що на відміну від імплантації порожніх мікрокапсул, при трансплантації мікрокапсул з клітинами НЗ значно зменшується популяція Т-лімфоцитів, знижується відсоток субпопуляцій клітин CD4<sup>+</sup> і CD8<sup>+</sup>, зникає маркер активації макрофагів, а оточу-

юча фіброзна тканина стає менш виразною і не настільки щільною.

Були розпочаті експериментальні дослідження функціональної активності мікроінкапсульованих клітин кори НЗ (КНЗ) поросят [5], 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 КНЗ людини, який забезпечував би тривале їх функціонування і який можна було б застосовувати як захист трансплантаційного матеріалу замість імуносупресивної терапії при компенсації сталого гіпокортицизму.

Мета нашої роботи – дослідити гістологічну і гормональну характеристику мікроінкапсульованої тканини КНЗ людини при тривалому культивуванні.

## МЕТОДИКА

Для проведення експериментальних досліджень тканину КНЗ людини отримували в хірургічному відділі клініки Інституту ендокринології та обміну речовин після операцій з приводу хвороби Іценка–Кушінга і феохромоцитоми. Адренокортикальну 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 тканини КНЗ людини перенесли в 1%-й розчин альгілату (“Fluka”, Норвегія), який безпосередньо перед застосуванням стерилізували, пропускаючи через фільтр з порами 0,45 мкм (“Filtron”, Німеччина), після чого здійснювали мікроінкапсуляцію тканини за стандартним методом [10]. Для цього через перший канал генератора мікро-

капсул пропускали 1,0%-й 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 гелеутворювальний 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 10–15 хв і промивали кілька разів 0,9%-м розчином хлориду натрію.

Нативну та мікроінкапсульовану тканину КНЗ людини культивували у флакончиках з 1 мл середовища RPMI-1640 (“Sigma”, США), яке містило 10 % сироватки новонародженого теляти (“Sigma”, США) і антибіотики, при постійному обертанні з частотою 10–12 год<sup>-1</sup> і 37°C. Частина проб містила також синактен-депо (“Novartis”, Німеччина) в кінцевій концентрації 0,1 Од/мл і хлоридитан, розчинений в спирту, (синтез здійснено керівником лабораторії оргсинтезу та хімреактивів Інституту, доктором хімічних наук Бальоном Я.Г.) в кінцевих концентраціях 0,0005, 0,005, 0,05 і 0,5 %. Середовище культивування змінювали через кожну добу.

На етапі мікроінкапсуляції та в динаміці культивування здійснювали макроскопічний контроль стану альгілатних мікрокапсул за допомогою мікроскопа “Біолам” (“ЛОМО”, Росія). Для гістологічного дослідження відбирали мікроінкапсульовану адренокортикальну тканину людини, яку фіксували в рідині Буена протягом 18 год, двічі відмивали у 40° етиловому спирті, зневоднювали у спиртах зростаючої концентрації, двічі просвітлювали у ксилолі по 5 хв та заливали у Paraplast X-tra (“Sigma”, США) при 55 °C. Мікротомні зрізи завтовшки 5 мкм забарвлювали гематоксилін-еозином і проводили стандартні гістологічні дослідження.

У різні строки культивування відбирали аліквоти середовища та заморожували при температурі -20 °C для наступного визначення вмісту 11-гідроксикортикостероїдів (11-

ГОКС) людини флуориметричним методом [1] на спектрофлуориметрі “Hitachi MPF-4” (“Hitachi”, Японія) з використанням як стандарту кристалічного кортизолу (“Reanal”, Угорщина).

До початку дослідження було отримано позитивне рішення Комісії з етики державної установи “Інститут ендокринології та обміну речовин ім. В.П. Комісаренка НАМН України”, а також інформована згода від кожного пацієнта.

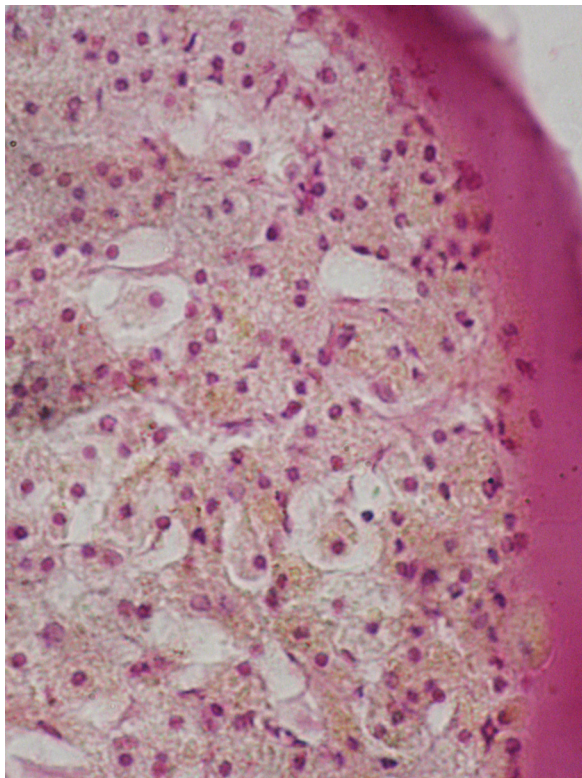
Обробка результатів здійснена стандартними методами варіаційної статистики із застосуванням критерію *t* Стьюдента.

## РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

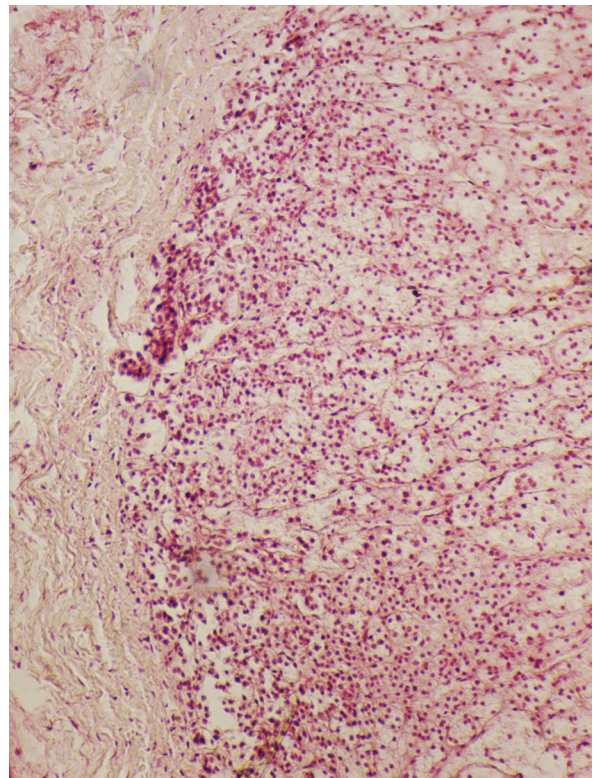
Результати макроскопічного дослідження показали, що виготовлені за стандартним методом альгінатні мікрокапсули [10] мали правильну округлу форму, однорідну структуру, а їх розмір був 1–2 мм у діаметрі. Товщина

стінки мікрокапсул становила 0,1–0,2 мм з усіх сторін від адренокортикальної тканини. Мікрокапсули щільно прилягали до тканини КНЗ і заповнювали заглибини, утворені за рахунок нерівностей її країв (рис. 1,а).

Морфологічна організація переважної більшості адренокортикальних клітин в мікрокапсулах не була порушена. Клітини оточені цільною плазматичною мембраною, їх ядра достатньо активні, цитоплазма помірної щільності, містить дрібні гранули. Лише окремі адренокортикоцити в мікрокапсулах у стані набряку та з ознаками деструктивних змін. Між тим частка таких клітин була незначною порівняно з адренокортикоцитами зі збереженою морфологічною структурою. Шматочки адренокортикальної тканини розміщувалися в мікрокапсулах як по центру, так і дещо ексцентрично, що не впливало на морфологічні ознаки та цілісність ендокринної тканини КНЗ [21].



а



б

Рис. 1. Мікроінкапсульована тканина кори надниркової залози людини. Забарвлення гематоксилін-еозином. х600



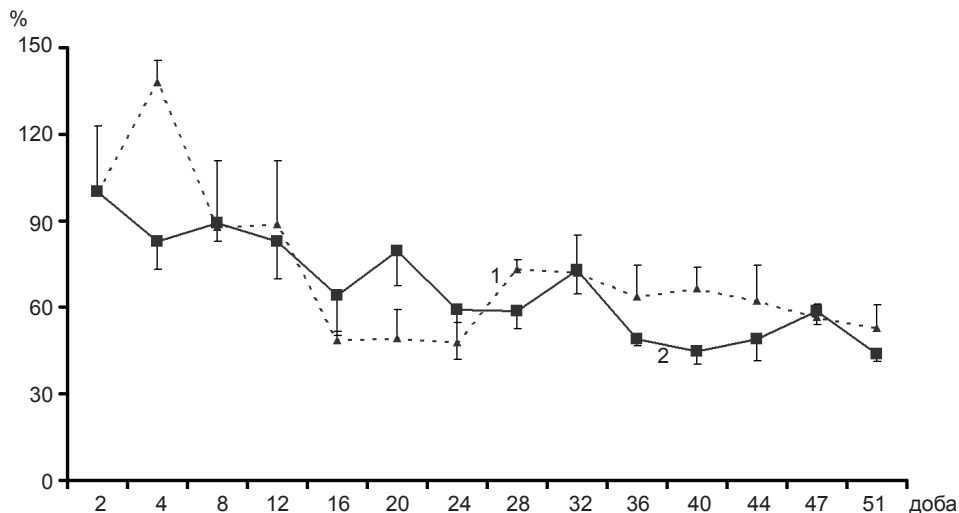


Рис. 2. Вміст 11-гідроксикортикостероїдів у середовищі культивування нативної (1) та мікроінкапсульованої (2) тканини кори надниркової залози людини

Адренокортикальна тканина в мікрокапсулах зберігала свою структурну організацію (див. рис. 1,б). Чітко видно всі три зони КНЗ: клубкова, пучкова та сітчаста. При цьому переважна більшість адренокортикоцитів у кожній зоні характеризувалася морфологічними ознаками життєздатності і не мала деструктивних змін.

Гормональні дослідження встановили наявність функціональної активності як нативної, так і мікроінкапсульованої тканини КНЗ людини в динаміці культивування (рис. 2).

Культивування нативної та мікроінкапсульованої адренокортикальної тканини людини з синактен-депо (0,1 Од/мл) збільшувало вміст 11-ГОКС в середовищі на 83,5 і 81,3 % відповідно порівняно з базальними показниками, прийнятими за 100 % (рис. 3).

Дослідження функціональної активності клітин КНЗ поросят, які були попередньо мікроінкапсульовані в тришарові альгінат-полілізин-альгінатні мембрани за допомогою електростатичного генератора мікрокапсул, показали адекватну секрецію кортизолу у відповідь на стимуляцію адренокортикотропним гормоном, яка збігалася з даними специфічної стимуляції вільних адренокортикоцитів [5].

Культивування адренокортикальної тканини людини з хлоританом дозозалежно знижувало вміст 11-ГОКС в культуральному середовищі: при концентрації препарату 0,0005 % – на 11,1 %, при 0,005 % – на 39,5 %, при 0,05 % – на 54,3 % ( $P < 0,05$ ) і при концентрації 0,5 % – на 69,8 % ( $P < 0,02$ ; рис. 4).

Культивування нативної та мікроінкапсульованої адренокортикальної тканини людини з хлоританом (0,5 %) знижувало вміст 11-ГОКС в середовищі на 70,1 і 76,4 % відпо-

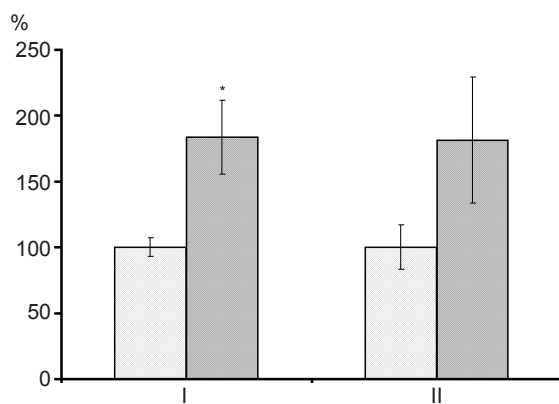


Рис. 3. Вплив синактен-депо на вміст 11-гідроксикортикостероїдів у середовищі культивування нативної (I) та мікроінкапсульованої (II) тканини кори надниркової залози людини: 1 – контроль, 2 – синактен-депо. \* $P < 0,05$  порівняно з відповідним контролем

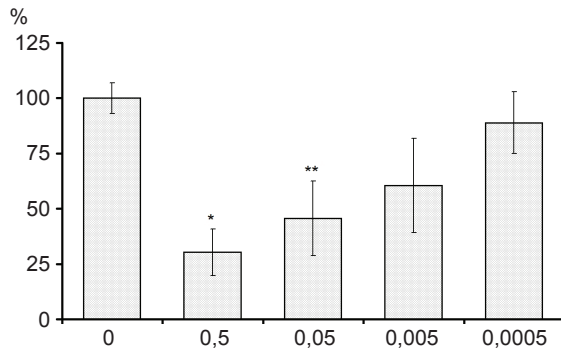


Рис. 4. Вплив хлодитану на вміст 11-гідроксикортикостероїдів в середовищі культивування нативної тканини кори надниркової залози людини залежно від концентрації препарату: 1 – контроль, 2 – хлодитан. \* $P < 0,02$  і \*\* $P < 0,05$  порівняно з контролем

відно порівняно з базальними показниками, прийнятими за 100 % (рис. 5).

Хлодитан (2-о-хлорфеніл-2-п-хлорфеніл-1,1-дихлоретан, о,п'-ДДД) як адренолітичний препарат і специфічний інгібітор функції КНЗ затверджений Food and Drug Agency і European Medicine Executive Agency для використання в клінічній практиці при хворобі та синдромі Іценка-Кушінга, а також гормональноактивних пухлинах КНЗ (кортикостеромах) в поєднанні з операцією або самостійно, якщо пухлина чи віддалені метастази не можуть бути видалені хірургічним шляхом, або якщо існує висока ймовірність рецидиву [2, 3, 7, 8, 16].

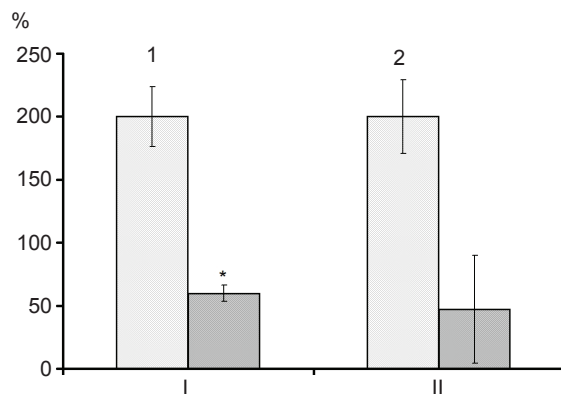


Рис. 5. Вплив хлодитану на вміст 11-гідроксикортикостероїдів в середовищі культивування нативної (I) та мікроінкапсульованої (II) тканини кори надниркової залози людини: 1 – контроль, 2 – хлодитан. \* $P < 0,05$  порівняно з відповідним контролем

Однак ефективність його застосування дуже варіабельна і залежить від багатьох обставин (зокрема, від біологічного виду надниркової тканини та умов її застосування) [2, 4, 19].

Виразність ефекту хлодитану на утворення кортикостероїдів може бути пов'язаний із індивідуальною чутливістю, здатністю препарату проникати всередину шматочків тканини, а також площею його контакту з поверхнею тканинних елементів КНЗ [4, 11, 12].

Таким чином, мікроінкапсульована тканина кори надниркової залози людини зберігає здатність секретувати кортикостероїди в динаміці культивування, а також адекватно реагувати на специфічні чинники, що свідчить про перспективність її застосування для компенсації гіпофункціонального стану адренокортикальної системи у тварин з експериментальним гіпокортицизмом.

*Автори висловлюють щире подяку дослідникам T.Bohrer, C.Hasse і M.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 НАМН України".*

**И.П.Пастер, Н.И.Левчук, Н.Д.Тронько**

#### **ХАРАКТЕРИСТИКА МИКРОИНКАПСУЛИРОВАННОЙ ТКАНИ КОРЫ НАДПОЧЕЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ ЧЕЛОВЕКА ПРИ ДЛИТЕЛЬНОМ КУЛЬТИВИРОВАНИИ**

Микроинкапсулированная ткань коры надпочечной железы человека сохраняет способность секретировать 11-оксикортикостероиды на протяжении 51 сут культивирования, а также адекватно реагировать на стимулирование адренокортикотропным гормоном и угнетение хлодитаном, что свидетельствует о перспективности её применения для компенсации гипофункционального состояния адренокортикотропной системы в экспериментах на животных.

Ключевые слова: кора надпочечной железы, микроинкапсуляция, культивирование, 11-оксикортикостероиды, адренокортикотропный гормон, хлодитан.

I.P.Pasteur, N.I.Levchuk, M.D.Trunko

## CHARACTERIZATION OF MICROENCAPSULATED HUMAN ADRENAL CORTEX TISSUE IN LONG-TERM CULTURE

Microencapsulated human adrenal cortex tissue preserves the ability to secrete 11-oxycorticosteroids for 51 days of cultivation, and to react adequately in responses to stimulation with adrenocorticotrophin and inhibition with chlorthalidone, suggesting good prospects of the use of this tissue for compensation of the hypofunctional state of adrenocorticotropin system in experimental animals.

Key words: adrenal cortex, microencapsulation, cultivation, 11-oxycorticosteroids, adrenocorticotrophin, chlorthalidone.

*V.P. Komisarenko Institute of Endocrinology  
and Metabolism of the NAMS of Ukraine", Kyiv*

## СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Балашов Ю.Г. Флюориметрический микрометод определения кортикостероидов: сравнение с другими методами // Физиол. журн. СССР. – 1990. – **76**, № 2. – С. 280–283.
2. Комиссаренко В.П. Применение ингибиторов для регуляции эндокринных функций и лечения гормонозависимых опухолей // Врач. дело. – 1970. – № 4. – С. 13–18.
3. Комиссаренко И.В. Лечение болезни и синдрома Иценко-Кушинга хлоридом // Клин. медицина. – 1976. – **54**, № 9. – С. 122–127.
4. Кравченко В.И. Влияние о,п'-ДДД на образование кортикостероидов надпочечниковой тканью in vitro // Пробл. эндокринол. – 1973. – **19**, № 5. – С. 76–79.
5. 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**, № 3. – С. 171–174.
6. Cadic C., Vitiello S., Gin H., Neveu P.J., Dupuy B. Embedded adrenal cells graft reduced local and early nonspecific inflammatory phenomena which follow agarose beads implantation // Cell Transplant. – 1992. – **1**, № 5. – С. 349–354.
7. Daffara F., De Francia S., Reimondo G., Zaggia B., Aroasio E., Porpiglia F., Volante M., Termine A., Di Carlo F., Dogliotti L., Angeli A., Berruti A., Terzolo M. Prospective evaluation of mitotane toxicity in adrenocortical cancer patients treated adjuvantly // Endocrine-Related Cancer. – 2008. – **15**, № 4. – С. 1043–1053.
8. De Francia S., Ardito A., Daffara F., Zaggia B., Germano A., Berruti A., Di Carlo F. Mitotane treatment for adrenocortical carcinoma: an overview // Minerva Endocrinol. – 2012. – **37**, № 1. – С. 9–23.
9. Elliott R. B., Escobar L., Garkavenko O., Croxson M.C., Schroeder B.A., McGregor M., Ferguson G., Beckman N., Ferguson S. No evidence of infection with porcine endogenous retrovirus in recipients of encapsulated porcine islet xenografts // Cell Transplant. – 2000. – **9**, № 6. – С. 895–901.
10. Figliuzzi M., Plati T., Cornolti R., Adobati F., Fagiani A., Rossi L., Remuzzi G., Remuzzi A. Biocompatibility and function of microencapsulated pancreatic islets // Acta Biomaterialia. – 2006. – **2**, № 2. – С. 221–227.
11. Hahner S., Fassnacht M. Mitotane for adrenocortical carcinoma treatment // Curr. Opin. Investig. Drugs. – 2005. – **6**, № 4. – С. 386–394.
12. Hart M.M., Straw J.A. Effect of 1-(o-chlorophenyl)-1-(o-chlorophenyl)-2,2-dichloroethane on adrenocorticotrophic hormone-induced steroidogenesis in various preparations in vitro of dog adrenal cortex // Biochem. Pharmacol. – 1971. – **20**, № 7. – С. 1679–1688.
13. 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**, № 3. – С. 240–249.
14. Moustafa T., Girod S., Tortosa F., Li R., Sol J.C., Rodriguez F., Bastide R., Lazorthes Y., Sallerin B. Viability and functionality of bovine chromaffin cells encapsulated into alginate-PLL microcapsules with a liquefied inner core // Cell Transplant. – 2006. – **15**, № 2. – С. 121–133.
15. Rowiński W. Future of transplantation medicine // Ann. Transplant. – 2007. – **12**, № 1. – С. 5–10.
16. Schteingart D.E., Doherty G.M., Gauger P.G., Giordano T.J., Hammer G.D., Korobkin M., Worden F.P. Management of patients with adrenal cancer: recommendations of an international consensus conference // Endocrine-Related Cancer. – 2005. – **12**, № 3. – С. 667–680.
17. Smidsrød O., Skjåk-Bræk G. Alginate as immobilization matrix for cells // Trends Biotechnol. – 1990. – **8**, № 3. – С. 71–78.
18. Uludag H., De Vos P., Tresco P.A. Technology of mammalian cell encapsulation // Adv. Drug. Deliv. Rev. – 2000. – **42**, № 1-2. – С. 29–64.
19. Veytsman I., Nieman L., Fojo T. Management of endocrine manifestations and the use of mitotane as a chemotherapeutic agent for adrenocortical carcinoma // Clin. Oncol. – 2009. – **27**, № 27. – С. 4619–4629.
20. Weiss M.J., Ng C.Y., Madsen J.C. Tolerance, xenotransplantation: future therapies // Surg. Clin. North. Am. – 2006. – **86**, № 5. – С. 1277–1296.
21. Zimmermann U., Cramer H., Jork A., Thürmer F., Zimmermann H., Fuhr G., Hasse C., Rothmund M. Microencapsulation-based cell therapy / In: H.-J. Rehm and G. Reed (eds.). Biotechnology. – Weinheim, Wiley-VCH, 2001. – С. 547–571.
22. Zimmermann U., Mimietz S., Zimmermann H., Hillgärtner M., Schneider H., Ludwig J., Hasse C., Haase A., Rothmund M., Fuhr G. Hydrogel-based non-autologous cell and tissue therapy // BioTechniques. – 2000. – **29**, № 3. – С. 564–581.

*ДУ «Ін-т ендокринології та обміну речовин  
ім. В.П. Комисаренка НАМН України», Київ  
E-mail: pasteur@bigmir.net*

*Матеріал надійшов до  
редакції 12.07.2013*