

## **Функциональная оценка жизнедеятельности макроинкапсулированного тиреоидного ксенотрансплантата после пересадки в сосудистое русло**

*Белорусский государственный медицинский университет*

Целью настоящего исследования было исследовать функциональную способность и выживаемость ксеногенной культуры тироцитов на экспериментальной модели гипотиреоза у собак. Полученные культуры тироцитов помещались в контейнер размером 1,2-1,5 см, изготовленный из полупроницаемой мембраны. Инкапсулированная культура тироцитов помещалась в сосудистое русло (n = 16). Функциональная состоятельность тиреоидного ксенотрансплантата была отмечена во всех случаях. Ксенокультура тироцитов может замещать функцию щитовидной железы после тотальной тиреоидэктомии.

**Ключевые слова:** культура тироцитов, щитовидная железа, экспериментальный гипотиреоз, ксенотрансплантация.

S.I.Tret'yak, V.Ya.Khryshchanovich, V.A.Goranov, A.V.Romanovich Functional status of macroencapsulated thyroid xenograft after intravascular transplantation

The aim of this study was to investigate the functional capacity and survival of thyroid cultured xenografts after total thyroidectomy in a dog model. We have developed a culture technique by which the normal configuration of follicles and most other structural characteristics of the thyroid gland are well preserved. We constructed 1,2-to-1,5 cm straws fabricated of permselective membranes which were sealed at both ends after seeding with rabbit thyroid culture. Encapsulated thyroid culture was introduced into the blood circulation (n = 16). Functional capacity of thyroid transplants were found in all animals. Thyroid xenografts can completely substitute thyroid function after total thyroidectomy.

Key words: thyroid culture, thyrocyte, experimental hypothyroidism, xenografting.

Впервые принцип трансплантации эндокринных желез после тотальной или субтотальной резекции железы с целью предотвращения послеоперационной функциональной недостаточности был предложен Холстедом в 1909 году [9]. Известно, что у 5-10% пациентов после субтотальной тиреоидэктомии и, конечно, у всех пациентов после тотальной тиреоидэктомии развивается послеоперационный гипотиреоз (ГТ), который требует перорального приема L-тироксина в течение всей жизни пациента. Однако применяемые в настоящее время методы заместительной гормональной терапии ограничены из-за узкого спектра биологических эффектов, развития побочных реакций, сложности подбора адекватных доз гормонов [7]. В то же время пересадка щитовидной железы (ЩЖ), целиком или отдельных фрагментов, с целью компенсации ГТ, также не в состоянии положительно решить эту проблему. На путях ее реализации стоят нерешенные вопросы тканевой совместимости и ряд иммунологических аспектов, технические сложности пересадки с учетом малого калибра сосудов, наличия рассыпного типа артериального кровоснабжения, очень высокой чувствительности ЩЖ к гипоксии и ишемии; сюда же следует добавить трудности с обеспечением донорским материалом, потребность в специальном микрохирургическом инструментарии, оптических системах и т.д [2]. Новым приоритетным направлением в лечении различных форм эндокринной

недостаточности явился метод трансплантации жизнеспособных, секреторноактивных клеточных и органных культур, соответствующих желез внутренней секреции [5]. В мировой литературе существуют лишь единичные сообщения о трансплантации тироцитов (ТЦ) в подкожную жировую клетчатку, прямую мышцу живота, большой сальник, под капсулу печени и почки [4, 8]. Результаты таких пересадок все еще далеки от удовлетворительных, главным образом, из-за гибели трансплантата в результате реакции отторжения. Одним из направлений в защите трансплантата от иммунной агрессии является иммуноизоляция пересаживаемых клеток и их трансплантация в иммунопривилегированные зоны и, в частности, в сосудистое русло [6]. Использование принципа двойной иммуноизоляции позволяет отказаться от иммуносупрессивной терапии и использовать не только аллогенные, но и ксеногенные источники тиреоидной ткани. Последнее является весьма актуальным из-за дефицита аллогенного донорского материала, а также многих юридических, этических и медицинских проблем.

Поэтому целью настоящего исследования явилось экспериментальное обоснование возможности ксенотрансплантации культуры ТЦ в сосудистое русло, как наиболее иммунологически «выгодную» зону, а также функциональная оценка жизнедеятельности ксенотрансплантата, оценка эффективности иммуноизоляции в различные сроки после пересадки.

#### Материалы и методы

Было проведено 16 хронических опытов на половозрелых беспородных собаках обоего пола массой от 12 до 19 кг в соответствии с приказом Минвуза СССР №742 от 13.11.84 «Об утверждении правил работ с использованием экспериментальных животных», «Правилами работы с экспериментальными животными» (Утверждены Ученым Советом МГМИ 24/04/1996г.) и требованиями, регламентирующими работу с экспериментальными животными. Все животные содержались в одинаковых условиях в течение всего исследования и получали ежедневно одинаковое количество пищи и воды. Для обезболивания применяли внутривенную анестезию 1% раствором тиопентала натрия, который вводили в дозе 70±2 мг на 1 кг массы тела. Операции выполнялись с соблюдением правил асептики и антисептики. Животных наблюдали от одной недели до 3 месяцев.

В нашей экспериментальной работе мы пошли по пути использования ксеногенных источников культуры ТЦ. Основываясь на опыте НИИТ и ИО (г.Москва) [4], нами выполнено 16 ксенотрансплантаций собакам с экспериментальным ГТ. Экспериментальную модель первичного гипотиреоза воспроизводили по методике Ю.М.Лопухина путем тотальной тиреоидэктомии [3]. Таким образом, достигали 100% воспроизводимости модели послеоперационного первичного гипотиреоза к 1-2 неделям от начала опыта.

Культуру ТЦ получали из ЩЖ новорожденных кроликов по общепринятой методике в нашей модификации с последующим микробиологическим и бактериологическим тестированием [1]. Среднее количество тиреоидных фолликулов для каждой трансплантации колебалось от 250 до 300 тысяч. Культура ТЦ перед трансплантацией помещалась в макрокапсулу, изготовленную из производных полиамида и нейлона и представляющую собой полупроницаемую мембрану с диаметром пор 1-2 мкм. Размеры капсулы составили 12-15 мм в длину и 4-5 мм в диаметре. Для уменьшения вероятности тромбоза трансплантацию капсулы с культурой ТЦ проводили в просвет артериального русла – 11 собакам культура клеток

была имплантирована в абдоминальный отдел аорты ниже отхождения почечных сосудов и 5 собакам – по разработанной нами методике – в бедренную артерию с использованием ангиопластики синтетическим материалом («Экофлон», Россия). Определение лабораторных показателей сыворотки крови подопытных животных проводили в лаборатории ЦНИЛ БГМУ в группе биохимических, радиоиммунохимических и радиоизотопных методов исследования. Кровь центрифугировали в течение 20 минут в лабораторной центрифуге ОПН-3, с угловой скоростью 3000 об/мин. Полученную сыворотку собирали микропипеткой и замораживали при температуре  $-40^{\circ}\text{C}$ . Содержание тиреоидных гормонов в сыворотке крови подопытных животных (тироксин, трийодтиронин, свободный тироксин), а также антител к тиреопероксидазе и тиреоглобулину определяли с использованием  $\gamma$ -счетчика 5500 фирмы Beckman радиоиммунологическим методом с помощью стандартного набора реактивов унитарного предприятия «ХОП ИБОХ НАН Беларуси». Визуализацию ложа щитовидной железы и тиреоидного трансплантата у подопытных животных выполняли с помощью статической тиреосцинтиграфии в  $\gamma$ -камере Dyna Camera Series 5 через 3 месяца после ксенотрансплантации. Натриевый пертехнетат- $^{99\text{m}}\text{Tc}$  вводили внутривенно непосредственно перед исследованием (активность 25 МБк, период полураспада,  $T_{1/2}$  – 6 часов, время поступления в исследуемый орган – 15-20 минут).

#### Результаты и обсуждение

Развитие ГТ характеризовалось снижением уровня общего тироксина до  $9,62 \pm 1,96$  нмоль/л (исходный уровень  $15 \pm 1,82$  нмоль/л), свободного тироксина до  $6,23 \pm 1,66$  пмоль/л (исходный уровень  $11,51 \pm 1,72$  пмоль/л) и трийодтиронина до  $0,92 \pm 0,08$  нмоль/л (исходный уровень  $1,46 \pm 0,09$  нмоль/л). Затем (на 14 сутки) была отмечена тенденция к нормализации уровней тиреоидных гормонов: Т4 -  $11,5 \pm 2,39$  нмоль/л; Т4своб. -  $8,53 \pm 2,03$  пмоль/л; Т3 -  $1,09 \pm 0,12$  нмоль/л. Показатели близкие к нормальным были достигнуты на 21 сутки после трансплантации (Т4 -  $14,14 \pm 1,49$  нмоль/л; Т4своб. -  $11,1 \pm 1,57$  пмоль/л; Т3 -  $1,31 \pm 0,1$  нмоль/л) и прослеживались на протяжении 3 месяцев (рис. 1).

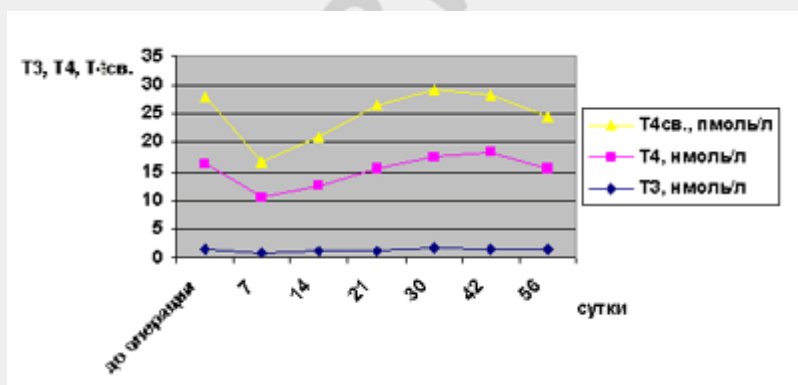


Рис. 1. До- и послеоперационная динамика уровня тиреоидных гормонов в сыворотке крови.

После внутрисосудистой ксенотрансплантации культуры ТЦ в первые две недели иммунный статус реципиентов соответствовал изменению иммунологической реактивности, наблюдавшейся в ответ на хирургическое вмешательство (воздействие наркоза, стресс, операционная травма). При этом отмечалось нарастание титра антител к тиреопероксидазе и тиреоглобулину, которое, однако, не превышало

показателей нормы. Восстановление иммунореактивности происходило в основном ко 2 неделе после операции для титра антител к тиреопероксидазе и к 3 неделе - к тиреоглобулину (рис. 2).

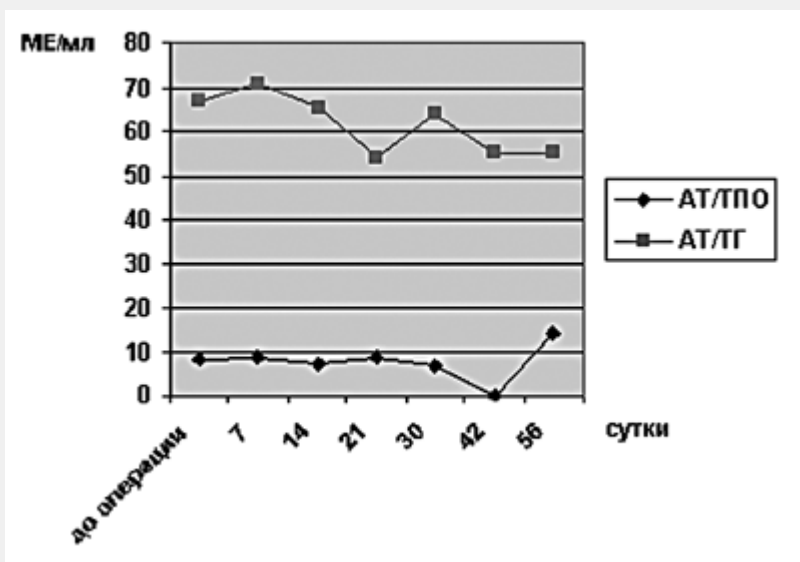


Рис. 2. До- и послеоперационная динамика уровня антител к ТПО и ТГ

У всех животных после тотальной тиреоидэктомии при скеннировании в области ложа ЩЖ накопления радиофармпрепарата (РФП) выявлено не было. Однако уже через 15-20 минут после внутривенного введения Tc99m определялась зона интенсивного накопления изотопа в проекции трансплантата. Размеры области накопления РФП зависели от количества тиреоидной ткани, помещенной в макрокапсулу, и составили 2-2,5 см (рис. 3, 4).

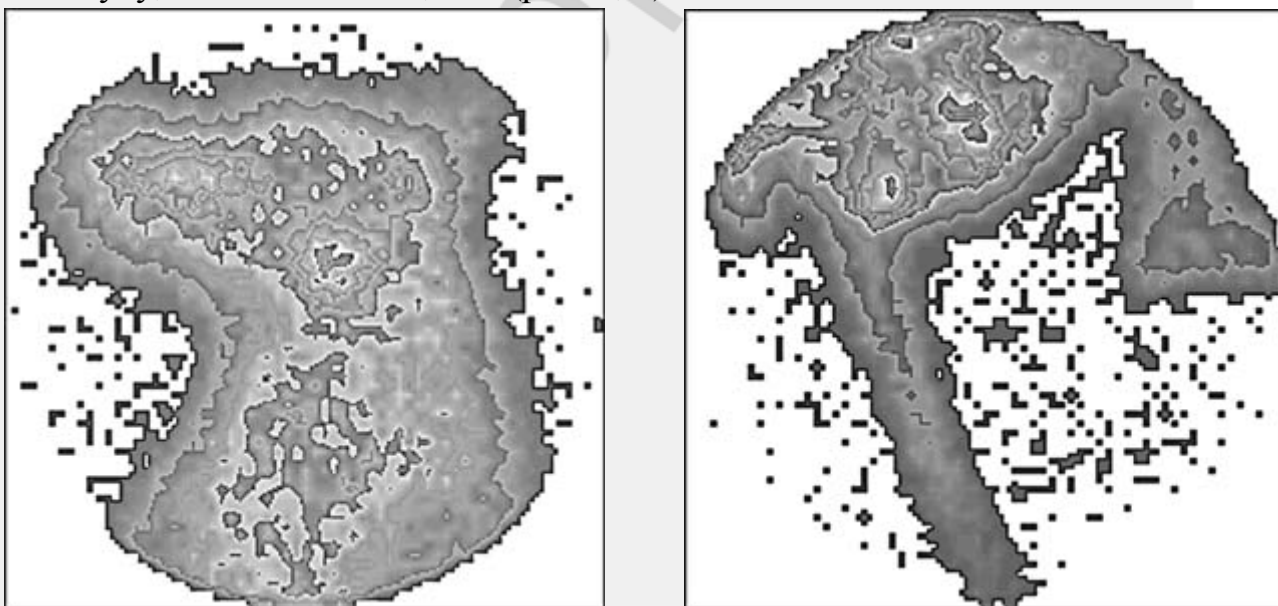


Рис.3,4. Сцинтиграммы ложа щитовидной железы (А) и области трансплантата (Б).

Результаты эксперимента показывают, что ксенотрансплантат начинает функционировать к 2-3-й неделе после трансплантации. Вероятно, существует “латентный период” между тиреоидэктомией и инициацией функционирования ксенотрансплантата, который, возможно, необходим для достаточной нутритивной его поддержки из крови. В течение этого периода возможно развитие транзиторного ГТ.

К преимуществам данного метода можно отнести сохранение в послеоперационном периоде естественного ауторегуляторного механизма секреции тиреоидных гормонов согласно потребностям организма в каждый конкретный период времени, а также возможность исключения пожизненной заместительной гормонотерапии.

#### Выводы

1. Использование в качестве донорского материала фетальных тканей, в качестве метода иммуноальтерации – культивирования, а в качестве иммуноизоляции – метода макроинкапсуляции позволяет обоснованно надеяться на достижение длительного метаболического эффекта без применения иммуносупрессии.

2. Проведенные нами исследования говорят о возможности успешной ксенотрансплантации тиреоидной ткани в сосудистое русло с целью коррекции первичного ГТ, и дают основание для применения метода в клинической практике.

#### Литература

1. Блюмкин В.Н., Бабилова Р.А., Скалецкий Н.Н. и др. Флотирующие культуры, полученные из щитовидной железы плодов человека и животных. – Трансплантация и искусственные органы. – М., 1986. – С.92-94.

2. Бредихин Т.Ф., Бредихин В.Т. Клиническая эффективность аллотрансплантации щитовидно-околощитовидного комплекса // Казанский мед. журнал. – 1981. - №5. – С.26-29.

3. Лопухин Ю.М. Экспериментальная хирургия. – М., «Медицина», 1971. – 344 с.

4. Скалецкий Н.Н., Загребина О.В. Флотирующие культуры, получаемые из щитовидной железы плодов человека и трансплантация их больным гипотиреозом // Трансплантация органов. – Львов, 1990. – С.124-125.

5. Трансплантология. Руководство для врачей / Под ред. В.И.Шумакова. – М.: Медицина, 1995. – 575 с.

6. Шотт А.В., Третьяк С.И., Леонтьук А.С., Романовский А.И. Необычная закономерность в трансплантации // Избранные главы хирургии. Сб. научн. трудов, посвященный 70-летию кафедры общей хирургии. – Минск, 1992. – С.51-53.

7. Karachentsev Yu.I., Lyakh I.A., Khasiev V.V. Efficacy and prospects for cryopreserved thyroid gland transplantation as a method for treatment of different forms of primary hypothyroidism including postradiation // International Journal of Radiation Medicine. – 1999. - №3-4. – P. 104-108.

8. Lee M.-K., Bae Y.H. Cell transplantation for endocrine disorders // Journal of Advanced Drug Delivery Reviews. – 2000. - Vol. 42, № 1. – P. 103-120.

9. Papaziogas B., Antoniadis A., Lazaridis Ch. et. al. Functional Capacity of the Thyroid Autograft: An Experimental Study // J. Surg. Research – 2002. – Vol.103. – P223-227.