

А.Н. Харламова, В.Я. Хрыщанович, С.И. Третьяк

ОСОБЕННОСТИ ДЛИТЕЛЬНОГО КУЛЬТИВИРОВАНИЯ КЛЕТОК ПАРАЩИТОВИДНОЙ ЖЕЛЕЗЫ ЧЕЛОВЕКА

УО «Белорусский государственный медицинский университет»

Разработан эффективный метод выделения клеток из паращитовидной железы человека. Использование преинкубации позволяет не только выделить клетки из органа в высокой концентрации, но и получить жизнеспособную и функционально активную культуру паратироцитов. Полученные результаты могут быть использованы для получения культур клеток паращитовидной железы с целью дальнейшего применения в научно-практических целях.

Ключевые слова: гипопаратиреоз, паращитовидная железа, трансплантация, макроинкапсуляция.

A.N. Kharlamova, V.Ja. Khryshchanovich, S.I. Tretyak

FEATURES OF LONG-TERM CULTIVATION OF HUMAN PARATHYROID CELLS

The present study has shown a successful method of cell digestion from human parathyroid glands. To preserve the tissue and to enhance the yield of cells we reported the cell isolation with pre-incubation at 40°C permitting the enzyme to diffuse into the tissue and explicate activity equally throughout the whole particle. The results which we received in this study can be used to investigate the structural and functional potential of these cells for future transplantation and for in creating the protocol of cultivation for long term cultures of human parathyroid cells.

Key words: hypoparathyroidism, parathyroid gland, transplantation, macroencapsulation.

Хронический гипопаратиреоз относится к дефицитарным гормонапатиям, развитие которого чаще всего связано с хирургическими вмешательствами на щитовидной или паращитовидной железах [1–4]. Заместительная терапия заболевания предполагает назначение препаратов кальция и витамина Д. В то же время, паратиреоидная трансплантация – наиболее физиологический способ восполнения гормонодефицита у пациентов со сниженной продукцией паратгормона, основным препятствием на пути которой является иммунологическое отторжение трансплантата. Паренхима паращитовидных желез человека представлена несколькими типами клеток, главными из которых являются паратироциты. В «нормальной» паращитовидной железе на долю паратироцитов приходится около 40–70%, остальные 30–60% составляют фибробласты, оксифильные и жировые клетки. При различных патологических состояниях, связанных с заболеваниями паращитовидной железы (аденома, гиперплазия), процентное соотношение клеток нарушается. При этом по сравнению с нормальной тканью паращитовидной железы, риск отторжения патологически измененной паратиреоидной ткани несколько выше вследствие более выраженной экспрессии антигенов I и II классов главного комплекса гистосовместимости [5]. В связи с этим, до настоящего времени паратиреоидная трансплантация в клинической практике ограничивается ауто трансплантацией нативных или криоконсервированных паращитовидных желез [6–9], несмотря на то, что в эксперименте и клинике предпринимались попытки пересадки аллогенной паратиреоидной ткани иммуносупрессированным реципиентам [10, 11].

Lim, Sun [12] предложили простой и надежный способ иммунопротекции трансплантируемой ткани (островки Лангерганса) *in vitro* и *in vivo* путем альгинатной микроинкапсуляции, который позволил преодолеть реакцию отторжения и, тем самым, исключить необходимость иммуносупрессии и существенно продлить функциональную активность трансплантата. Мембрана микрокапсул, представленная поперечно-связанными между собой нитями альгината, не препятствовала диффузии небольших молекул (глюкоза, инсулин) и,

вместе с тем, была не проницаема для иммуноглобулинов и альбумина. В последующих экспериментальных исследованиях была подтверждена эффективность метода микроинкапсуляции при алло- и ксенотрансплантации [13–18]. Основными недостатками, ограничивающими применение технологии микроинкапсуляции в клинической практике, являются недостаточно длительная стабильность альгинат-поли-L-лизинных микрокапсул в организме реципиента [19], а также высокий риск канцерогенеза. Полученные нами ранее экспериментальные данные свидетельствуют о возможности длительного сохранения в организме реципиента структурной целостности биоконтейнера из полиамидной ткани [20], которая по прочности не уступает микропористым PTFE капсулам Boggs® и TheraCyte™ [21].

В настоящее время в биомедицинской практике весьма перспективным направлением является создание гибридных или биоискусственных органов, в связи с чем, инкапсуляция фрагментов ткани паращитовидной железы и последующая их имплантация в организм реципиента представляет собой альтернативный метод лечения перманентного симптоматического гипопаратиреоза, не требующий применения иммуносупрессии. Работами зарубежных авторов была показана возможность успешной микро- и макроинкапсуляции паратиреоидной ткани человека и животных [22–24], однако в отношении эпителиальных клеток паращитовидной железы человека подобные исследования не проводились. Целью настоящего исследования явилась разработка эффективного метода макроинкапсуляции и выделения паратироцитов из гиперплазированной или аденоматозной ткани паращитовидной железы пациентов, перенесших паратиреоидэктомию по поводу первичного или вторичного гиперпаратиреоза. Жизнеспособность клеток паращитовидной железы в процессе длительного культивирования оценивали на основании параметров пролиферации и дифференцировки под микроскопом в условиях фазового контраста. Как показали результаты исследования, аллогенные паратироциты сохраняли высокую жизнеспособность, пролиферативную и гормон-продуцирующую активность, чувствительность к Ca^{2+} .

Материал и методы

Исследование было выполнено в рамках государственного научно-технического проекта Республики Беларусь «Разработать и внедрить способ хирургического лечения больных гипотиреозом и гипопаратиреозом путем трансплантации тироцитов и паратироцитов». Выделение, обработка ткани и культивирование клеток проводились в асептических условиях в ламинарном боксе на базе Центральной научно-исследовательской лаборатории УО «Белорусский государственный медицинский университет» сотрудниками научной группы «Иммунология». Для приготовления культур использовали парашитовидные железы, полученные *ex vivo* во время паратиреоидэктомии от 6 пациентов, страдающих первичным и вторичным гиперпаратиреозом. Образцы железы доставлялись в лабораторию в транспортной среде на основе DMEM, содержащей 10% сыворотку и антибиотики (гентамицин – 100 мкг/мл, пенициллин – 100 МЕ/мл). Время хранения биоматериала до посева клеток составило не более 5 часов при температуре +4 °С. Проведение исследования было одобрено этическим комитетом нашего лечебного учреждения после получения письменного информированного согласия всех пациентов.

Для получения суспензии клеток парашитовидные железы вначале подвергали механической дезагрегации в чашке Петри путем измельчения ножницами в течение 3 минут на фрагменты размером 0,1–2 мм³. После этого измельченную паратиреоидную ткань обрабатывали раствором ферментов (Sigma, Milan, Italy), состоящим из коллагеназы II типа (1%), трипсина (0,25%) и ДНК-азы (0,01%). Время инкубации с ферментами составляло 20 минут при температуре +37 °С. Полученные клетки осаждали центрифугированием, после чего осадок ресуспендировали в ростовой среде DMEM/F-12 (Sigma) с добавлением 5% телячьей сыворотки (Irvine Scientific, Santa Ana, CA). С помощью камеры Горяева оценивали количество выделенных клеток, их жизнеспособность (по исключению 0,4% трипанового синего) и доводили концентрацию клеток и их конгломератов до 10³ в 1 мл питательной среды. Суспензию клеток в 5 мл среды заливали в культуральные флаконы и культивировали в CO₂-инкубаторе при +37 °С. Ростовую среду во флаконе с культивируемыми клетками меняли каждые 3–4 суток.

Оценку состояния культуры проводили ежедневно под микроскопом в условиях фазового контраста, а также, после помещения паратироцитов на микропористую мембрану, при помощи сканирующей электронной микроскопии (СЭМ) (MIRA\TESCAN). Контроль культур клеток и их фотографирование осуществляли с помощью микроскопа Olympus X51.

Методом радиоиммунного анализа культуральной жидкости с использованием набора для определения паратгормона (Roche, PTH-DRG) подтверждали специфическую функциональную активность популяции паратироцитов в культуре. Измерение проводилось в исходном состоянии культуры и при стимуляции Ca²⁺ (1мМ и 3мМ).

Основные структурные параметры (диаметр пор, толщина, пористость) полиамидной полупроницаемой мембраны (Nylon N66; Pall Filtrationstechnik GmbH, West-Germany) изучали при помощи СЭМ на разных увеличениях. Макрокапсулу конструировали в виде цилиндрической трубки длиной 15–20 мм и наружным диаметром 3–4 мм. Для герметизации капсулы использовали стандартный анатомический пинцет, бранши которого разогревали над огнем спиртовой горелки и затем охлаждали до температуры 250 °С (контроль – электрический термометр), после чего ~100 000 паратироцитов путем инъекционного введения инсулиновым шприцем (B.Braun Melsungen AG, Germany) помещали в просвет капсулы. Затем края отверстия макрокапсулы сближали с некото-

рым усилием до полного сплавления. Контейнер находился в свежей культуральной среде до момента помещения в организм реципиента не более 20 минут.

Результаты

Культура, полученная из парашитовидной железы человека, в 1-е сутки культивирования была представлена преимущественно флотирующими клетками, также встречались единичные фибробластоподобные клетки. Со 2-х суток быстро формировалась прикрепленная фракция клеток неправильной формы с четко контурированным ядром, которая не представляла собой многочисленных очагов роста клеток, плотно прилегающих друг к другу. К 4–10 суткам культивирования клетки образовывали плотный монослой, представленный тесно прилегающими друг к другу эпителиальными клетками полигональной формы. Анализ полученных данных показал, что наибольшее количество клеток из тканевых фрагментов парашитовидной железы удалось получить в режиме 18-часовой инкубации с ферментами при температуре +4 °С с последующей 10-минутной инкубацией при +37 °С. В этом случае удалось выделить клетки в концентрации 3÷5×10⁶ в 1 мл, жизнеспособность которых составила 99%. При микроскопии культуры, полученной из образцов парашитовидной железы человека, на 3 сутки наблюдали образование клеточных агрегатов, состоящих из 20 и более клеток (рисунок 1-А). При этом была отмечена относительная гомогенность культуры, которая проявлялась в одинаковых размерах клеток и плотности их укладки, клетки достигали практически уровня монослоя (рисунок 1-Б). Начинали формироваться везикулярные структуры – микрофолликулы. Клетки, выстилающие полость фолликулов, очень тесно прилегали друг к другу и имели кубическую форму.

После прикрепления агрегата клеток достаточно быстро формировалась колония, единичные клетки также могли прикрепляться к поверхности подложки. Колонии за счет деления клеток увеличивались в размерах и постепенно сливались. Центральная часть колоний в результате дифференцировки становилась многослойной, происходила стратификация колонии, и через определенное время образовывался сплошной многослойный (стратифицированный) пласт (МПК).

Формирование межклеточных связей в культуре паратироцитов зависело от содержания в ростовой среде ионов кальция. Хорошая пролиферация клеток была отмечена в среде с низким содержанием кальция (0,05–0,1 мМ), однако при этом замедлялись процессы дифференцирования клеток и многослойный пласт не формировался. Среда, содержащая нормальное количество кальция (1,2–1,8 мМ), инициировала дифференцирование и способствовала формированию десмосом.

В результате тестирования специфической функциональной активности культуры средняя концентрация паратгормона при указанных условиях получения клеток составила 210±41 пг/мл. Необходимо отметить, что существенных отличий в секреторной активности культивированных паратироцитов в зависимости от характера патоморфологических изменений нативных парашитовидных желез (аденома, гиперплазия) обнаружено не было.

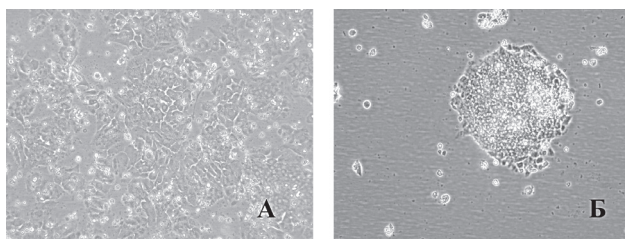


Рисунок 1 – Морфология культуры паратироцитов. 3 сутки роста *in vitro*. Фазово-контрастная микроскопия. Ув.×4 (А). Ув.×20 (Б)

По данным СЭМ толщина полиамидной мембраны составила 157 ± 2 мкм, пористость – 6,7%, диаметр пор – 1,33–5,55 мкм (рисунок 2–А), благодаря чему, помещенные на ее поверхность клетки оставались на прежнем месте, не выходя за пределы макрокапсулы (рисунок 2–Б). Паратироциты претерпевали дезагрегацию и приобретали сферическую или продолговатую форму, при этом концентрация паратгормона в культуральной среде находилась на прежнем уровне ($203,5 \pm 3,5$ пг/мл). Оценить ультраструктурные особенности клеток парашитовидной железы человека (рибосомы, цитоплазма, митохондрии, ретикулярный аппарат, секреторные гранулы), характеризующие их функциональную активность, не позволили технические возможности СЭМ.

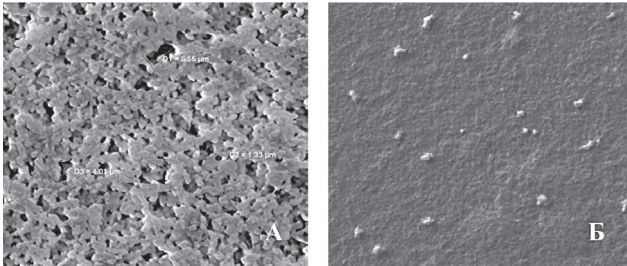


Рисунок 2 – Сканирующая электронная микроскопия полиамидной мембраны (А) и паратироцитов, расположенных на ее поверхности (Б). Ув.: 3.00 кх (А). Ув.: 1.00 кх (Б)

Проведенное нами исследование позволило получить гормонально-активную жизнеспособную культуру паратироцитов, а также разработать эффективный способ иммупротекции клеточного трансплантата путем макроинкапсуляции. Однако одним из условий успешного приживания МПК является выполнение своевременной трансплантации. Для этого необходимо определение степени готовности (зрелости) культуры клеток к пересадке, о которой судили, главным образом, по картине, наблюдаемой в инвертированном микроскопе. Переросший МПК обладал более низкими витальными свойствами, питание клеток в нем было нарушено. Молодой или недозревший МПК был тонким, имел достаточно слабые межклеточные связи и в процессе ферментативной обработки диспазой разрушался. В связи с этим, в процессе культивирования необходимо оценивать степень зрелости МПК и своевременно осуществлять трансплантацию.

Обсуждение

Заместительная терапия хронического гипопаратиреоза основана на применении препаратов кальция, витамина Д, паратгормона или его синтетических аналогов. Вместе с тем, существует целый ряд серьезных обстоятельств, ограничивающих использование паратгормона в клинической практике [25]. Аутотрансплантация парашитовидных желез показана в случаях выполнения тотальной паратиреоидэктомии по поводу гиперпаратиреоза и не всегда обеспечивает восстановление паратиреоидного гомеостаза [10]. Поэтому для категории пациентов с первичным или послеоперационным гипопаратиреозом при неэффективности аутотрансплантации необходима разработка альтернативных методов лечения. В немногочисленных литературных сообщениях, касающихся пересадки алогенной паратиреоидной ткани в эксперименте и клинике [10, 11, 26, 27], непродолжительное функционирование трансплантата авторы связывали с развитием реакции отторжения [5, 28]. Для решения этой проблемы животным-реципиентам производили трансплантацию органной культуры парашитовидной железы, которая обладала сниженной экспрессией антигенов главного комплекса гистосовместимости [29, 30]. Sollinger et al. [31] с целью снижения антигенных свойств аллотрансплантата на некоторое время помещали ткань парашитовидной железы человека под капсулу почки иммуносупрессированных мышей, после чего извлекали для выполнения аллотрансплантации в клинических условиях. С целью снижения иммуногенности паратиреоидной ткани путем элиминации антигенов с поверхности паратироцитов Anton et al. [32] использовали магнитные микросферы.

В качестве дополнительного метода клеточной иммуноизоляции Lim, Sun [12] использовали полупроницаемые альгинат-полилизинные мембраны, в которые помещали островковые клетки перед имплантацией в брюшную полость крысам-реципиентам с индуцированным сахарным диабетом. Следует отметить, что результаты подобных исследований были далеки от удовлетворительных, поскольку лишь в некоторых случаях у животных достигалась нормогликемия [15, 16, 33–35]. Вместе с тем, несмотря на некоторые нерешенные вопросы, связанные с биологической совместимостью и стабильностью полупроницаемых мембран [36–38], разработка технологии инкапсуляции клеток парашитовидной железы представляет большой научный и практический интерес. Hasse et al. [24] впервые сообщили об успешной аллотрансплантации микроинкапсулированной паратиреоидной ткани человека. В то же время, мы не встретили сообщений, посвященных изучению особенностей длительного культивирования и макроинкапсуляции паратироцитов человека.

Как показали результаты собственных исследований, культура паратироцитов человека представляет собой одну из самых «трудных» клеточных культур для получения и длительного культивирования в условиях *in vitro*. Количество выделяемых из парашитовидной железы клеток и их жизнеспособность во многом зависят от температурного режима хранения и от состава используемой транспортной среды. В процессе работы, установлено, что в случае хранения при комнатной температуре железы, выделить из нее достаточное количество жизнеспособных клеток не удается, пролиферация клеток в культуре происходит вяло. При хранении железы в охлажденном состоянии (при температуре $+4^\circ\text{C}$) витальные свойства клеток сохраняются в течение нескольких суток. Таким образом, паратиреоидную ткань необходимо хранить при пониженной температуре ($0...+4^\circ\text{C}$), и стремиться к тому, чтобы промежуток времени между отбором проб до начала выделения клеток был минимальным. Помимо температурного режима на жизнеспособность клеток влияет и состав среды, в которой транспортируют парашитовидную железу. В наших исследованиях образцы железы доставлялись в лабораторию в транспортной среде на основе DMEM, содержащей 10% сыворотку и антибиотики (гентамицин – 100мкг/мл, пенициллин – 100МЕ/мл).

Выделение клеток является первым и весьма важным этапом технологии. Эффективность последующего культивирования паратироцитов и формирования многослойного пласта во многом зависит от того, как была выполнена эта процедура, а также от ряда других факторов: состояния клеток (их жизнеспособности и способности к пролиферации); состава ростовой среды, используемых добавок и ростовых факторов; вида субстрата, на который высеваются клетки; конкретного варианта технологии культивирования (в присутствии фидерного слоя клеток или без него, при низком или высоком уровне кальция в среде). Выделение паратироцитов из железы проводят с помощью обработки различными ферментами: трипсином, колагеназой, диспазой, гиалуронидазой, ДНК-азой, а также их сочетанием [39]. Используются также хелатирующие соединения, связывающие Ca_2^+ и Mg_2^+ и разрывающие межклеточные связи [39]. При действии ферментов происходит разрушение десмосом

и клетки высвобождаются в среду в виде единичных клеток или агрегатов, состоящих из разного количества (от 2–4 до 25–30) паратирицитов. В нашем исследовании было показано, что паратирициты, находящиеся в агрегатах (рисунок 1–А), сохраняют жизнеспособность лучше, чем единичные клетки. В связи с этим, отсутствует необходимость в получении взвеси клеток, состоящей исключительно из единичных клеток. Кроме того, было доказано, что избыточная обработка трипсином приводит не столько к резкому снижению жизнеспособности клеток, сколько к последующему снижению их пролиферативной способности, что в последующем затрудняет формирование многослойного пласта.

Таким образом, технология длительного культивирования паратирицитов в условиях *in vitro* чрезвычайно сложна и требует пристального внимания на каждом технологическом этапе. Дальнейшее усовершенствование методов культивирования и селекции хорошо дифференцированных клеток паратитовидной железы, наряду с разработкой эффективных иммуноизолирующих мембран, в скором будущем позволят создать функционально активную биоискусственную паратитовидную железу для трансплантационного лечения гипопаратиреоза.

Литература

- White, J.V., Lo Gerfo P., Feind C., Weber C. Autologous parathyroid transplantation. *Lancet*. 1983; 2: 461.
- Rothmund, M., Wagner P.K., Scharck C. Subtotal parathyroidectomy versus total parathyroidectomy and autotransplantation in secondary hyperparathyroidism: A randomized trial. *World J. Surg.* 1991; 15: 745.
- Kats, A.D. Parathyroid autotransplantation in patients with parathyroid disease and total thyroidectomy: Indications in 117 cases. *Am. J. Surg.* 1981; 142: 490.
- Funahashi, H., Satoh Y., Imai T. et al. Our technique of parathyroid autotransplantation in operation for papillary thyroid carcinoma. *Surgery*. 1993; 114: 92.
- Bjerneroth, G., Juhlin C., Rastad J. et al. MHC class I and II antigen expression on parathyroid cells and prospects for their allogenic transplantation. *Transplantation*. 1993; 56(3): 717.
- Lutz, P., Kane O., Pfersolorff A. et al. Neonatal primary hyperparathyroidism: total parathyroidectomy with autotransplantation of cryopreserved parathyroid tissue. *Acta Paediatr. Scand.* 1986; 75: 179.
- Tominaga, Y., Tanaka Y., Sato K. et al. Recurrent renal hyperparathyroidism and DNA analysis of autografted parathyroid tissue. *World J. Surg.* 1992; 16: 595.
- Saxe, A.W., Brennan M.F. Reparative parathyroid surgery in patients with primary hyperparathyroidism due to multiple gland disease: Results of total parathyroidectomy and selective autotransplantation with cryopreserved tissue. *Surgery*. 1982; 91: 616.
- Durando, R., Palestini N., Mazzucco G. Trapianto di paratiroidi e tecniche di crioconservazione. *Minerva Chir.* 1993; 48: 1307.
- Saxe, A. Parathyroid transplantation: A review. *Surgery*. 1984; 95: 507.
- Alfrey, E.J., Perloff L.J., Asplund H.W. et al. Normocalcemia thirteen years after successful parathyroid allografting in a recipient of a renal transplant. *Surgery*. 1992; 111: 234.
- Lim, F., Sun A.M. Microencapsulated islets as bioartificial endocrine pancreas. *Science*. 1980; 210: 908.
- O'Shea, G.M., Goosen M.F.A., Sun A.M. Prolonged survival of transplantation islet of Langerhans encapsulated in a biocompatible membrane. *Biochim. Biophys. Acta*. 1984; 804: 133.
- Sun, A.M., O'Shea G.M. Microencapsulation of living cells – A long term delivery system. *J. Controlled Release*. 1985; 2:137.
- O'Shea, G.M., Sun A.M. Encapsulation of rat islets of Langerhans prolongs xenograft survival in diabetic mice. *Diabetes*. 1986; 35: 943.
- Fan, M.Y., Lum Z.P., Fu X. et al. Reversal of diabetes in BB rats by transplantation of encapsulated pancreatic islets. *Diabetes*. 1990; 39: 519.
- Fritschy, W.M., Wolters G.H.J., Van Schifgarde R. Effects of alginate–polylysine–alginate microencapsulation on «in vitro» insulin release from rat pancreatic islets. *Diabetes*. 1991; 40: 37.
- Levesque, L., Brubaker P.L., Sun A.M. Maintenance of long-term secretory function by microencapsulated islets of Langerhans. *Endocrinology*. 1992; 130(2): 644.
- Wang, T, Lacik I, Brissova M. et al. An encapsulation system for the immunoisolation of pancreatic islets. *Nature Biotechnology*. 1997; 15: 358–62.
- Tretyak, S.I., Prochorov A.V., Khryshchanovich V.Ya. et al. Long-term preservation of vitality of the xenogenic thyrocytes in the recipient after their transplantation into the blood stream. *Advances in Medical Sciences*. 2008; 53(1): 76–9.
- Brauker, J., Carr–Brendel V., Martinson L. et al. Neovascularization of synthetic membrane directed by membrane microarchitecture. *J Biomed. Mater. Res.* 1995; 29: 1517–24.
- Hasse, C., Schrezenmeier J., Stinner B. et al. Successful allotransplantation of microencapsulated parathyroids in rats. *World J. Surg.* 1994; 18: 630.
- 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(5): 617.
- Hasse, C., Klock G., Schlosser A. et al. Parathyroid allotransplantation without immunosuppression. *Lancet*. 1997; 350(9087): 1296.
- Tashjian, A.H., Goltzman D. On the interpretation of rat carcinogenicity studies for human PTH(1–34) and human PTH(1–84). *J. Bone Min. Res.* 2008; 23: 803–11.
- Niederle, B., Roka R., Brennan M.F. The transplantation of parathyroid tissue in man: development, indications, techniques and results. *Endocr. Rev.* 1982; 3: 245.
- Fu, X., Sun, A. Microencapsulated parathyroid cells as a bioartificial parathyroid. *Transplantation*. 1989; 7: 432.
- Gao, Z., Zhu Y., Tang W. Comparison of parathyroid donor graft. *Clin. Med. Sci. J.* 1993; 8: 89.
- Lafferty, K.J., Cooley M.A., Woolnough J., Walker K.Z. Thyroid allograft immunogenicity is reduced after a period in organ culture. *Science*. 1975; 188: 259.
- Feind, C.R., Weber C.J., Derenoncourt F. et al. Survival and allotransplantation of cultured human parathyroids. *Transplant. Proc.* 1979; 11: 1011.
- Sollinger, H.W., Mack E., Cook K. et al. Allotransplantation of human parathyroid tissue without immunosuppression. *Transplantation*. 1983; 36: 599.
- Anton, G., Decker G., Stark J.H. et al. Allotransplantation of parathyroid cells. *Lancet*. 1995; 345: 124.
- Lum, Z.P., Krestow M., Tai I.T. et al. Xenografts of rats islets into diabetic mice. *Transplantation*. 1992; 53: 1180.
- Sun, Y., Ma X., Zhou D. et al. Normalisation of diabetes in spontaneously diabetic cynomolgus monkeys by xenografts of microencapsulated porcine islets without immunosuppression. *J. Clin. Invest.* 1996; 98: 1417.
- Yang, H., O'Hali W., Kearns H. et al. Long term function of fish islet xenografts in mice by alginate encapsulation. *Transplantation*. 1997; 64: 28.
- Wijsman, J., Atkinson P., Mazaheri R. et al. Histological and immunological analysis of recovered encapsulated allogenic islets from transplanted diabetic BB/W rats. *Transplantation*. 1992; 54: 588.
- De Vos P., Wolters G.H., Fritschy W.M., Van Schilfgaarde R. Obstacles in the application of microencapsulation in islet transplantation. *Intern. J. Artif. Org.* 1993; 16 (4): 205.
- De Vos P., De Hoan B.J., Wolters G.H. et al. Improved biocompatibility but limited graft survival after purification of alginate for microencapsulation of pancreatic islets. *Diabetologia*. 1997; 40 (3): 262.
- Picariello, L., Benvenuti S., Recenti R. Microencapsulation of Human Parathyroid Cells: An «in Vitro» Study. *Journal of Surgical Research*. 2001; 96: 81–9.

Поступила 7.10.2013 г.