

В.Я. ХРЫЩАНОВИЧ¹, С.И. ТРЕТЬЯК¹, А.Н. ХАРЛАМОВА¹,
В.А. КОНДРАТОВИЧ², А.М. ПИСАРЕНКО², Е.И. КУЗЬМЕНКОВА³,
А.В. РОМАНОВИЧ⁴, А.В. БОЛЬШОВ¹

РЕЗУЛЬТАТЫ ПАРАТИРЕОИДНОЙ АЛЛОТРАНСПЛАНТАЦИИ

УО «Белорусский государственный медицинский университет»¹,
УЗ «Минский городской клинический онкологический диспансер»²,
ГУ «Республиканский центр медицинской реабилитации и бальнеолечения»³,
УЗ «4-я городская клиническая больница им. Н.Е. Савченко»⁴, г. Минск,
Республика Беларусь

Цель. Изучить эффективность аллотрансплантации макроинкапсулированных клеток паратиреоидной железы в артериальное сосудистое русло пациентам с послеоперационным гипопаратиреозом без применения иммуносупрессии.

Материал и методы. За период с декабря 2010 года по ноябрь 2011 года семи пациентам было выполнено 7 аллотрансплантаций макроинкапсулированных паратироцитов, показанием к которым во всех случаях был ятрогенный гипопаратиреоз после операций на щитовидной железе. Средний возраст пациентов составил 52 [39-59] лет. В качестве доноров были выбраны пациенты, которым выполнялась паратиреоидэктомия по поводу первичного (аденома) и вторичного (обусловленного хронической почечной недостаточностью) гиперпаратиреоза.

Результаты. Для трансплантации были отобраны культивированные клетки с высокой концентрацией паратгормона в культуральной жидкости (2927, 5 [1400,5-4847] пг/мл) и степенью жизнеспособности 99%. Медиана продолжительности функционирования паратиреоидного трансплантата составила 3 [1-9] месяца, в то время как, у 4 (57,1%) пациентов клеточные аллотрансплантаты сохраняли свою эндокринную функцию более 2 месяцев. В посттрансплантационном периоде клинические симптомы гиперпаратиреоза не были выявлены ни в одном случае.

Заключение. У некоторых пациентов с гипопаратиреозом, развившимся после операций на щитовидной железе, паратиреоидная аллотрансплантация является эффективной терапевтической альтернативой стандартным методам лечения. Возраст доноров и реципиентов, продолжительность гипопаратиреоза не оказывали существенного влияния на длительность функционирования трансплантата. Дальнейшего изучения требуют вопросы, касающиеся пористости, биосовместимости и длительной стабильности микропористых мембран, а также необходимости HLA- и ABO-типирования пар донор-реципиент и потребности в иммуносупрессии.

Ключевые слова: культура паратироцитов, аллотрансплантация эндокринных клеток, без иммуносупрессии, послеоперационный гипопаратиреоз, клеточная терапия

Objectives. To evaluate the effectiveness of macroencapsulated parathyroid cells allotransplantation into the arterial bed of patients with postoperative hypoparathyroidism and without immunosuppression application.

Methods. From December 2010 to November 2011 7 patients underwent to 7 allotransplantations of cultured macroencapsulated parathyroid cells it was indicated by the iatrogenic hypoparathyroidism after the thyroid surgery in all cases. An average recipient age was 52 [39-59] years. Donors were selected from patients undergoing parathyroidectomy for primary (adenoma) and secondary (due to chronic renal failure) hyperparathyroidism.

Results. The cultivated cells with high concentration of parathormone in the cultured liquid (2927,5 [1400,5-4847] pg/ml) and the degree of viability (99%) were selected for the transplantation. The median cellular allograft survival was 3 [1-9] months. In 4 patients (57,1%) the allografts retained their endocrine function for more than 2 months. None of the patients showed clinical symptoms of hyperparathyroidism in the posttransplantation follow-up period.

Conclusions. In some patients with hypoparathyroidism developed after the thyroid surgery, parathyroid cell allotransplantation is considered to be an effective therapeutic alternative vs the standard methods. Donors' and recipients' age, the duration of hypoparathyroidism didn't influence significantly on the terms of the graft functioning. The problems concerning porosity, biocompatibility, long-term stability of the microporous membranes demand on the further investigation as well as the necessity of ABO- and HLA-matching of donor-recipient pairs and requirement for immunosuppression application.

Keywords: parathyroid culture, endocrine cells allotransplantation, immunosuppression free, surgical hypoparathyroidism, cell therapy

Novosti Khirurgii. 2013 Nov-Dec; Vol 21 (6): 68-77

Results of parathyroid allotransplantation

V.J. Khryshchanovich, S.I. Tretyak, A.N. Kharlamova, V.A. Kondratovich,
A.M. Pisarenko, E.I. Kuzmenkova, A.V. Romanovich, A.V. Bolshov

Введение

Гипопаратиреоз в большинстве случаев является следствием расширенных или повторных тиреоидэктомий и паратиреоидэктомий. Установлено, что более чем у 10% пациентов, перенесших хирургическое вмешательство по поводу карциномы щитовидной железы, в последующем развивается гипопаратиреоз [1].

В настоящее время заместительная терапия препаратами кальция и витамина Д3 является единственным методом лечения гипопаратиреоза. Подобное лечение при отсутствии механизмов отрицательной обратной связи чревато передозировкой или, наоборот, недостаточным дозированием витамина Д3 и кальция и, как следствие, развитием гипо- или гиперкальциемических осложнений. Для предотвращения таких осложнений предпринимались попытки хирургического лечения в различных вариантах, включающих и аутотрансплантацию фрагментов паращитовидной железы. В 1971 году S. Wells использовал родственный аллогraft (2 паращитовидные железы), который трансплантировали от отца сыну с пересаженной почкой [2]. С тех пор в медицинской литературе появилось много сообщений о результатах подобных трансплантаций [3, 4, 5]. В то же время, после аллотрансплантации фрагментов паращитовидной железы необходима иммуносупрессия, применение которой вряд ли оправдано в случаях не осложненного течения хронического гипопаратиреоза.

Отторжение — одна из главных проблем аллотрансплантации. Длительное выживание и функционирование пересаженных органов и тканей возможно при элиминации антигенпредставляющих клеток, которые экспрессируют человеческие лейкоцитарные антигены (HLA) II класса. Любой эндокринный орган на ~ 50% состоит из иммуногенной не эндокринной ткани (кровеносные сосуды, фибробласты, лимфоциты), в то время как паратиреоциты экспрессируют только HLA антигены I класса, которые не участвуют в индукции реакции отторжения [6].

Другим иммунопротективным подходом является инкапсуляция клеточных трансплантатов в полупроницаемые мембраны [3]. К основным принципам иммуноизоляции клеток относятся: биосовместимость мембран; селективный транспорт; проницаемость для элементарных молекул и непроницаемость для крупных белковых молекул. Наиболее частыми геометрическими конфигурациями имплантируемых иммуноизолирующих устройств являются внутрисосудистые трубчатые или

диско-образные имплантаты, пустотелые волокна, микросферы. Геометрия первых трех имплантируемых устройств соответствует понятию «макрокапсула» и характеризуется определенными размерами (внутренний диаметр ~ 0,5–1,5 мм, длина ~ 1–10 см) и вместимостью (от тысяч до миллионов клеток). Количество макрокапсул, требуемое для имплантации, зависит от их емкостных характеристик. Микроинкапсуляция подразумевает иммобилизацию клеток в тонкие сферические мембраны, в результате чего образуются микросферы в виде мелких «бусинок», каждая из которых содержит одну или несколько клеток. Требуемый терапевтический эффект достигается путем микроинкапсуляции большого количества клеток — от нескольких тысяч до миллионов. В то же время, технология клеточной инкапсуляции, детально изученная при алло- и ксенотрансплантации островков Лангерганса, не получила широкого распространения в паратиреоидной трансплантации [6].

Не менее актуальной проблемой клеточной трансплантологии является выбор анатомической области для имплантации, что особенно важно в случаях макроинкапсуляции трансплантата. Проводимые в настоящее время экспериментально-клинические исследования в этом направлении основаны на пересадке биокапсулы в жировые привески толстой кишки, свободную брюшную полость и на поверхность печени, подкожную жировую клетчатку, мышцы, большой сальник [2, 3]. Однако, несмотря на кажущуюся простоту техники выполнения подобных вмешательств, вероятность сохранения жизнеспособности инкапсулированных клеток остается крайне низкой вследствие недостаточного регионального кровоснабжения, кроме того, интраперитонеальная имплантация чревата развитием выраженного адгезивного процесса в брюшной полости. Вместе с тем, опираясь на результаты собственных исследований, можно утверждать, что артериальное сосудистое русло, как место для имплантации инкапсулированных тироцитов и паратироцитов, обладает достаточными иммунопротективными свойствами, поскольку неповрежденная интима является мощным гистогематическим барьером, который обеспечивает нестандартный иммунный ответ на пересаженную ткань, что в конечном итоге позволяет длительно сохраняться чужеродной ткани в организме реципиента [7].

В статье представлены клинические результаты аллотрансплантации макроинкапсулированных паратироцитов без применения иммуносупрессии пациентам с послеопераци-

онным гипопаратиреозом, а также приведено описание модифицированной методики приготовления паратиреоидного эксплантата со сниженной иммуногенностью путем культивирования *in vitro*.

Цель настоящего исследования — изучить эффективность аллотрансплантации макроинкапсулированных клеток паращитовидной железы в артериальное сосудистое русло пациентам с послеоперационным гипопаратиреозом без применения иммуносупрессии.

Материал и методы

Из числа пациентов, которым выполнялась паратиреоидэктомия по поводу первичного и вторичного гиперпаратиреоза, были отобраны 6 неродственных по отношению к реципиентам доноров в возрасте от 27 до 59 лет (средний возраст 54 [42-57] лет, соотношение мужчин и женщин — 1:1). Все доноры дали информированное согласие на использование удаленных паращитовидных желез для культивирования и последующей трансплантации. Проспективных доноров обследовали на вирусологические маркеры (HBs-антиген гепатита В, антитела к HBs-, HBc-, HBe-антигенам, вирусу С гепатита, вирусу иммунодефицита человека) и антитрепонемные антитела. Серопозитивные пациенты, а также имеющие в анамнезе злокачественные новообразования, были исключены из исследования. У четырех доноров гиперпаратиреоз носил вторичный характер и был обусловлен хронической почечной недостаточностью, по поводу которой в течение длительного времени они получали гемодиализную терапию. У двух доноров показанием к паратиреоидэктомии являлся первичный гиперпаратиреоз (солитарная аденома).

Забор паратиреоидных эксплантатов осуществлялся в стерильных условиях во время выполнения паратиреоидэктомии на базе отделения опухолей головы и шеи УЗ «Минский городской клинический онкологический диспансер». Образцы железы доставлялись в лабораторию в транспортной среде Игла в модификации Дюльбекко (DMEM). Время хранения биоматериала до посева клеток составляло не более 5 часов при температуре +4°C. Для получения суспензии клеток паращитовидную железу человека вначале освобождали от капсулы, жировой и соединительной ткани, кровеносных сосудов и подвергали механической дезагрегации в чашке Петри путем измельчения ножницами в течение 3 минут до фрагментов размером 0,1-2 мм³. Фрагмент каждой из

удаленных паращитовидных желез подвергался гистопатологическому исследованию, пациентам с вторичным гиперпаратиреозом выполняли паратиреоидную аутоаллотрансплантацию в мышцы предплечья. Аденоматозная ткань паращитовидной железы служила для отработки методики культивирования и в качестве трансплантата не использовалась вследствие возможной функциональной автономии и утраты физиологических механизмов отрицательной обратной связи между уровнем сывороточного кальция и секрецией паратгормона, а также не уточненным риском неопластической трансформации в процессе культивирования [8]. Для последующей трансплантации были использованы 3 паращитовидные железы каждого из четырех доноров с диффузной гиперплазией, которые подвергали предтрансплантационной обработке с целью получения первичной культуры паратироцитов.

Приводим краткое описание собственной методики выделения клеточной биомассы из измельченной паратиреоидной ткани, которую обрабатывали раствором ферментов, состоящим из коллагеназы II типа (1%), трипсина (0,25%) и ДНКазы (0,01%). Время инкубации с ферментами составляло 18 часов при 4°C, затем 10 минут при 37°C. Под действием ферментов происходило разрушение межклеточных связей с высвобождением паратироцитов в питательную среду или в виде единичных клеток, или в виде агрегатов, состоящих из разного количества (от 2-5 до 20-30) клеток. Полученные клетки осаждали центрифугированием, после чего осадок ресуспендировали в соответствующей питательной среде. С помощью камеры Горяева оценивали количество выделенных клеток, их жизнеспособность (по исключению 0,4% трипанового синего) и доводили концентрацию для посева до 500-1000 тысяч клеток в 1 мл питательной среды. Суспензию клеток в 5 мл среды заливали в культуральные флаконы и культивировали в CO₂-инкубаторе при 37°C. Ростовую среду во флаконе с культивируемыми клетками меняли каждые 3-4 дня. Оценку состояния культуры проводили ежедневно под микроскопом в условиях фазового контраста. 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 Ca⁺⁺ (1 мМ и 3 мМ). С целью определения клеточного фенотипа выполняли иммуноцитохимическое исследование мазков-

отпечатков из культуры клеток паращитовидной железы с использованием моноклональных антител (Dako, Дания) к паратгормону человека в разведении 1:20, время экспозиции хромогена (диаминобензида) — 1 минута (система визуализации LSAB, SantaCruz Biotechnology, США). Контроль культур клеток и их фотографирование осуществляли с помощью микроскопа Olympus X51. Для последующего замораживания в 2-миллитровые криопробирки были отобраны культуры клеток ($3-5 \times 10^6$ клеток/мл) с высокой продукцией и степенью цитохимической экспрессии паратгормона, которые помещали в морозильник (температура хранения -70°C). Замораживание культуры производили быстро на водяной бане при температуре 56°C , клетки сразу помещали в полную ростовую среду и определяли их жизнеспособность. Для трансплантации были отобраны клетки с высокой концентрацией паратгормона в культуральной жидкости (2927, 5 [1400,5-4847] пг/мл) и степенью жизнеспособности $> 85\%$. Опираясь на результаты исследований В. Wozniwicz et al. [9], для трансплантации использовали количество клеток, эквивалентное количеству клеток, содержащихся в одной нормальной паращитовидной железе ($\sim 20-30 \times 10^6$).

За период с декабря 2010 года по ноябрь 2011 года семи пациентам было выполнено 7 аллотрансплантаций паратироцитов, показанием к которым во всех случаях был ятрогенный гипопаратиреоз после операций на щитовидной железе по поводу рака (5), болезни Грейвса (1) и аутоиммунного тиреоидита Хасимото (1). Средний возраст пациентов составил 52 [39-59] лет. Распределение пар реципиент/донор по фенотипу группы крови АВО было следующим: O(I)/A(II) — 1, A(II)/A(II) — 1, A(II)/O(I) — 1, A(II)/AB(IV) — 2, B(III)/O(I) — 2. HLA-типирование не проводили. Из сопутствующих заболеваний хронический гипотиреоз был выявлен у 7 (100%) реципиентов, артериальная гипертензия — 4 (57%), сахарный диабет 2 типа — 1 (14%), хроническая гастродуоденальная язва — 1 (14%).

Пациенты, отобранные для аллотрансплантации паратироцитов, соответствовали критериям «послеоперационного» гипопаратиреоза: развитие характерных симптомов отмечалось сразу после операции на щитовидной железе, симптомы купировались после назначения кальций-содержащих лекарственных средств, возобновление симптомов отмечалось после прекращения их приема. В крови регистрировались низкие показатели паратгормона, гипокальциемия и гиперфосфатемия.

До трансплантации все пациенты получали пероральную заместительную терапию, включающую 20 [10-20] мкг витамина Д3 и 2000 [1200-4000] мг элементарного кальция. В двух случаях симптоматическая гипокальциемия требовала внутривенного введения, как минимум, 1 раз в неделю 40 мг кальция хлорида.

Исследование было выполнено в рамках государственного инновационного проекта «Разработать и внедрить метод хирургического лечения гипопаратиреоза», проведение которого было одобрено этическим комитетом УЗ «Городская клиническая больница скорой медицинской помощи г. Минска» после получения информированного согласия пациентов на проведение хирургического вмешательства.

Макрокапсулу конструировали в виде цилиндрической трубки длиной 15-20 мм и наружным диаметром 3-4 мм из микропористой мембраны поливинилидендифторида толщиной 157 мкм, диаметром пор 0,55-1,37 мкм и пористостью 28,2%, после чего $\sim 20-30 \times 10^6$ паратироцитов путем инъекционного введения помещали в просвет капсулы. Под спинномозговой анестезией 0,5% раствором бупивакаина гидрохлорида инкапсулированный трансплантат имплантировали в просвет глубокой бедренной (6 пациентов) и внутренней подвздошной (1 пациентка) артерий с последующей пластикой артериотомиического отверстия аутовенозной или политетрафторэтиленовой заплатой (рис. 1). Пройдемость артерии подтверждали пальпаторно в конце операции, а также в послеоперационном периоде при помощи ультразвуковой доплерографии. Умеренный болевой синдром в области раны в течение первых трех суток после

Рис. 1. Этап операции: макрокапсула с клеточным трансплантатом имплантирована в просвет глубокой бедренной артерии



операции купировали назначением противовоспалительных препаратов (кетопрофен 100 мг внутримышечно 3 раза в сутки). Профилактику артериальных тромботических осложнений осуществляли путем подкожного введения 5 000 МЕ/сутки дальтепарина натрия в течение 5 суток.

Выбор места трансплантации был обусловлен тремя причинами:

1) иммунологической привилегированностью артериального сосудистого русла [7];

2) отсутствием риска нарушения кровоснабжения нижней конечности в случае развития тромботических осложнений;

3) возможностью достаточной оксигенации и нутритивного обеспечения клеточного трансплантата.

В до и посттрансплантационном периодах производили забор образцов крови из кубитальной вены и определяли концентрацию сывороточных кальция и паратгормона (чувствительность 1 пг/мл, референтные значения 15-65 пг/мл). Критериями функционирования трансплантата считали повышение концентрации сывороточного кальция ≥ 2 ммоль/л, снижение потребности в кальций-содержащих лекарственных средствах, повышение уровня сывороточного паратгормона в сравнении с предтрансплантационными показателями, купирование или улучшение основных симптомов заболевания (парестезии, онемение, тетания) [3]. Критериями дисфункции трансплантата являлись очень низкие или неопределяемые уровни сывороточного паратгормона, сохранение или возобновление клинических симптомов заболевания и гипокальциемии на фоне возрастания потребности в кальций-содержащих лекарственных средствах до исходного уровня.

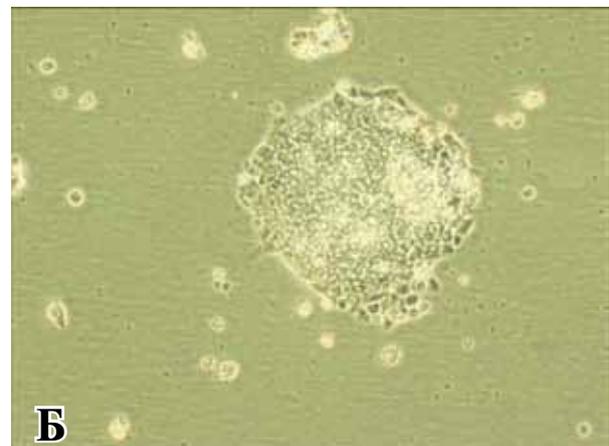
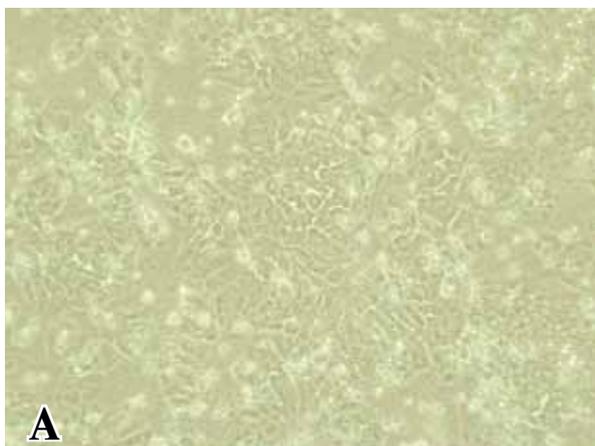
В исследовании использованы непара-

метрические методы статистического анализа. Полученные данные представлены в виде медианы и перцентилей (Me [25-75]). Оценка связи между длительностью функционирования аллотрансплантата и переменными (возраст донора и реципиента, длительность гипопаратиреоза) осуществлялась путем вычисления коэффициента ранговой корреляции Спирмена (rs). Статистически значимой корреляция считалась при значении $p < 0,05$.

Результаты и обсуждение

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 представляла собой многочисленные очаги 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°C с последующей 10-минутной инкубацией при 37°C. В этом случае удалось выделить клетки в концентрации $3-5 \times 10^6$ 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 (рис. 2 А). При этом была отмечена относительная

Рис. 2. Морфология культуры паратироцитов. 3 сутки роста *in vitro*. Фазово-контрастная микроскопия. Ув.×4 (А). Ув.×20 (Б)



гомогенность культуры, которая проявлялась в одинаковых размерах клеток и плотности их укладки, клетки достигали практически уровня монослоя (рис. 2 Б). Начали формироваться везикулярные структуры — микрофолликулы. Клетки, выстилающие полость фолликулов, очень тесно прилегали друг к другу и имели кубическую форму. В результате тестирования специфической функциональной активности культуры клеток средняя концентрация паратгормона при указанных условиях получения клеток составила 2927, 5 [1400,5-4847] пг/мл.

Полученные результаты исследования согласуются с литературными данными. В зависимости от методических условий выделения клеток из парашитовидной железы человека в среднем удается получить клетки в концентрации от 1×10^5 до 5×10^6 на мл с жизнеспособностью от 90% до 100% [3, 6]. Как показали результаты собственного исследования, применение метода, предполагающего 18-часовую преинкубацию с ферментами, позволило получить клетки не только в высокой концентрации и с высокой степенью жизнеспособности — 99%, но и самой высокой функциональной активностью по сравнению с другими методами их выделения. I. Nawrot et al. [3] отметили отсутствие очагов кальцификации и низкое содержание компонентов стромы, CD3, CD4, CD8-позитивных лимфоцитов-пассажиры и CD68-позитивных макрофагов в паратироидной ткани доноров с диффузной гиперплазией. Кроме того, культивирование и криоконсервация позволили уменьшить экспрессию HLA антигенов I класса паратироцитов и элиминировать HLA-позитивные клетки II класса.

По мнению H. Murray et al. [10], культивирование клеток более 6 недель приводит к за-

медлению их роста и прогрессивному снижению секреции паратгормона. Подобная утрата функциональной активности является общей закономерностью для длительно существующих первичных культур клеток, что объясняется отличием особенностей микроокружения *in vitro* и *in vivo*. Чтобы приблизить условия культивирования клеток *in vitro* к естественным, предпринимались попытки добавления в питательную среду растворимых компонентов, а также ко-культивирования с эндотелиальными клетками или на экстрацеллюлярном матриксе (сэндвич-культура) [11].

Позитивная реакция при иммуноцитохимическом исследовании с антителами к паратгормону человека определялась микроскопически в виде золотистого окрашивания хромогеном цитоплазмы исследуемых клеток в мазках-отпечатках (рис. 3), что свидетельствовало о фенотипической принадлежности культивируемых клеток к паратироцитам. Весьма важным подтверждением секреторной фазы являлась извитость клеточных мембран паратироцитов. В негативном контроле (без первичного антитела) с помощью системы визуализации (вторичное антитело) — окрашивание цитоплазмы клеток отсутствовало (рис. 4).

Перед трансплантацией у всех пациентов показатели сывороточного паратгормона и кальция находились в субнормальном диапазоне (10,7 [6,5-23] пг/мл и 1,71 [1,59-1,79] ммоль/л соответственно). Медиана продолжительности функционирования паратироидного трансплантата составила 3 [1-9] месяцев, в то время как, у 4 (57,1%) пациентов клеточные аллотрансплантаты сохраняли свою эндокринную функцию более 2 месяцев (таблица). В посттрансплантационном периоде

Рис. 3. Иммуноцитохимическое исследование культуры клеток — отмечается позитивное окрашивание цитоплазмы паратироцитов. Окраска: моноклональные антитела к паратгормону человека. Ув. $\times 400$

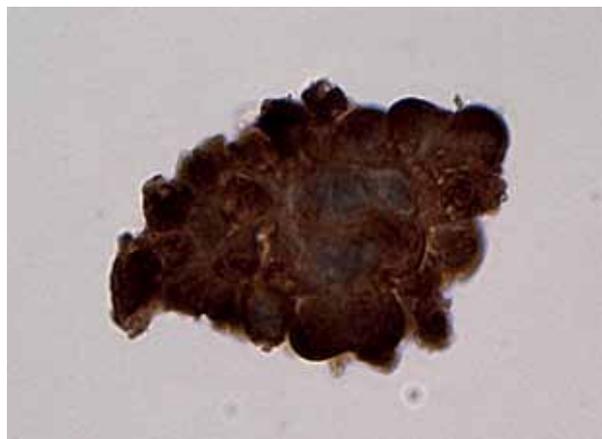
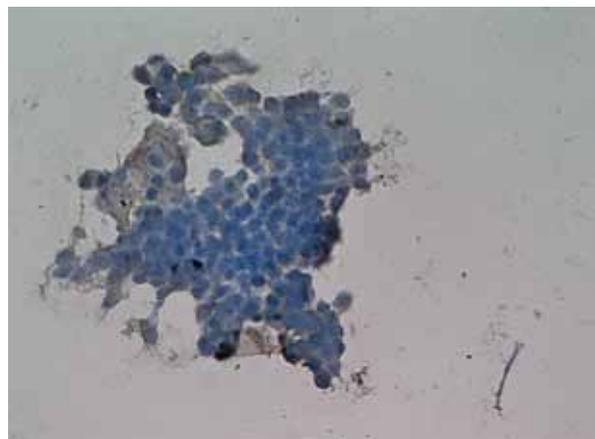


Рис. 4. Негативный контроль — окрашивание цитоплазмы клеток отсутствует. Окраска: без первичного антитела с помощью системы визуализации (вторичное антитело). Ув. $\times 400$



Сроки функциональной активности паратиреоидных аллотрансплантатов

| Длительность функционирования аллотрансплантата (месяцев) | Длительность функционирования аллотрансплантата (месяцев) | | |
|---|---|-----------|-----------|
| | 0-2 | 3-6 | > 6 |
| Количество трансплантаций | 3 (42,8%) | 2 (28,6%) | 2 (28,6%) |

клинические симптомы гиперпаратиреоза не были выявлены ни в одном случае. Дисфункция аллотрансплантата в разные сроки наблюдения потребовала возобновления пероральной заместительной терапии витамином Д3 и элементарным кальцием до первоначальных значений, но, в то же время, не явилась основанием для парентерального введения солевых растворов кальция.

Ультразвуковая доплерография, выполненная через 12 месяцев после операции, подтвердила проходимость глубокой бедренной артерии в месте имплантации капсулы с паратироцитами без существенных нарушений гемодинамики (рис. 5).

Поскольку большинством авторов в качестве места паратиреоидной ауто- и аллотрансплантации использовались мышцы предплечья, был предложен еще один объективный критерий функционирования трансплантата – Casanova тест, заключающийся в проведении сравнительного анализа между уровнями сывороточного паратгормона на предплечье с трансплантатом и без него [12], при этом градиент концентрации в 1,5 и более раза свидетельствовал об удовлетворительной функции пересаженной паратиреоидной ткани. Изученный нами Casanova тест у двух пациентов с длительно функционирующим аллотрансплантатом (6 и 12 месяцев) через 1 месяц после пересадки составил 1,1 и 1,2 соответственно. Ве-

Рис. 5. Ультрасонограмма бедренных артерий. Стрелками обозначена глубокая бедренная артерия с трансплантатом



роятной причиной столь низких показателей градиента концентрации паратгормона можно считать невозможность корректного воспроизведения описанного теста в случае трансплантации паратироцитов в глубокую бедренную артерию, поскольку забор крови для исследования производили на значительном удалении от клеточного трансплантата (поверхностные вены стопы) в отсутствие редукции венозного оттока путем наложения манжетки сфигмоманометра. В то же время, повышение концентрации паратгормона (14,4 [12,4-21,1] пг/мл) в системном кровотоке и нормокальциемия (2,03 [1,96-2,09] ммоль/л), наряду с отсутствием (в одном случае) или снижением потребности в витамин Д3- и кальций-содержащих лекарственных средствах (15 [8,75-22,5] мкг и 1500 [875-2250] мг соответственно), свидетельствовали о функционировании аллотрансплантата.

До настоящего времени не разработан воспроизводимый метод «успешной» паратиреоидной аллотрансплантации без применения иммуносупрессии реципиента, а клинические результаты подобных пересадок по-прежнему остаются неудовлетворительными и в литературе представлены немногочисленными сообщениями в виде случаев из практики (case report) [13]. Несколько экспериментальных работ были посвящены изучению иммунологической привилегированности передней камеры глаза, капсулы почки, желудочков головного мозга при аллотрансплантации эндокринной ткани [14]. Однако разработанные локусы для пересадки невозможно использовать в клинических целях вследствие высокой травматичности операции и риска серьезных послеоперационных осложнений. Разработанный нами метод паратиреоидной аллотрансплантации позволил избежать указанных проблем и, вместе с тем, подтвердить гипотезу о принадлежности артериального пространства к иммунологически выгодным средам [7].

С целью увеличения сроков функционирования аллотрансплантата предпринимались попытки краткосрочной иммуносупрессии циклоспорином А, предтрансплантационного культивирования в атмосфере 5% CO₂ и рентгеновского облучения трансплантата [15]. В последующем I. Nawrot et al. [3] отказались от проведения иммуносупрессии, поскольку у

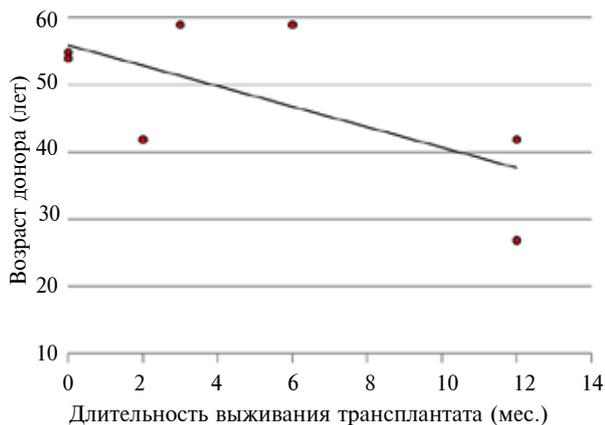


Рис. 6. Корреляционная зависимость длительности функционирования аллотрансплантата от возраста донора ($r_s = -0,36$; $p = 0,43$)

большинства пациентов развитие дисфункции трансплантата не было связано с какой-либо конкретной причиной, в том числе иммунным ответом, в то время как циклоспорин вызывал серьезные побочные эффекты. В настоящее время авторы проводят проспективное исследование по изучению эффективности локальной иммуносупрессии такролимусом, которая, по их мнению, позволит сократить или уменьшить степень выраженности побочных эффектов, наблюдаемых при пероральном или внутривенном введении иммуносупрессантов.

В своем составе нормальная параситовидная железа содержит 60% эндокринных клеток и 30% – сосудистых эндотелиальных, окруженных 10% жировой и фиброзной ткани, при этом лимфоциты и макрофаги встречаются только в просвете сосудов. Для фенотипа паратироцитов характерна слабая степень экспрессии HLA-антигенов I класса, в то время как, компоненты стромы обладают суперэкспрессией HLA-антигенов II класса (30% – нормальная и > 50% гиперплазированная паратироидная ткань). Собственные результаты подтвердили данные других исследований о наибольшей ростовой активности культивируемых *in vitro* паратироцитов, полученных из ткани параситовидных желез с диффузной гиперплазией. Идея использования паратироцитов из гиперплазированной паратироидной ткани возникла у нас на основании сообщений, указывающих на наличие резерва клеток в любом функционирующем органе, который способен заместить утраченные в результате апоптоза клетки.

Вполне логичное предположение о большей целесообразности использования параситовидных желез, полученных от молодых доноров, нашло свое подтверждение в прове-

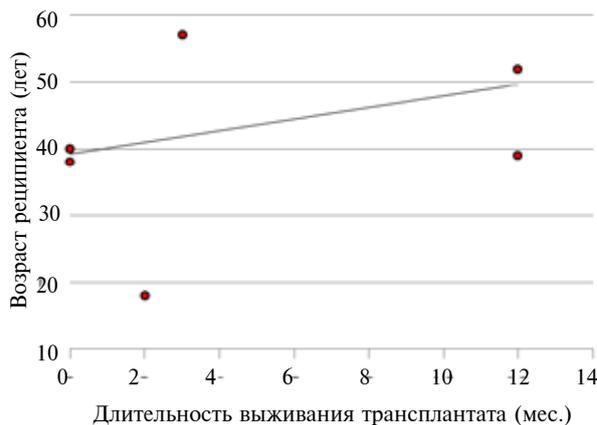
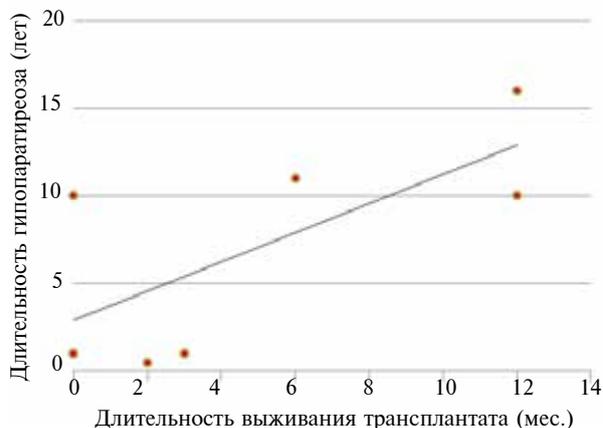


Рис. 7. Корреляционная зависимость длительности функционирования аллотрансплантата от возраста реципиента ($r_s = 0,40$; $p = 0,37$)

денном исследовании (рис. 6). Возраст реципиента не оказывал влияния на сроки функционирования трансплантата (рис. 7), в то время как, у пациентов с более длительным анамнезом гипопаратиреоза результаты паратироидной аллотрансплантации были лучше (рис. 8). Более длительная (12 месяцев) секреторная активность паратироидного аллотрансплантата была отмечена у двух пар реципиент/донор с фенотипом группы крови В(III)/О(I). В то же время, I. Nawrot et al. [3] не выявили влияния возраста доноров на выживаемость аллотрансплантата ($p < 0,11$), однако минимальные и максимальные сроки его функционирования наблюдались в случаях совпадения фенотипа группы крови О (I) и А(II) соответственно ($p < 0,086$ и $p < 0,118$). Таким образом, возраст донора не является единственным фактором, определяющим жизнеспособность трансплантата. Пролонгации функциональной активности трансплантата может способствовать повышение жизнеспособности культивируемых

Рис. 8. Корреляционная зависимость сроков функционирования аллотрансплантата от длительности гипопаратиреоза ($r_s = 0,60$; $p = 0,15$)



паратироцитов путем предупреждения их старения. В то же время, полученные нами результаты носят недостоверный характер, что связано с неоднородностью исследуемой группы и небольшим количеством реципиентов.

Другим фактором, детерминирующим выживаемость трансплантата, является клеточная адгезия. В нормальной паращитовидной железе каждый слой клеток окружен капиллярной сетью. В популяции культивированных *in vitro* клеток отмечалась тенденция к высокой степени адгезии, однако, *in vivo* их жизнеспособность зависела от скорости неоваскуляризации трансплантата [3]. Паратироциты, не получавшие достаточной нутритивной поддержки из кровеносного русла, формировали агрегаты размером 1000 мкм, что приводило к их гибели в результате метаболического голодания. Подтверждением тому являются результаты собственных экспериментальных исследований, свидетельствующие о важной роли перикапсулярного аваскулярного фиброза, который оказывал существенное влияние на функциональную активность и выживаемость инкапсулированного трансплантата. Гибель определенной части клеток наступала в так называемый период «нутритивного голода» — когда диффузионное питание трансплантата уже невозможно из-за развившегося фиброза капсулы, а его неоваскуляризация еще не наступила [7].

Большинством авторов донорская паратиреоидная ткань, предназначенная для трансплантации, подвергалась замораживанию и хранению в жидком азоте в течение 6 и более месяцев, после чего ее размораживали и культивировали [5]. Мы же использовали опыт польских коллег [3], по мнению которых, предварительное культивирование «свежих» паращитовидных желез с последующей криоконсервацией выделенных паратироцитов позволяет улучшить результаты клинической аллотрансплантации.

Тщательный анализ полученных нами данных, к сожалению, не выявил достоверных прогностических факторов, влияющих на выживаемость аллогенных паратироцитов. Возможно, для этого потребуются проведение дополнительных исследований, направленных на установление более сложных иммунологических феноменов, определяющих жизнеспособность пересаженных клеток. Например, необходимо выяснить роль реэкспрессии HLA-антигенов I класса имплантированных паратироцитов в развитии реакции отторжения в отдаленном периоде. В то же время, результаты экспериментальной ксенотрансплантации человеческих паратироцитов в

брюшную полость мышам показали возможность длительного (15 месяцев) сохранения их эндокринной функции в отсутствие реакции отторжения [15]. По мнению авторов, предварительное культивирование паратиреоидной ткани и введение анти-CD4 моноклональных антител приводит к элиминации антигенов на поверхности паратироцитов. Как показали I. Nawrot et al. [3], ре-аллотрансплантация паратироцитов, полученных от того же донора, являлась весьма эффективной, что косвенно свидетельствовало об отсутствии иммунизации организма реципиента к донорским антигенам после первой трансплантации.

Заключение

Проведенное исследование свидетельствует о том, что у некоторых пациентов с гипопаратиреозом, развившимся после операций на щитовидной железе, паратиреоидная аллотрансплантация является эффективной терапевтической альтернативой стандартным методам лечения. Следует отметить, что, несмотря на аллогенный характер трансплантации, в послеоперационном периоде пациенты не нуждались в иммуносупрессии. Изучение секреции паратгормона позволило подтвердить очевидную, хотя и транзиторную, функциональную активность пересаженных аллогенных паратироцитов более чем у половины пациентов. Возраст доноров и реципиентов, продолжительность гипопаратиреоза не оказывали существенного влияния на длительность функционирования трансплантата.

Наряду с невысокой травматичностью оперативного вмешательства и возможностью его выполнения в большинстве хирургических стационаров, дополнительным преимуществом разработанного метода является возможность проведения повторных пересадок в случае снижения функциональной активности паратиреоидного трансплантата. Дальнейшего изучения требуют вопросы, касающиеся пористости, биосовместимости и длительной стабильности микропористых мембран, а также необходимости HLA- и ABO-типирования парадонор-реципиент и потребности в иммуносупрессии.

ЛИТЕРАТУРА

1. Hypocalcemia following thyroid surgery: incidence and prediction of outcome / F. Pattou [et al.] // *World J Surg.* — 1998 Jul. — 22, N 7. — P. 718–24.
2. The allografted parathyroid gland: evaluation of function in the immunosuppressed host / S. A. Wells [et al.] // *Ann Surg.* — 1974 Dec. — Vol. 180, N 6. — P. 805–13.

3. Allograft transplantation of cultured parathyroid progenitor cells without immunosuppression: clinical results / I. Nawrot [et al.] // *Transplantation*. – 2007 Mar 27. – Vol. 83, N 6. – P. 734–40.
4. Simultaneous kidney-parathyroid allotransplantation from a single donor after 20 years of tetany: a case report / T. Chapelle [et al.] // *Transplant Proc.* – 2009 Mar. – Vol. 41, N 2. – P. 599–600.
5. Viability of cryopreserved parathyroid tissue: when is continued storage versus disposal indicated? / M. A. Guerrero [et al.] // *World J Surg.* – 2008 May. – Vol. 32, N 5. – P. 836–39.
6. Culture of human parathyroid cells for transplantation / K. Tsuji [et al.] // *Transplant Proc.* – 1999 Nov. – Vol. 31, N 7. – P. 2697.
7. Long-term preservation of vitality of xenogenic thymocytes in the recipient after their transplantation into the blood stream / S. Tretyak [et al.] // *Adv Med Sci.* – 2008. – Vol. 53, N 1. – P. 76–9.
8. Different pathological findings in each of four parathyroid glands in a long-standing hemodialysis patient / T. Kuji [et al.] // *Clin Nephrol.* – 2000 Nov. – Vol. 54, N 5. – P. 413–17.
9. Cell culture preparation of human parathyroid cells for allotransplantation without immunosuppression / B. Woniewicz [et al.] // *Transplant Proc.* – 1996 Dec. – Vol. 28, N 6. – P. 3542–44.
10. Murray H. E. Preservation of glucose responsiveness in human islets maintained in a rotational cell culture system / H. E. Murray, M. B. Paget, R. Downing // *Mol Cell Endocrinol.* – 2005 Jun 30. – Vol. 238, N 1-2. – P. 39–49.
11. Walker G. M. Microenvironment design considerations for cellular scale studies / G. M. Walker, H. C. Zeringue, D. J. Beebe // *Lab Chip.* – 2004 Apr. – Vol. 4, N 2. – P. 91–97.
12. Lo C. Y. Parathyroid autotransplantation during thyroidectomy: documentation of graft function / C. Y. Lo, S. C. Tam // *Arch Surg.* – 2001 Dec. – Vol. 136, N 12. – P. 1381–85.
13. Survival of macroencapsulated allogeneic parathyroid tissue one year after transplantation in nonimmunosuppressed humans / A. Tibell [et al.] // *Cell Transplant.* – 2001. – Vol. 10, N 7. – P. 591–99.
14. Lee M. K. Cell transplantation for endocrine disorders / M. K. Lee, Y. H. Bae // *Adv Drug Deliv Rev.* – 2000 Aug 20. – Vol. 42, N 1-2. – P. 103–20.
15. Experimental parathyroid transplantation: human parathyroid grafts survived and functioned in mice treated with anti-CD4 monoclonal antibody / M. Niimi [et al.] // *Biomed Pharmacother.* – 2000 Jun. – Vol. 54. – Suppl. 1. – P. 80s–82s.

Адрес для корреспонденции

220116, Республика Беларусь,
г. Минск, пр-т Дзержинского, д. 83,
УО «Белорусский государственный
медицинский университет»,
2-я кафедра хирургических болезней,
тел.раб.: + 375 17 287-86-52,
факс: + 375 17 201-91-60,
e-mail: vladimirkh77@mail.ru,
Хрыщанович Владимир Янович

Сведения об авторах

Хрыщанович В.Я., к.м.н., доцент 2-й кафедры хирургических болезней УО «Белорусский государственный медицинский университет».
Третьяк С.И., д.м.н., профессор, заведующий 2-й кафедрой хирургических болезней УО «Белорусский государственный медицинский университет».
Харламова А.Н., научный сотрудник научно-исследовательской части УО «Белорусский государственный медицинский университет».
Кондратович В.А., заместитель главного врача УЗ «Минский городской клинический онкологический диспансер».

Писаренко А.М., заведующий отделением опухолей головы и шеи УЗ «Минский городской клинический онкологический диспансер».
Кузьменкова Е.И., к.м.н., заведующая эндокринологическим отделением ГУ «Республиканский центр медицинской реабилитации и бальнеолечения».
Романович А.В., врач-ангиохирург УЗ «4-я городская клиническая больница им. Н.Е. Савченко».
Большов А.В., к.м.н., ассистент 2-й кафедры хирургических болезней УО «Белорусский государственный медицинский университет».

Поступила 9.09.2013 г.