

*С.И. Третьяк, В.Я. Хрыщанович, М.К. Недзьведзь, В.А. Горанов, А.В. Романович*

## **МОРФОМЕТРИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ТИРЕОИДНОГО КСЕНОТРАНСПЛАНТАТА ПОСЛЕ ИМПЛАНТАЦИИ В АРТЕРИАЛЬНОЕ СОСУДИСТОЕ РУСЛО**

*Белорусский государственный медицинский университет*

---

*Проведена серия экспериментов по ксенотрансплантации тироцитов в артериальное сосудистое русло. Показана возможность длительного сохранения тиреоидного ксенотрансплантата в организме реципиента. Доказана эффективность использования морфометрического анализа в комплексной оценке жизнеспособности пересаженной культуры тироцитов.*

---

**М**ногочисленными исследованиями экспериментально и клинически была показана эффективность при послеоперационном гипотиреозе аллотрансплантации щитовидной железы на сосудистых связях, свободной пересадки тиреоидной ткани, криоконсервированной щитовидной железы, аллогенной трансплантации культуры тироцитов в подкожную клетчатку, мышцы, под капсулу почки, печени, селезенки и в порталную систему [2, 3, 4, 7, 9].

Мы пошли по пути использования ксеногенных источников донорской тиреоидной ткани, иммобилизованной в полупроницаемую капсулу и помещенную в артериальное сосудистое русло, что позволило избежать целого ряда проблем, сопряженных с аллотрансплантацией щитовидной железы: правовых, технических, морально-этических, религиозных, дефицита аллогенного донорского материала, необходимости пожизненной иммуносупрессивной терапии [13, 14]. В

этом аспекте экспериментальное изучение жизнеспособности и секреторной активности тиреоидного ксенотрансплантата с помощью объективных методов исследования является не только актуальным, но и необходимым этапом разработки данного направления. Одним из таких методов в экспериментальной и клинической трансплантологии является морфометрическое исследование, которое позволяет определить в динамике относительные объемы компонентов трансплантата, площадь поверхности и количество структурно-функциональных единиц, их распределение по размерам [1, 6]. Характеризуя реальные взаимоотношения в трехмерном пространстве на различных уровнях организации трансплантата щитовидной железы, морфометрический метод дает наиболее объективную качественную и гистоколичественную оценку состояния пересаженной тиреоидной ткани. Более широкое и целенаправленное использование гистоколичественного анализа в тканевой и клеточной трансплантологии при адекватной математической обработке может быть ключом в решении вопроса о необходимом количестве трансплантационного материала для полноценной компенсации эндокринной недостаточности у реципиента [12, 15].

#### Материал и методы

Исследования были выполнены на экспериментальной модели «кролик-собака». Все исследования проводились согласно разрешению этического комитета. Экспериментальную модель первичного гипотиреоза воспроизводили путем тотальной тиреоидэктомии. 16 беспородным собакам массой 12-16 кг, находящихся на стандартном питании под внутривенной анестезией 1% раствором тиопентала натрия в дозе  $70,0 \pm 2,0$  мг/кг было выполнено тотальное удаление щитовидной железы. Культуру тироцитов для пересадки получали от плодов кроликов третьего триместра беременности по методикам Korsgren O. et al. и Блюмкина В.Н. [10, 11]. Перед трансплантацией суспензию тироцитов помещали в синтетическую микропористую капсулу из производных полиамида размером  $0,5 \times 3$  см с диаметром пор 1-2 м [8]. 11 животным макрокапсула была имплантирована в просвет брюшного отдела аорты, 5 собакам – в бедренную артерию, используя аутовенозную ангиопластику для увеличения просвета сосуда. Забор материала для морфологического исследования (макрокапсула с культурой тироцитов и фрагмент аорты или бедренной артерии) производили через 7, 14, 30, 35 дней, 3 месяца и 6 месяцев. Препараты фиксировали в 10% растворе нейтрального формалина с последующей окраской препаратов гематоксилин-эозином, по Ван Гизону и MSB. Световая микроскопия и микрофото выполнялись с помощью программного аппаратного комплекса «Leika DMLS-Qwin» («Leika», Germany). Морфометрический анализ выполнялся в лаборатории компьютерных технологий ЦНИЛ БГМУ при помощи программно-аппаратного комплекса «Bioscan-NT». Оценивали следующие параметры: наличие тиреоидных фолликулов и их функциональный статус (размеры фолликулов, количество коллоида, высоту эпителия), развитие фиброзной ткани и наличие клеточной инфильтрации в тканевом ложе трансплантата. Статистический анализ полученных результатов проводился на персональном компьютере с использованием программы STATISTICA (версия 6.0) [5].

#### Результаты и обсуждение

Донорская щитовидная железа была представлена фолликулами округлой и овальной формы различных размеров, стенка их была построена из уплощенного кубического эпителия. В отдельных фолликулах определялся темно-окрашенный коллоид. Для нормального гистологического стро-

ения фолликулов щитовидной железы плода кролика были характерны следующие морфометрические параметры: площадь  $2394 \pm 80,15$  мкм<sup>2</sup>, периметр  $180,83 \pm 3,05$  мкм; площадь коллоида  $1260 \pm 59,25$  мкм<sup>2</sup>, индекс Klein's –  $55,74 \pm 0,92$  мкм, индекс накопления коллоида  $3,12$ . Большинство фолликулов имели не сильно вытянутую овальную форму, коэффициент элонгации составил  $1,37 \pm 0,02$ . Средняя высота тиреоидного эпителия составляла  $8,92 \pm 0,22$  мкм, площадь ядер –  $44,65 \pm 1,44$  мкм<sup>2</sup>, показатель ядерно-цитоплазменного отношения –  $1:0,30$ . Тироциты имели овальную форму с коэффициентом элонгации  $1,45 \pm 0,04$ , площадь –  $148,82 \pm 5,44$  мкм<sup>2</sup> и средним диаметром  $14,57 \pm 0,25$  мкм.

При морфометрическом исследовании препаратов на 7 сутки после пересадки обнаружили значительное увеличение размеров фолликулов: площадь –  $19655 \pm 4570$  мкм<sup>2</sup>, периметр –  $474,23 \pm 56,34$  мкм, индекс Klein's –  $143,67 \pm 17,05$  мкм. Форма фолликулов оставалась прежней (коэффициент элонгации –  $1,49 \pm 0,06$ ), индекс накопления коллоида увеличился до  $7,42$ , площадь и периметр коллоида – до  $16292 \pm 4373$  мкм<sup>2</sup> и  $428,01 \pm 62,45$  мкм соответственно. Указанные изменения фолликулов можно связать с нарушением процессов резорбции коллоида и стрессовым снижением функциональной активности трансплантата. Анализ популяции тироцитов выявил некоторые изменения их структуры. При средней высоте эпителиальных клеток в  $9,68 \pm 0,42$  мкм происходило уменьшение их площади с  $148,82 \pm 5,44$  до  $137,96 \pm 5,10$  мкм<sup>2</sup> и увеличение коэффициента элонгации с  $1,45 \pm 0,04$  до  $1,74 \pm 0,08$  (форма тироцитов стала более уплощенной). Кариометрический анализ выявил значительное уплощение ядер (коэффициент элонгации –  $1,85 \pm 0,17$ ) и умеренное увеличение их площади с  $44,65 \pm 1,44$  до  $49,72$  мкм<sup>2</sup>. Кроме того, наблюдалось незначительное изменение ядерно-цитоплазменного отношения. Морфометрический анализ свидетельствовал о наличии перестройки тиреоидного ксенотрансплантата, характеризующей некоторое снижение его активности и адаптацию к новым условиям функционирования.

Через 14 суток после пересадки анализ морфометрических данных показал, что в трансплантате произошли значительные структурные изменения. Эти изменения проявлялись в заметном уменьшении площади фолликулов и коллоида (на  $66,71\%$  и  $80,06\%$  соответственно) по сравнению с 7-суточным трансплантатом. Форма фолликулов становилась более вытянутой. Подобные изменения связаны с резорбцией коллоида из фолликулов, о чем свидетельствует снижение индекса накопления коллоида (до  $3,04$ ). Подобные изменения в фолликулах связаны с улучшением условий для выведения гормонов. Гистограммные и информационные характеристики организации популяций фолликулов щитовидной железы, характеризующие их распределение по форме, периметру, диаметру и площади сечения, демонстрировали определенные сдвиги, отражавшие перестройку популяционной структуры системы фолликулов. Анализ популяции тироцитов выявил некоторые изменения в их структуре. При сохранении средней площади эпителиальных клеток ( $145,06 \pm 3,82$  мкм<sup>2</sup>) наблюдалось увеличение их высоты с  $9,68 \pm 0,42$  мкм<sup>2</sup> до  $14,77 \pm 0,34$  мкм<sup>2</sup>, что свидетельствовало о достаточной активности клеточного метаболизма. В тироцитах фолликулов щитовидной железы на 14-й день после ксенотрансплантации имело место изменение формы ядер, они становились шарообразными (элонгация приблизилась к  $1,59 \pm 0,04$ ). Размеры ядер остались прежними: площадь –  $49,66 \pm 1,82$  мкм<sup>2</sup>, периметр –  $28,05 \pm 0,51$  мкм. Ядерно-цитоплазменное отноше-

ние тироцитов уменьшилось до 1:0,34. Таким образом, через 14 суток после пересадки данные морфометрического анализа указывали на наличие существенной перестройки в трансплантате на тканевом и клеточном уровнях (уменьшение площади фолликулов и коллоида, снижение индекса накопления коллоида, изменение формы фолликулов, увеличение высоты тиреоидного эпителия), что позволило сделать заключение о начале стабилизации функциональной активности фолликулов после своеобразного посттрансплантационного периода адаптации.

При морфометрическом анализе через 30 суток после пересадки не было отмечено значительных изменений структурных компонентов трансплантата. Значения площади и периметра фолликулов увеличились с  $6544 \pm 409,04$  до  $10694 \pm 1365$  мкм<sup>2</sup> и с  $299,47 \pm 9,35$  до  $377,7 \pm 23,01$  мкм соответственно. Индекс накопления коллоида увеличился на 42,75%. Форма фолликулов не претерпела изменений (коэффициент элонгации  $1,54 \pm 0,07$ ). Фолликулярный эпителий имел среднюю высоту  $10,69 \pm 0,20$  мкм и был представлен как светлыми, так и изредка встречающимися темными клетками. В популяции тироцитов через 30 суток после пересадки выявлялось изменение формы ядер, которые имели более округлую форму и меньшую гетерогенность в сравнении с предыдущими сроками наблюдения. Размеры ядер уменьшались незначительно, о чем свидетельствовали показатели их площади и периметра. Обращало на себя внимание различие в показателях ядерно-цитоплазматического отношения (1:0,51), что свидетельствовало о менее интенсивных процессах метаболизма, протекающих в эпителиальных клетках трансплантата. Следовательно, по данным морфометрического исследования на уровне фолликулов (форма, размеры фолликулов, индекс накопления коллоида), а также на уровне тироцитов (округлые, сохранившие прежние размеры ядра) можно утверждать о достаточной функциональной активности трансплантата.

Через 35 суток после пересадки данные морфометрического исследования свидетельствовали о высокой функциональной активности трансплантата. Было отмечено некоторое уменьшение площади, индекса Klein's и периметра фолликулов (на 24,66%, 14,26% и 13,49% соответственно) по сравнению с предыдущим периодом наблюдения. Индекс накопления коллоида претерпел незначительные изменения и составил 3,44. Снижение площади коллоида на 45,41% объяснялось усиленной его резорбцией, что указывало на повышение функциональной активности трансплантата. Кариометрическое исследование тироцитов также подтверждало наше предположение об интенсификации процессов метаболизма тиреоидных гормонов в трансплантате. Отмечалось увеличение высоты фолликулярного эпителия на 33,77% и площади тироцитов более чем в два раза. Форма и размеры ядер существенно не изменялись. Важным критерием, отражающим высокий уровень метаболических процессов в тироцитах, было изменение ядерно-цитоплазматического отношения, которое составило 1:0,19.

Через 3 месяца после пересадки организация фолликулов трансплантата мало чем отличалась от донорской щитовидной железы, различия были отмечены только на клеточном уровне. Обращало на себя внимание увеличение индекса накопления коллоида до 6,46. Кариометрическое исследование выявило значительное уменьшение площади ядер с  $47,78 \pm 1,68$  до  $7,35 \pm 0,32$  мкм<sup>2</sup>, что наряду со снижением высоты фолликулярного эпителия до  $4,89 \pm 0,11$  мкм и площади тироцитов до  $43,86 \pm 1,72$  мкм<sup>2</sup> свидетельствовало о замедлении процессов метаболизма, протекающих в эпителиальных клетках трансплантата.

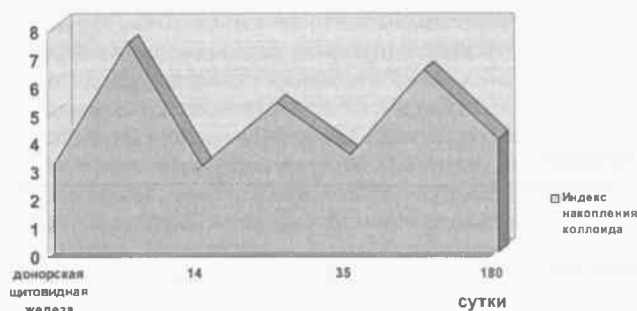


Рис. 1. Индекс накопления коллоида в фолликулах трансплантатов щитовидной железы

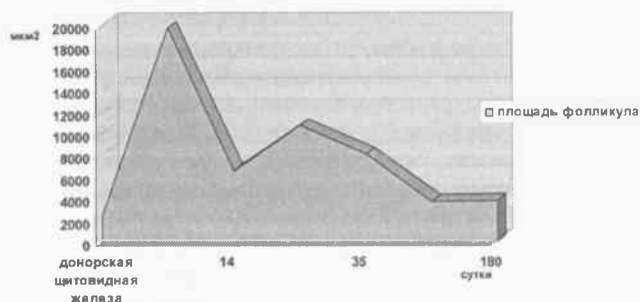


Рис. 2. Площадь фолликулов в трансплантатах щитовидной железы

Морфометрический анализ, проведенный через шесть месяцев после пересадки, не выявил значительных отличий в организации популяционной структуры фолликулов тиреоидного трансплантата от донорской щитовидной железы. Только показатели диаметра, периметра и площади сечения фолликулов превышали контрольные, соответственно, на 22,71%, 28,62% и 58,86%. По данным кариометрического исследования ядра тироцитов становились более округлыми (элонгация уменьшилась на 8,28%). Другие параметры кариометрического исследования свидетельствовали об уменьшении площади и периметра ядер, соответственно, на 54,29% и 33,19% по сравнению с аналогичными параметрами донорской щитовидной железы. При этом уменьшался показатель ядерно-цитоплазматического отношения, что говорило о снижении метаболической активности тироцитов. Показатели высоты фолликулярного эпителия, площади и периметра тироцитов практически не отличались от таковых донорской щитовидной железы. По данным морфометрического исследования, наблюдалось восстановление и сохранение органной структуры пересаженной культуры тироцитов и ее функции. Некоторые изменения ее морфофункциональных показателей можно было связать с нахождением трансплантата в особых условиях.

Данные гистологического исследования трансплантатов показали, что на протяжении исследованных сроков в пересаженной культуре тироцитов происходили структурные изменения на уровне фолликулов и их популяций, и на уровне тироцитов и их ядер. Каждому периоду наблюдения соответствовала своеобразная структурная перестройка трансплантата, что нашло свое отражение в морфометрических показателях. Так, в ранние сроки после пересадки наблюдалось значительное увеличение индекса накопления коллоида. В остальные сроки его параметры практически соответствовали показателям донорской щитовидной железы, и лишь только к 3 месяцам наблюдалось его некоторое увеличение (рис. 1).

Определенные изменения наблюдались и на уровне фолликулов. В течение первых дней после трансплантации

средняя площадь фолликулов была значительно выше контрольных значений (рис. 2). Через 2 недели в трансплантах появлялись фолликулы различных размеров, с тенденцией уменьшения средней их площади. Средняя площадь фолликулов приближалась к значениям донорской щитовидной железы к 6 месяцам после трансплантации. Аналогичные изменения наблюдались с показателями среднего диаметра и периметра фолликулов.

Косвенным критерием в оценке функциональной активности щитовидной железы может служить и количество коллоида в просвете фолликула, о котором мы судили, анализируя площадь и периметр просвета фолликула. Так, к 14 суткам после трансплантации наблюдалось уменьшение площади и периметра коллоида, что свидетельствовало об интенсивных процессах резорбции и секреции тиреоидных гормонов. Показатели просвета фолликулов, близкие к донорской щитовидной железе, были достигнуты к 6 месяцам после пересадки (рис. 3).

В ранние сроки после пересадки отмечалось увеличение высоты фолликулярного эпителия, которое сохранялось на протяжении 35 суток. Затем наблюдалось ее снижение, но к 6 месяцам после трансплантации были достигнуты показатели близкие к контрольным (рис. 4). Определение средней высоты тиреоидного эпителия используется как один из главных морфометрических критериев при определении функционального состояния щитовидной железы [6]. Установлена высокая степень корреляции между высотой эпителия и скоростью тиреоидной секреции. В клетках разной высоты обнаружены различия в интенсивности гистохимических реакций. В то же время высота клеток не связана с размерами фолликула.

При кариометрическом исследовании тироцитов в ранние сроки после трансплантации отмечалось некоторое увеличение площади ядер, однако к 3 месяцам после пересадки их размеры значительно уменьшились (рис. 5). Как следует из приведенных данных, в ранние сроки после трансплантации имело место усиление метаболических процессов, которые затем сменялись его снижением, что связано с адаптацией трансплантатов к новым условиям.

Проведенные морфометрические исследования позволяют сделать заключение о том, что пересаженная макроинкапсулированная культура тироцитов не только сохраняет свою структуру, но и активно функционирует через 6 и более месяцев после пересадки, в посттрансплантационном периоде тиреоидный ксенотрансплантат проходит стадии адаптации, неогисто- и неоорганогенеза. Следует отметить, что сохранение и функционирование культуры тироцитов в просвете артерии в указанные сроки по морфологическим и морфометрическим изменениям не имеет тенденции к их разрушению, отторжению и гибели. Этот факт дает нам основание говорить о том, что предел возможных сроков функционирования пересаженной тиреоидной ткани по разработанной методике значительно больше.

#### Выводы

1. Длительное выживание трансплантата (6 и более месяцев), высокая функциональная активность культуры тироцитов дают основание считать ксенотрансплантацию реальной альтернативой аллотрансплантации в лечении больных с первичным гипотиреозом. Возможность неограниченных поставок ксеногенной эндокринной ткани позволяет преодолеть дефицит аллогенного донорского материала и создать банк культуры тироцитов.

2. Формирование гистологической структуры, подобной фолликулам щитовидной железы с клеточной организацией свидетельствует о возможности формирования биоис-

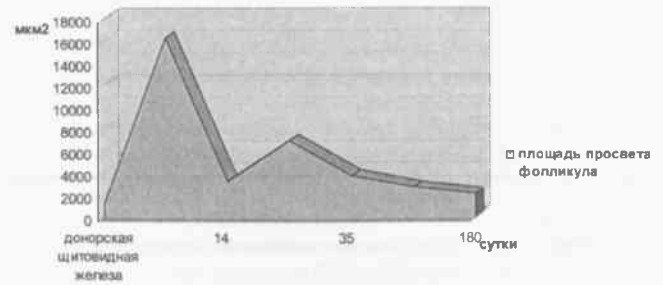


Рис. 3. Площадь просвета фолликулов в трансплантах щитовидной железы

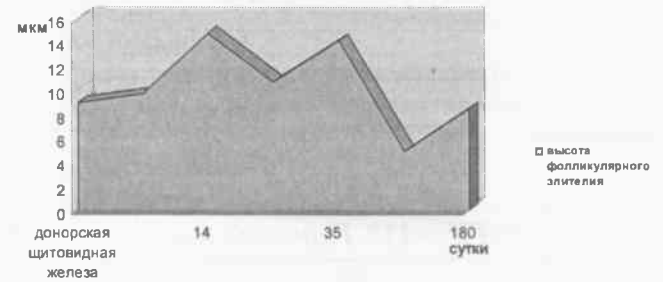


Рис. 4. Высота фолликулярного эпителия в трансплантах щитовидной железы

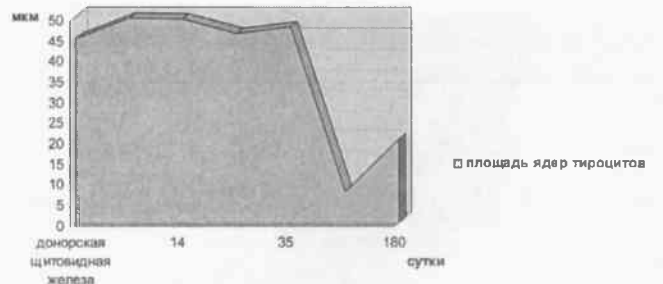


Рис. 5. Площадь ядер тироцитов в трансплантах щитовидной железы

кусственной щитовидной железы.

3. Для оценки жизнедеятельности пересаженной культуры тироцитов применение морфометрического метода исследования позволяет получить объективную и достоверную информацию.

#### Литература

- Арбузов, А.И. Гистоколичественный метод определения основных компонентов щитовидной железы по срезу // Сов. здравоохранение Киргизии. – 1965.-№2. – С. 194-195.
- Асляев, Л.А. Морфологические изменения трансплантатов щитовидной железы при различных способах ее пересадки // Третья Всесоюз. конф. по пересадке тканей и органов: Тез. докл. конф. – Ереван, 1963. – С. 36.
- Аутоимплантация криоконсервированной (-196°C) тиреоидной паренхимы как метод лечения послеоперационного гипотиреоза / Н.С.Пушкар, В.А.Македонская, А.М.Утевский и др. // Пробл. эндокринологии. – 1984.-№5. – С. 42-46.
- Бредихин, Т.Ф. Эффективность пересадки щитовидной железы в переднюю камеру глаза // Бюл. эксперим. биологии и медицины. – 1962. – Т. 53, № 3. – С. 92-96.
- Боровиков, В.П., Боровиков, И.П. STATISTICA-Статистический анализ и обработка данных в среде Windows.-М.:Информационно-издательский дом «Филинь», 1997.-608 с.
- Быков, В.Л. Стереологический анализ щитовидной железы: (обзор методов) // Арх. анатомии, гистологии и эмбриологии. – 1979.-№7. – С. 98-106.
- Исмаилов, С.И., Нугманова, Л.Б., Расулов, С.Ф. Ауто- и аллотрансплантация криоконсервированной тиреоидной паренхимы как радикальный метод лечения послеоперационного гипотиреоза // Современные

## ☆ Новые технологии в медицине

проблемы экспериментальной и клинич. эндокринологии: Тез. докл. IV съезда эндокринол. Укр. ССР – Киев, 1987. – С. 159-160.

8. Ксенотрансплантация культуры  $\beta$ -клеток в лечении инсулинзависимого сахарного диабета / А.В.Прохоров, С.И.Третьяк, В.А.Горанов и др. // Бел. мед. журн. – 2002.-№1. – С. 34-37.

9. Некоторые показатели клеточного и гуморального иммунитета у больных после аллотрансплантации щитовидной железы на сосудистых связях / С.Н.Игнатенко, В.С.Сускова, Ю.В.Кипренский и др. // Трансплантация и искусственные органы: Науч. тр. / Под ред. В.И. Шумакова. – М., 1984. – С. 50-53.

10. Трансплантология (руководство для врачей) / Под общ. ред. В.И.Шумакова. – М.: Медицина, 1995. – 575 с.

11. Флотирующие культуры, полученные из щитовидной железы пло-

дов человека и животных / В.Н.Блюмкин, Р.А.Бабинова, Н.Н.Скалецкий и др. // Трансплантация и искусственные органы: Тр. / Под ред. В.И. Шумакова – М., 1986. – С. 92-94.

12. Domann, F.E., Mitchen, J.M., Clifton, K.H. Restoration of Thyroid Function after Total Thyroidectomy and Quantitative Thyroid Cell Transplantation // Endocrinology. – 1990.-Vol. 127, №6.-P. 2673-2678.

13. Goddard, M.J., Foweraker, J.E., Wallwork, J. Xenotransplantation — 2000 // J. Clin. Pathol.-2000. – Vol. 53, №6. – P. 44-48.

14. Hagan, P. Public Attitudes to Xenotransplantation Favor Cell Transplants Over Organs // Xenotransplantation. – 2003.-Vol. 10, №2. – P. 72.

15. The Influence of Donor and Recipient Age and Sex on the Quantative Transplantation of Monodispersed Rat Thyroid Cells / H.Watanabe, M.N.Gould, P.A.Mahler e.a. // Endocrinology. – 1983. – Vol. 112, №1. – P. 172-177.