

## Трансплантация криоконсервированного эндокринного материала как метод коррекции различных патологий у экспериментальных ЖИВОТНЫХ

Т.П. БОНДАРЕНКО, Н.М. АЛАБЕДАЛЬКАРИМ, Г.А. БОЖОК, Н.А. ВОЛКОВА, В.Д. УСТИЧЕНКО,  
И.И. САМЧЕНКО, В.В. СИРОТА

*Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, г. Харьков*

Более полувека в теоретической и практической биологии и медицине обсуждаются вопросы о возможности лечения эндокринопатий различной этиологии путем трансплантации клеточных и органотипических культур соответствующих эндокринных тканей [12]. Для этих целей в большинстве случаев используется нативный материал. Его применение имеет ряд ограничений, связанных, прежде всего, с невозможностью надежного тестирования трансплантационного материала, а также с необходимостью немедленного использования культуры сразу же после окончания их роста.

Достижения в области криоконсервирования биологических объектов позволяют успешно консервировать эндокринные ткани, в том числе и органотипические культуры надпочечников [4], щитовидной железы [9] и семенников [3]. Длительное хранение данных биологических объектов с сохранением их морфо-функциональных характеристик позволят не только надежно тестировать культуры на наличие инфекций, но и использовать его в широком временном интервале.

В последнее время среди описанных методов коррекции тиреоидной недостаточности, гипофункции надпочечников, семенников, бронхиальной астмы наряду с традиционными медикаментозными средствами, которые не всегда дают желательный результат, распространение получают методы алло- и ксенотрансплантации соответствующих органотипических культур из эндокринных органов. Ксенотрансплантация имеет ряд преимуществ, связанных с неограниченной доступностью трансплантационного материала. Однако, как и для аллотрансплантатов, дисфункция ксенографтов вследствие отторжения остается актуальной проблемой. Для увеличения продолжительности функционирования ксенотрансплантатов разрабатываются способы снижения их иммуногенности, в том числе посредством культивирования и криоконсервирования. [1].

Целью данной работы явился сравнительный анализ использования нативных и криоконсервированных органотипических культур из тканей

новорожденных поросят для коррекции ряда патологий: гипофункции семенников, надпочечников и щитовидной железы, бронхиальной астмы у экспериментальных животных (крысы, кролики, мыши).

### Материалы и методы

Органотипические культуры получали из тканей щитовидной железы (ОКЩЖ), надпочечников (ОКН) и семенников (ОКС) новорожденных поросят по методу [7], в условиях стерильного бокса с соблюдением всех правил асептики и антисептики. Трансплантатом служили 5-ти суточные нативные и криоконсервированные культуры. Культуры замораживали в присутствии димексида (ДМ) с использованием режимов криоконсервирования, разработанных для надпочечников [4], щитовидной железы [9], семенников [3]. Отогрев во всех случаях осуществляли на водяной бане при 37°C до появления жидкой фазы. ДМ удаляли 5-7-ми кратным отмыванием средой 199. Повторное культивирование криоконсервированных органотипических культур после замораживания и отогрева осуществляли по [2], как метод предтрансплантационной подготовки ксеногенного материала. Уровень тиреоидных гормонов определяли радиоиммунологическим методом при помощи наборов РИА Т3, Т4-СТ, согласно прилагаемой инструкции. Содержание тестостерона определяли радиоиммунологическим методом с использованием набора РИА СТ-тестостерон. Концентрацию гидрокортизона в плазме крови мышей после трансплантации ОКН определяли стандартным набором РИА-КОРТИЗОЛ-СТ.

Модель бронхиальной астмы у крыс формировали по методу [11], используя в качестве антигенов кристаллический овалбумин.

Недостаточность соответствующих эндокринных желез вызывали хирургическим путем или путем введения хлорида кадмия. Были исследованы следующие группы животных:

- крысы с андрогендефицитным состоянием;
- орхиэктомия по методу [5],
- токсический гипогонадизм, индуцированный хлоридом кадмия по схеме, предложенной в работе [10];

*Адрес для корреспонденции:* Бондаренко Т.П., Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, ул. Переяславская, 23, г. Харьков, Украина 61015; тел.: +38 (057) 373-30-07, факс: +38 (057) 373-30-84, e-mail: cryo@online.kharkov.ua

– тиреодную недостаточность кроликов моделировали посредством субтотальной тиреоидэктомии по методу [5, 6];

– супраренальную недостаточность у мышей формировали путем односторонней адреналэктомии.

Премедикацию крыс и кроликов проводили, комбинируя легкий эфирный наркоз и введение тиопентала (1мл раствора с концентрацией 4,5 мг/мл на 100г массы тела животного), удаление надпочечников у мышей осуществляли под кетамин-ксилазиновой анестезией.

Трансплантацию эндокринного материала кроликам и крысам проводили в холку в подкожный карман при помощи иглы Дюфо, а мышам – немедленно после адреналэктомии путем введения ксеногенного материала под почечную капсулу. Доза трансплантационного материала составляла 0,30-0,32г на 100 г массы тела животного. Гистологический анализ трансплантатов осуществляли по стандартной методике [8], окрашивали гематоксилином и эозином.

### Результаты и обсуждение

Ранее мы установили, что криоконсервированные по оптимальным программам органотипические культуры эндокринных желез сохраняют гистоструктуру, способность к базальной и стимулированной секреции. Это и послужило основой для использования криоконсервированного материала в качестве трансплантационного.

Минимальный уровень тестостерона у орхидектомированных животных регистрировался на 7 сутки, а с токсическим гипогонадизмом – минимальная концентрация андрогена регистрировалась на 21 сутки. К этому времени снижалась и масса семенников.

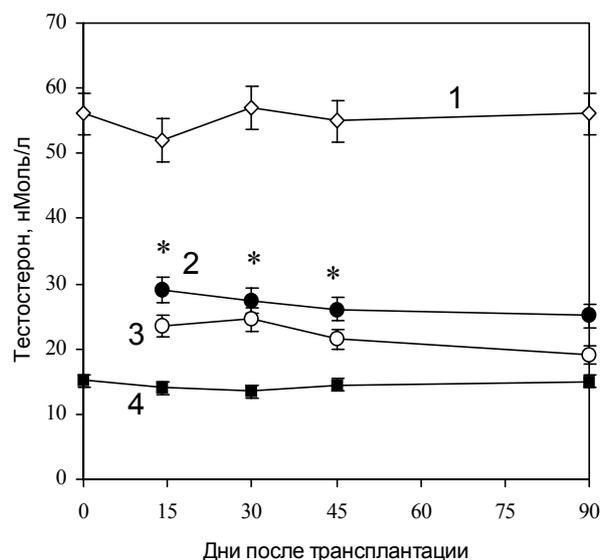
На рис. 1 представлены данные об уровне тестостерона в плазме крови животных в различные сроки после ксенотрансплантации нативных и криоконсервированных органотипических культур из семенников новорожденных поросят. Видно, что и нативный и криоконсервированный трансплантаты вызывали повышение уровня тестостерона в плазме крови реципиентов. Обращает на себя внимание тот факт, что криоконсервированный трансплантат оказывал по сравнению с нативным больший положительный эффект.

Кроме того, если после 45 суток с момента ксенотрансплантации нативного материала намечалась некоторая тенденция к снижению уровня тестостерона, то для криоконсервированного мы регистрировали стойкий эффект с 45 по 90 сутки (срок эксперимента).

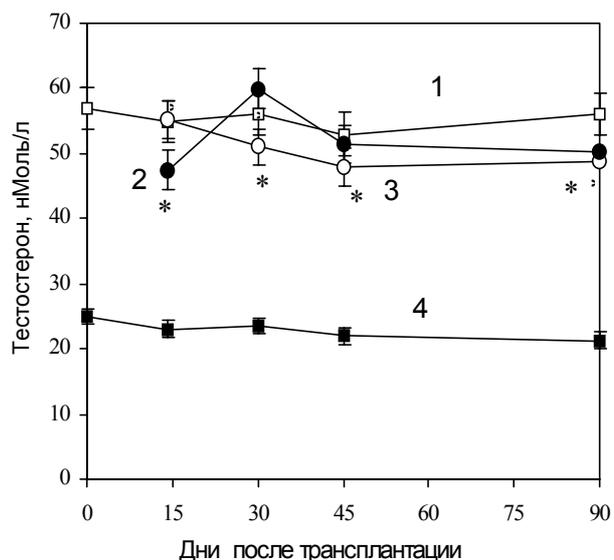
Результаты экспериментов, проведенные на животных с экспериментальным гипогонадизмом,

которым была осуществлена ксенотрансплантация, представлены на рис. 2.

Анализ полученных данных позволяет сделать следующие выводы. Во-первых, положительный эффект начинает проявляться на 15 сутки после ксенотрансплантации как нативного, так и криоконсервированного материала. Во-вторых, к 30-м суткам с момента трансплантации уровень тестостерона в случае нативного трансплантата достигал уровня у контрольных животных, а в случае



**Рис. 1.** Уровень тестостерона в плазме животных в различные сроки после трансплантации (n=10): 1 – контроль; 2 – криоконсервированная ОКС; 3 – нативная ОКС; 4 – орхиэктомия; \* – различия достоверны относительно группы орхидектомированных животных, P<0,05.



**Рис. 2.** Уровень тестостерона в плазме крови животных с гипогонадизмом в зависимости от сроков после ксенотрансплантации (n=10): 1 – контроль; 2 – криоконсервированная ОКС; 3 – нативная ОКС; 4 – орхиэктомия; \* – различия достоверны относительно группы животных с экспериментальным гипогонадизмом, P<0,05.

криоконсервированного – даже превышал таковой. К 45-90 суткам уровень тестостерона в крови животных несколько снижался, однако, достоверно оставался выше, чем у животных с токсическим гипогонадизмом без трансплантации.

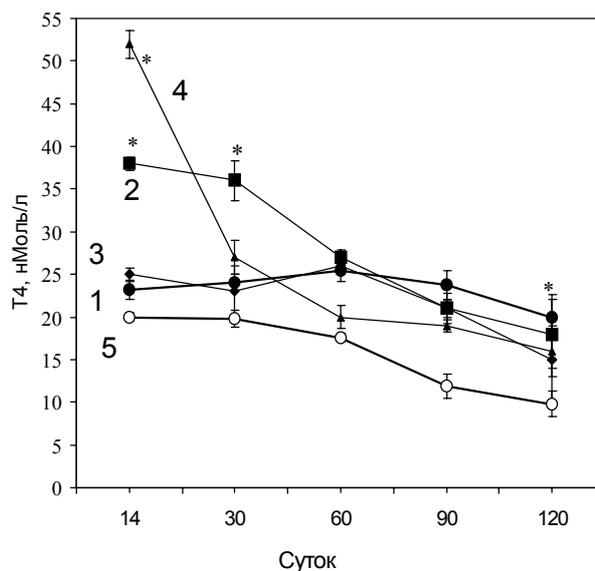
При трансплантации нативной и криоконсервированной ОКЩЖ тиреоидэктомированным кроликам, были получены следующие результаты (рис. 3).

Уже с 14 суток после трансплантации уровень тироксина в крови животных с трансплантатом нативной и криоконсервированной ОКЩЖ превышал показатели контрольных и тиреоидэктомированных кроликов. Динамика изменения концентрации Т4 в крови животных, которым трансплантировали криоконсервированную и рекультивированную ОКЩЖ, была наиболее близка к значениям контрольной группы животных. К 120-м суткам после трансплантации весь ксеногенный материал сохранял способность компенсировать тиреоидную недостаточность, однако, наиболее эффективная гормонокомпенсация достигалась трансплантацией нативной и криоконсервированной ОКЩЖ.

Анализ динамики трийодтиронина показал аналогичные результаты. Однако, на гистологических препаратах трансплантатов с нативной ОКЩЖ к 120 суткам не были выявлены железистые структуры, характерные для щитовидной железы, что свидетельствовало о развитии деструктивно-некротических процессов. В эти же сроки после трансплантации криоконсервированной и рекультивированной ОКЩЖ были обнаружены островки из фрагментов щитовидной железы, содержащие фолликулы с плотным коллоидом, что является признаком активной секреторной деятельности графта.

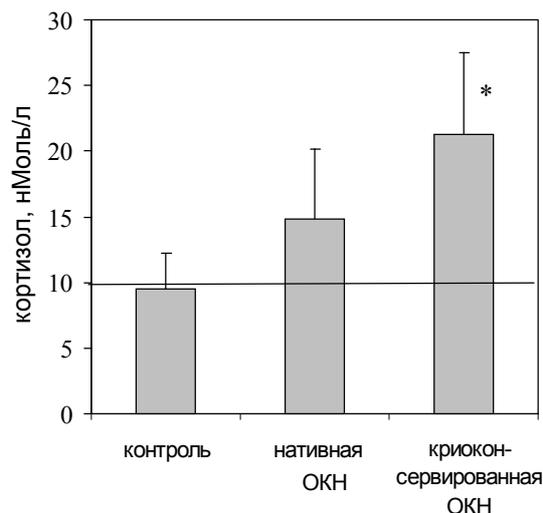
Таким образом, можно говорить о том, что ксенотрансплантация криоконсервированного материала в отдаленные сроки после операции приводит к компенсации гормонального статуса тиреоидэктомированных животных, причем интенсивность иммунологических реакций, развивающихся вследствие ксенотрансплантации, может быть снижена путем криоконсервирования и/или последующего рекультивирования ОКЩЖ.

Эффективность ОКН в компенсации гипокортицизма была исследована на мышях, подвергнутых односторонней адреналэктомии. Так как адренокортикальные клетки мышей синтезируют кортикостерон, и не способны продуцировать гидрокортизон [13], то достоверное выявление кортизола в плазме крови животных с ксенотрансплантатом является признаком функциональной активности последнего. В плазме крови контрольных и односторонне адреналэкто-



**Рис. 3.** Динамика изменения концентрации тироксина в плазме крови кроликов с различными видами ксенотрансплантатов: 1 – контроль; 2 – криоконсервированная ОКЩЖ; 3 – рекультивированная ОКЩЖ; 4 – нативная ОКЩЖ; 5 – субтотальная тиреоидэктомия; \* – различия достоверны относительно группы животных с экспериментальной тиреоидной недостаточностью,  $P < 0,05$ .

мированных мышей концентрация гормона, определяемого РИА КОРТИЗОЛ-СТ, не достигала 10 нМоль/л – минимального достоверно определяемого тест набором показателя. При трансплантации ОКН достоверная идентификация кортизола в плазме крови мышей была отмечена только для животных с криоконсервированной ОКН (рис. 4). Отсутствие секреторной активности трансплантата нативной ОКН подтвердилось при

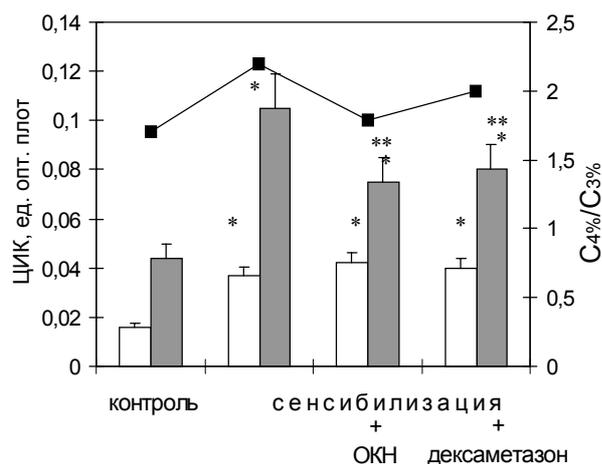


**Рис. 4.** Концентрация кортизола в плазме крови мышей на 25-29 сутки после ксенотрансплантации. — – минимальная достоверно определяемая тест-набором концентрация кортизола. \* – различия достоверны относительно контрольной группы животных, не вырабатывающих гидрокортизон,  $P < 0,05$ .

гистологическом анализе, когда были обнаружены только единичные сохранившиеся клетки трансплантата. Большая часть ксеногенного материала представляла собой некротически измененную аморфную массу, содержащую незначительные количества лимфоцитарных клеток. Трансплантаты криоконсервированной и криоконсервированной рекультивированной ОКН были отграничены от почечной паренхимы капсулой из пролиферирующих клеток гистиогенного и гематогенного происхождения. Некротические изменения графтов также были отмечены. Они выражались в наличии клеток с признаками кариолиза и плазмолиза, некотором изменении межклеточного вещества. Однако, в целом, сохранность трансплантата была значительно выше, особенно в случае рекультивированного материала.

Другой областью применения ксенотрансплантации ОКН может быть коррекция иммунологически сенсibilизированного состояния организма. В клинической практике в этих целях достаточно часто используют глюкокортикоидную терапию. Оценка уровня циркулирующих иммунных комплексов, повышение которого сопутствует развивающемуся воспалительному процессу, в т.ч. бронхолегочным заболеваниям бактериальной, аутоиммунной этиологии, может являться индикатором степени тяжести и остроты патологического процесса, а также служить критерием эффективности проводимого лечения.

На рис. 5 представлены данные о концентрации крупных и мелких ИК в периферической крови крыс, сенсibilизированных овальбумином по традиционной схеме. Очевидно, что двукратная



**Рис. 5.** Уровень ЦИК в периферической крови животных после коррекции сенсibilизированного состояния: □ – 3%; ■ – 4%; —■— С3%/С4%; \* –  $P < 0,05$  различия достоверны по отношению к контролю; \*\* –  $P < 0,05$  различия достоверны по отношению к значениям ЦИК у группы сенсibilизированных животных, не получавших лечения.

иммунизация аллергеном приводила к развитию патологического состояния, которое проявлялось, в частности, в достоверном увеличении ИК крупного размера, и оказало наиболее выраженный эффект на концентрацию ЦИК мелкого размера.

Величина, отражающая соотношение ЦИК  $K = C_{4\%}/C_{3\%}$ , осажденных при 4% ( $C_{4\%}$ ) и 3% ( $C_{3\%}$ ) ПЭГ, позволяет косвенно судить о размерах ЦИК, большие значения  $K$  соответствуют ЦИК меньшего размера. Мы установили, что в группе животных, сенсibilизированных ОВА ( $K=2,2$ ) преобладают мелкие комплексы в сравнении с контрольной группой животных ( $K=1,7$ ), что отражает иницирование ряда патологических механизмов. Трансплантация ОКННП сенсibilизированным животным приводит к достоверному снижению концентрации мелких ИК в периферической крови сенсibilизированных животных, хотя практически не влияет на содержание крупных ИК. Внутримышечное введение дексаметазона вызывало аналогичный эффект. Следовательно, весьма вероятно, что механизм противовоспалительного эффекта трансплантированной ОКН обусловлен ее гормонопродуцирующей активностью. Однако, соотношение  $C_{4\%}/C_{3\%}$ , несколько понижающееся при глюкокортикоидной терапии, практически возвращалось к контрольным значениям только в случае трансплантации ОКН. Это позволяет предположить, что эффективность ОКН связана не только с локальными иммуносупрессивным воздействием благодаря секреции глюкокортикоидов, но также реализуется как позитивный иммуномодулятор на уровне целого организма.

## Выводы

Таким образом, ксенотрансплантация не только нативного, но и криоконсервированного эндокринного материала, полученного в виде органотипических культур из различных эндокринных желез, способствует коррекции сенсibilизированного состояния животных, приводит к стабилизации их гормонального статуса. Применение криоконсервирования и последующего рекультивирования значительно повышает эффективность трансплантации и положительно влияет на иммунологическое окружение ксенотрансплантата.

## Литература

1. Божок Г.А., Алабедалькарім Н.М., Легач Е.І. Вплив криоконсервування на імуно-біологічні властивості фрагментів надниркових залоз при алотрансплантації // Трансплантологія.– 2004.– Т. 5, №1.– С. 88-92.
2. Алабедалькарім Н.М., Божок Г.А., Легач Е.І., Бондаренко Т.П. Спосіб підготовки криоконсервованої органотипової культури надниркової залози для трансплантації: Патент

№4845, МПК7, №12N5/08 A61K35/55 Публ 15.02.05, Бюл. №2, 2005

3. *Бондаренко Т.П., Алабедалькарім Н.М., Божок Г.А., Абу Жаяб Салех* Вплив диметилсульфоксиду та кріоконсервування на функціональні характеристики органної культури сім'яників // Проблеми ендокринної патології.– 2003.– №3.– С. 57-62.
4. *Бондаренко Т.П., Легач Е.И.* Метод кріоконсервирования культуры адренкортикальных клеток: Патент Украины N 99073996.– 1999.– Бюл. №4.
5. *Кабак Я.М.* Практикум по эндокринологии.– Москва: Сов. Наука, 1945.– 236 с.
6. *Корлэтяну А.Н.* Модификация операции удаления щитовидной железы у крыс // Пробл.эндокринологии.– 1987.– №1.– С.51-53.
7. *Лечение хронического гипокортицизма* методом трансплантации культуры клеток коры надпочечных желез: Метод. рекомендации // Сост.: Тронько Н.Д., Рыбаков С.И. Комисаренко И.В. и др.– Киев, 1990.– 24 с.
8. *Лилли Р.* Патогистологическая техника и практическая гистохимия.– М.: Мир, 1969.– 645 с.
9. *Луговой С.В., Бондаренко Т.П., Губина Н.Ф. и др.* Органная культура щитовидной железы новорожденных поросят как объект кріоконсервирования // Пробл. кріобиологии.– 2003.– №2.– С. 98-103.
10. *Потіха О.П., Челнокова І.С., Турчин І.С.* Ауто- і ксенотрансплантація органних культур сім'яників кастрованим щурам та щурам із експериментальним гіпогонадізмом // Физиологический журнал.– 1993.– Вып. 49, №5-6.– С. 71-76.
11. *Andersson P.* Antigen-induced bronchial anaphylaxis in actively sensitized guinea-pigs// Allergy.– 1980.– Vol. 35.– №1.– P. 65-71.
12. *Lee M. K., Bae Y.H.* Cell transplantation for endocrine disorders // Adv. Drug Deliv. Rev.–2000.– Vol. 42.– №1-2.– P. 103-20.
13. *Payne A.P., Hales D.B.* Overview of steroidogenic enzymes in the pathway from cholesterol to active steroid hormones // Endocr. Rev.– 2004.– Vol. 25.– P. 947-970.