

... ФІЗИОЛОГІЯ ЛЮДИНИ ТА ТВАРИН ...
... PHYSIOLOGY OF HUMAN AND ANIMALS ...

УДК: 612.616.014:612.43.089.6

**Влияние предтрансплантационной интрапортальной инфузии
спленоцитов на выживаемость тестикулярных трансплантатов и
состояние печени у орхиэктомированных мышей**
Г.А.Божок

Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины (Харьков, Украина)

Орхиэктомированным мышам была проведена трансплантация аллогенных и ксеногенных суспензий клеток и фрагментов ткани семенников (СКС и ФТС) без или с предтрансплантационной (за 7 суток) инфузией спленоцитов донорского происхождения в портальную вену печени. Посредством измерения уровня тестостерона в крови реципиентов и гистологического анализа установлено, что предварительная инфузия спленоцитов улучшала выживаемость аллогенных, но не ксеногенных трансплантатов. Результаты изучения активности аминотрансфераз АЛТ и АСТ в крови и гомогенате печени реципиентов на 37 сутки эксперимента свидетельствуют об отсутствии повреждения клеток печени после интрапортальной инфузии.

Ключевые слова: трансплантация, семенники, тестостерон, донор-специфическая толерантность, печень, аминотрансферазы, спленоциты.

**Вплив передтрансплантаційної інтрапортальної інфузії спленоцитів на
виживання тестикулярних трансплантатів та стан печінки у
орхієктомованих мишей**
Г.А.Божок

Орхієктомованим мишам була проведена трансплантација алогенних та ксеногенних суспензій клітин та фрагментів тканини сім'яників (СКС та ФТС) без та з передтрансплантаційною (за 7 діб) інфузією спленоцитів донорського походження в портальну вену печінки. За допомогою вимірювання рівню тестостерону в крові реципієнтів та гістологічного аналізу встановлено, що попередня інфузія спленоцитів покращувала виживання алогенних, але не ксеногенних трансплантатів. Результати вивчення активності аминотрансфераз АЛТ та АСТ в крові та гомогенаті печінці реципієнтів на 37 добу експерименту свідчать про неушкодженість гепатоцитів після інтрапортальної інфузії.

Ключові слова: трансплантација, яєчко, тестостерон, донор-специфічна толерантність, печінка, аминотрансферази, спленоцити.

**The impact of pretransplant intraportal splenocyte infusion on the survival of
testicular grafts and state of the liver in orhiectomized mice**
G.A.Bozhok

The transplantation of allogeneic and xenogeneic testicular cell suspensions and tissue fragments (TCS and TTF) with or without pre-transplant (before 7 days) infusion of splenocytes of donor's origin into the portal vein of the liver of orhiectomized mice was carried out. By measuring the level of testosterone in the recipient's blood and histological analysis it was established that pre-infusion of splenocytes improved survival of allogeneic, but not xenogeneic grafts. The results of studying the activity of aminotransferases ALT and AST in the blood and liver homogenate of recipients on the 37th day of the experiment indicate the integrity of hepatocytes after intraportal infusion.

Key words: transplantation, testis, testosterone, donor-specific tolerance, liver, aminotransferases, splenocytes.

Введение

Клеточная и тканевая трансплантация становится все более востребованным методом современной регенеративной и восстановительной медицины. В экспериментальных и клинических работах установлено, что этот метод также может быть использован для восстановления

гормональной функции семенников (Потіха та ін., 1993; Турчин, 1996; Пахомов и др., 2007). Однако такой подход к лечению эндокринной недостаточности требует решения проблемы отторжения трансплантатов.

Известно, что поляризация иммунного ответа в сторону принятия или отторжения трансплантата зависит от взаимодействия профессиональных антиген-представляющих клеток (дендритных клеток, макрофагов) и различных субпопуляций Т-лимфоцитов, в том числе регуляторных Treg клеток (Long, Wood, 2009). В экспериментальных работах, посвященных поиску подходов пролонгирования выживаемости трансплантатов, отмечается, что инфузия клеток донорского происхождения, полученных из лимфоузлов, селезенки, костного мозга, периферической крови, реципиенту за некоторое время до трансплантации снижает выраженность реакции отторжения либо, более того, толеризует иммунную систему реципиента к донорскому органу (Morita et al., 2000; Oiko et al., 2002; Sato et al., 2003; Sheng Sun et al., 2005). Это явление получило название индукции донор-специфической толерантности (ДСТ). Однако данный подход практически не изучался на тканях эндокринных желез, имеющих свои особенности, которые могут влиять на активность иммунного ответа реципиента. В частности, известно, что интерстиций семенников содержит значительное количество макрофагов (до 30%), которые являются не только иммунокомпетентными клетками, а и участвуют в регуляции синтеза тестостерона (Hedger, 1997). Такое высокое содержание антигенпредставляющих клеток должно отражаться на выживаемости ткани после трансплантации.

При индукции ДСТ решающее значение имеет место, куда вводятся донорские клетки. При инфузии клеток в портальную вену печени частота наступления ДСТ выше, чем при введении в общий кровоток (Oiko et al., 2002). Это связывают с особенностями иммунитета печени, где приобретается толерантность к пищевым антигенам (Parker, Picut, 2005). Однако при таком способе введения клеток необходимо контролировать сохранность функции печени, так как могут наблюдаться сопутствующие осложнения в виде тромбоза, печеночной гипертензии и, как следствие, обширного повреждения клеток (Bucher et al., 2004).

Целью представленной работы было изучение влияния интрапортальной инфузии спленоцитов на выживаемость тестикулярных алло- и ксенотрансплантатов, а также состояние печени у орхиэктомированных животных-реципиентов.

Методика исследования

Исследование было проведено на 5–6-месячных мышах самцах линий C57/Bl и СВН, а также 6-месячных крысах линии Август, содержащихся в условиях вивария ИПКиК НАН Украины. Эксперименты проведены в соответствии с «Общими принципами экспериментов на животных», одобренными I Национальным конгрессом по биоэтике (20.09.01 г., Киев, Украина) и согласованными с положениями «Европейской Конвенции о защите позвоночных животных, используемых для экспериментальных и других научных целей» (Страсбург, 1985).

Мыши линии C57/Bl являлись реципиентами, мыши линии СВН и крысы линии Август – донорами.

Спленоциты получали из селезенки мышей линии СВН и крыс линии Август по методу (Клаус, 1990). Клетки семенников получали от животных этих же линий неферментативным методом. Для этого семенники освобождали от оболочек и измельчали, осаждали тубулярные структуры. Далее ткань продавливали через стальное сито с диаметром пор 100 мкм. Отмывали полученные клетки несколько раз средой 199 (Sigma, USA). Фильтровали полученную клеточную суспензию через капроновое сито с диаметром пор 30–40 мкм. Фрагменты ткани семенников получали и подвергали краткосрочному органотипическому культивированию по методу (Легач и др., 2005). Весь биоматериал, предназначенный для трансплантации, получали в стерильных условиях.

Двустороннюю орхиэктомию мышам линии C57/Bl выполняли по методу (Кабак, 1968). Трансплантацию суспензии клеток семенников (СКС) и фрагментов ткани семенников (ФТС) проводили под капсулу левой почки непосредственно после орхиэктомии. Животным некоторых экспериментальных групп за 7 суток до трансплантации в портальную вену печени вводили 0,5 мл физиологического раствора, содержащего спленоциты в количестве 2×10^7 кл/мл.

На 30 сутки после трансплантации животных забивали. Выживаемость трансплантатов оценивали по двум параметрам: содержанию тестостерона в сыворотке крови и сохранности клеток/ткани на гистологических образцах. Содержание тестостерона измеряли радиоиммунологическим методом при помощи набора «РИА СТ-тестостерон» (Беларусь).

Состояние печени оценивали по активности аланинаминотрансферазы (АЛТ) и аспартатаминотрансферазы (АСТ). Активности аминотрансфераз измеряли в сыворотке крови и

гомогенате печени с помощью тест-наборов АЛТ «ДДС» и АСТ «ДДС» («ДИАКОН – ДС», Россия) методом Райтмана-Френкеля. Определение оптической плотности проводили на длине волны 540 нм с использованием кювет с длиной оптического пути 1 см. Активность АЛТ в печени определяли в пересчете на белок гомогената, который измеряли по методу Бредфорд.

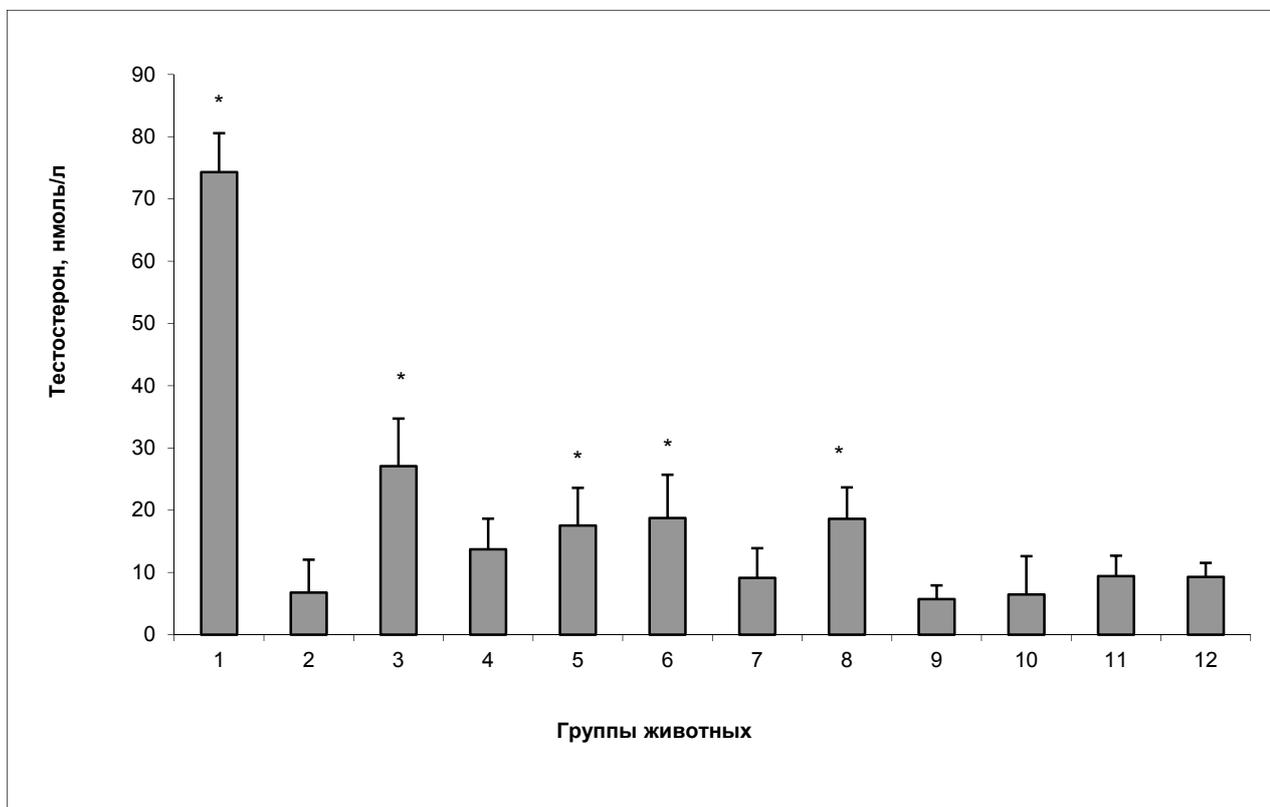
Для гистологического анализа образцы почек с трансплантатами были зафиксированы в 10%-м формалине и залиты в парафин. Серийные срезы толщиной 5 мкм были окрашены гематоксилином и эозином.

Группами сравнения служили следующие группы животных: интактные мыши линии С57/В1; мыши линии С57/В1 с трансплантацией сингенных СКС и ФТС; мыши линии С57/В1 с моделью СС14-индуцированного поражения печени по методу (Зубахин и др., 2000).

Статистическую достоверность оценивали с помощью однофакторного дисперсионного анализа, достоверными считались различия при $p < 0,05$. Данные представлены как среднее значений, полученных в 2-х аналогичных экспериментах и измеренных в двух параллельных пробах, \pm стандартное отклонение.

Результаты и обсуждение

На 30 сутки после орхизектомии у мышей наблюдается уровень тестостерона $6,7 \pm 5,3$ нмоль/л (рис. 1), что составляет 9% от уровня интактного контроля ($74,3 \pm 6,3$ нмоль/л).



Достоверность различий: * – различия достоверны по сравнению с орхизектомией ($P < 0,05$).

Рис. 1. Уровень тестостерона в сыворотке крови мышей:

1 – интактных, 2 – орхизектомированных; 3 – с трансплантацией сингенных СКС; 4 – с трансплантацией сингенных ФТС; 5 – с трансплантацией аллогенных СКС; 6 – с трансплантацией аллогенных СКС и интрапортальной инфузией спленоцитов; 7 – с трансплантацией аллогенных ФТС; 8 – с трансплантацией аллогенных ФТС и интрапортальной инфузией спленоцитов; 9 – с трансплантацией ксеногенных СКС; 10 – с трансплантацией ксеногенных СКС и интрапортальной инфузией спленоцитов; 11 – с трансплантацией ксеногенных ФТС; 12 – с трансплантацией ксеногенных ФТС и интрапортальной инфузией спленоцитов

Сингенная трансплантация СКС характеризовалась наибольшим повышением уровня тестостерона ($27,1 \pm 7,6$ нмоль/л), который составлял 36% от контрольных значений. Уровень тестостерона после сингенной трансплантации ФТС был меньше ($13,7 \pm 4,9$ нмоль/л) и составлял около 18% от контроля.

После аллогенной трансплантации СКС наблюдалось повышение уровня гормона до 23,5% от контрольных значений ($17,5 \pm 6,1$ нмоль/л). При этом предварительное введение спленоцитов не приводило к значительному улучшению этого результата: уровень гормона у животных этой группы составлял около 25% от контроля ($18,7 \pm 6,9$ нмоль/л).

При трансплантации аллогенных ФТС установлены значения уровня тестостерона $9,1 \pm 4,8$ и $18,6 \pm 5,0$ нмоль/л, что составляло 12% и 25% от контроля. В этом случае наблюдалось увеличение уровня гормона в 2 раза после трансплантации биоматериала с предтрансплантационной инфузией донорских спленоцитов.

Во всех изученных вариантах трансплантации биоматериала ксеногенного происхождения не было получено значимых отличий от уровня тестостерона, наблюдаемого у орхизектомированных мышей, что свидетельствовало об отсутствии гормональной функции ксенографтов.

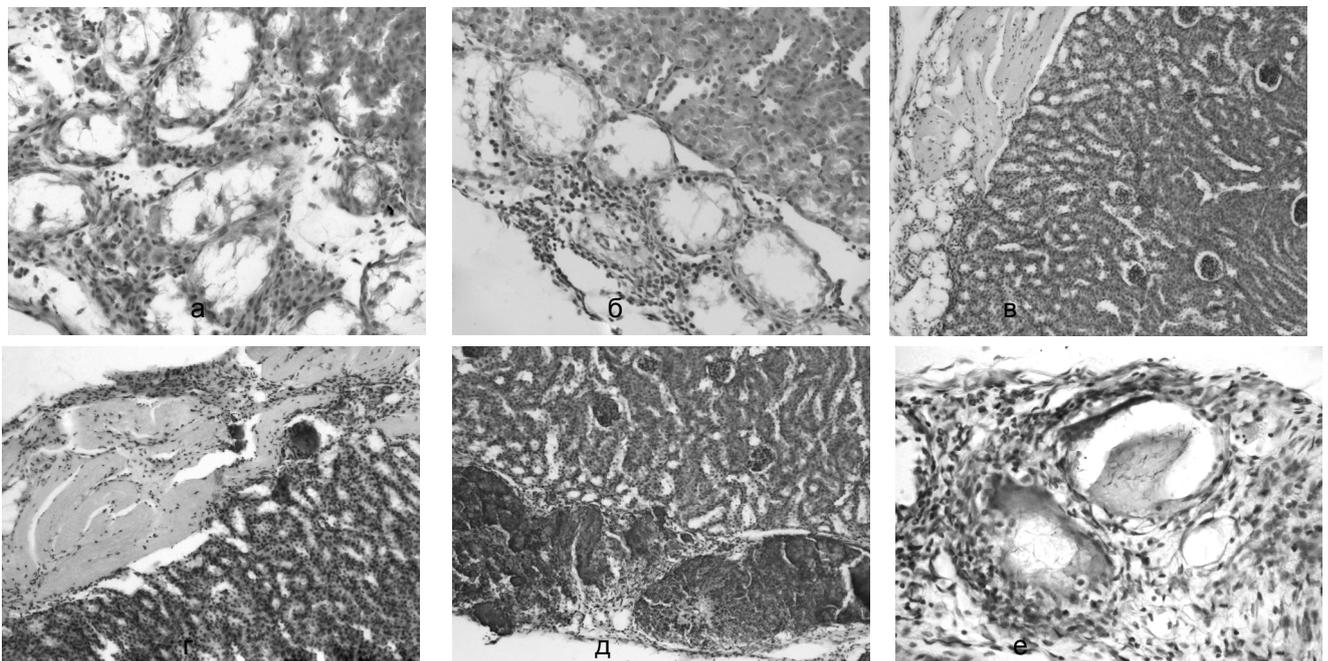


Рис. 2. Гистологические образцы трансплантатов СКС (верхняя панель) и ФТС (нижняя панель)

Примечания: верхняя панель: а – сингенный (ок. 10, об. 40); б – аллогенный с инфузией спленоцитов (ок. 10, об. 20); в – ксеногенный с инфузией спленоцитов (ок. 10, об. 10); нижняя панель: г – аллогенный (ок. 10, об. 10); д – аллогенный с инфузией спленоцитов (ок. 10, об. 20); е – ксеногенный с инфузией спленоцитов (ок. 10, об. 40). Окраска гематоксилином и эозином.

На следующем этапе работы было проведено гистологическое исследование трансплантатов, полученных на 30 сутки после операции. В образцах сингенных трансплантатов СКС наблюдалось формирование канальцевых структур с разреженной выстилкой из sustentоцитов, однако без сперматогенного эпителия (рис. 2, а). В межканальцевом пространстве определяются значительные зоны рыхлой соединительной ткани, содержащей клетки Лейдига со сферическими или овальными базофильными ядрами и обширной вакуолизированной эозинофильной цитоплазмой. В образцах аллогенных трансплантатов СКС как с предварительной инфузией спленоцитов, так и без нее, наблюдается сходная гистологическая картина (рис. 2, б), хотя визуально интерстициальная ткань занимает меньшую площадь трансплантата. Во всех трансплантатах ксеногенных СКС на 30 сутки не наблюдается структур, характерных для тестикулярной ткани (рис. 2, в). Напротив, трансплантат состоит из соединительной ткани с преобладанием молодых форм соединительнотканых элементов, особенно в субкапсулярной зоне ксенографта. В паранефральной зоне трансплантата волокна

соединительной ткани уплотнены, плотно прилегают друг к другу, что является признаком зрелой волокнистой соединительной ткани и свидетельствует о завершении процесса отторжения.

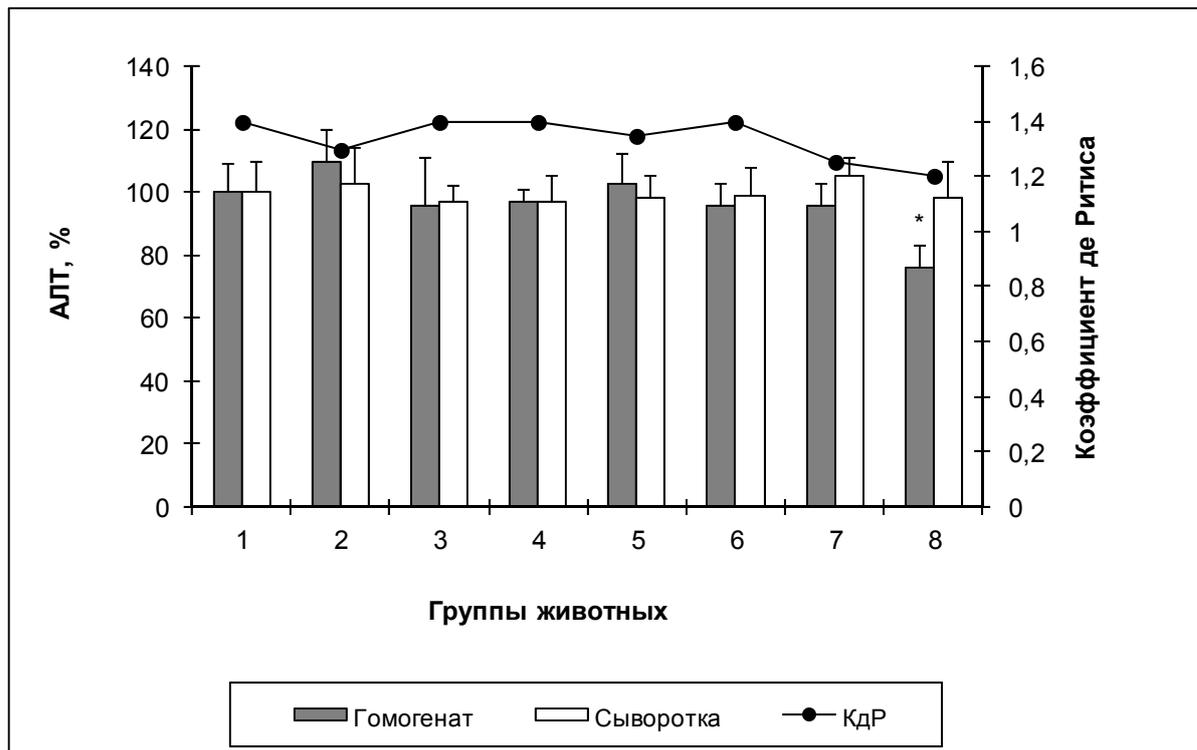
В образцах сингенных трансплантатов ФТС при микроскопическом исследовании обнаруживались канальцевые структуры и интерстициальная ткань (данные не представлены). В целом, данные образцы гистологически не отличались от сингенных трансплантатов СКС. Для аллогенных трансплантатов ФТС была характерна обширная лимфоцитарная инфильтрация в субкапсулярной зоне (рис. 2, г). В паранефральной зоне трансплантата обнаруживаются очаги, состоящие из масс распада, окруженные зрелой соединительной тканью. Структур, характерных для ткани семенников, не обнаруживалось. В трансплантатах аллогенных ФТС с инфузией спленоцитов, в отличие от предыдущих, определяются канальцевые структуры, что свидетельствует о лучшей их сохранности (рис. 2, д), однако наблюдается лимфоцитарная инфильтрация по всей ткани трансплантата. Полости канальцев заполнены массами распада. В образцах ксеногенных трансплантатов ФТС как с предварительной инфузией спленоцитов, так и без нее, обнаруживаются небольшие малочисленные участки с сохранившимися канальцевыми структурами (рис. 2, е). Внутри канальцев клеток не наблюдается, часто в полости их располагаются массы распада. Межканальцевое пространство заполнено инфильтрирующими клетками, в некоторых участках трансплантата обнаруживается начальный этап замещения ткани трансплантата соединительной тканью в виде формирования разрыхленных участков, обогащенных эпителиоидными клетками и фибробластами. Для всех ксеногенных трансплантатов характерным является присутствие в инфильтрате эозинофилов.

Известно, что тестикулярные клетки Лейдига, которые выполняют тестостерон-продуцирующую функцию, находятся в интерстициальном пространстве между семенными канальцами. Таким образом, наличие в трансплантате семенных канальцев и интерстиция свидетельствовало о сохранности трансплантата. Исходя из анализа гистологических образцов и результатов измерения уровня тестостерона в крови реципиентов, можно сказать, что наилучшая выживаемость на 30 сутки после трансплантации была установлена для сингенных и аллогенных графтов СКС и ФТС. Интрапортальная инфузия спленоцитов в этом случае улучшала выживаемость клеточных и тканевых аллогraftов семенников.

Определение активности трансаминаз АЛТ и АСТ в сыворотке крови широко используется для выявления патологии печени (Меньшиков и др., 1987). В норме содержание АЛТ в крови невелико, тогда как при поражении гепатоцитов оно возрастает в несколько раз. Нами был исследован уровень АЛТ у реципиентов СКС после интрапортальной инфузии спленоцитов. На рис. 3 показано содержание АЛТ в сыворотке крови и гомогенате печени экспериментальных животных на 37 сутки после инфузии. В качестве отрицательного контроля была использована группа животных, которым сделали однократную инъекцию СС14 в тот же день, когда остальным производили введение спленоцитов. Из данных, представленных на рисунке, видно, что достоверных отличий уровней АЛТ в сыворотке крови и гомогенате печени между интактным контролем и группами животных с интрапортальной инфузией спленоцитов не наблюдается. Наибольшие отличия характерны для группы животных с СС14-индуцированным поражением печени. Заметно уменьшение активности АЛТ в гомогенате печени, что связано с повреждением гепатоцитов, выходом ферментов в кровь, а на поздних стадиях развития процесса – с перерождением ткани печени (Степанова, Игнатов, 2007). Отсутствие достоверных различий уровня АЛТ в сыворотке крови животных этой группы связано, вероятно, с тем, что на достаточно длительных сроках после однократной инъекции СС14 наблюдается адаптивное восстановление баланса метаболитов белкового обмена.

Хотя АСТ преобладает в миокарде, тяжелое поражение печени также может характеризоваться повышением уровня этого фермента (Карпищенко, 2001). В связи с этим нами был исследован коэффициент де Ритиса (КдР), представляющий собой отношение АСТ/АЛТ (рис. 3). Нужно отметить, что достоверных отличий этого показателя между интактным контролем и другими экспериментальными группами не наблюдается.

В целом, результаты изучения активности аминотрансфераз косвенно свидетельствуют о целостности гепатоцитов печени у реципиентов на 37 сутки после интрапортальной инфузии спленоцитов.



Достоверность различий: * – различия достоверны по сравнению с интактным контролем ($P < 0,05$).

Рис. 3. Коэффициент де Ритиса (АСТ/АЛТ) и уровень активности АЛТ в сыворотке крови и гомогенате печени мышей:

1 – интактных, 2 – орхизектомированных; 3 – с трансплантацией сингенных СКС; 4 – с трансплантацией аллогенных СКС; 5 – с трансплантацией аллогенных СКС и интрапортальной инфузией спленоцитов; 6 – с трансплантацией ксеногенных СКС; 7 – с трансплантацией ксеногенных СКС и интрапортальной инфузией спленоцитов; 8 – с СС14-индуцированным поражением печени. Коэффициент де Ритиса определяли только в сыворотке крови

Вывод

Полученные данные указывают на то, что предварительная инфузия спленоцитов донорского происхождения улучшает выживаемость аллогraftов СКС и ФТС, при этом негативного влияния интрапортальной инфузии на целостность клеток печени не обнаружено. При ксенотрансплантации не наблюдается эффекта улучшения выживаемости трансплантата после предтрансплантационной интрапортальной инфузии спленоцитов.

Список литературы

- Зубахин А.А., Цырендоржиев Д.Д., Кутина С.Н. Резистентность печени к повреждению СС14 при депрессии клеток Купфера хлоридом гадолиния // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. – 2000. – №6. – С. 709–711. /Zubakhin A.A., Tsyrendorzhiev D.D., Kutina S.N. Rezistentnost' pecheni k povrezhdeniyu СС14 pri depressii kletok Kupfera khloridom gadoliniya // Byulleten' eksperimental'noy biologii i meditsiny. – 2000. – №6. – С. 709–711./
- Кабак Я.М. Практикум по эндокринологии. – М.: Советская наука, 1968. – С. 61–64. /Kabak Ya.M. Praktikum po endokrinologii. – M.: Sovetskaya nauka, 1968. – S. 61–64./
- Карпищенко А.И. Медицинская лабораторная диагностика (программы и алгоритмы). Справочник. – СПб.: Интермедика, 2001. – 44с. /Karpishchenko A.I. Meditsinskaya laboratornaya diagnostika (programmy i algoritmy). Spravochnik. – SPb.: Intermedika, 2001. – 44s./
- Клаус Дж. Лимфоциты: Методы. – М.: Мир, 1990. – 395с. /Klaus Dzh. Limfotsity: Metody. – M.: Mir, 1990. – 395s./
- Легач Е.И., Божок Г.А., Пахомов А.В. и др. Комбинированное культивирование и гетеротопическая трансплантация тестикулярной ткани с эксплантатом гипофиза // Трансплантология. – 2005. – Т.8, №3. – С. 28–34. /Legach Ye.I., Bozhok G.A., Pakhomov A.V. i dr. Kombinirovannoye kul'tivirovaniye i geterotopicheskaya transplantatsiya testikulyarnoy tkani s eksplantatom gipofiza // Transplantologiya. – 2005. – T.8, №3. – S. 28–34./

- Меньшиков В.В., Делекторская Л.Н., Золотницкая Р.П. и др. Лабораторные методы исследования в клинике: Справочник. – М.: Медицина, 1987. – 368с. /Men'shikov V.V., Delektorskaya L.N., Zolotnitskaya R.P. i dr. Laboratornyye metody issledovaniya v klinike: Spravochnik. – M.: Meditsina, 1987. – 368s./
- Пахомов А.В., Легач Е.И., Божок Г.А. и др. Восстановление добавочных половых желез крыс после поражения хлоридом кадмия // Трансплантология. – 2007. – Т.9, №1. – С. 212–213. /Pakhomov A.V., Legach Ye.I., Bozhok G.A. i dr. Vosstanovleniye dobavochnykh polovoykh zhelez kryс posle porazheniya khloridom kadmiya // Transplantologiya. – 2007. – T.9, №1. – S. 212–213./
- Потіха О.П., Челнакова І.С., Турчин І.С. Ауто- і ксенотрансплантація органних культур сім'яників кастрованим щурам та щурам з експериментальним гіпогонадізмом // Физиол. журнал. – 1993. – Т.39, № 5–6. – С. 70–75. /Potikha O.P., Chelnakova I.S., Turchin I.S. Auto- i ksenotransplantatsiya organnykh kul'tur sim'yanykiv kastrovanym shchuram ta shchuram z eksperymental'nym gipogonadyzmozom // Fiziol. zhurnal. – 1993. – T.39, № 5–6. – S. 70–75./
- Степанова Е.В., Игнатов В.В. Влияние ионов кадмия на активность аминотрансфераз у потомства самок белых крыс // Известия Саратовского университета. – 2007. – Т.7, №1. – С. 57–59. /Stepanova Ye.V., Ignatov V.V. Vliyaniye ionov kadmiya na aktivnost' aminotransferaz u potomstva samok belykh kryс // Izvestiya Saratovskogo universiteta. – 2007. – T.7, №1. – S. 57–59./
- Турчин І.С. Проблема трансплантації культур клітин і тканин залоз внутрішньої секреції хворим з різними формами ендокринопатії // Ендокринологія. – 1996. – Т.1, №2. – С. 6–13. /Turchyn I.S. Problema transplantatsii kul'tur kliitin i tkanyн zaloz vnutrishnyoi sekretsii khvorym z riznyimi formamy endokrynopatii // Endokrynologiya. – 1996. – T.1, №2. – S. 6–13./
- Bucher P., Mathe Z., Bosco D. et al. Morbidity associated with intraportal islet transplantation // Transplantation Proceedings. – 2004. – Vol.36, №4. – P. 1119–1120.
- Hedger M.P. Testicular leukocytes: what are they doing? // Rev. Reprod. – 1997. – Vol.2. – P. 38–47.
- Long E., Wood K.J. Regulatory T cells in transplantation: transferring mouse studies to the clinic // Transplantation. – 2009. – Vol.88, №9. – P. 1050–1056.
- Morita H., Sugiura K., Nagahama T. et al. Acceptance of skin xenografts (from guinea pig to mice) by portal venous and intravenous injections of donor hematology cells // Transplant. Proc. – 2000. – Vol.32. – P. 293–294.
- Oko A., Idasiak-Piechocka I., Pawlaczyk K. et al. Prolongation of rat kidney graft survival after inoculation of allogeneic spleen cells: the effect of various routes of cell transfer // Ann. Transplant. – 2002. – Vol.7, №2. – P. 51–53.
- Parker G.A., Picut C.A. Liver immunobiology // Toxicol. Pathol. – 2005. – Vol.33, №1. – P. 52–62.
- Sato Y., Ichida T., Watanabe H. et al. Repeating intraportal donor-specific transfusion may induce tolerance following adult living-related donor liver transplantation // Hepatogastroenterology. – 2003. – Vol.50. – P. 601–606.
- Sheng Sun D., Iwagaki H., Ozaki M. et al. Prolonged survival of donor-specific rat intestinal allograft by administration of bone-marrow-derived immature dendritic cells // Transpl. Immunol. – 2005. – Vol.14, №1. – P. 17–20.

Представлено: Г.Ф.Жегунов / Presented by: G.F.Zhegunov
Рецензент: В.В.Мартиненко / Reviewer: V.V.Martynenko
Подано до редакції / Received: 23.09.11