

УДК 615.451.35:612.43.014.43:615.014.41

*Е.И. Легач, Ю.И. Боднар, Г.А. Божок**Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, г. Харьков*

СРАВНИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ СТРУКТУРНОГО СОСТОЯНИЯ ФРАГМЕНТОВ ТКАНИ ЭНДОКРИННЫХ ЖЕЛЕЗ ПРИ ОРГАНОТИПИЧЕСКОМ КУЛЬТИВИРОВАНИИ ИЛИ ГИПОТЕРМИЧЕСКОМ ХРАНЕНИИ В КУСТОДИОЛЕ И ТУРУСОЛЕ

Проведен сравнительный анализ состояния фрагментов ткани эндокринных желез (поджелудочной и щитовидной желез, надпочечников, семенников) при органотипическом культивировании или гипотермическом хранении в Кустодиоле и Турусоле в течение 24 ч. Органотипическое культивирование в целом позволяет сохранять структурно-функциональные свойства ткани эндокринных желез, однако в центре фрагмента ткани наблюдается активация дистрофических процессов, что может ухудшить ее выживаемость после трансплантации. Гипотермическое хранение в течение 24 ч в растворе «Кустодиол» сохраняет нативную структуру ткани эндокринных желез. Использование раствора «Турусол» было неэффективно в этом случае.

Ключевые слова: *поджелудочная железа, щитовидная железа, надпочечники, семенники, гипотермическое хранение, кустодиол, турусол.*

На современном этапе развития медицины становится понятным, что заместительная гормональная терапия, хотя и является терапией выбора при лечении гормональной недостаточности, не может предотвратить развитие осложнений и сама может быть причиной их возникновения. Трансплантация культуры клеток либо фрагментов ткани эндокринных желез является альтернативным методом лечения гормональной недостаточности, при котором сохраняется физиологическая нейроэндокринная регуляция. Результаты трансплантации зависят от многих факторов, главным из которых является функциональное состояние трансплантата.

При получении материала для трансплантации возникает необходимость в хранении фрагментов ткани эндокринных желез в специальных растворах, из которых чаще всего используют растворы Университета Висконсина (UW solution) и Евроколлинз. Однако известно, что при хранении поджелудочной железы в растворе Университета Висконсина жизнеспособность и количество получаемых островков уменьшается уже после 6 часов [1]. В связи с этим актуальным является апробация новых защитных растворов для гипотермического хранения фрагментов ткани эндокринных желез.

Кустодиол (Custodiol®, Dr. F. Kohler Chemie GmbH, Германия) — ирригационный маннитолсодержащий раствор, разрешенный в том числе для консервации органов при трансплантации [2–4]. Турусол («Юрия-фарм», Украина) также относится к маннитолсодержащим ирригационным средствам, однако его применение для гипотермического хранения органов/тканей не описано.

Маннитол — шестиатомный спирт, который используется в криобиологии в качестве защитного агента при замораживании биобъектов [5]. Растворы, содержащие криопротекторы, защищают клетки от негативных факторов криоконсервирования, однако могут оказать и токсическое действие.

Целью данной работы явилось изучение структурного состояния фрагментов ткани эндокринных желез (поджелудочной и щитовидной желез, надпочечников, семенников) при краткосрочном органотипическом культивировании или гипотермическом хранении в маннитолсодержащих растворах «Кустодиол» и «Турусол».

Материал и методы. Источником фрагментов ткани поджелудочной и щитовидной желез, надпочечников, семенников являлись железы однодневных поросят, извлеченные в среднем через 10–15 минут пос-

© Е.И. Легач, Ю.И. Боднар, Г.А. Божок, 2011

ле забоя животного. Сразу после извлечения железы помещали в охлажденную среду 199, затем измельчали эндокринную ткань на фрагменты размером 0,5–1,0 мм³. Отмывали 3–4 раза от крови средой 199 с антибиотиками (пенициллин — 200 ЕД/мл и канамицин — 150 мкг/мл).

Фрагменты ткани эндокринных желез на 24 часа помещали в: 1) среду для культивирования; 2) кустодиол; 3) турусол. Органотипическое культивирование фрагментов ткани эндокринных желез проводили в среде 199 с добавлением 10 % инактивированной эмбриональной телячьей сыворотки и антибиотиков при 37 °С. Инкубацию фрагментов ткани эндокринных желез в кустодиоле и турусоле проводили при 8 °С.

Через сутки после культивирования или гипотермического хранения фрагменты ткани эндокринных желез фиксировали в 10 % формалине и заливали в парафин. Серийные срезы толщиной 5 мкм окрашивали гематоксилином и эозином.

Результаты и их обсуждение. В трансплантологии часто является необходимым сохранение ткани в функциональном состоянии некоторое время до трансплантации. Такими способами претрансплантационного хранения ткани эндокринных желез могут быть краткосрочное культивирование, гипотермическое хранение и низкотемпературное криоконсервирование.

Нами была проведена сравнительная оценка состояния фрагментов ткани эндокринных желез (поджелудочной и щитовидной желез, надпочечников, семенников) при использовании двух из этих способов — культивирования и гипотермического хранения. Нужно отметить, что эти два подхода являются принципиально разными по спектру воздействия на природу биохимических процессов, происходящих в ткани. Культивирование фрагментов ткани предполагает создание условий, максимально приближенных к физиологическим (осмолярность и рН среды, температура, наличие питательных веществ), в результате чего можно ожидать сохранения нормального метаболизма клеток. Гипотермическое хранение, напротив, имеет своей целью замедление всех метаболических процессов, происходящих в ткани, путем понижения температуры внешней среды. Оба подхода имеют свои недостатки, к которым относится возможность активации перекисных процессов при культивировании, а также самоотравления клеток при плохом оттоке метабо-

литов [6]. При гипотермическом хранении возможен распад энергетических субстратов, изменение активности окислительно-восстановительных процессов, изменение рН, вне- и внутриклеточный отек [7].

Результаты гистологического исследования образцов ткани эндокринных желез представлены ниже.

Микроскопически паренхима нативной щитовидной железы новорожденного поросенка представлена высокодифференцированной тканью, состоящей, главным образом, из четко сформированных фолликулярных структур, полость которых выстлана однослойным кубическим эпителием. Фолликулы заполнены яркоокрашенным коллоидом плотной консистенции, с выраженными участками резорбции. Через сутки культивирования фрагменты ткани щитовидной железы сохраняли нормофолликулярное строение в периферической зоне фрагмента, однако в центральной зоне наблюдались деструктивные изменения. Фолликулы значительно уменьшены в размерах, в большинстве из них коллоид отсутствует или видны остатки бледноокрашенного секрета, подвергшегося значительной резорбции. Характерны признаки десквамации тиреоидного эпителия. Межфолликулярные пространства расширены и заполнены тироцитами и секретом разрушенных фолликулов. Заметны скопления дезинтегрированных фолликулярных клеток.

После культивирования фрагментов семенников сохраняется нативная морфологическая структура ткани, которая представляет собой семенные каналцы и расположенные между ними скопления интерстициальных клеток. В интерстиции семенника различаются кровеносные капилляры. Клетки внутри каналцев располагаются правильными концентрическими слоями, снаружи от базальной мембраны различаются миоидные клетки. В базальной области каналцев клеточный компонент представлен двумя типами клеток: гоноцитами и клетками Сертоли, имеющими небольшие ядра неправильной формы. В интерстиции определяются многочисленные клетки Лейдига со сферическими или овальными базофильными ядрами, содержащими более темно-окрашенные ядрышки, и вакуолизированной эозинофильной цитоплазмой. Однако в центре фрагмента отмечается разволокнение базальной мембраны и истончение ее отдельных участков. В некоторых семенных каналцах на-

блюдается отслоение спермоэпителиального пласта от базальной мембраны.

При органотипическом культивировании фрагментов ткани надпочечных желез структура кортекса и медуллы в целом сохраняется. В основном присутствуют клетки с темными и мелкими ядрами, относящиеся к клубочковой зоне кортекса, и клетки с крупными светлыми ядрами и крупнопенистой цитоплазмой, принадлежащие к пучковой зоне кортекса. Клетки сетчатой зоны незначительны. Однако наряду с нормальной гистологической организацией в центре фрагмента встречаются небольшие участки ткани с начинающимся некрозом и распадом клеток.

Нативная поджелудочная железа новорожденного поросенка имеет типичное альвеоларно-трубчатое строение и состоит преимущественно из экзокринной ткани. Ацинусы представляют собой радиально расположенные скопления пирамидальных клеток, разделенные на дольки тонкими соединительнотканными междольковыми перегородками, отходящими от капсулы. Ациноциты имеют круглое ядро, расположенное в базальной части клетки. Цитоплазма вокруг ядра ациноцита базофильна, в апикальной части находится большое количество ацидофильных гранул. Эндокринная часть поджелудочной железы состоит из множественных небольших островков, которые отделены от ацинусов прослойками соединительной ткани. Относительное количество островков в ткани поджелудочной железы новорожденного поросенка больше, чем у взрослой особи, что связано с небольшим объемом экзокринного компонента поджелудочной железы и некоторой недоразвитостью органов пищеварительной системы свиней в первый месяц жизни.

При гистологическом анализе фрагментов поджелудочной железы после суточного культивирования определялись значительные зоны аутолизиса ацинарных клеток, хотя ткань сохраняла альвеоларно-трубчатое строение. Между ацинусами наблюдались скопления островковых клеток. Обнаружено характерное увеличение междолькового пространства, указывавшее на развитие дистрофических изменений в ткани поджелудочной железы, в центре фрагмента выявлены очаги некроза.

Таким образом, на основе гистологических исследований фрагментов ткани эндокринных желез, подвергнутых органотипическому культивированию в течение 24 ча-

сов, можно заключить, что даже на таком небольшом сроке культивирования во всех изученных видах ткани наблюдается активация дистрофических процессов. Известно, что при органотипическом культивировании ткани способны переживать в течение небольшого промежутка времени [8], поскольку в процессе культивирования постепенно происходит дедифференцировка ткани с утратой ее специфической функции. Это связано с тем, что благоприятные условия существования ткани в среде культивирования — газообмен и обмен веществ — могут обеспечиваться лишь в зоне краевой локализации, где имеется свободный доступ трофических и ростовых факторов. В центральной части фрагмента при этом в связи с недостатком обмена веществ будут наблюдаться процессы апоптоза и некроза ткани.

В наших исследованиях мы также наблюдали появление дистрофических зон в центре культивируемых фрагментов. Использование такой органотипической культуры ткани эндокринных желез снижает «качество трансплантата» и может негативно сказаться на результатах трансплантации.

В связи с этим нами были проведены исследования состояния фрагментов ткани эндокринных желез, подвергшихся гипотермическому хранению в маннитолсодержащих растворах «Кустодиол» и «Турусол».

Во фрагментах ткани эндокринных желез, хранившихся в турусоле, наблюдалось нарастание процессов деструкции ткани, пикнотичность ядер клеток, отек. При изучении образцов, хранившихся в кустодиоле, не наблюдалось видимых изменений нативной структуры ткани.

Выводы

При сравнении образцов фрагментов ткани эндокринных желез (поджелудочной и щитовидной желез, надпочечников, семенников), пребывавших в течение 24 ч в условиях органотипического культивирования либо гипотермии, установлено следующее. Органотипическое культивирование в целом позволяет сохранять структурно-функциональные свойства ткани эндокринных желез в течение суток, однако активация дистрофических процессов в центре фрагмента ткани может ухудшить ее выживаемость после трансплантации. Гипотермическое хранение в течение 24 ч в растворе «Кустодиол» сохраняет нативную структуру ткани эндокринных желез. Использование раствора «Турусол» неэффективно для этой цели.

Список литературы

1. Human pancreas preservation prior to islet isolation — cold ischaemic tolerance / J. R. T. Lakey, R. V. Rajotte, G. L. Warnock [et al.] // Transplantation. — 1995. — V. 59. — P. 689–694.
2. Никоненко А. С. Опыт применения кардиоплегического раствора «Кустодиол» / А. С. Никоненко, В. И. Ступаков, В. А. Собокаръ // Грудная и сердечно-сосудистая хирургия. — 1996. — № 6. — С. 275–276.
3. Liver transplantation in Medellin, Colombia: initial experience / J. Gutierrez, C. Guzman, G. Correa [et al.] // Transplant. Proc. — 2004. — V. 36, № 6. — P. 1677–1680.
4. Effects of Custodiol-N, a novel organ preservation solution, on ischemia/reperfusion injury / S. Loganathan, T. Radovits, K. Hirschberg [et al.] // J. Thorac. Cardiovasc. Surg. — 2010. — V. 139, № 4. — P. 1048–1056.
5. Brodthagen U. A. Platelet cryopreservation with glycerol, dextran, and mannitol: recovery of 5-hydroxytryptamine uptake and hypotonic stress response / U. A. Brodthagen, W. J. Armitage, N. Parmar // Cryobiology. — 1985. — V. 22, № 1. — P. 1–9.
6. Адамс Р. Методы культуры клеток для биохимиков / Р. Адамс. — М.: Мир, 1983. — 263 с.
7. Fuller B. Storage of cells and tissues at hypothermia for clinical use / B. Fuller ; ed. by K. Bowler. — N.Y.: Cambridge, 1987. — P. 341–362.
8. Гаврилюк Б. К. Органотипическое культивирование тканей / Б. К. Гаврилюк, В. П. Сафонов — М.: Наука, 1983. — 128 с.

Є.І. Легач, Ю.І. Боднар, Г.А. Божок

ПОРІВНЯЛЬНИЙ АНАЛІЗ СТРУКТУРНОГО СТАНУ ФРАГМЕНТІВ ТКАНИНИ ЕНДОКРИННИХ ЗАЛОЗ ПРИ ОРГАНОТИПОВОМУ КУЛЬТИВУВАННІ АБО ГІПОТЕРМІЧНОМУ ЗБЕРІГАННІ В КУСТОДІОЛІ ТА ТУРУСОЛІ

Проведено порівняльний аналіз стану фрагментів тканини ендокринних залоз (підшлункової та щитовидної, надниркових залоз, сім'яників) при органотиповому культивуванні або гіпотермічному зберіганні в кустодіолі і турусолі протягом 24 год. Органотипове культивування в цілому дозволяє зберігати структурно-функціональні властивості тканини ендокринних залоз, однак у центрі фрагментів тканини спостерігається активація дистрофічних процесів, що може погіршити її виживання після трансплантації. Гіпотермічне зберігання протягом 24 год в розчині «Кустодіол» залишає нативну структуру тканини ендокринних залоз. Використання розчину «Турусол» в цьому випадку неефективно.

Ключові слова: підшлункова залоза, щитовидна залоза, надниркові залози, сім'яники, гіпотермічне зберігання, кустодіол, турусол.

E.I. Legach, Yu.I. Bodnar, G.A. Bozhok

COMPARATIVE ANALYSIS OF THE STRUCTURE OF THE ENDOCRINE GLANDS TISSUE FRAGMENTS AT ORGANOTYPIC CULTURE OR HYPOTHERMIC STORAGE IN THE CUSTODIOLE AND TURUSOLE

The comparative analysis of the structure of the tissue fragments of the endocrine glands (pancreas, thyroid glands, adrenal glands, testes) at organotypic culture or hypothermic storage in the Custodiol and Turusole within 24 hours was done. Organotypic culture generally allows to save the structural and functional properties of the tissue of the endocrine glands, but in the center of tissue fragment an activation of degenerative processes is observed that can affect survival of tissue after transplantation. Hypothermic storage for 24 h in a Custodiol preserves the native structure of tissue of the endocrine glands. Turusol was ineffective in this case.

Key words: pancreas, thyroid glands, adrenal glands, testes, hypothermic storage, Custodiol, Turusol.