

УДК 612.41.014:612.43.089.6

Г.А. Божок, В.В. Кирошка, Ю.О. Тищенко, Ю.В. Люпина,
Я.Д. Карпова*, Н.П. Шарова*, Е.И. Легач*

*Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, г. Харьков
Институт биологии развития им. Н.К. Кольцова РАН, г. Москва

ВЛИЯНИЕ ИНТРАПОРТАЛЬНОГО ВВЕДЕНИЯ ДОНОРСКИХ СПЛЕНОЦИТОВ И ХЛОРИДА ГАДОЛИНИЯ НА ВЫЖИВАЕМОСТЬ ТКАНЕВЫХ АЛЛОГРАФТОВ ЭНДОКРИННЫХ ЖЕЛЕЗ

Известно, что введение донорских иммунокомпетентных клеток в портальную вену печени за 7–14 дней до трансплантации органа или ткани от того же донора может индуцировать состояние донор-специфической толерантности к аллогу. Было изучено влияние интрапортального введения спленоцитов, а также хлорида гадолиния ($GdCl_3$) на результат аллотрансплантации фрагментов ткани щитовидной железы и яичников у крыс. Выживаемость трансплантата оценивали по двум параметрам: уровню гормонов в сыворотке крови и сохранности структуры ткани трансплантата на гистологических образцах. Установлено, что выживаемость аллогraftов ткани щитовидной железы и яичников была лучше у реципиентов с интрапортальным введением спленоцитов. Введение хлорида гадолиния отменяло этот эффект.

Ключевые слова: трансплантация, щитовидная железа, яичники, донор-специфическая толерантность, хлорид гадолиния.

Трансплантация ткани эндокринных желез является методом восстановления гормонального потенциала, утраченного вследствие болезни. В клинике используется трансплантация островков поджелудочной железы [1], ткани паразитовидной [2] и щитовидной [3] желез, гормонопродуцирующих клеток тестисов [4] и яичников [5].

Известно, что при пересадке аллогенных органов/тканей активируется иммунная система реципиента и запускается процесс острого отторжения. Применение иммуносупрессии при трансплантации тканей эндокринных желез является нежелательным, так как может нарушить их гормонопродуцирующую функцию [6, 7], поэтому внимание исследователей привлекает возможность индукции специфической толерантности к трансплантату.

Экспериментально установлено, что донор-специфическую толерантность (ДСТ) к трансплантату можно вызвать путем введения иммунокомпетентных клеток донора в портальную вену печени за 7–14 дней до трансплантации, после чего производится

трансплантация органа или ткани от того же донора. Эффект ДСТ был показан при аллотрансплантации почки, сердца, печени, кишечника, кожи, фрагментов периферического нерва и островков поджелудочной железы [8–15].

Предполагается, что механизм развития ДСТ связан с особенностями процесса презентации антигена в печени, в частности клетками Купфера [16], так как при введении хлорида гадолиния, который избирательно ингибирует функцию макрофагов, индукции ДСТ не наблюдается [17].

В нашей работе мы исследовали влияние интрапортального введения спленоцитов донорского происхождения, а также хлорида гадолиния на результат аллотрансплантации фрагментов ткани щитовидной железы и яичников у крыс.

Материал и методы. Эксперименты были проведены на 3–4-месячных крысах-самках линий Вистар и Август. Донорами являлись крысы линии Вистар, реципиентами — крысы линии Август. Все манипуляции с животными проводились в соответст-

© Г.А. Божок, В.В. Кирошка, Ю.О. Тищенко и др., 2011

вии с положениями «Европейской конвенции защиты позвоночных животных, которые используются с экспериментальной и иной научной целью» (Страсбург, 1985) и национальными нормами по биоэтике (I Национальный конгресс по биоэтике, Киев, 2001).

Крысам линии Август проводили тиреоидэктомию по методу [18] или овариэктомию по методу [19] за 7 дней до трансплантации.

Спленоциты получали из селезенки крыс линии Вистар по методу [20]. От эритроцитов избавлялись путем трехкратной обработки клеточной суспензии раствором, содержащим 154 мМ хлорида аммония, 10 мМ бикарбоната натрия, 0,082 мМ ЭДТА. Жизнеспособность полученных спленоцитов, которую проверяли методом суправитального окрашивания трипановым синим, составляла в среднем 90 %.

Животным групп с индукцией ДСТ за 7 дней до трансплантации фрагментов эндокринных желез вводили в порталную вену печени 0,5 мл физиологического раствора, содержащего 1×10^7 спленоцитов. Двум группам крыс с индукцией ДСТ за день до введения спленоцитов делали внутрибрюшинную инъекцию раствора хлорида гадолиния ($GdCl_3$, 1 мг/100 г массы тела). Трансплантацию фрагментов ткани щитовидной железы (ФрЩЖ) или яичников (ФрЯ) проводили под капсулу левой почки.

Животных забивали на 30–35-е сутки после трансплантации, забирали кровь для измерения гормонов и почку с трансплантатом на гистологический анализ. Радиоиммунологическим методом измеряли общий тироксин (Т4) и трийодтиронин (Т3) с по-

мощью тест-наборов TOTAL T4 RIA KIT и TOTAL T3 RIA KIT (Immunotech); эстрадиол и прогестерон с помощью тест-наборов РИА-Эстрадиол-СТ и РИА-Прогестерон-СТ (Беларусь). Для гистологического анализа почки с трансплантатами были зафиксированы в 10 % формалине и залиты в парафин. Серийные срезы толщиной 5 мкм были окрашены гематоксилином и эозином.

Статистическую обработку результатов проводили с помощью пакета анализа программы Excel с использованием t-критерия Стьюдента и однофакторного дисперсионного анализа для непараметрических данных (ANOVA). При $p < 0,05$ различия считались статистически достоверными.

Результаты и их обсуждение. В результате оперативного вмешательства (тиреоидэктомии либо овариэктомии) у экспериментальных животных возникает состояние недостаточности тиреоидных или половых гормонов (таблица). Аллотрансплантация фрагментов соответствующей железы может частично компенсировать эту недостаточность. В случае трансплантации ФрЩЖ наблюдается компенсация уровня Т4 на 40 %, а в случае овариэктомии на 23 % — уровня эстрадиола и 47 % — прогестерона по сравнению с интактным контролем.

Интрапортальное введение спленоцитов донорского происхождения (индукция ДСТ) позитивно влияет на результат аллотрансплантации ФрЩЖ и ФрЯ. В этом случае наблюдается уровень Т4, составляющий 82 % от значений в интактном контроле; уровни эстрадиола и прогестерона составляют 45 и 73 % от контроля соответственно. Введение спленоцитов на фоне действия

Уровень гормонов в сыворотке крови экспериментальных животных

Группа	Т4, нмоль/л	Т3, нмоль/л	Эстрадиол, нмоль/л · 10 ⁻²	Прогестерон, нмоль/л
Интактный контроль	70,8±4,3	2,1±0,5	34,6±5,4	83,3±15,3
Тиреоидэктомия	19,2±3,5*	2,3±0,5	—	—
Овариэктомию	—	—	7,9±1,7*	10,7±2,5*
Трансплантация ФрЩЖ	32,8±7,1*	2,0±0,7	—	—
Трансплантация ФрЯ	—	—	7,5±4,3*	39,4±3,1*
Трансплантация ФрЩЖ + ДСТ	58,2±12,9	2,2±0,8	—	—
Трансплантация ФрЯ + ДСТ	—	—	15,4±5,1*	61,4±11,9
Трансплантация ФрЩЖ + ДСТ + $GdCl_3$	26,1±5,5*	1,9±0,9	—	—
Трансплантация ФрЯ + ДСТ + $GdCl_3$	—	—	7,7±2,3*	26,9±12,2*

Примечания: 1. У животных с моделью тиреоидной недостаточности уровень половых гормонов не изучали, и наоборот.

2. * $p < 0,05$, уровень гормона достоверно отличается от контроля.

GdCl₃ не приводило к значительному увеличению уровня гормонов после трансплантации. Нужно также отметить, что в группах животных с моделью тиреоидной недостаточности не наблюдалось достоверного изменения уровня ТЗ по сравнению с контролем.

Гистологический анализ выявил признаки отторжения аллогraftов как ФрЩЖ, так и ФрЯ. Наблюдалась диффузная инфильтрация лимфоцитами, а также выраженный лимфоцитарный барьер между паренхимой почки и трансплантатом. Отмечено нарушение характерной структуры ткани эндокринных желез и замещение ее соединительной. Такая же картина в целом была характерна для трансплантатов животных, которым были введены спленоциты на фоне GdCl₃.

При исследовании трансплантатов животных, которым были введены спленоциты без GdCl₃, выявлена достаточно хорошо сохранившаяся структура ткани яичников или щитовидной железы. На гистологических срезах образцов трансплантатов ФрЯ, полученных от животных этой группы, отмечены фолликулы различной степени

зрелости (примордиальные, первичные, преантральные и антральные), а также желтые тела, что свидетельствует о функциональной полноценности аллогraftов. На гистологических срезах образцов трансплантатов ФрЩЖ наблюдалась хорошо сохранившаяся ткань щитовидной железы, содержащая фолликулы, выстланные высоким кубическим эпителием и заполненные коллоидом с вакуолями резорбции, что свидетельствовало об активной гормонопродуцирующей функции аллогraftов. В обоих типах аллогraftов наблюдалась развитая сосудистая сеть.

Выводы

На основе результатов исследования уровня гормонов и гистологического анализа можно заключить, что при аллотрансплантации ткани эндокринных желез развивается острое отторжение трансплантата. Интрапортальное введение спленоцитов донорского происхождения за 7 дней до трансплантации приводит к улучшению выживаемости аллогraftов. Введение хлорида гадолиния (GdCl₃) отменяет этот эффект.

Список литературы

1. Allotransplantation of cryopreserved parathyroid tissue for severe hypocalcemia in a renal transplant recipient / S. M. Flechner, E. Berber, M. Askar [et al.] // *Am. J. Transplant.* — 2010. — V. 10. — P. 2061–2065.
2. Long-term graft function after allogeneic islet transplantation / J. R. Lakey, T. Kin, G. L. Warnock [et al.] // *Cell Transplant.* — 2007. — V. 16. — P. 441–446.
3. Trial of autotransplantation of cryopreserved thyroid tissue for postoperative hypothyroidism in patients with Graves' disease / K. Shimizu, S. Kumita, Y. Kitamura [et al.] // *J. Am. Coll. Surg.* — 2002. — V. 194. — P. 14–22.
4. Male fertility and strategies for fertility preservation following childhood cancer treatment / R. T. Mitchell, P. T. Saunders, R. M. Sharpe [et al.] // *Endocr. Dev.* — 2009. — V. 15. — P. 101–134.
5. Restoration of ovarian function after orthotopic (intraovarian and periovarian) transplantation of cryopreserved ovarian tissue in a woman treated by bone marrow transplantation for sickle cell anaemia: case report / J. Donnez, M. M. Dolmans, D. Demylle [et al.] // *Hum. Reprod.* — 2006. — V. 21. — P. 183–188.
6. Shushan A. Immunological factors in infertility / A. Shushan, J. G. Schenker // *Am. J. Reprod. Immunol.* — 1992. — V. 28, № 3–4. — P. 285–287.
7. Different effects of FK506, rapamycin, and mycophenolate mofetil on glucose-stimulated insulin release and apoptosis in human islets / J. D. Johnson, Z. Ao, P. Ao [et al.] // *Cell Transplant.* — 2009. — V. 18, № 8. — P. 833–845.
8. Pretransplant infusion of mesenchymal stem cells prolongs the survival of a semiallogeneic heart transplant through the generation of regulatory T cells / F. Casiraghi, N. Azzollini, P. Cassis [et al.] // *J. Immunol.* — 2008. — V. 181, № 6. — P. 3933–3946.
9. Oko A. Prolongation of rat kidney graft survival after inoculation of allogeneic spleen cells: the effect of various routes of cell transfer / A. Oko, I. Idasiak-Piechocka, K. Pawlaczuk // *Ann. Transplant.* — 2002. — V. 7, № 2. — P. 51–53.
10. Repeating intraportal donor-specific transfusion may induce tolerance following adult living-related donor liver transplantation / Y. Sato, T. Ichida, H. Watanabe [et al.] // *Hepatogastroenterology.* — 2003. — V. 50, № 51. — P. 601–606.
11. Prolongation of xenograft survival by combining donor-specific intravenous presensitization with FK 506 / H. Iwata, Y. Umeda, Y. Matsuno [et al.] // *Transplant. Proc.* — 2002. — V. 34. — P. 2745–2748.

12. Prolonged survival of mouse skin allografts in recipients treated with donor splenocytes and antibody to CD40 ligand / T. G. Markees, N. E. Phillips, R. J. Noelle [et al.] // *Transplantation*. — 1997. — V. 64, № 2. — P. 329–335.

13. Prolonged survival of donor-specific rat intestinal allograft by administration of bone-marrow-derived immature dendritic cells / D. Sheng Sun, H. Iwagaki, M. Ozaki [et al.] // *Transpl. Immunol.* — 2005. — V. 14, № 1. — P. 17–20.

14. Survival of long nerve allografts following donor antigen pretreatment: a pilot study / T. H. Tung, V. B. Doolabh, S. B. Mackinnon [et al.] // *J. Reconstr. Microsurg.* — 2006. — V. 22, № 6. — P. 443–449.

15. Treatment of streptozotocin-induced diabetes mellitus by transplantation of islet cells plus bone marrow cells via portal vein in rats / K. Ikebukuro, Y. Adachi, Y. Yamada [et al.] // *Transplantation*. — 2002. — V. 73. — P. 512–518.

16. *Parker G.A.* Liver immunobiology / G. A. Parker, C. A. Picut // *Toxicol. Pathol.* — 2005. — V. 33, № 1. — P. 52–62.

17. *Diaz-Peromingo J.A.* Influence of gadolinium-induced kupffer cell blockade on portal venous tolerance in rat skin allograft transplantation / J. A. Diaz-Peromingo, A. Gonzalez-Quintela // *Eur. Surg. Res.* — 2005. — V. 37, № 1. — P. 45–49.

18. *Легач Е. И.* Ретроградный способ тиреоидэктомии крыс как адекватная модель гипотиреоза / Е. И. Легач // *Трансплантология*. — 2005. — Т. 8, № 2. — С. 92–94.

19. *Кабак Я. М.* Практикум по эндокринологии / Я. М. Кабак. — М. : Сов. наука, 1968. — 236 с.

20. *Клаус Д.* Лимфоциты: методы / Д. Клаус. — М. : Мир, 1990. — 395 с.

Г.А. Божок, В.В. Кірошка, Ю.О. Тищенко, Ю.В. Люпіна, Я.Д. Карпова, Н.П. Шарова, Є.І. Легач
ВПЛИВ ІНТРАПОРТАЛЬНОГО ВВЕДЕННЯ ДОНОРСЬКИХ СПЛЕНОЦИТІВ ТА ХЛОРИДУ ГАДОЛІНІЮ
НА ВИЖИВАННЯ ТКАНИННИХ АЛОГРАФТІВ ЕНДОКРИННИХ ЗАЛОЗ

Відомо, що введення донорських імунокомпетентних клітин у портальну вену печінки за 7–14 днів до трансплантації органа чи тканини від того ж самого донора може індукувати стан донор-специфічної толерантності до алографту. Було вивчено вплив інтрапортального введення спленоцитів, а також хлориду гадолінію ($GdCl_3$) на результат алотрансплантації фрагментів тканини щитовидної залози та яєчників у щурів. Вживаність трансплантата оцінювали за двома параметрами: рівнем гормонів у сироватці крові та збереженості структури тканини трансплантата на гістологічних зразках. Встановлено, що вживаність алографтів тканини щитовидної залози та яєчників була краще у реципієнтів з інтрапортальним введенням спленоцитів. Уведення хлориду гадолінію відміняло цей ефект.

Ключові слова: трансплантація, щитовидна залоза, яєчники, донор-специфічна толерантність, хлорид гадолінію.

G.A. Bozhok, V.V. Kiroshka, Yu.O. Tishchenko, Y.V. Lyupina, Ya.D. Karpova, N.P. Sharova, E.I. Legach

INFLUENCE OF DONOR SPLENOCYTES INTRAPORTAL INFUSION AND GADOLINIUM CHLORIDE ON THE SURVIVAL OF THE ENDOCRINE GLANDS ALLOGRAFT TISSUE

It is known, that infusion of donor immune cells in portal vein of the liver for 7–14 days before the transplant organ or tissue from the same donor can induce a state of donor-specific tolerance to the allograft. The effect of infusion of splenocytes into the portal vein, as well as gadolinium chloride ($GdCl_3$), on the outcome of allotransplantation of the tissue fragments of thyroid gland and ovaries was studied in rats. Graft survival was evaluated by two parameters: the level of hormones in blood serum and the preservation of the graft tissue structure on histological specimens. It was established, that survival of allograft tissue of the thyroid gland and ovaries was better in recipients with infusion of splenocytes into the portal vein. The introduction of $GdCl_3$ abolished this effect.

Key words: transplantation, thyroid gland, ovaries, donor-specific tolerance, gadolinium chloride.