

ВЛИЯНИЕ ВВЕДЕНИЯ ДОНОРСКИХ СПЛЕНОЦИТОВ НА ВЫЖИВАЕМОСТЬ ФРАГМЕНТОВ ТКАНИ ЩИТОВИДНОЙ ЖЕЛЕЗЫ ПРИ АЛЛОТРАНСПЛАНТАЦИИ

Божок Г. А.

Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, г. Харьков

В качестве альтернативного метода лечения гормональной недостаточности, например сахарного диабета 1 типа, гипокортицизма, гипотиреоза, применяется трансплантация клеток и тканей эндокринных желез [1–3]. Преимуществом данного метода является возможность коррекции гормональной потребности организма по его физиологическому запросу, учитывающему циркадные ритмы, стресс и т. д. Метод используется достаточно давно, однако широкого распространения в клинической практике он не получил, несмотря на то, что после трансплантации наблюдается повышение уровня гормонов в крови реципиентов [3]. Одной из причин этого является нестойкость достигаемого эффекта, что связано с деструкцией трансплантата в результате реакции отторжения, возникающей в ответ на введение в организм чужеродного биологического материала [4]. Возможность применения иммуносупрессивных препаратов в случае трансплантации клеток эндокринного происхождения ограничена вследствие негативного влияния их на гормональный статус [5].

Анализ клинических и экспериментальных данных свидетельствует о том, что в трансплантологии могут быть с успехом задействованы другие методы коррекции иммунного ответа, к которым относится индукция донор-специфической толерантности (ДСТ) к трансплантату. Один из основоположников трансплантологии П. Медвар еще в 60-х годах прошлого века устано-

вил, что при трансплантации кожи животным, которым внутриутробно была сделана инъекция донорских спленоцитов, не наблюдается реакции острого отторжения [6]. Позднее было установлено [7, 8], что ДСТ может быть вызвана предтрансплантационным введением донорских клеток (мононуклеаров периферической крови, клеток лимфоузлов, селезенки, костного мозга) в портальную вену печени. Через 7–14 дней производят трансплантацию органа или ткани от того же донора.

Механизм индукции ДСТ до настоящего времени детально не изучен. Считается, что ДСТ обеспечивают ряд процессов, таких, как апоптоз реактивных Т-клеток, уклонение их от иммунного ответа и активная супрессия иммунных реакций [9].

Была показана возможность индукции ДСТ при трансплантации целых органов (почки, сердца, печени), а также кожи и фрагментов кишечника [10–14]. Однако данный метод практически не применялся при пересадке клеток и тканей эндокринных желез.

Нами была предпринята попытка апробировать метод индукции ДСТ при трансплантации овариальной ткани [15]. В результате установлена лучшая выживаемость аллотрансплантата в организме реципиента.

Целью данной работы была оценка влияния введения донорских спленоцитов на выживаемость фрагментов ткани щитовидной железы при аллотрансплантации.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Все манипуляции с животными проводились в соответствии с положениями «Европейской конвенции защиты позвоночных животных, которые используются с экспериментальной и иной научной целью» (Страсбург, 1985) и национальными нормами по биоэтике (Киев, 2001).

Исследования проводили на 3–4-месячных крысах линий Вистар и Август. Реципиентами служили крысы линии Август.

Спленоциты получали из селезенки крыс линии Вистар [16]. Эритроциты из клеточной суспензии удаляли путем трехкратной обработки раствором, содержащим 154 мМ хлорида аммония, 10 мМ бикарбоната натрия, 0,082 мМ ЭДТА. Жизнеспособность полученных клеток, которую проверяли методом суправитального окрашивания трипановым синим, составляла в среднем 90 %.

Животным одной из экспериментальных групп за 7 дней до трансплантации в портальную вену печени вводили 1 мл физиологического раствора, содержащего спленоциты в количестве 1×10^7 .

Тиреоидэктомию у крыс линии Август проводили за 7 дней до трансплантации [17]. Щитовидную железу забирали у крыс линии Вистар, измельчали на четыре фрагмента, отмывали 3–4 раза физиологическим раствором и трансплантировали под капсулу левой почки реципиентам линии Август.

В качестве ложнооперированного контроля была использована группа животных, которым выполняли интрапортальное введение физиологического раствора без спленоцитов, далее осуществляли тиреоидэктомию.

Все операции проводили под комбинированным наркозом (кетамин — 2,5 мг, ксилазин — 1 мг на 100 г массы тела).

Забор крови для изучения уровня T_4 в сыворотке крови осуществляли каждые 7 суток. На 35 или 54 сутки после трансплантации животных забивали.

Общий T_4 измеряли радиоиммунологическим методом с помощью тест-набора TOTAL T_4 RIA KIT (Immunotech).

В эксперименте были использованы следующие группы животных:

группа 1 — интактный контроль ($n = 6$);

группа 2 — тиреоидэктомированные крысы ($n = 10$);

группа 3 — крысы с тиреоидэктомией и трансплантацией ($n = 12$);

группа 4 — крысы с введением спленоцитов, тиреоидэктомией и трансплантацией ($n = 8$);

группа 5 — ложнооперированный контроль ($n = 8$).

Для гистологического анализа почки с трансплантатами фиксировали в 10 % формалине и заливали в парафин. Серийные срезы толщиной 5 мкм окрашивали гематоксилином и эозином.

Статистическую обработку данных проводили с помощью программного приложения Excel. Данные представлены как среднее значений, полученных в двух аналогичных экспериментах и измеренных в двух параллельных пробах, \pm стандартная ошибка. Статистическую достоверность оценивали с помощью однофакторного дисперсионного анализа, достоверными считались различия при $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Установлено, что на 14 сутки у крыс 2 и 5 групп в сыворотке крови наблюдалось уменьшение уровня общего T_4 в среднем до $27,21 \pm 3,45$ нмоль/л (рис. 1) по сравнению с контрольными животными ($73,89 \pm 6,25$ нмоль/л). У животных, которым после тиреоидэктомии была вы-

полнена аллотрансплантация фрагментов ткани щитовидной железы (группа 3), на исследуемые сутки уровень T_4 составлял $34,10 \pm 6,77$ нмоль/л. К 35 суткам наблюдения достоверной разницы между уровнем гормонов у животных 2, 3 и 5 групп не наблюдалось.

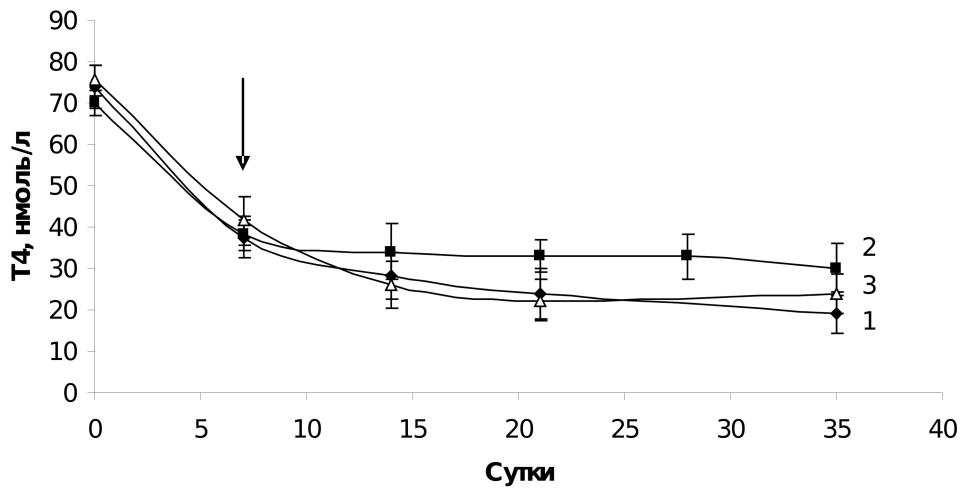


Рис. 1. Концентрація тироксина в сировотці крові експериментальних груп тварин після тиреоїдектомії.

1 — група 2; 2 — група 3; 3 — група 5.

Стрелкою указані сутки, на які тваринам групи 3 була виконана трансплантація.

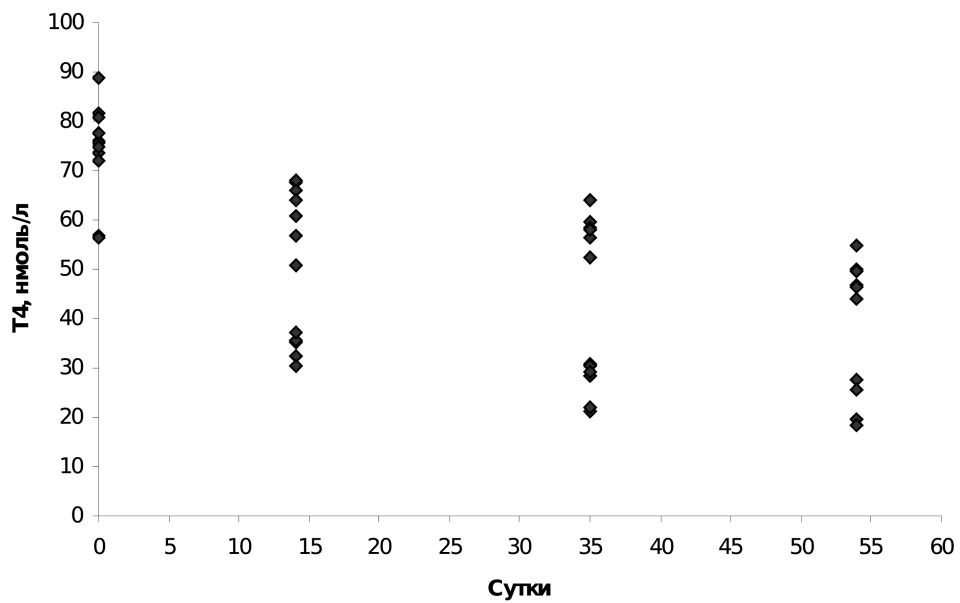


Рис. 2. Концентрація тироксина в сировотці крові тварин 4 групи після тиреоїдектомії і трансплантації. Представлені дані рівня гормону для кожного тварини групи, вимірені в двох паралельних пробах.

Трансплантація тваринам була виконана на 7 сутки.

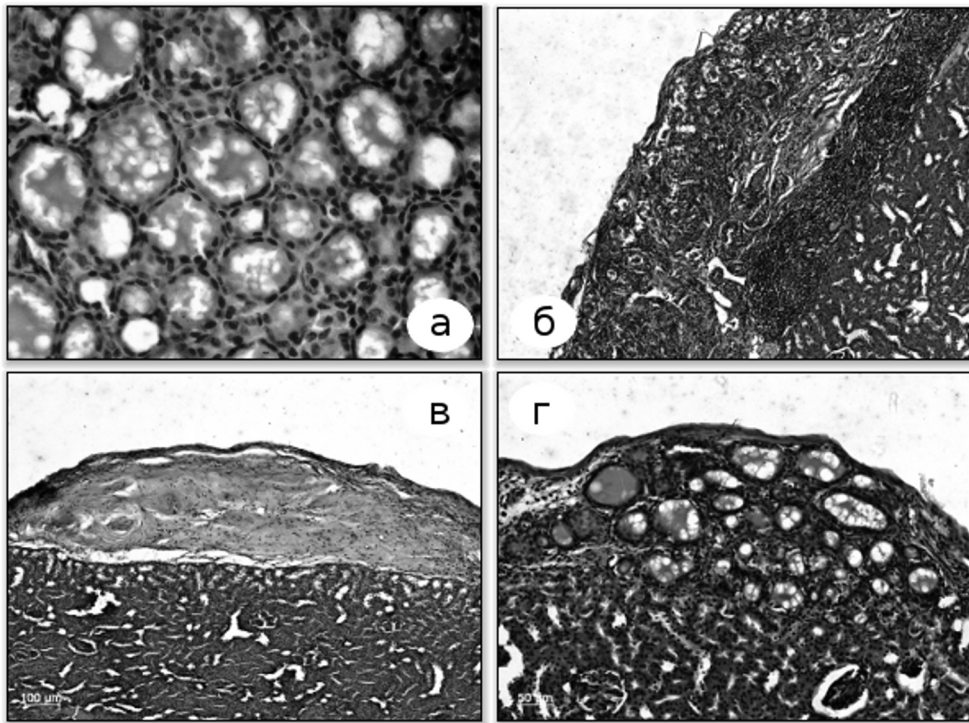


Рис. 3. Гистологические препараты нативной ткани щитовидной железы (а) и трансплантатов на 35 сутки после трансплантации под капсулу почки животным экспериментальных групп: б — группа 3; в — группа 4 (у животных наблюдался уровень T_4 ниже 50% от контроля); г — группа 4 (у животных наблюдался уровень T_4 выше 50% от контроля).

Увеличение: а — $\times 400$; б — $\times 100$; в — $\times 100$; г — $\times 200$.

В группе животных с предтрансплантационным введением донорских спленоцитов (группа 4) наблюдался значительный разброс уровня общего T_4 (рис. 2). Приблизительно у половины животных этой группы на 35 сутки в сыворотке крови наблюдался пониженный уровень T_4 , находившийся в пределах от 21,9 до 30,4 нмоль/л, что составляло 29–41% от среднего значения гормона в группе интактного контроля. У остальных экспериментальных животных этой группы уровень T_4 находился в пределах 52,5–64,1 нмоль/л, что составляло 71–86% от контрольных значений. В последующий период наблюдения (до 54 суток) уровень гормона несколько снижался у животных всей группы.

Гистологический анализ выявил явные признаки отторжения трансплантатов ткани щитовидной железы у животных 3 группы (рис. 3, б). Наблюдалась диффузная лимфоцитарная инфильтрация, некроз тироцитов, нарушение характерной фолликулярной структуры ткани щитовидной железы и замещение ее соединительной. Среди

образцов трансплантатов животных 4 группы наблюдались ярко выраженные морфологические отличия. У животных с уровнем T_4 ниже 50% от интактного контроля наблюдались явные признаки отторжения трансплантата: инфильтрация лимфоцитами, полная деградация фолликулярного строения ткани, замещение ткани трансплантата соединительной тканью (рис. 3, в).

У животных этой же группы с уровнем T_4 выше 50% от интактного контроля наблюдалась хорошо сохранившаяся ткань щитовидной железы, содержащая фолликулы, выстланные высоким кубическим эпителием (рис. 3, г). Хорошо различались фолликулы, заполненные коллоидом с вакуолями резорбции, что свидетельствовало об активной гормон-продуцирующей функции трансплантата. Также наблюдались мелкие сосуды, пронизывающие ткань трансплантата.

Таким образом, при аллотрансплантации фрагментов щитовидной железы под капсулу почки без использования иммуносупрессии развивается острое отторжение

трансплантата. У експериментальних животних, которым была выполнена предтрансплантационная инъекция донорских спленоцитов в портальную вену печени, установлена хорошая выживаемость трансплантата ткани щитовидной железы. Однако, этот эффект наблюдается приблизительно в 50 % случаев. У остальных животных этой группы процесс отторжения протекает, по-видимому, быстрее, чем у животных с аллотрансплантацией без введения спленоцитов.

Тот факт, что состояние специфической ареактивности иммунной системы реципиента к трансплантату наблюдался не у всех животных, ставит вопрос о необходимости дальнейшего изучения механизмов донорспецифической толерантности и выяснения ключевых факторов, ответственных за раз-

витие иммунного ответа в сторону принятия или отторжения трансплантата. Известно, что наступление состояния толерантности к трансплантату зависит от места введения (периферические сосуды или портальная вена печени) донорских клеток [7, 10], периода времени от введения клеток до трансплантации [7], повторности предтрансплантационных обработок [8], дозы вводимого антигена [18]. В предыдущих исследованиях нами была установлена хорошая выживаемость неонатальной овариальной ткани при индукции ДСТ [15]. То, что при таких же условиях эффект выживаемости ткани щитовидной железы половозрелых животных был достигнут не в 100 % случаев после трансплантации, говорит о влиянии на этот процесс вида пересаживаемой ткани и возраста донора.

ВЫВОДЫ

1. При аллотрансплантации фрагментов щитовидной железы половозрелых крыс под капсулу почки без иммуносупрессии наблюдается развитие острого отторжения трансплантата к 35 суткам.
2. Введение спленоцитов донорского про-

исхождения в портальную вену печени реципиентов за семь суток до трансплантации фрагментов щитовидной железы половозрелых животных может привести как к принятию трансплантата, так и к ускорению его отторжения.

ЛИТЕРАТУРА

1. International trial of the Edmonton protocol for islet transplantation [Text] / A. M. Shapiro, C. Ricordi, B. J. Hering [et al.] // *N. Engl. J. Med.* — 2006. — Vol. 355, № 13. — P. 1318–1330.
2. Ксенотрансплантація кріоконсервованого ендокринного матеріалу як метод корекції гіпофункції залоз в експерименті [Текст] / Т. П. Бондаренко, Г. А. Божок, Н. М. Алабедалькарім [та ін.] // *Трансплантологія.* — 2003. — Т. 4, № 4. — С. 60–63.
3. Застосування комбінованих органних культур ендокринних залоз для лікування ендокринопатій: досягнення та перспектива [Текст] / І. С. Турчин, О. С. Ларін, І. І. Дроздович [та ін.] // *Трансплантологія.* — 2007. — Т. 9, № 1. — С. 293–295.
4. Трансплантация органной культуры коркового вещества надпочечников в лечении постадреналэктомического гипокортицизма [Текст] / Р. М. Сичинава, С. И. Рыбаков, И. В. Комиссаренко [и др.] // *Клинич. хирургия.* — 1997. — № 11–12. — С. 51–53.
5. *Penforinis A.* Immunosuppressive drug-induced diabetes [Text] / A. Penforinis, S. Kury-Paulin // *Diabetes Metabol.* — 2006. — Vol. 32, № 5. — P. 539–546.
6. *Billingham R. E.* Actively acquired tolerance of foreign cells [Text] / R. E. Billingham, L. Brent, P. B. Medawar // *Nature.* — 1953. — Vol. 172 (4379). — P. 603–606.
7. Impact of 70 % partial hepatectomy on administration of donor leukocytes in cardiac transplantation in rats [Text] / Y. Sato, O. Farges, D. Buffello [et al.] // *Transplant. Proc.* — 1998. — Vol. 30. — P. 3873–3875.
8. Repeating intraportal donor-specific transfusion may induce tolerance following adult living-related donor liver transplantation [Text] / Y. Sato, T. Ichida, H. Watanabe [et al.] // *Hepatology Research.* — 2003. — Vol. 50, № 51. — P. 601–606.
9. Molecular mechanisms of portal vein tolerance [Text] / T. Watanabe, M. Kudo, T. Chiba, Y. Wakatsuki // *Hepatology Research.* — 2008. — Vol. 38. — P. 441–449.

10. Prolongation of rat kidney graft survival after inoculation of allogeneic spleen cells: the effect of various routes of cell transfer [Text] / A. Oko, I. Idasiak-Piechocka, K. Pawlaczyk // Ann. Transplant. — 2002. — Vol. 7, № 2. — P. 51–53.
11. Impact of intraportal donor-specific leukocyte transfusion for adult ABO-incompatible liver transplantation [Text] / H. Oya, Y. Sato, S. Yamamoto [et al.] // Transplant Proc. — 2009. — Vol. 41, № 1. — P. 222–225.
12. Prolonged survival of donor-specific rat intestinal allograft by administration of bone-marrow-derived immature dendritic cells [Text] / D. Sheng Sun, H. Iwagaki, M. Ozaki [et al.] // Transpl. Immunol. — 2005. — Vol. 14, № 1. — P. 17–20.
13. Prolonged cardiac allograft survival following portal venous inoculation of allogeneic cells: What is «hepatic tolerance?» [Text] / S. Kenick, R. P. Lowry, R. D. S. Forbes, R. Lisbona // Transplant. Proc. — 1987. — Vol. 19. — P. 478–479.
14. Eid A. Induction of transplantation tolerance by intraportal injection of allogeneic bone marrow cells. Possible implications for intrauterine bone marrow transplantation across major histocompatibility barriers [Text] / A. Eid, S. Morecki, S. Slavin // Transpl. Int. — 1988 — Vol. 1, № 2. — P. 109–112.
15. Предтрансплантационное введение донорских лимфоцитов пролонгирует выживаемость аллогенной ткани яичников у овариэктомированных животных-реципиентов [Текст] / Г. А. Божок, В. В. Киришча, Ю. О. Тищенко, Е. И. Легач // Пробл. эндокрин. патол. — 2009. — № 4. — С. 79–84.
16. Лимфоциты: Методы [Текст] / Под ред. Дж. Клауса // М.: Мир, 1990. — 395 с.
17. Легач Е. И. Ретроградный способ тиреоидэктомии крыс как адекватная модель гипотиреоза [Текст] / Е. И. Легач // Трансплантология. — 2005. — Т. 8, № 2. — С. 92–94.
18. Portal venous donor-specific transfusion in conjunction with sirolimus prolongs renal allograft survival in nonhuman primates / K. K. Dhanireddy, D. A. Bruno, T. A. Weaver [et al.] // Am. J. Transplant. — 2009. — Vol. 9, № 1. — P. 124–131.

ВПЛИВ УВЕДЕННЯ ДОНОРСЬКИХ СПЛЕНОЦИТІВ НА ВИЖИВАНІСТЬ ФРАГМЕНТІВ ТКАНИНИ ЩИТОПОДІБНОЇ ЗАЛОЗИ ПРИ АЛОТРАНСПЛАНТАЦІЇ

Божок Г. А.

Інститут проблем кріобіології і кріомедицини НАН України, м. Харків

В роботі вивчено вплив передтрансплантацийного введення спленоцитів донорського походження на виживаність фрагментів тканини щитоподібної залози статевозрілих щурів за умов алотрансплантациї. Встановлено, що введення спленоцитів у портальну вену печінки за сім діб до трансплантациї може призвести як до прийняття трансплантату, так і до прискорення його відторгнення.

К л ю ч о в і с л о в а: щитоподібна залоза, трансплантация, донор-специфічна толерантність, тироксин.

ВЛИЯНИЕ ВВЕДЕНИЯ ДОНОРСКИХ СПЛЕНОЦИТОВ НА ВЫЖИВАЕМОСТЬ ФРАГМЕНТОВ ТКАНИ ЩИТОВИДНОЙ ЖЕЛЕЗЫ ПРИ АЛОТРАНСПЛАНТАЦИИ

Божок Г. А.

Інститут проблем кріобіології і кріомедицини НАН України, г. Харків

В работе изучено влияние предтрансплантационного введения спленоцитов донорского происхождения на выживаемость фрагментов ткани щитовидной железы половозрелых крыс при аллотрансплантации. Установлено, что введение спленоцитов в портальную вену печени реципиентов за семь суток до трансплантации может привести как к принятию трансплантата, так и к ускорению его отторжения.

К л ю ч е в ы е с л о в а: щитовидная железа, трансплантация, донор-специфическая толерантность, тироксин.

**THE INFLUENCE OF DONOR'S SPLENOCYTES ADMINISTRATION ON SURVIVAL
OF THYROID TISSUE FRAGMENTS AT TRANSPLANTATION**

G. A. Bozhok

Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine, NAS of Ukraine, Kharkiv

The influence of pretransplant administration of the splenocytes of donor's origin on survival of thyroid tissue fragments of adult rats at transplantation was studied. It has been established that introduction of the splenocytes into portal vein of recipient's liver 7 days before transplantation can lead to the allograft either acceptance or acceleration of rejection.

Key words: thyroid gland, transplantation, donor-specific tolerance, thyroxin.