

## ... ФІЗІОЛОГІЯ ЛЮДИНИ ТА ТВАРИН ...

УДК: 615.361.451.014.41

### **Гормонопродуцирующая активность криоконсервированных и SIS-инкапсулированных фрагментов надпочечников новорожденных поросят *in vitro* и при ксенотрансплантации** Н.М.Алабедалькарім<sup>2</sup>, Ден Бо<sup>1</sup>, В.Д.Устиченко<sup>2</sup>, Т.П.Бондаренко<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Харьковский национальный университет имени В.Н.Каразина (Харьков, Украина)

<sup>2</sup>Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины (Харьков, Украина)  
vustichenko@yahoo.com

В работе исследован уровень гормональной активности инкапсулированных в SIS (small intestinal submucosa) фрагментов надпочечников новорожденных поросят при криоконсервировании и последующем рекультивировании при 26°C и 37°C *in vitro* и при трансплантации. Показано, что *in vitro* криоконсервированные SIS-инкапсулированные фрагменты способны к базальной и стимулированной секреции кортизола и альдостерона в случае медленного замораживания и гипотермического рекультивирования, и быстрого замораживания с последующим рекультивированием при 37°C. При этом на 31 сутки после трансплантации наиболее успешными в компенсации надпочечниковой недостаточности были как быстро, так и медленно замороженные фрагменты надпочечников, рекультивированные в условиях гипотермии, трансплантированные в SIS.

Ключевые слова: *кортизол, альдостерон, криоконсервирование, рекультивирование, адреналэктомия.*

#### **Введение**

Современная гормонозаместительная терапия, применяемая при ряде эндокринных патологий, к сожалению, не может восстановить весь комплекс метаболических взаимодействий гормонов. В этой связи, трансплантация эндокринных клеток является более адекватным методом, позволяющим сохранить суточные и сезонные гормональные ритмы, обеспечить регуляцию гормонопродукции под контролем гипоталамо-гипофизарной системы. Однако серьезным ограничением для широкого клинического применения эндокринных трансплантатов является ограниченный срок функционирования в связи с отторжением (Lee, Bae, 2000). Для решения этой проблемы применяются различные способы обработки донорского материала: культивирование (Rutzky et al., 2002; Зубкова та ін., 2005), в том числе и гипотермическое (Ricordi et al., 1990), криоконсервирование с различными скоростями охлаждения (Taylor et al., 1987; Iwasa et al., 1994), рекультивирование (Алабедалькарім та ін., 2005). Кроме того, в настоящее время трансплантация микроинкапсулированных клеток с использованием биологических материалов, поддерживающих пролиферацию, регенерацию клеток трансплантата и обеспечивающих его иммунологическую изоляцию, является одним из перспективных методов в области клеточной трансплантации (Balamurugan, Gu, 2003). Small intestinal submucosa (SIS) – ксеногенный биоматериал, полученный из селективных слоев тонкого кишечника поросят, уже показал свои исключительные ремоделирующие характеристики при трансплантации кровеносных сосудов (Baltoyannis et al., 2000), кожи (Admire et al., 2003), островковых клеток (Woods et al., 2004). Преимущества SIS связаны не только с влиянием на тип иммунного ответа, который будет преобладать после трансплантации (Th-2 или Th-1), но и со стимуляцией регенеративных процессов в трансплантате, улучшением его трофики вследствие ускорения васкуляризации (Pribitkin et al., 2004). Все вышеуказанное позволяет предположить, что SIS ксеногенного или аллогенного происхождения может представлять интерес с точки зрения иммуноизолирующего материала при трансплантации стероидпродуцирующих клеток надпочечных желез.

В связи с этим целью данной работы явилось исследование влияния SIS-инкапсуляции на гормонопродуцирующую активность нативных, криоконсервированных и впоследствии рекультивированных фрагментов надпочечников новорожденных поросят *in vitro* и при ксенотрансплантации.

#### **Объекты и методы исследования**

Надпочечные железы новорожденных поросят извлекали в стерильных условиях, тщательно отмывали средой 199, содержащей 100 ед./мл пенициллина и 200 мкг/мл стрептомицина, измельчали

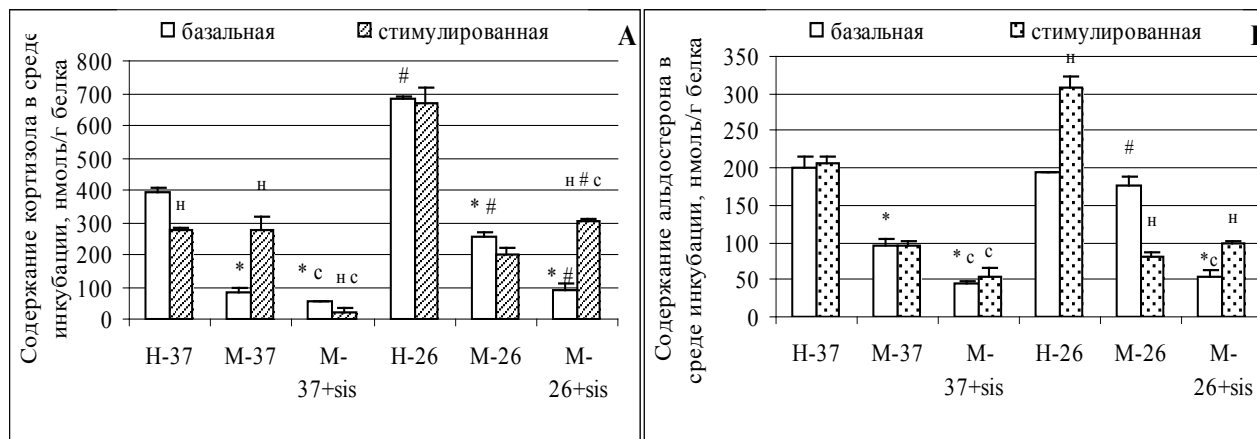
на фрагменты размером 1–3 мм<sup>3</sup> (Фр) и подвергали медленному (Бондаренко, Легач, 2001) и быстрому замораживанию (Гуріна та ін., 2005) под защитой ДМСО, отогревали при 37°C на водяной бане до появления жидкой фазы и немедленно удаляли криопротектор. После этого Фр заключали в фрагменты SIS, которые получали по методу (Suckow et al., 1999), помещали в стандартную среду культивирования и рекультивировали в пластиковых чашках Петри 2 суток при 26°C или 37°C в газовой атмосфере с 5% CO<sub>2</sub>. О функциональной активности Фр судили по секреции кортизола и альдостерона за 24 часа инкубации. Для стимуляции стероидогенеза в среду инкубации добавляли дибутирил-цАМФ в конечной концентрации 2 мМ.

В качестве реципиентов использовали крыс (самок) возрастом 13–15 недель, которых подвергали двусторонней адреналэктомии (А/э) под кетамин-ксилазиновой анестезией. Трансплантацию Фр под почечную капсулу производили немедленно после удаления надпочечников. На 31 сутки после адреналэктомии животные были умерщвлены, и образцы плазмы крови использовали для измерения уровня кортизола и альдостерона в плазме крови. Содержание кортизола и альдостерона в среде инкубации и плазме крови измеряли радиоиммунологическим методом и в случае *in vitro* нормировали на содержание белка в образце, который измеряли по методу Бредфорд (Bradford, 1976).

Статистическую обработку данных проводили методом ANOVA с использованием программы Microsoft Excel. При  $p < 0,05$  отличия считали достоверными.

### Результаты и обсуждение

Поскольку в данной работе использовались два температурных режима рекультивирования (26°C и 37°C), полученные данные мы сравнивали с уровнем кортизола в среде инкубации нативных Фр (Н), определение гормональной активности которых проводили при соответствующей температуре (Н-26 и Н-37). Как показано на рис. 1А, в случае медленно замороженных Фр (М) рекультивирование, как при 26°C, так и при 37°C (М-26 и М-37 соответственно), приводило к достоверному снижению базальной секреции кортизола. Хотя рекультивированные при 26°C Фр (М-26) обладали более высокой секреторной активностью, что, вероятно, обусловлено более высоким уровнем их кортизолсекретирующей активности до замораживания. При этом способность к стимулированной секреции кортизола была характерна только для медленно замороженных Фр, рекультивированных при 37°C (М-37).



**Рис. 1.** Влияние медленного замораживания и последующего рекультивирования при 24°C и 37°C на базальную и дибутирил-цАМФ-стимулированную секрецию кортизола (А) и альдостерона (Б) фрагментами надпочечников новорожденных поросят

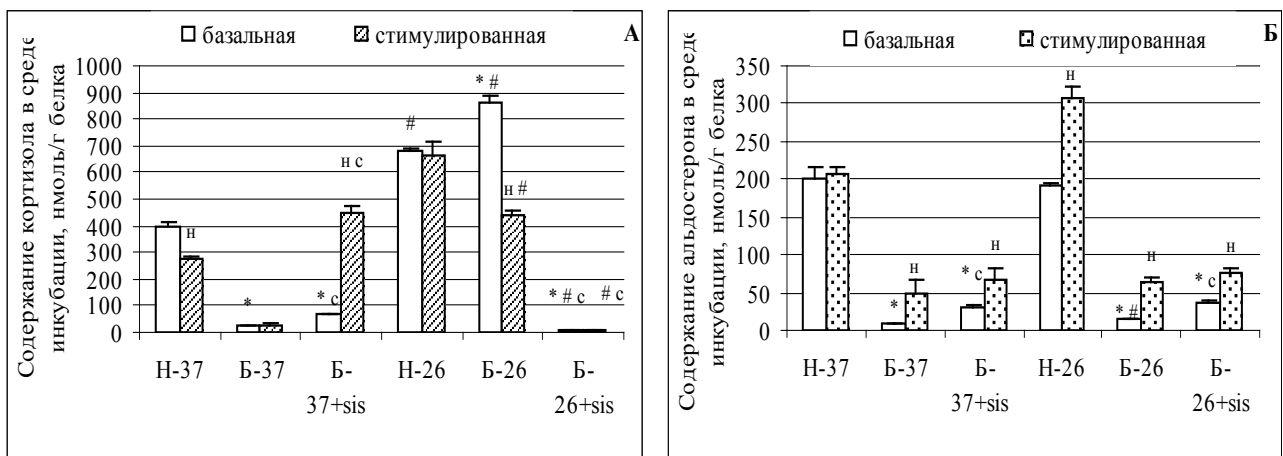
*Примечание:* <sup>h</sup> – различия достоверны относительно секреции кортизола нестимулированными образцами,  $p < 0,05$ ; \* – различия достоверны относительно секреции кортизола соответствующими нативными фрагментами,  $p < 0,05$ ; <sup>c</sup> – различия достоверны относительно секреции кортизола соответствующими образцами, не инкапсулированными в SIS,  $p < 0,05$ ; # – различия достоверны относительно секреции кортизола соответствующими образцами, рекультивированными при 37°C,  $p < 0,05$ .

Существуют данные о возможности использования SIS в качестве подложки для стимуляции клеточных культур *in vitro* (Tian et al., 2005). В нашем случае инкапсуляция материала в SIS не позволила повысить гормональную активность Фр после рекультивирования в условиях 37°C (М-37+SIS), а также способствовала утрате способности клеток к дибутирил-цАМФ-стимулированному

стероидогенезу (рис. 1А). Однако совместное использование гипотермического рекультивирования и инкапсуляции медленно замороженных Фр в SIS (M-26+SIS), хотя и приводило к снижению базальной кортизол-секретирующей активности по сравнению с соответствующими образцами без SIS, абсолютные значения данного показателя были достоверно выше относительно SIS-инкапсулированных образцов, рекультивированных при 37°C. Кроме того, в данном случае мы наблюдали 3-кратное повышение уровня кортизола в среде инкубации в присутствии стимулятора стероидогенеза дибутирил-цАМФ.

Важной характеристикой данного материала является способность к секреции альдостерона, поскольку трансплантация аллогенных фрагментов надпочечников не приводит к компенсации минералокортикоидной недостаточности у адrenaлэктомированных животных (Gallende et al., 2001). Нами было показано, что Фр, рекультивированные при 37°C, способные к дибутирил-цАМФ-стимулированной секреции кортизола, не отвечали на введение в среду инкубации дибутирил-цАМФ повышением секреции альдостерона. Это могло быть обусловлено тем, что дибутирил-цАМФ не является специфическим стимулятором гормонопоэза для клеток клубочковой зоны надпочечников, в которых осуществляется синтез альдостерона (Connel, 2005). В то же время, как нативные Фр (Н-26), так и Фр, рекультивированные при 26°C в SIS (M-26+SIS), были способны к повышению альдостерон-секретирующей функции в присутствии стимулятора дибутирил-цАМФ (рис. 1Б).

Исследование гормональной активности быстро замороженных Фр (Б) показало, что криоконсервирование и рекультивирование при 37°C также приводило к достоверному снижению гормоносекретирующей активности материала, как не заключенного в SIS (Б-37), так и в случае SIS-инкапсулированных образцов (Б-37+SIS) (рис. 2А). Однако, в отличие от медленно замороженных Фр, более высокий уровень кортизола был зафиксирован для SIS-инкапсулированных образцов, что сопровождалось повышением уровня кортизола в присутствии дибутирил-цАМФ.



**Рис. 2. Влияние быстрого замораживания и последующего рекультивирования при 24°C и 37°C на базальную и дибутирил-цАМФ-стимулированную секрецию кортизола (А) и альдостерона (Б) фрагментами надпочечников новорожденных поросят**

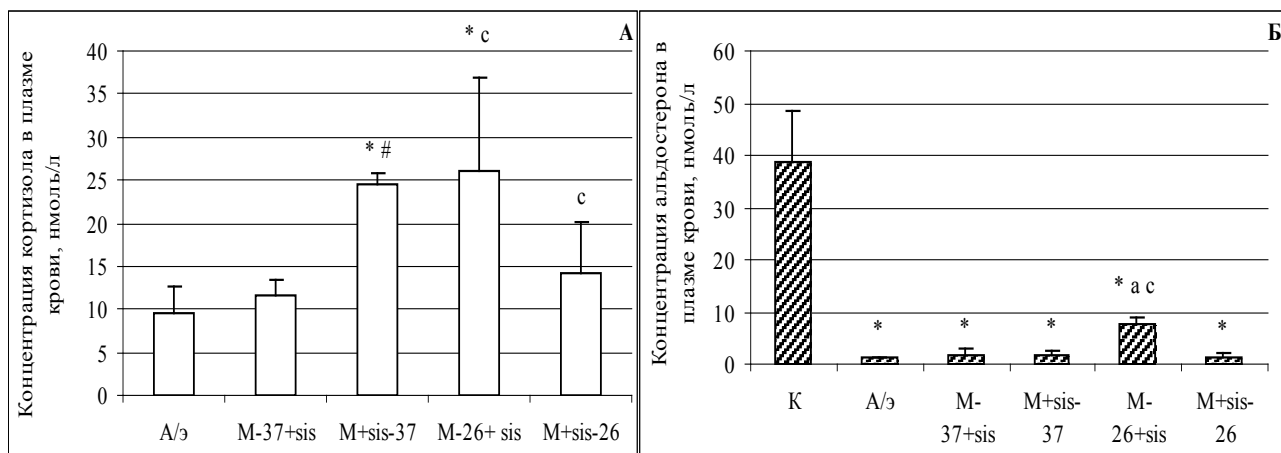
*Примечание:* <sup>H</sup> – различия достоверны относительно секреции кортизола нестимулированными образцами,  $p < 0,05$ ; \* – различия достоверны относительно секреции кортизола соответствующими нативными фрагментами,  $p < 0,05$ ; <sup>c</sup> – различия достоверны относительно секреции кортизола соответствующими образцами, не инкапсулированными в SIS,  $p < 0,05$ ; # – различия достоверны относительно секреции кортизола соответствующими образцами, рекультивированными при 37°C,  $p < 0,05$ .

Интересно, что для быстро замороженных образцов в условиях гипотермии на фоне отсутствия ответа на действие стимулятора мы наблюдали стимуляцию базальной секреции кортизола (Б-26) по сравнению с нативными образцами. При этом наименьшая кортизол-секретирующая активность была характерна для SIS-инкапсулированных образцов (Б-26+SIS). Вероятно, важную роль в осуществлении гормонопродуцирующей функции играет сочетание скорости охлаждения при замораживании и температуры при последующем рекультивировании. По-видимому, при использовании медленного замораживания позитивное влияние на гормональную активность оказывает гипотермическое культивирование, в то время как повышение скорости охлаждения требует повышения температуры рекультивирования до физиологической. В то же время, по данным уровня альдостерона видно, что сочетание быстрого замораживания и SIS-инкапсуляции

обеспечивает более высокий уровень гормональной активности фрагментов надпочечников, как при гипотермическом рекультивировании, так и при рекультивировании в условиях 37°C (рис. 2Б).

Однако только *in vivo* возможно оценить способность адренкортикоцитов включаться в систему метаболической регуляции и функционировать в рамках гипоталамо-гипофизарно-надпочечниковой системы. Известно, что в надпочечниках крыс основным глюкокортикоидом является кортикостерон, в связи с неактивностью фермента CYP21 $\alpha$ , который отвечает за синтез кортизола (Payne, Hales, 2004). Поэтому эффективность трансплантата мы оценивали по наличию в плазме крови реципиентов кортизола, который секретируется клетками надпочечников новорожденных поросят. Согласно нашим данным и данным литературы, в плазме крови контрольных (К) и адrenaлэктомированных животных (А/э) определяется незначительный уровень кортизола, который продуцируется неадреналовыми клетками.

Для изучения компенсаторной активности SIS-инкапсулированных фрагментов надпочечников заключение трансплантационного материала в SIS проводили до рекультивирования или непосредственно перед трансплантацией. Нами было установлено, что в условиях *in vivo* наблюдается обратная корреляция в уровне кортизол-секретирующей активности медленно замороженных Фр по сравнению с данными, полученными *in vitro* (рис. 3А).

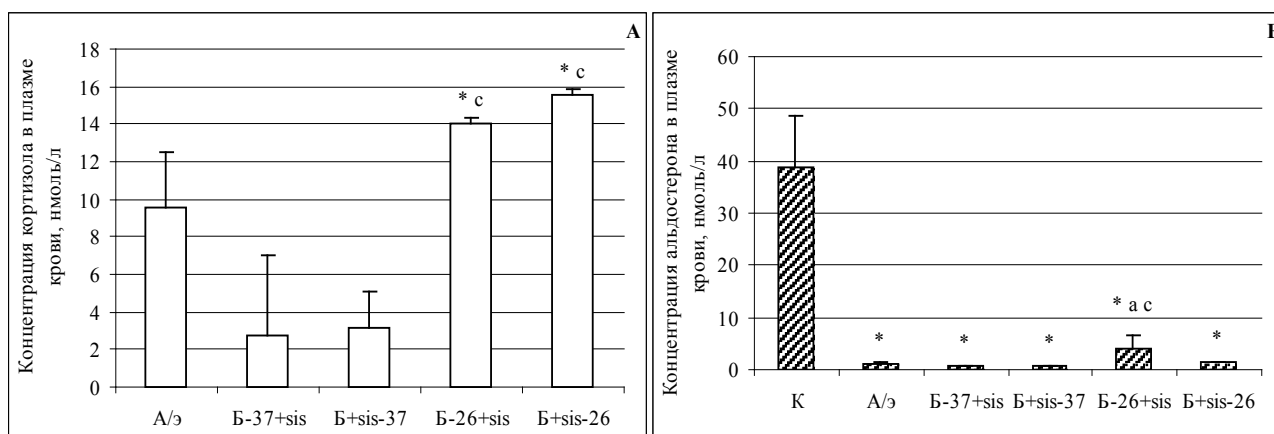


**Рис. 3. Влияние адrenaлэктомии и трансплантации медленно замороженных и SIS-инкапсулированных фрагментов надпочечников новорожденных поросят на содержание кортизола (А) и альдостерона (Б) в плазме крови экспериментальных крыс**

*Примечание:* – различия достоверны относительно концентрации альдостерона в плазме контрольных крыс или кортизола относительно адrenaлэктомированных крыс,  $p < 0,05$ ; <sup>a</sup> – различия достоверны относительно данных для адrenaлэктомированных животных,  $p < 0,05$ ; # – различия достоверны относительно данных для крыс с трансплантатами, инкапсулированными в SIS непосредственно перед трансплантацией,  $p < 0,05$ ; <sup>c</sup> – различия достоверны относительно данных для крыс с трансплантатами, рекультивированными при 37°C,  $p < 0,05$ .

Медленно замороженные Фр, рекультивированные в SIS при 37°C (M-SIS+37), которые характеризовались низким уровнем гормональной активности *in vitro* (рис. 1А: M-37+SIS), при трансплантации обеспечивали достоверную компенсацию недостаточности кортизола на 31 сутки после адrenaлэктомии (рис. 3А). В то время как Фр, рекультивированные при 26°C в SIS (M-SIS+26), обладающие более высокой кортизол-секретирующей активностью *in vitro* и способностью отвечать на действие стимулятора стероидогенеза (рис. 1 А, Б: M-26+SiS), не обеспечивали достоверное повышение уровня кортизола в плазме крови экспериментальных животных. Однако инкапсуляция в SIS данного материала непосредственно перед трансплантацией позволила достоверно повысить компенсаторную эффективность Фр, рекультивированных при 26°C (M-26+SiS). Кроме того, только в данном случае мы наблюдали достоверное повышение альдостерона в плазме крови крыс по сравнению с адrenaлэктомированными животными (рис. 3Б).

При этом в случае быстро замороженных Фр (Б) компенсация и глюкокортикоидной, и минералокортикоидной недостаточности обеспечивалась при трансплантации Фр, рекультивированных при 26°C и трансплантированных в SIS (Б-26+SiS) (рис. 4А, 4Б).



**Рис. 4.** Влияние адrenaлэктомии и трансплантации быстро замороженных и SIS-инкапсулированных фрагментов надпочечников новорожденных поросят на содержание кортизола (А) и альдостерона (Б) в плазме крови экспериментальных крыс

Примечание: \* – различия достоверны относительно концентрации альдостерона в плазме контрольных крыс или кортизола относительно адrenaлэктомированных крыс,  $p < 0,05$ ; <sup>a</sup> – различия достоверны относительно данных для адrenaлэктомированных животных,  $p < 0,05$ ; <sup>#</sup> – различия достоверны относительно данных для крыс с трансплантатами, инкапсулированными в SIS непосредственно перед трансплантацией,  $p < 0,05$ ; <sup>c</sup> – различия достоверны относительно данных для крыс с трансплантатами, рекультивированными при 37°C,  $p < 0,05$ .

#### Выводы

Таким образом, сохранению более высокой гормональной активности медленно замороженных фрагментов надпочечников новорожденных поросят *in vitro* способствует гипотермическое рекультивирование, тогда как для быстро замороженных образцов более предпочтительным является рекультивирование при 37°C.

Достоверная компенсация надпочечниковой недостаточности у адrenaлэктомированных животных на 31 послеоперационные сутки достигается при трансплантации как медленно, так и быстро замороженных фрагментов надпочечников, рекультивированных при 26°C, инкапсулированных в SIS непосредственно перед трансплантацией. Использование данного подхода открывает перспективы пролонгирования функционирования трансплантационного материала при коррекции соответствующей гиподисфункции.

#### Список литературы

- Алабедалькарім Н.М., Божок Г.А., Легач Є.І., Бондаренко Т.П. Спосіб підготовки кріоконсервованої органотипової культури надниркової залози для трансплантації // Патент №4845 (Україна), МПК7, А61К35/55. Заявл. №12N5/08. Опубл. 15.02.05, Бюл. №2, 2005.
- Бондаренко Т.П., Легач Є.І. Спосіб кріоконсервування культури клітин адренкортикальної тканини // Патент 99073996 (Україна). Заявл. 09.12.99. Опубл. 15.03.2001. Бюл. №2 – П. – 5с.
- Гуріна Т.М., Алабедалькарім Н.М., Устиченко В.Д., Бондаренко Т.П. Спосіб кріоконсервування органної культури надниркових залоз новонароджених поросят // Патент №4567, МПК7, №12N5/08 А01N1/02. Опубл. 17.01.05. Бюл. №1, 2005.
- Зубкова Г.А., Давидова Т.І., Сидоренко Л.М., Лучицький Є.В. Зміни іммуногенності органної культури ендокринних залоз новонароджених поросят у процесі культивування // Трансплантологія. – 2005. – Т.8, №1. – С. 63–66.
- Admire A.A., Greenfeld J.I., Cosentino C.M., Ghory M.J. Repair of cloacal exstrophy, omphalocele, and gastroschisis using porcine small-intestinal submucosa or cadaveric skin homograft // *Plast. Reconstr. Surg.* – 2003. – Vol.112. – P. 1059–1062.
- Balamurugan A.N., Gu Y. Bioartificial pancreas transplantation at prevascularized intermuscular space: effect of angiogenesis induction on islet survival // *Pancreas.* – 2003. – Vol.26. – P. 279–285.
- Baltoyannis G., Mitsis M., Nathanael C. et al. Submucosa of canine small intestine as an alternative medium-diameter autogenous arterial graft // *Int. Angiol.* – 2000. – Vol.19. – P. 280–284.
- Bradford M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding // *Anal. Biochem.* – 1976. – Vol.72. – P. 248–254.
- Connel J. The new biology aldosterone // *J. Endocrinology.* – 2005. – Vol.186. – P. 1–20.

- Gallende G., Chavira R., Quintana-Stephan A. Biochemical evidence of the functional recovery and regeneration of adrenal autotransplants in the rat spleen // *Endocr. Rev.* – 2001. – Vol.16, №3. – P. 173–179.
- Iwasa K., Izumi R., Shimizu K. et al. Effect of cryopreservation on the immunogenicity of pancreatic islets in xenotransplantation // *Transplant Proc.* – 1994. – Vol.26. – P. 2439–2440.
- Lee M.K., Bae Y.H. Cell transplantation for endocrine disorders // *Adv. Drug. Deliv. Rev.* – 2000. – №42. – P. 103–120.
- Payne A.H., Hales D.B. Overview of steroidogenic enzymes in the pathway from cholesterol to active steroid hormones // *Endocr. Rev.* – 2004. – Vol.6, №25. – P. 947–970.
- Pribitkin E.A., Ambro B.T., Bloeden E. Rabbit ear cartilage regeneration with a small intestinal submucosa graft // *Laryngoscope.* – 2004. – Vol.45. – P. 1–19.
- Ricordi C., Lacy P.E., Santiago J.V. et al. Transplantation of parathyroid, adrenal cortex and adrenal medulla using procedures which successfully prolonged islet allograft survival // *Horm. Metab. Res. Suppl.* – 1990. – Vol.25. – P. 132–135.
- Rutzky L.P., Bilinski S., Kloc M. et al. Microgravity culture condition reduces immunogenicity and improves function of pancreatic islets1 // *Transplantation.* – 2002. – Vol.74. – P. 13–21.
- Suckow M.A., Voytik-Harbin S.L., Terril L.A., Badylak S.F. Enhanced bone regeneration using porcine small intestinal submucosa // *J. Invest. Surg.* – 1999. – Vol.5, №12. – P. 277–287.
- Taylor M.J., Bank H.L., Benton M.J. Selective killing of leucocytes by freezing: potential for reducing the immunogenicity of pancreatic islets // *Diabetes Res.* – 1987. – Vol.5. – P. 99–103.
- Tian X.H., Xue W.J., Pang X.L., Teng Y. Effect of small intestinal submucosa on islet recovery and function in vitro culture // *Hepatobiliary Pancreat Dis. Int.* – 2005. – Vol.4. – P. 524–529.
- Woods E.J., Walsh C.M., Sidner R.A. et al. Improved in vitro function of islets using small intestinal submucosa // *Transplant. Proc.* – 2004. – Vol.36. – P. 1175–1177.

**Гормонопродукуюча активність кріоконсервованих і SIS-інкапсульованих фрагментів надниркових залоз новонароджених поросят in vitro та при ксенотрансплантації  
Н.М.Алабедалькарим, Ден Бо, В.Д.Устиченко, Т.П.Бондаренко**

В роботі досліджено рівень гормональної активності SIS-інкапсульованих фрагментів надниркових залоз новонароджених поросят при кріоконсервуванні та наступному рекультивуванні при 26°C и 37°C in vitro та при трансплантації. Показано, що in vitro кріоконсервовані SIS-інкапсульовані фрагменти здатні до базальної і стимульованої секреції кортизолу та альдостерону у випадку повільного заморожування і гіпотермічного рекультивування та швидкого заморожування з наступним рекультивуванням при 37°C. При цьому на 31 добу після трансплантації найбільш успішними в компенсації надниркової недостатності були як швидко, так і повільно заморожені фрагменти надниркових залоз, рекультивовані за умов гіпотермії, трансплантовані в SIS.

Ключові слова: *кортизол, альдостерон, кріоконсервування, рекультивування, адrenaлектомія.*

**Hormone-producing activity of cryopreserved and SIS-encapsulated newborn piglets adrenal glands in vitro and at xenotransplantation  
N.M.Alabedalkarim, Den Bo, V.D.Ustichenko, T.P.Bondarenko**

In the present work the level of hormonal activity of SIS-encapsulated fragments of newborn piglets adrenal glands was investigated at the cryopreservation and subsequent reculturing at 26°C and 37°C in vitro and at transplantation. It was shown, that in vitro cryopreserved and SIS-encapsulated fragments are capable for basal and stimulated secretion of cortisol and aldosterone in the case of slow freezing and hypothermic reculturing, and fast freezing with subsequent reculturing at 37°C. At that on the 31 day after transplantation the most successful in compensation of adrenal insufficiency were fastly and slowly frozen adrenal glands fragments, recultured in conditions of hypothermia and transplanted in SIS.

Key words: *cortisol, aldosterone, cryopreservation, reculturing, adrenalectomy.*

Представлено: Г.Ф.Жегуновим  
Рекомендовано до друку: Є.Е.Перським