

Влияние ксенотрансплантации криоконсервированной органной культуры щитовидной железы на физиологические параметры экспериментальных животных

Н.А. Волкова, Г.А. Божок, Н.М. Алабедалькарим, Е.И. Легач, Т.П. Бондаренко
Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, г. Харьков

Effect of Xenotransplantation of Cryopreserved Organ Culture of Thyroid Gland on Physiological Parameters of Experimental Animals

VOLKOVA N.A., BOZHOK G.A., ALABEDALKARIM N.M., LEGACH YE.I., BONDARENKO T.P.
Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine of the National Academy of Sciences of the Ukraine, Kharkov

Изучали функционирование нативной и криоконсервированной органной культуры щитовидной железы (ОКЩЖ) новорожденных поросят на разных сроках после ксенотрансплантации в организме экспериментальных животных. Показано, что ОКЩЖ, подвергнутая низкотемпературному хранению, после трансплантации способна к синтезу и секреции тиреоидных гормонов. Установлено, что ксенотрансплантация нативной, криоконсервированной и рекультивированной ОКЩЖ приводит к увеличению уровня Т3, Т4 в плазме крови кроликов с экспериментальным гипотиреозом.

Ключевые слова: криоконсервирование, органная культура щитовидной железы новорожденных поросят, ксенотрансплантация.

Вивчали функціонування нативної та криоконсервованої органної культури щитовидної залози (ОКЩЗ) новонароджених поросят на різних строках після ксенотрансплантації в організмі експериментальних тварин. Показано, що ОКЩЗ, піддана низькотемпературному зберіганню, після трансплантації здатна до синтезу та секреції тиреоїдних гормонів. Встановлено, що ксенотрансплантація нативної, криоконсервованої та рекультивованої ОКЩЗ призводить до збільшення рівня Т3, Т4 в плазмі крові у кроликів з експериментальним гіпотиреозом.

Ключові слова: криоконсервування, органна культура щитовидної залози новонароджених поросят, ксенотрансплантація.

The functioning of native and cryopreserved organ culture of thyroid gland (OCThG) of newborn piglets at various terms after xenotransplantation in an organism of experimental animals was studied. It was shown that OCThG subjected to low temperature storage after xenotransplantation is able to synthesize and secrete thyroid hormones. It was established, that xenotransplantation of native, cryopreserved and recultured OCThG led to the increase of T3, T4 in blood plasma level in the rabbits with experimental hypothyrosis.

Key words: cryopreservation, thyroid gland organ culture of newborn piglets, xenotransplantation.

На сегодняшний день накоплено достаточно большое количество экспериментальных исследований, посвященных вопросам трансплантации эндокринных органов в виде срезов, а также органных и клеточных культур [2,3,8]. Однако исследователи в основном используют нативный материал, доступность которого ограничена [6,7]. Эффективные технологии криоконсервирования эндокринного материала, разработанные в ИПКиК НАН Украины, позволяют сохранить биологический материал при -196°C без существенного снижения жизнеспособности [1-3]. Цель работы – исследование функционирования криоконсервированной ОКЩЖ новорожденных поросят *in vivo*.

Материалы и методы

Исследования проводили на беспородных кроликах массой 2,7-3,2 кг. Гормональную недостаточность моделировали путем субтотальной тиреоидэктомии (СТ) кроликов. В качестве трансплантационного материала использовали

Адрес для корреспонденции: Волкова Н.А., Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, ул. Переяславская, 23, г. Харьков, Украина 61015; тел.: +38 (057) 7722007, факс: +38 (057) 7720084, e-mail: cryo@online.kharkov.ua

Till now there has been accumulated a big number of experimental studies, devoted to the questions of transplantation of endocrine organs as the slices as well as organ and cell cultures [2, 3, 8]. However the investigators mainly use native material, which is of limited availability [6, 7]. Efficient technologies of endocrine material cryopreservation, developed at the Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine of the National Academy of Sciences of the Ukraine, allow the keeping of biological material at -196°C without significant decrease in viability [1-3]. The aim of the work is to investigate the functioning of cryopreserved organ culture of thyroid gland (OCThG) *in vivo*.

Materials and methods

The investigations were carried-out in mongrel rabbits of 2.7-3.2kg. Hormonal insufficiency was modelled by subtotal thyroidectomy (STh) of rabbits. As the material for transplantation we use native and cryopreserved OCThGs of new born piglets, which

Address for correspondence: Volkova N.A., Institute for Problems and Cryomedicine of the Natl. Acad. Sci. of Ukraine, 23, Pereyaslavskaya st., Kharkov, Ukraine 61015; tel.: +38 (057) 7722007, fax: +38 (057) 7720084, e-mail: cryo@online.kharkov.ua

нативные и криоконсервированные ОКЩЖ новорожденных поросят, которые получали по методу [4]. Криоконсервирование проводили под защитой 7%-го ДМСО по 2-этапной программе [1]. Контейнеры хранили в жидком азоте в течение месяца. Трансплантацию осуществляли под местной анестезией введением органной культуры иглою Дюфо в подкожную жировую клетчатку экспериментальным животным. На 120-е сутки после трансплантации животные были декапитированы с использованием эфирного наркоза, внутренние органы (печень, почки, селезенка, тимус, семенники) выделены и нормированы на массу тела. Содержание тиреоидных гормонов в плазме крови определяли на 14-е и 120-е сутки после трансплантации при помощи наборов РИА-T3, T4-СТ. Результаты статистически обрабатывали с использованием t-критерия Стьюдента.

В процессе исследования экспериментальные животные были разделены на следующие группы: контроль- ложнооперированные животные; СТ животные; группа 1 – кролики с нативным ксенотрансплантатом (5-е сутки культивирования) ОКЩЖ; группа 2 – кролики с криоконсервированным (отогрев на водяной бане при 37°C в течение часа) ксенотрансплантатом ОКЩЖ; группа 3 – кролики с рекультивированным (инкубация при 37°C в течение 48 ч) ксенотрансплантатом ОКЩЖ.

Результаты и обсуждение

Одним из важных показателей при трансплантации эндокринного материала является уровень компенсации гормональной недостаточности. Результаты радиоиммунологического исследования, приведенные на рис. 1, свидетельствуют, что на 35-е сутки в плазме крови СТ кроликов наблюдается снижение содержания T3 и T4 на 20% относительно контрольной группы. У всех исследуемых групп животных на 14-е сутки после трансплантации отмечается компенсация тиреоидной недостаточности относительно СТ животных: в группах 1 и 2 наблюдается увеличение T3 и T4 в среднем на 50 и 60%, а в группе 3- на 44 и 22% соответственно. Представленные данные свидетельствуют о том, что трансплантация ОКЩЖ, подвергнутая низкотемпературному хранению, характеризуется некоторым угнетением гормон-продуцирующей функции относительно нативной культуры, что, вероятно, связано с более длительным адаптационным периодом в организме реципиента [5].

На 120-е сутки (рис.2) после трансплантации ОКЩЖ в плазме крови экспериментальных животных сохраняется тенденция к увеличению содержания тиреоидных гормонов относительно

were obtained according to the method [4]. Cryo-preservation was performed under 7% DMSO protection according to two-stage programme [1]. Containers were stored in liquid nitrogen during a month. Transplantation was accomplished under local anaesthesia by the introduction of organ cultures with Dufaut needle under subcutaneous fat to experimental animals. To the 120th day after transplantation the animals were decapitated using ether narcosis, internal organs (liver, kidneys, spleen, thymus, testes) were isolated and were compared with the norm in respect of body mass. The content of thyroid hormones in blood plasma was examined to the 14th and 12th days after transplantation with the devices RIA-T3, T4-ST. The results were statistically processed using Student's t -criterion.

In the process of investigation the experimental animals were divided into the following groups: control – pseudo-operated animals; STh animals; group 1- the rabbits with native xenotransplant (the 5th day of culturing) of OCThG; group 2 – rabbits with cryopreserved (thawing on water bath at 37°C during an hour) xenotransplant of OCThG; group 3 – the rabbits with re-cultured (incubation at 37°C during 48 hrs) xenotransplant of OCThG.

Results and discussion

One of important indices during transplantation of endocrine material is the level of hormonal insufficiency compensation. The results of radioimmunologic

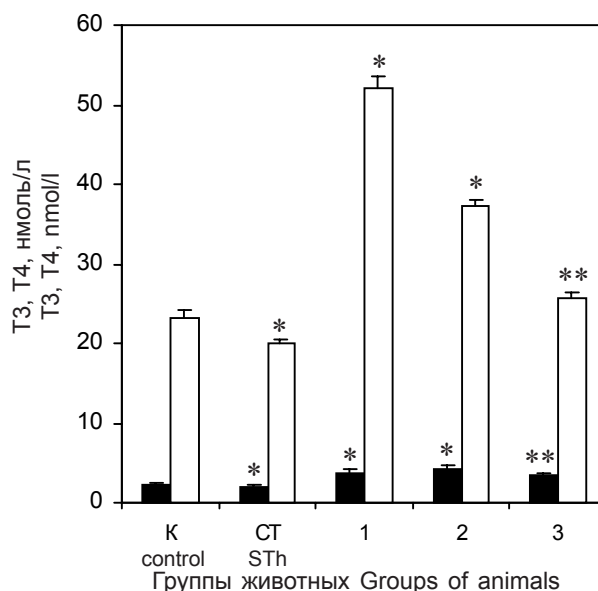


Рис.1. Уровень тиреоидных гормонов в плазме крови кроликов на 14-е сутки после трансплантации ОКЩЖ: □ - T4; ■ - T3; * - $p < 0,05$ -относительно контрольной группы животных; ** - $p < 0,05$ -относительно СТ животных.

Fig. 1. Level of thyroid hormones in rabbit's blood plasma for the 14th day of OCThG transplantation: □ - T4; ■ - T3; * $p < 0.05$ - in respect of control animal group; ** $p < 0.05$ - in respect of STh animals.

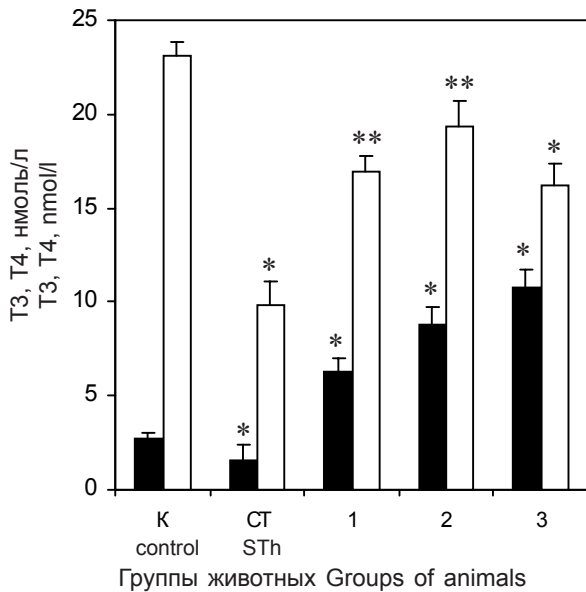


Рис.1. Уровень тиреоидных гормонов в плазме крови кроликов на 120-е сутки после трансплантации ОКЩЖ: □ - T₄; ■ - T₃; * - p<0,05-относительно контрольной группы животных; ** - p<0,05-относительно СТ животных.

Fig. 1. Level of thyroid hormones in rabbit's blood plasma for the 120th day of OThG transplantation: □ - T₄; ■ - T₃; * p<0.05 - in respect of control animal group; ** p<0.05 - in respect of STh animals.

СТ животных, в то время как в плазме крови СТ кроликов их уровень снизился на 38% относительно контрольной группы. Во всех исследуемых группах животных с трансплантатами наблюдается увеличение содержания T₃: в группе 1-на 58,32±0,42, в группе 2 – на 69,24±0,12, в группе 3 - на 75,15±0,35% относительно контрольных значений. При этом уровень T₄ в группах 1, 2 и 3 превышал таковой у СТ животных, однако не достигал соответствующего уровня у контрольных животных. Необходимо отметить, что трансплантация как рекультивированной, так и нативной ОКЩЖ СТ кролика приводит к восстановлению уровня тиреоидных гормонов, который был снижен после операции. Однако трансплантация рекультивированной ОКЩЖ оказывала более выраженное влияние на процесс восстановления содержания T₃ в

investigation, presented in Fig. 1, testify to the fact that to the 35th day in blood plasma of STh rabbits there was observed a decrease in the content of T₃ and T₄ by 20% in respect of the control group. In all studied groups of animals to the 14th day after transplantation there was found the compensation of thyroid insufficiency in respect of STh animals: in groups 1 and 2 we have observed the increase in T₃ and T₄ in average by 50 and 60% and in the group 3 by 44 and 22%, correspondingly. The presented data testify to the fact that transplantation of OThG, subjected to low temperature storage, is characterized with a suppression of hormone-producing function in respect of native culture, which is likely related to longer adaptation period in a recipient's organism [5].

To the 120th day (Fig. 2) after transplantation of OThG in blood plasma of experimental animals the tendency to the increase in the content of thyroid hormones in respect of STh animals is kept, meanwhile in blood plasma of STh rabbits their level reduced by 38% in respect of the control group. In all studied groups of animals with transplants there has been observed the rise in the content of T₃: in group 1 by 58.32±0.42, in group 2 by 69.24±0.12, in group 3 by 75.15±0.35% regarding to the control values. In this case the level of T₄ in the groups 1, 2 and 3 exceeded that in STh animals, but did not reach the appropriate level in the control animals. Its should be noted that transplantation of both re-cultured and native OThG to STh rabbits results in the recovery of the level of thyroid hormones, which was reduced after operation. However the transplantation of re-cultured OThG caused more manifested effect on the process of the recovery of T₃ content in animals' blood (statistically significant increase by 42%) than native OThG for the studied term after transplantation [5, 9].

The data characterising the ratio of the mass of internal organs of experimental animals to their body

Физиологические параметры кроликов на 120-е сутки после трансплантации ОКЩЖ
Physiological parameters of rabbits to the 120th day of OThG transplantation

Группы животных Animals group	Масса животных, г Animals' mass, g	Масса органов, % Mass of organs, %				
		печени liver	почек kidneys	селезенки spleen	тимуса thymus	семенников testes
Контроль	3270±24	2,245±0,031	0,245±0,015	0,079±0,015	0,092±0,008	0,112±0,013
СТ	3070±11	1,972±0,045 ¹	0,223±0,007 ¹	0,104±0,008 ¹	0,094±0,021	0,078±0,005 ¹
1	3120±21	2,836±0,111 ^{1,2}	0,232±0,021	0,044±0,012 ^{1,2}	0,117±0,011 ^{1,2}	0,075±0,012 ¹
2	3730±15	2,154±0,008 ²	0,247±0,011	0,047±0,009 ^{1,2}	0,183±0,024 ¹	0,093±0,006
3	2980±13	2,711±0,031 ¹	0,284±0,017 ^{1,2}	0,081±0,010	0,125±0,004 ^{1,2}	0,067±0,017 ¹

Примечание: ¹-p<0,05 относительно контрольной группы животных;
²-p<0,05 относительно СТ животных.

Notes: ¹- p<0.05 - in respect of control animal group;
²- p<0.05 - in respect of STh animals.

крови животных (достоверное увеличение на 42%), чем нативной ОКЩЖ на исследуемом сроке после трансплантации [5,9].

Данные, характеризующие соотношение масс внутренних органов экспериментальных животных к массе их тела, представлены в таблице. У СТ кроликов наблюдается достоверное увеличение соотношения массы селезенки к массе тела относительно остальных групп животных. У экспериментальных животных с трансплантатами ОКЩЖ отмечается тенденция к снижению соотношения селезенки и семенников к массе тела относительно контрольных животных. При этом наблюдается увеличение соотношения тимуса к массе тела у животных с криоконсервированным и рекультивированным трансплантатом ОКЩЖ.

Выводы

Представленные данные характеризуют способность к восстановлению функциональной активности и гормонообразованию ОКЩЖ, подвергнутой воздействию низких температур при экспериментальной ксенотрансплантации. Это свидетельствует о том, что воздействие низких температур и криопротектора не вызывает выраженного повреждающего действия на ОКЩЖ. Отогрев до физиологических температур и последующее рекультивирование приводят к более длительному функционированию ОКЩЖ в условиях организма.

Литература

1. Бондаренко Т.П., Луговой С.В. Влияние димексида на секреторную способность тироцитов новорожденных поросят // Пробл. криобиологии.–2001.–№1.– С. 48-51.
2. Грищенко В.И., Чуйко В.А., Пушкарь Н.С. Криоконсервация тканей и клеток эндокринных органов.– Киев: Наук.думка, 1993.– 243 с.
3. Грищенко В.И., Бондаренко Т.П., Бугайов В.М. и др. Заготівля, криоконсервування та клінічне застосування органної культури щитовидної залози новонароджених поросят у лікуванні гіпотиреозів: Метод. рекомендації. – Харків, 2000.– 14 с.
4. 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
5. Чуйко В.А., Утевський А.М. Биохимия криоконсервированной щитовидной железы.– Киев: Наук. думка, 1985.– 216 с.
6. Gulik T.M., Boudjema K., Platz K. et al. A comparison of the effects of hyperbaric oxygen culture on survival of murine and canine thyroid gland grafts // *Transpl. Int.*– 1991.– N2.– P. 110-115.
7. Sachs D.H. The pig as a potential xenograft donor // *Pathol. Biol.*– 1994.– Vol.42.– 217 p.
8. Shimizu K., Nagahama M., Kitamura Y. et al. Autotransplantation of cryopreserved thyroid tissue for the treatment of irreversible postoperative hypothyroid Graves' disease. Report of the first case // *Thyroid. Clin. Exp.*– 1997.– N9.– P. 23-26.
9. Talmage D.W., Dart G.A. Search for optimum conditions for culturing allografts before transplantation // *Clin. Immunol. Immunopathol.*– 1980.– N3.– P. 314-317.

Поступила 8.10.2002.

mass are presented in the Table. In STh rabbits there was observed a statistically significant increase in the ratio of spleen mass to that of body when comparing with the rest animal groups. In experimental animals with transplants of OCThG we noted the tendency to the reduction in the ratio of mass of spleen and testes to that of body in respect of the control animals. In this case there was found an increase in the mass of thymus to body mass in animals with cryopreserved and re-cultured transplant of OCThG.

Conclusions

The presented data characterize the ability to recover the functional activity and hormone formation of OCThG, subjected to the effect of low temperatures under experimental xenotransplantation. This testifies the fact that the effect of low temperatures and cryoprotectant do not cause a manifested damaging influence on OCThG. Thawing up to physiological temperatures and following re-culturing result in longer functioning of OCThG under organism's conditions.

References

1. Bondarenko T.P., Lugovoy S.V. Dimethyl sulfoxide effect on thyrocyte secreting ability of newborn piglets// *Problems of Cryobiology.*– 2001.– N1.– P. 48-51.
2. Grisichenko V.I., Chujko V.A., Pushkar N.S. Cryopreservation of tissues and cells of endocrine organs.– Kiev: Naukova dumka, 1993.– 243 p.
3. Grisichenko V.I., Bondarenko T.P., Bugayov V.M. et al. procurement, cryopreservation and clinical application of organ culture of thyroid gland of new born piglets when treating hypothyrosis: methodical recommendations. – Kharkiv, 2000.– 14 p.
4. Turchin I.S. Problem of transplantation of cell and tissue cultures of the internal secretion glands to the patients with various forms of endocrinopathy// *Endokrynologiya.*– 1996.– V.1, N2.– P. 6-13.
5. Chujko V.A., Utevsky A.M. Biochemistry of cryopreserved thyroid gland.– Kiev; Naukova dumka, 1985.– 216 p.
6. Gulik T.M., Boudjema K., Platz K. et al. A comparison of the effects of hyperbaric oxygen culture on survival of murine and canine thyroid gland grafts // *Transpl. Int.*– 1991.– N2.– P. 110-115.
7. Sachs D.H. The pig as a potential xenograft donor // *Pathol. Biol.*– 1994.– Vol.42.– 217 p.
8. Shimizu K., Nagahama M., Kitamura Y. et al. Autotransplantation of cryopreserved thyroid tissue for the treatment of irreversible postoperative hypothyroid Graves' disease. Report of the first case // *Thyroid. Clin. Exp.*– 1997.– N9.– P. 23-26.
9. Talmage D.W., Dart G.A. Search for optimum conditions for culturing allografts before transplantation // *Clin. Immunol. Immunopathol.*– 1980.– N3.– P. 314-317.

Accepted in 8.10.2003