

Некоторые показатели системы эритропоэза крыс после частичной гепатэктомии и трансплантации криоконсервированных клеток эмбриональной печени

Н.Н. МОИСЕЕВА, Е.Д. РОЗАНОВА, С.П. МАЗУР, А.Ю. ПЕТРЕНКО

Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, г. Харьков

Some Indices of Erythropoiesis System of Rats after Partial Hepatectomy and Transplantation of Cryopreserved Embryonic Liver Cells

MOISEYEVA N.N., ROZANOVA E.D., MAZUR S.P., PETRENKO A.YU.

Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine of the National Academy of Sciences of the Ukraine, Kharkov

Изучали содержание фетального и общего гемоглобина в крови у крыс после 70%-й гепатэктомии и трансплантации криоконсервированных клеток эмбриональной печени (ККЭП) человека. Частичная гепатэктомия приводит к снижению содержания общего гемоглобина в крови крыс на протяжении эксперимента и повышению уровня фетального гемоглобина на 3-и сутки. После трансплантации ККЭП содержание общего гемоглобина достоверно превышало результаты, полученные у частично гепатэктомированных крыс без трансплантации на 1-е и 2-е сутки, а уровень фетального гемоглобина в данный промежуток времени увеличивался в 1,5 раза. Методом флуоресцентной микроскопии с помощью моноклональных антител, меченных флуоресцентным красителем CD45-FITC, в гистологических срезах печени и селезенки крыс после частичной гепатэктомии на 3-и сутки идентифицирован трансплантат.

Вивчали вміст фетального та загального гемоглобіну в крові у щурів після 70%-ї гепатектомії та трансплантації криоконсервованих клітин ембріональної печінки (ККЕП) людини. Часткова гепатектомія приводить до зниження вмісту загального гемоглобіну в крові щурів на протязі експерименту і підвищення вмісту фетального гемоглобіну на 3-ю добу. Після трансплантації ККЕП вміст загального гемоглобіну значно перевищував результати, отримані у частково гепатектомованих щурів без трансплантації на 1-у та 2-у добу, а рівень фетального гемоглобіну в даний проміжок часу збільшувався в 1,5 рази. Методом флуоресцентної мікроскопії за допомогою моноклональних антитіл, мічених флуоресцентним барвником CD45-FITC, у гістологічних зрізах печінки і селезінки щурів після часткової гепатектомії на 3-ю добу ідентифіковано трансплантат.

The authors studied the content of fetal and total hemoglobin in blood of rats after 70%-hepatectomy and transplantation of cryopreserved human embryonic liver (HEL) cells. Partial hepatectomy leads to a decrease in the content of total hemoglobin in rats' blood during experiment and increasing of fetal hemoglobin level by the 3rd day. After transplantation of cryopreserved HEL cells the content of total hemoglobin markedly exceeds the results in partially hepatectomised rats without transplantation by the 1st and 2nd day, and the level of fetal hemoglobin during this period decreased in 1.5 times. The transplant was identified in histological sections of liver and spleen from partially hepatoectomised rats with the method of fluorescent microscopy using monoclonal antibodies, labelled with fluorescent dye CD45-FITC.

Оперативное вмешательство с целью частичной резекции печени неизбежно связано с потерей части циркулирующей крови, что приводит к гипоксии. В работах [3-5] были изучены динамика изменения количества эритроцитов у частично гепатэктомированных крыс и влияние на данный критерий трансплантации гемопоэтических клеток – эмбриональной печени человека 7-12 недель гестации.

Эмбриональная печень является источником кроветворных клеток, гемопоэтических факторов и содержит фетальный гемоглобин, отличающийся от гемоглобина взрослого типа более высоким сродством к кислороду. Синтез фетального гемоглобина сформировался как механизм адаптации человека и животных к гипоксии и синтезируется на ранних стадиях развития эмбриона, когда доступ кислорода ограничен, а также является маркером патологий, обусловленных кислородной недостаточностью [1].

Operative intervention with aim of partial liver resection is inevitably connected with the loss of the part of circulating blood, which leads to hypoxia. In our previous papers [3-5] the dynamics of erythrocyte number changes in partially hepatectomised rats and effect on this index of transplantation of hemopoietic cells from embryonic liver of 7-12 gestation weeks.

Embryonic liver is the source for hemopoietic cells and factors, and also contains fetal hemoglobin, differing from adult one by higher oxygen affinity. Synthesis of fetal hemoglobin was formed as a mechanism of human and animals adaptation to hypoxia and is activated at early stages of embryo development, when an oxygen entering is limited, and it is a marker of pathologies, caused by oxygen insufficiency [1].

The poor investigation of dynamics of fetal hemoglobin content in recipient's blood after transplantation of hemopoietic cells served as the

Динамика содержания фетального гемоглобина в крови реципиента после трансплантации гемопоэтических клеток мало изучена, что и послужило основанием для наших исследований. Также у нас вызвала интерес идентификация трансплантационного материала с помощью иммунофлуоресцентного метода в селезёнке и печени реципиента.

Исследования проводили на самцах беспородных крыс массой 140-160 г. Клетки эмбриональной печени выделяли из эмбрионов 7-12 недель гестации неферментативным методом [6], модифицированным для малых объёмов. Одновременно с 70%-й гепатэктомией, которую моделировали по методу [7], в пульпу селезенки крыс вводили ККЭП в количестве 1×10^7 клеток (0,3 мл). Контролем служили крысы, которым в селезенку вводили равный объем среды консервирования. Содержание общего и фетального гемоглобина в крови экспериментальных крыс определяли по общепринятому методу [2].

Печень и селезёнка экспериментальных крыс были зафиксированы в 10%-м формалине. Гистологические срезы селезенки и печени окрашивали гематоксилином и эозином. Для мечения ККЭП, трансплантированных крысам, их инкубировали при комнатной температуре с моноклональными антителами CD45 человека, меченными флуоресцентным красителем FITC (флуоресцеин-изоцианат). Результаты реакции оценивали в течение 24 ч с помощью люминесцентного микроскопа в тщательно затемнённом помещении, учитывая только светящиеся клетки.

Как было показано ранее [3-5], 70%-я гепатэктомия приводит к поступательному снижению исходного ($7,6 \pm 0,2 \times 10^{12}/л$) уровня эритроцитов до $4,0 \pm 0,1 \times 10^{12}/л$ на 3-й день.

После трансплантации ККЭП достоверное ($p < 0,05$) увеличение количества эритроцитов до $6,8 \pm 0,2 \times 10^{12}/л$ регистрировалось на 2-е сутки, а на 3-и снижалось до $3,7 \pm 0,1 \times 10^{12}/л$.

Динамика содержания общего гемоглобина у частично гепатэктомированных крыс была аналогична динамике изменения количества эритроцитов в течение 3-х суток наблюдения (рис. 1). Уровень фетального гемоглобина (HbF) в эритроцитах периферической крови крыс после 70%-й гепатэктомии достоверно увеличивался на 3-и сутки (рис. 2). Полученные результаты согласуются с нашими предыдущими данными по эритроцитам [5]: эритродиализ у частично гепатэктомированных крыс приводит к снижению содержания эритроцитов и общего гемоглобина, в свою очередь гипоксическое состояние стимулирует образование фетального гемоглобина.

reason for our investigation. The identification of transplanted material in recipient's spleen and liver using the immuno-fluorescent method was also of some interest for us.

Investigations were performed in breedless male rats with 140-160 g weight. Embryonic liver cells were obtained from embryos of 7-12 gestation weeks using non-enzymic method [6], modified for small volumes. Simultaneously with 70%-hepatectomy, modelled according the method in the paper [7], the suspension of cryopreserved HEL cells in amount of 1×10^7 cells (0.3 ml) was injected into spleen parenchyma. As the control we used the rats, which were injected into spleen with an equal volume of preservation medium. The content of total and fetal haemoglobin in blood of experimental animals was assessed with a standard method [2].

Liver and spleen of experimental animals were fixed in 10% formalin. Histological sections of spleen and liver were stained with hematoxylin and eosin. To label the HEL cells, transplanted into rats, we incubated them at room temperature with human CD45 monoclonal antibodies, conjugated with FITC fluorescent dye (fluorescein-isothiocyanate). Results of reaction were estimated within 24 hrs with a luminescent microscope in carefully darkened room, only the illuminating cells were under consideration.

As it was shown earlier [3-5] 70%-hepatectomy results in a gradual decrease of initial ($7.6 \pm 0.2 \times 10^{12}/l$) level of erythrocytes down to $4.0 \pm 0.1 \times 10^{12}/l$ to the 3rd day.

A significant ($p < 0.05$) increase in erythrocyte number up to $6.8 \pm 0.2 \times 10^{12}/l$ was recorded to the 2nd

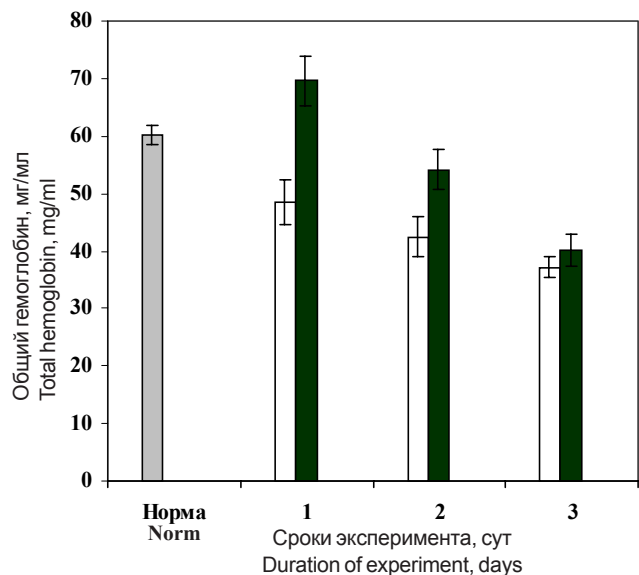


Рис. 1. Содержание общего гемоглобина в крови крыс: □ – после частичной гепатэктомии; ■ – после трансплантации ККЭП; $M \pm m$, $n=15$.

Fig. 1. Content of total haemoglobin in rats' blood: □ – after partial hepatectomy; ■ – after transplantation of cryopreserved HEL cells, $M \pm m$, $n=15$.

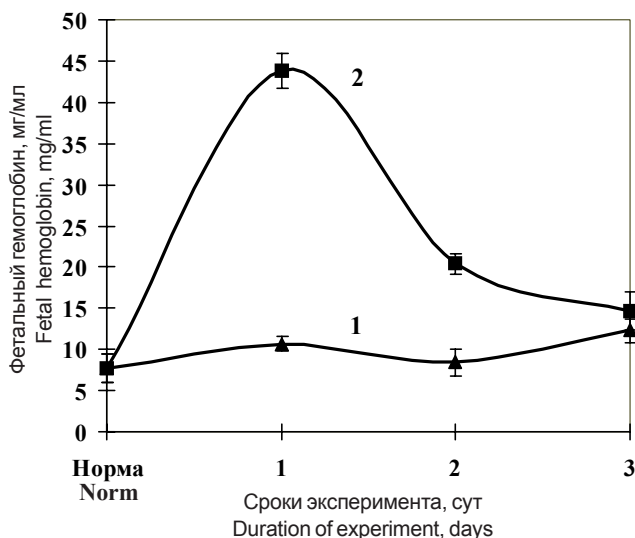


Рис. 1. Содержание фетального гемоглобина в крови крыс: 1 – после частичной гепатэктомии; 2 – после трансплантации ККЭП; $M \pm m$, $n=15$.

Fig. 1. Content of fetal haemoglobin in rats' blood: 1 – after partial hepatectomy; 2 – after transplantation of cryopreserved HEL cells, $M \pm m$, $n=15$.

При трансплантации ККЭП частично гепатэктомированным крысам были отмечены последствия введения эритроидных клеток-предшественников, содержащих фетальный гемоглобин. В периферической крови крыс после 70%-й гепатэктомии и трансплантации ККЭП на 1-е и 2-е сутки отмечена тенденция к увеличению уровня общего гемоглобина, что, вероятно, связано с повышением в 1,5 раза содержания фетального гемоглобина в этот же промежуток времени.

Особый интерес в наших исследованиях представила попытка выявить в паренхиме печени и селезёнки частично гепатэктомированных животных трансплантированные ККЭП человека. Методом флуоресцентной микроскопии в гистологических срезах селезёнки и печени на 3-и сутки после трансплантации ККЭП были выявлены единичные клеточные элементы, содержащие метку и локализованные в паренхиме исследуемых органов. В срезах селезёнки и печени частично гепатэктомированных крыс подобной картины отмечено не было. Следовательно, трансплантат находится на 3-и сутки не только в месте его введения (селезёнке), но и мигрирует в печень частично гепатэктомированных крыс.

Установленный факт повышения фетального и общего гемоглобина в крови экспериментальных животных после введения эмбриональных клеток имеет большое физиологическое значение. Как уже отмечалось, фетальный гемоглобин обладает повышенным сродством к кислороду, следовательно, увеличение его уровня способствует протеканию всех кислородозависимых процессов, в том числе репарации и регенерации.

day after transplantation of cryopreserved HEL cells, and to the 3rd day it decreased down to $3.7 \pm 0.1 \times 10^{12}/l$.

Dynamics of total haemoglobin content in the partially hepatectomised rats was similar to that of erythrocyte number changes within three days of observation (Fig.1). Level of fetal hemoglobin (HbF) in erythrocytes of rat peripheral blood significantly increased by the 3rd day after 70%-hepatectomy (Fig.2). Obtained results are in the accordance with our previous results for erythrocytes [5]: erythrodiuresis in partially hepatectomised rats leads to the decreasing of erythrocyte number and total haemoglobin content, and in its turn the hypoxic state stimulates the formation of fetal hemoglobin.

During transplantation of cryopreserved HEL cells to the partially hepatectomised rats we noticed the consequences of injection of erythroid progenitor cells, containing fetal hemoglobin. In peripheral blood of rats after 70%-hepatectomy and HEL cells transplantation we observed the tendency for increasing the total hemoglobin level by the 1st and 2nd day, that is probably connected to a rise in fetal hemoglobin level within this period.

Of special interest in our investigations was the attempt to reveal the transplanted HEL cells in liver and spleen parenchyma of the partially hepatectomised animals. Using the method of fluorescent microscopy the single cell elements, containing the label and localised in parenchyma of liver and spleen were found by the 3rd day after HEL cells transplantation in histological slices of studied organs. In the spleen and liver sections of control animals we have not found such a picture. Therefore there is a transplant by the 3rd day not only in the injection site (spleen) but also it migrates to liver of the partially hepatectomised rats.

The found fact of the increasing of fetal and total hemoglobin content in blood of experimental animals after the injection of embryonic cells is of great physiological importance. As it was noted, fetal hemoglobin had an increased affinity to oxygen, therefore the increase of its level contributed to the proceeding of all oxygen-dependent processes, including reparation and regeneration.

References

1. Antonenko V.T., Korolyov Yu.N. Peculiarities in oxygen-binding function of fetal haemoglobin // *Gematologiya i transfuziologiya*. – 1983, Vol. 28, N5. – P. 61-64.
2. *Clinical laboratory diagnostics: Practical studies in clinical biochemistry: Educational book* / Aksenenko L.P., Barkagan Z.S., Gette Z.P. et al. Ed. by Bazamova M.A., Gette Z.P. - Kiev: Vyshcha shkola, 1994. - P. 194-195.
3. Moiseyeva N.N., Mazur S.P., Ochenashko O.V., Petrenko A. Yu. Influence of transplantation of cryopreserved human fetal liver cells on regeneration and functions of rat liver after partial hepatectomy // *Problems of Cryobiology*. - 2001. - N1. - P. 42-47.

Литература

1. Антоненко В.Т., Королёв Ю.Н. Особенности кислород-связывающей функции фетального гемоглобина // Гематол. и трансфузиол.– 1983, Т. 28, №5.– С. 61-64
2. *Клінічна лабораторна діагностика*: Практичні заняття з клінічної біохімії: Навч. посібник / Л. П. Аксененко, З.С. Баркаган, З.П. Гетте та ін.; За ред. М.А. Базарнової, З.П. Гетте.– Київ: Вища школа, 1994.– С. 194-195.
3. Моисеева Н.Н., Мазур С.П., Оченашко О.В., Петренко А.Ю. Влияние трансплантации криоконсервированных клеток фетальной печени человека на регенерацию и функции печени крыс после частичной гепатэктомии // Пробл. криобиологии.– 2001.– №1.– С. 42-47.
4. Моисеева Н.Н., [Кравченко Л.П.], Семенченко Ю.А., Петренко Ю.Ю. Влияние трансплантации гепатоцитов, подвергнутых гипотермическому хранению, на регенерацию печени крыс после частичной гепатэктомии // Пробл. криобиологии.– 2002.– №1.– С.24-31.
5. Моисеева Н.Н., Мазур С.П., Петренко А.Ю. Показатели периферической крови и регенерация печени крыс после 70%-й гепатэктомии и трансплантации дифференцированных и эмбриональных клеток печени // Пробл. криобиологии.– 2002.– №2.– С. 20-23.
6. Петренко А.Ю., Сукач А.Н., Росляков А.Д., Мазур С.П. Выделение гепатоцитов крыс неферментативным методом: детоксикационная и дыхательная активности // Биохимия.– 1991.– Т. 56, №9.– С. 1647-1651.
7. Higgins G.H., Anderson R.H. Experimental pathology of the liver restoration at the liver of white rat following partial surgical removal // Arch. Path.– 1931.– 12.– P.186-188.
4. Moiseyeva N.N., [Kravchenko L.P.], Semenchenko O.A., Petrenko A.Yu. Transplantation effect of subjected to hypothermic storage hepatocytes on rat's liver regeneration after a partial hepatectomy // Problems of cryobiology.– 2002.– N1.– P. 24-31.
5. Moiseyeva N.N., Mazur S.P., Petrenko A. Yu. Peripheric blood indices and rat liver regeneration following 70% hepatectomy and transplantation of differentiated and embryonic liver cells // Problems of cryobiology.– 2002.– N2.– P. 24-31.
6. Petrenko A. Yu., Sukach A.N., Roslyakov A.D., Mazur S.P. Isolation of rat hepatocytes by a non-enzymatic method: detoxication and breathing activity // Biokhimiya.– 1991.– Vol.56, N9.– P. 1647-1651.
7. Higgins G.H., Anderson R.H. Experimental pathology of the liver restoration at the liver of white rat following partial surgical removal // Arch. Path.– 1931.– 12.– P.186-188.

Accepted in 10.12.2002

Поступила 10.12.2002