

MORPHO-FUNCTIONAL CHANGES OF RAT ILEUM IN ETHANOL INTOXICATION

L.M. Yakovleva and L.A. Liubovtseva

The effect of chronic alcohol intoxication of 2, 4 and 6 months' duration on the morpho-functional state of the ileum was studied in male rats (n=36) using histological, morphometric and histochemical methods. The results show that alcohol intoxication for a period of 2 months induced the changes in the mucous membrane of the ileum which in the form of its hypertrophy accompanied by the increase of epitheliocyte mitotic activity and goblet cell number. The activity of succinate dehydrogenase

in the enterocytes and muscular tunic myocytes of the ileum wall was increased. After 4 and 6 months the changes included the inhibition of enterocyte mitotic activity. By 6 months of the experiment marked atrophy of the mucous membrane was noted. Succinate dehydrogenase activity was decreased in all the structures studied.

Key words: *ileum, mucous membrane, muscular tunic, succinate dehydrogenase, alcohol*

Department of General and Clinical Pathology with a Course of Forensic Medicine, Department of Histology, Cytology and Embryology, I.N. Ulyanov Chuvash State University, Cheboksary

© Коллектив авторов, 2012
УДК 616.231-089.844

М.В. Киселевский¹, Н.Ю. Анисимова¹, О.В. Лебединская³, Б.Е. Полоцкий² и М.И. Давыдов²

ГЕТЕРОТОПНАЯ ТРАНСПЛАНТАЦИЯ НЕИММУНОГЕННОЙ ТРАХЕИ, ЗАСЕЛЁННОЙ КОСТНОМОЗГОВЫМИ СТРОМАЛЬНЫМИ СТВОЛОВЫМИ КЛЕТКАМИ РЕЦИПИЕНТА

¹ Лаборатория клеточного иммунитета (зав. — проф. М.В. Киселевский), ² торакоабдоминальное отделение (зав. — академик РАН и РАМН проф. М.И. Давыдов), Российский онкологический научный центр им. Н.Н. Блохина РАМН, Москва; ³ кафедра гистологии, эмбриологии и цитологии (зав. — проф. В.А. Четвертных), Пермская государственная медицинская академия им. акад. Е.А. Вагнера, e-mail: lebedinska@mail.ru

На 30 мышах линий C57BL/6 и Balb/c массой 22–25 г изучены морфологические изменения в лишённой клеток аллогенной трахее при заселении костномозговыми стромальными (мезенхимальными) стволовыми клетками (КССК) реципиента и её гетеротопной трансплантации. Результаты исследования показали недостаточную эффективность режима подготовки трансплантата методом замораживания и размораживания, поскольку в этом случае развивалась воспалительная реакция в области аллотрансплантата и происходило его отторжение. Установлено, что предложенный авторами режим получения лишённого клеток трансплантата трахеи путём обработки перхлоратом натрия (NaClO_4), в отличие от режима замораживания и размораживания, позволяет эффективно удалять клетки, экспрессирующие маркеры МНС I и МНС II. Воздействие NaClO_4 не приводит ни к повреждению хондроцитов, ни к существенным нарушениям структуры хряща трахеи в гетеротопных трансплантатах. Поскольку заселение трансплантата КССК способствует восстановлению соединительной ткани, снижает образование грануляций в области анастомоза и способствует более быстрой эпителизации трансплантата, то наиболее перспективным для подготовки трахеи к пересадке является сочетание удаления иммунокомпетентных клеток из органа NaClO_4 с последующим заселением полученного трансплантата КССК.

Ключевые слова: *трахея, аллотрансплантация, гетеротопная трансплантация, костномозговые стромальные (мезенхимальные) стволовые клетки*

Несмотря на несомненные успехи в развитии трансплантологии, пересадка трахеи остаётся нерешённой и одной из важных проблем в торакальной хирургии. Многочисленные экспериментальные и клинические исследования показали, что основной причиной отторжения трахеи, как и других органов после трансплантации, является

реакция иммунной системы реципиента на антигены главного комплекса гистосовместимости донора (МНС I и МНС II) с индукцией аллореактивных CD4^+ Т-лимфоцитов по отношению к этим антигенам [4, 11]. Важную роль в отторжении аллотрансплантата играют также донорские антигенпредставляющие клетки [3]. Иммунодепрессанты,

применяемые в высоких дозах, подавляют острое отторжение аллотрансплантата. Однако применение цитостатиков или лучевой терапии не влияет на развитие хронических воспалительных и обструктивных процессов в аллотрансплантате [8]. В экспериментах на животных было показано, что введение реципиентам клеток костного мозга доноров, приводящее к развитию смешанного химеризма кроветворения, снижает выраженность фибропролиферативных процессов в трансплантате трахеи [7, 10].

Другим перспективным направлением, позволяющим избежать отторжения аллотрансплантата трахеи, является создание синтетических протезов, а также лишённых клеток участков донорской трахеи или аорты. Для удаления из аллотрансплантата клеток, экспрессирующих МНС, использовали различные методы обработки, чаще всего — криоконсервацию или обработку детергентами. С целью ускорения реваскуляризации и восстановления соединительной ткани, а также реснитчатого эпителия некоторые авторы предлагают заселять трансплантат трахеи костномозговыми стромальными стволовыми клетками (КССК) [1, 5]. Однако существующие подходы трудоёмки, не позволяют полностью удалить МНС⁺-клетки, не обеспечивают стерильность и сохранение функциональных свойств аллотрансплантата. Сказанное свидетельствует о необходимости совершенствования методов подготовки трансплантатов.

Экспериментальные исследования показали, что адекватной моделью для оценки толерантности и возможного развития обструктивного воспаления аллотрансплантата трахеи является гетеротопная трансплантация этого органа [2, 6]. Цель настоящей работы — изучение морфологических изменений в аллотрансплантатах трахеи, заселённой КССК реципиента, при её гетеротопной трансплантации.

Материал и методы. Исследования проведены на 30 мышцах линии C57BL/6 и Balb/c массой 22–25 г.

Удаление и обработка трахеи. У мышей линии C57BL/6 под эфирным наркозом проводили медианную стернотомию и удаляли трахею, которую помещали в изотонический раствор хлорида натрия [2]. Образцы трахеи механически освобождали от слизи, мышечных элементов, эпителия, соединительной ткани и промывали дистиллированной водой.

Для выявления оптимального способа подготовки аллотрансплантата исследовали 2 режима. При первом (общепринятом) с целью удаления клеток препараты трахеи подвергали замораживанию — размораживанию. Для этого образцы помещали в низкотемпературный холодильник на 1 сут при -70°C , после чего их извлекали и размораживали в термостате при 37°C . Данную процедуру повторяли трижды. Во втором режиме (предложенном авторами) орган обрабатывали 5% раствором перхлората натрия — NaClO_4 (Sigma, США)

в течение 72 ч, при этом раствор обновляли 1 раз в сутки. После обработки в каждом из режимов трахею отмывали изотоническим раствором хлорида натрия и подвергали морфологическому и иммуногистохимическому исследованиям.

КССК выделяли из костного мозга бедренной кости мышей линии Balb/c. Взвесь клеток костного мозга ресуспендировали в среде RPMI 1640 (ПанЭко, Россия) в концентрации 1×10^6 клеток/мл и инкубировали в пластиковых флаконах (Nung, США) в течение 4 ч. Неприлипшие клетки сливали, добавляли среду для культивирования негемопоэтических клеток костного мозга (NH Stem Cell Media; Miltenyi Biotec, Германия) и культивировали 72 ч в условиях CO_2 -инкубатора. КССК, полученные в результате культивирования, удаляли из культурального флакона механическим путём и ресуспендировали в среде RPMI 1640 в концентрации 1×10^6 клеток/мл. Лишённые клеток препараты трахеи помещали на 4 ч в культуральный сосуд со взвесью стволовых клеток, затем выдерживали в течение 3 сут в условиях CO_2 -инкубатора, ежедневно заменяя среду со взвесью КССК. Препараты трахеи при заселении стволовыми клетками встряхивали при помощи шейкера каждые 30 мин.

Анализ иммунофенотипа. Экспрессию антигенов МНС I и II классов, а также дифференцировочных антигенов натуральных киллеров (НК) определяли на отпечатках и на криостатных срезах полученных препаратов трахеи. Для этого использовали моноклональные антитела, выявляющие NK 1.1 в сочетании с PE (феноэтринном), МНС I в сочетании с FITC (флюоресцеин-изотиоцианатом) и МНС II — FITC (Coltag, Великобритания).

Гетеротопная трансплантация трахеи. У мышей-реципиентов линии Balb/c в дорсолатеральной области формировали подкожный карман, в который помещали донорскую трахею мышей линии C57BL/6. На 28-е сутки после трансплантации аллотрансплантаты извлекали и подвергали гистологическому исследованию. Экспрессию антигенов МНС I и II классов, а также дифференцировочных антигенов НК определяли на отпечатках и на криостатных срезах извлечённых образцов трахеи с использованием моноклональных антител NK 1.1 — PE, МНС I — FITC и МНС II — FITC (Coltag, Великобритания).

Световую и флюоресцентную микроскопии проводили с использованием фотовидеосистемы (Zeiss, Германия) и программы Axiovision 2.

Результаты исследования. Установлено, что обработка трахеи 5% раствором NaClO_4 , в отличие от режима замораживания и размораживания, не приводит к отчетливо выраженным нарушениям структуры хряща в данном органе. Иммунофлюоресцентный анализ клеточных маркеров выявил, что клетки на отпечатках препаратов трахеи, подвергнутых замораживанию — размораживанию, характеризуются высоким уровнем экспрессии молекул МНС I и II классов. В некоторых случаях выявляются единичные лимфоциты, в том числе и NK 1.1⁺ НК (рис. 1, а). В то же время, после воздействия NaClO_4 на отпечатках трахеи не обнаруживается специфическая реакция на данные маркеры, выявляются лишь единичные МНС II-положительные клетки (см. рис. 1, б). На криостатных срезах трахеи, под-

вергнутой химической обработке, регистрируется положительная реакция на антигены МНС I класса на хондроцитах (рис. 2). После замораживания и размораживания трахеи на хрящевых клетках практически не обнаруживается экспрессия молекул МНС I и II класса. Таким образом, обработка трансплантата трахеи NaClO_4 вызывает меньшие изменения хрящевых структур, но приводит к более выраженной гибели клеток слизистой оболочки по сравнению с режимом замораживания и размораживания.

Для заселения обработанного трансплантата трахеи были генерированы КССК из аллогенных клеток костного мозга мышей. В культурах после 48 ч инкубации в кондиционной среде клеточной взвеси костного мозга на дне культуральных сосудов определяются скопления клеток удлинённой формы, обладающие высокой степенью адгезии (рис. 3, а). В окрашенных фибробластоподобных клетках, прилипших к пластику, выявляются гипохромные овальные ядра с ядрышками и слабо окрашенная цитоплазма (см. рис. 3, б).

В результате культивирования трансплантата со взвесью полученных КССК в течение 72 ч (с периодической ротацией образца) на поверхности трахеи, лишённой клеток, обнаруживаются адгезированные фибробластоподобные клетки.

Трансплантаты, заселённые КССК, подвергнутые замораживанию — размораживанию, помещали в подкожные карманы мышам-реципиентам. После их извлечения через 28 сут гистологическое исследование показало, что они окружены обширным воспалительным валом. Ткани трахеи полностью замещены клетками лимфоидного и макрофагального рядов, структура хряща и соединительной ткани почти утрачена (рис. 4).

В случае обработки NaClO_4 в трансплантате трахеи сохранялись хрящевые полукольца и соединительная ткань с дезорганизованными пучками волокон (рис. 5). Трансплантат трахеи, обработанный NaClO_4 и заселённый КССК, после аллогенной трансплантации не терял своих морфологических свойств. При этом в соединительной ткани, покрывающей трансплантат, выявлялось значительное количество фибробластоподобных клеток (рис. 6).

Таким образом, предлагаемый режим получения лишённого клеток трансплантата трахеи с обработкой NaClO_4 , в отличие от режима замораживания и размораживания, позволяет эффективно удалять иммунокомпетентные клетки, экспрессирующие маркеры МНС I и МНС II. Кроме того, в результате такого воздействия не происходит повреждения хондроцитов, что позволяет сохранить структуру трахеи и её функциональные свойства.

Обсуждение полученных данных. Существенную роль в отторжении трансплантатов играют реакция иммунной системы реципиента на антигены главного комплекса гистосовместимости донора [4, 11], а также донорские антигенпредставляющие клетки [3].

При подготовке аллогенной трахеи с использованием режима замораживания и размораживания в образцах остаётся большое количество иммунокомпетентных (в том числе и антигенпредставляющих) клеток, несущих на своей поверхности антигены МНС I и II классов. По этой причине, на наш взгляд, в области гетеротопных трансплантатов развиваются активные иммунные

Рис. 1. Отпечатки трахеи мыши после замораживания и размораживания (а) и обработки NaClO_4 (б).

а — моноклональные антитела к МНС I в сочетании с флюоресцеин-изотиоцианатом (FITC); натуральные киллеры — в сочетании с фикоэретрином (PE); б — моноклональные антитела к МНС II в сочетании с FITC. Ув.: а — 400; б — 900.

Рис. 2. Криостатный срез трахеи мыши после обработки NaClO_4 .

Моноклональные антитела к МНС I в сочетании с флюоресцеин-изотиоцианатом. Ув. 900.

Рис. 3. Стромальные клетки-предшественники (а, б) костного мозга мыши на дне культурального флакона через 48 ч культивирования.

б — окраска метиловым синим. Ув. 400.

Рис. 4. Аллотрансплантат криоконсервированной трахеи.

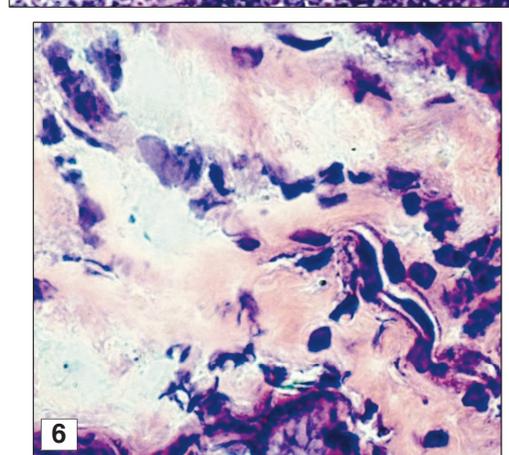
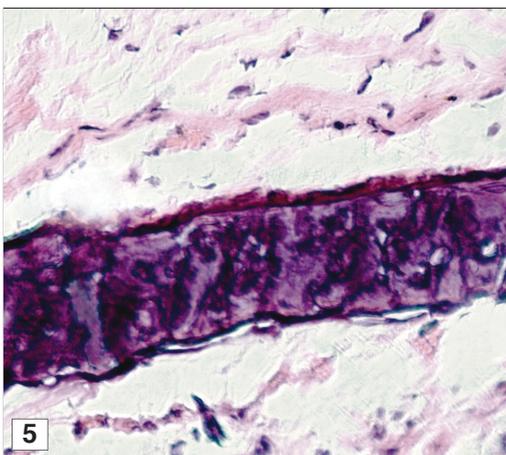
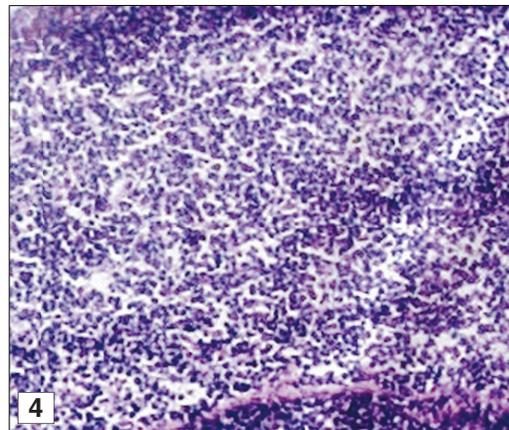
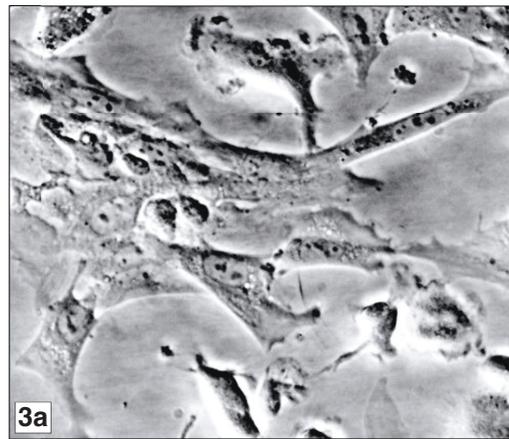
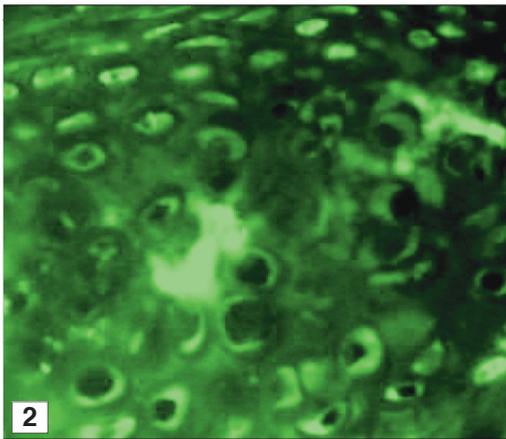
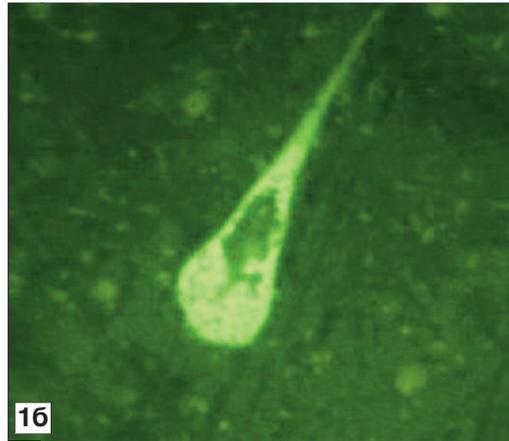
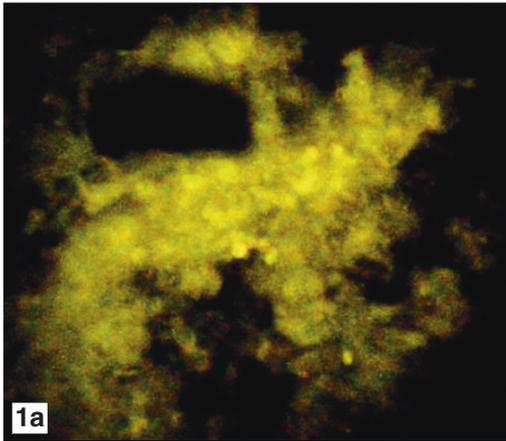
Окраска гематоксилином—эозином. Ув. 400.

Рис. 5. Аллотрансплантат трахеи, подвергнутый обработке NaClO_4 .

Окраска гематоксилином—эозином. Ув. 200.

Рис. 6. Аллотрансплантат трахеи, подвергнутой обработке NaClO_4 и заселённой костномозговыми стромальными стволовыми клетками.

Окраска гематоксилином—эозином. Ув. 400.



процессы, приводящие к замещению трансплантата воспалительным инфильтратом.

Предложенный авторами метод позволяет эффективно удалять иммунокомпетентные клетки из аллотрансплантата и обеспечивает толерантность гетеротопного трансплантата. В данных условиях не происходит существенных изменений хондроцитов, что позволяет сохранить функциональные свойства трахеи. Результаты недавних исследований показали, что не удалённые из аллотрансплантата хондроциты в силу своей низкой иммуногенности не индуцируют реакции отторжения трансплантата трахеи [9].

Полученные в настоящей работе результаты по заселению трансплантатов трахеи КССК соответствуют ранее опубликованным данным [1, 5] и свидетельствуют о целесообразности применения для аллотрансплантации трахеи, заселённой КССК реципиента.

Результаты проведённых в данной работе экспериментов позволяют заключить, что перспективным методом подготовки трахеи к трансплантации является удаление иммунокомпетентных клеток из органа NaClO_4 с последующим заселением трахеи КССК реципиента.

ЛИТЕРАТУРА

1. Campioni D., Lanza F., Dominici M. et al. Functional and immunophenotypic characteristics of isolated CD105(+) and fibroblast(+) stromal cells from AML: implications for their plasticity along endothelial lineage. *Cytotherapy*, 2000, v. 5, № 1, p. 566–579.
2. Hele D.J., Yacoub M.H. and Belvisi M.G. The heterotopic tracheal allograft as an animal model of obliterative bronchiolitis. *Respir Res.*, 2001, v. 2, № 3, p. 169–183.
3. Hosenpud G.D. The bronchial epithelium: a potential allogenic target for chronic rejection after lung transplantation. *J. Heart Lung Transplant.*, 1996, v. 15, № 7, p. 665–674.
4. Lu K.C., Jaramillo A., Mendeloff E.N. et al. Concomitant allorecognition of mismatched donor HLA class I- and II-derived peptides in pediatric lung transplant recipients with bronchiolitis obliterans syndrome. *J. Heart Lung Transplant.*, 2003, v. 22, № 1, p. 35–43.
5. Martinod E., Seguin A., Radu D. et al. Advances in tracheal surgery: are we close to finding the ideal tracheal substitute? *Rev. Mal. Respir.*, 2010, v. 27, № 6, p. 554–564
6. Neuringer I.P., Mannon R.B., Coffman T.M. et al. Immune cells in a mouse airway model of obliterative bronchiolitis. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.*, 1998, v. 19, № 3, p. 379–386.

7. Nusair S., Or R., Junadi S. et al. Simultaneous donor marrow cell transplantation with reduced intensity conditioning prevents tracheal obliteration in a bronchiolitis obliterans murine model. *Chest*, 2005, v. 128, № 6, p. 4024–4029.
8. Ross D.J., Lewis M.I., Kramer M. et al. The impact of cytolytic therapy on bronchiolitis obliterans syndrome. *J. Heart Lung Transplant.*, 1998, v. 17, № 9, p. 869–875.
9. Sykes M. Immune evasion by chimeric trachea. *N. Engl. J. Med.*, 2010, v. 362, № 2, p. 172–174.
10. Taylor D.O., Edwards L.B., Mohacsi P.J. et al. The Registry of the International Society for Heart and Lung Transplantation: twentieth official adult lung and heart-lung transplant report. *J. Heart Lung Transplant.*, 2003, № 6, p. 625–639.
11. Tullius S.G. and Tilney N.L. Both alloantigen-dependent and independent factors influence chronic allograft rejection. *Transplantation*, 1995, v. 59, № 3, p. 313–318.

Поступила в редакцию 14.11.2010
Получена после доработки 11.10.2011

HETEROTOPIC TRANSPLANTATION OF NON-IMMUNOGENIC TRACHEA POPULATED WITH RECIPIENT BONE MARROW STROMAL CELLS

M.V. Kiselevskiy, N.Yu. Anisimova, O.V. Lebedinskaya, B.Ye. Polotskiy and M.I. Davydov

Morphological changes in decellularized allogenic trachea populated with recipient bone marrow stromal (mesenchymal) stem cells and transplanted heterotopically, were examined in 30 C57Bl/6 and Balb/c mice of 22–25 g body mass. The research results have shown the insufficient efficacy of a transplant preparation mode by freezing and thawing method as in this case inflammatory reaction developed in the transplant area and its rejection took place. It was established that the mode of obtaining decellularized tracheal transplant by means of sodium perchlorate (NaClO_4) treatment, proposed by the authors, unlike a freezing–thawing mode, allowed to efficiently remove immunocompetent cells that expressed MHC I and II markers. NaClO_4 effect did not result in either chondrocyte damage or significant disturbance of tracheal cartilaginous and connective tissue structure in heterotopic transplants. Since transplant population with bone marrow stromal stem cells promoted connective tissue restoration, reduced the formation of granulations in anastomosis area and favored faster transplant epithelization, most promising method of trachea preparation for transplantation apparently seems to be the combination of immune cell removal from this organ by NaClO_4 treatment with subsequent bone marrow stromal stem cell population of transplant obtained.

Key words: *trachea, allotransplantation, heterotopic transplantation, bone marrow stromal (mesenchymal) stem cells*

Laboratory of Cell Immunity, Thoraco-Abdominal Department, N.N. Blokhin RAMS Russian Cancer Research Centre, Moscow; Department of Histology, Embryology and Cytology, Ye.A. Vagner Perm' State Medical Academy