

## Эффективность криоконсервированных ксенографтов надпочечников новорожденных поросят при компенсации экспериментального гипокортицизма и гипоальдостеронизма

UDC 615.361.45.014.41:616.45-089.843-092.9

G.V. DUDETSKAYA\*, DENG BO, N.M. ALABEDALKARIM, T.P. BONDARENKO

## Efficiency of Cryopreserved Xenografts of Newborn Piglet Adrenal Glands Under Compensation of Experimental Hypocorticism and Hypoaldosteronism

Влияние криоконсервирования на функциональные характеристики адренокортикальных клеток новорожденных поросят широко исследуется в течение последних 10 лет. Первоначально предполагалось, что создание низкотемпературного банка эндокринных желез сделает трансплантацию более доступной по сравнению с использованием нативного донорского материала. В настоящее время культивирование и криоконсервирование являются способами увеличения сроков функционирования трансплантатов в организме реципиента [6]. Показано, что нативные и криоконсервированные органотипические культуры надпочечников новорожденных поросят компенсируют недостаточность глюкокортикоидов при трансплантации животным с надпочечниковой недостаточностью [1]. Однако способность неваскуляризованных графтов надпочечников компенсировать недостаточность минералокортикоидов не подтверждалась даже при аутотрансплантации [4].

Цель работы – оценка эффективности различных видов ксенографтов надпочечников новорожденных поросят при трансплантации крысам с надпочечниковой недостаточностью.

### Материалы и методы

В эксперименте исследовали следующие виды ксенографтов надпочечников новорожденных поросят: 1) 1- и 3-суточные органотипические культуры; 2) фрагменты надпочечников, криоконсервированные со скоростью замораживания 1°C/мин по методу [2] и культивированные после отогрева в течение 48 часов; 3) фрагменты надпочечников, криоконсервированные со скоростью замораживания 100°C/мин по методу [3] и культивированные после отогрева в течение 48 часов. Донорский материал трансплантировали под по-

Cryopreservation effect on functional characteristics of newborn piglet adrenocortical cells has been widely investigated recently. The establishment of low temperature bank for endocrine glands was primarily supposed to make the transplantation more available compared to the use of native donor material. Nowadays the culturing and cryopreservation are the ways to increase the terms of transplant functioning in a recipient's organism [6]. Native and cryopreserved organotypic cultures of newborn piglet adrenal glands are shown as compensating glucocorticoids failure under transplantation to animals with adrenal insufficiency [1]. However the capability of non-vascularized adrenal grafts to compensate a mineral corticoid failure was not confirmed even under autotransplantation [4].

The research was aimed to estimate the efficiency of different types of newborn piglet adrenal xenografts under transplantation to rats with adrenal failure.

### Materials and methods

In the experiment we investigated the following types of newborn piglet xenografts: 1) 1 and 3 day organotypic cultures; 2) adrenal fragments, cryopreserved with 1°C/min freezing rate according to the method [2] and cultured after thawing for 48 hrs; 3) adrenal fragments, cryopreserved with 100°C/min freezing rate by the method [3] and cultured for 48 hrs after thawing. Donor material was transplanted under kidney capsule right after bilateral adrenalectomy. To the 36<sup>th</sup> day after operation an animal blood was taken intracardially under ether narcosis to determine the cortisone and aldosterone contents with radioimmunological method.

### Results and discussion

According to our data only 40% animals survived after bilateral adrenalectomy. At the same time an

Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, г. Харьков

\* Автор, которому необходимо направлять корреспонденцию: ул. Переяславская, 23, г. Харьков, Украина 61015; тел.: +38 (057) 373-30-07, факс: +38 (057) 373-30-84, электронная почта: cryo@online.kharkov.ua

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

\* To whom correspondence should be addressed: 23, Pereyaslavskaya str., Kharkov, Ukraine 61015; tel.: +380 57 373 3007, fax: +380 57 373 3084, e-mail: cryo@online.kharkov.ua

чечную капсулу сразу же после двусторонней адреналэктомии. На 36-е сутки после операции у животных брали кровь интракардиально под эфирным наркозом для определения содержания кортизола и альдостерона радиоиммунологическим методом.

### Результаты и обсуждение

Согласно нашим данным только 40% животных выживали после билатеральной адреналэктомии. При этом средняя продолжительность жизни составляла  $20,8 \pm 12,29$  суток. При трансплантации 1-суточной органотипической культуры выживаемость животных с графтами достигала 100%. Увеличение сроков культивирования донорского материала перед трансплантацией и его криоконсервирование снижали процент выживших животных. Самая низкая выживаемость животных (33%) была выявлена для реципиентов с трансплантатами, культивированными после криоконсервирования со скоростью  $1^\circ\text{C}/\text{мин}$ , или при трансплантации фрагментов, криоконсервированных со скоростью  $100^\circ\text{C}/\text{мин}$ . При анализе динамики гибели животных было выдвинуто предположение, что в первом случае неэффективность трансплантации была связана с первичной дисфункцией графта, так как средняя продолжительность жизни реципиентов ( $14,57 \pm 12,53$  суток) не отличалась от показателя адреналэктомированных животных. Во втором случае «быстро» замороженный трансплантат в течение 23 суток обеспечивал выживаемость животных 100%, вследствие чего средняя продолжительность жизни ( $31,67 \pm 3,61$  суток) этих животных достоверно превышала этот показатель у адреналэктомированных крыс.

Известно, что основным глюкокортикоидом поросят является кортизол, тогда как у грызунов – кортикостерон из-за ингибирования фермента CYP21 $\beta$ , который отвечает за синтез кортизола [5]. Тем не менее, в плазме крови контрольных и адреналэктомированных крыс определяется незначительный уровень кортизола [4]. Поэтому достоверное увеличение содержания кортизола в плазме крови крыс-реципиентов, по сравнению с этим показателем у контрольных и адреналэктомированных крыс, мы связывали с функциональной активностью трансплантата. Наиболее высокие показатели кортизола были выявлены у животных с трансплантатами 1- и 3-суточных органотипических культур (23 и 30 нмоль/л соответственно, против 10 нмоль/л у контрольных животных). Однако достоверное повышение кортизола также было показано для реципиентов графтов, культивированных после «медленного» замораживания, или для реципиентов с «быстро» замороженными трансплантатами.

Показано, что интраспленичная трансплантация аутоклеток надпочечников адреналэктомиро-

average life duration was  $20.8 \pm 12.29$  days. When transplanting the 1 day organotypic culture, the animal survival with grafts achieved 100%. The prolongation of donor material culturing terms before transplantation and its cryopreservation reduced the percentage of survived animals. The lowest animal survival (33%) was revealed in the recipients either with transplants, cultured after cryopreservation with  $1^\circ\text{C}/\text{min}$  rate or under transplantation of fragments, cryopreserved with  $100^\circ\text{C}/\text{min}$  rate. When analysing the dynamics of animal death we assumed that in the first case the transplantation failure was associated to a primary dysfunction of graft, because an average life of recipients ( $14.57 \pm 12.53$  days) did not differ from the index of adrenal ectomised animals. In the second case a “rapidly” frozen transplant provided 100% animal survival for 23 days, due to that an average life of these animals ( $31.67 \pm 3.61$  days) statistically and significantly exceeded this index in adrenal ectomised rats.

The cortisone is known as the main glucocorticoid in piglets, meanwhile corticosterone is that one in rodents due to the CYP21 $\beta$  enzyme inhibition, that is responsible for cortisone synthesis [5]. Nevertheless in blood plasma of control and adrenal ectomised rats a slight cortisone level is determined [4]. Therefore a statistically significant increase in cortisone content in blood plasma of rats-recipients compared to this index in the control and adrenal ectomised rats we related to a transplant functional activity. The highest cortisone indices were revealed in animals with transplants of 1 and 3 days organotypic cultures (23 and 30 nmol/l, correspondingly, versus 10 nmol/l in control animals). However a statistically significant cortisone increase was also shown for recipients of grafts, cultured after “slow” freezing or for recipients with “rapidly” frozen transplants.

An intraspleen transplantation of adrenal autocytes to adrenalectomised rats was shown as not compensating the aldosterone failure [4]. Our research enabled to reveal certain types of transplants, contributing to a statistically significant correction of hypoaldosterony in rats with bilateral adrenalectomy. During adrenal gland elimination there was a sharp decrease in aldosterone content down to 0.72 pg/ml in rat blood plasma (versus 32 pg/ml in control animals). Under cryopreserved adrenal fragment transplantation the aldosterone content in rat blood plasma statistically and significantly increased up to 19–20 pg/ml, although did not achieve the control values. In the animals with cryopreserved and cultured xenografts no compensation of aldosterone failure was revealed. Glomerular area cells, successfully surviving cryopreservation, die during following organotypic culturing.

### Conclusions

The donor material, cryopreserved either with low or high cooling rates statistically and significantly

ванным крысам не приводила к компенсации недостаточности альдостерона [4]. Наши исследования позволили выявить некоторые виды трансплантатов, которые способствовали достоверной коррекции гипоальдостеронии у крыс с двусторонней адреналэктомией. При удалении надпочечников резко снижалось содержание альдостерона в плазме крови крыс до 0,72 пг/мл (против 32 пг/мл у контрольных животных). При трансплантации криоконсервированных фрагментов надпочечников содержание альдостерона в плазме крови крыс достоверно повышалось до 19-20 пг/мл, хотя и не достигало контрольных значений. У животных с криоконсервированными и культивированными ксенографтами компенсация недостаточности альдостерона не была выявлена. Вероятно, что клетки гломерулярной зоны, которые успешно переживают криоконсервирование, гибнут при последующем органотипическом культивировании.

### Выводы

Донорский материал, который криоконсервировали с низкими или высокими скоростями охлаждения, достоверно повышал уровень альдостерона в плазме периферической крови крыс, хотя был менее эффективен с точки зрения коррекции гипокортицизма. Сохранение активности клеток, продуцирующих минералокортикоиды, на фоне частичной, но достоверной компенсации недостаточности кортизола, позволяет говорить о выраженных преимуществах “быстро” криоконсервированных фрагментов надпочечников при трансплантации пациентам с надпочечниковой недостаточностью.

### Литература

1. Бондаренко Т.П., Божок Г.А., Алабедацькарім Н.М. та інші. Ксенотрансплантація криоконсервованого ендокринного матеріалу як метод корекції гіпофункції залоз в експерименті // Трансплантологія.– 2003.– Т. 1, №4.– С. 60–63.
2. Пат. України № 34848А, Україна, МПК<sup>6</sup> С12N 5/02. Спосіб криоконсервування культури клітин адреналокортикальної тканини / Т.П. Бондаренко, Є.І. Легач; Заявлено 13.07.1999; Опубл. 15.03.2001; Бюл. № 2.
3. Пат. України № 4567, МПК<sup>7</sup>, №12N5/08 А01N1/02. Спосіб криоконсервування органної культури надниркових залоз / Т.М. Гуріна, Н.М. Алабедацькарім, В.Д. Устиченко, Т.П. Бондаренко; Заявлено 07.06.2004; Опубл. 17.01.2005; Бюл №1.
4. Allende G., Chavira R., Quintana-Stephan A. Biochemical evidence of the functional recovery and regeneration of adrenal autotransplants in the rat spleen // Endocrine.–2001.– Vol.16, N3.– P. 173–179.
5. Payne A.H., Hales D.B. Overview of steroidogenic enzymes in the pathway from cholesterol to active steroid hormones // Endocr. Rev.– 2004.– Vol. 25, N6.– P. 947–970.
6. 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, N2.– P. 99–103.

Поступила 13.05.2008

increased the aldosterone level in rat peripheral blood plasma, although was less efficient from point of view of hypocorticism correction. Activity preservation in cells, producing mineral corticoids at the background of partial, but statistically significant compensation of cortisone failure enables to suggest about the manifested advantages of “rapidly” cryopreserved adrenal fragments during transplantation to patients with adrenal insufficiency.

### References

1. Bondarenko T.P., Bozhok G.A., Alabedalkarim N.M. et al. Xenotransplantation of cryopreserved endocrine material as the method of gland hypofunction correction in experiment // Transplantologiya.– 2003.– Vol. 1, N4.– P. 60–63.
2. Patent of Ukraine N 34848A, Ukraine IPC<sup>6</sup> C12N 5/02. Method for adrenocortical tissue cell culture cryopreservation / T.P. Bondarenko, E.I. Legach; Applied 13.07.1999; Published 15.03.2001, Bull. N2.
3. Patent of Ukraine N 4567, Ukraine IPC<sup>7</sup>, N 12N5/08 AO1N1/02. Method for adrenal gland organ culture cryopreservation / T.M. Gurina, N.M. Alabedalkarim, V.D. Ustichenko, T.P. Bondarenko; Applied 07.06.2004; Published 17.01.2005; Bull. N1.
4. Allende G., Chavira R., Quintana-Stephan A. Biochemical evidence of the functional recovery and regeneration of adrenal autotransplants in the rat spleen // Endocrine.–2001.– Vol.16, N3.– P. 173–179.
5. Payne A.H., Hales D.B. Overview of steroidogenic enzymes in the pathway from cholesterol to active steroid hormones // Endocr. Rev.– 2004.– Vol. 25, N6.– P. 947–970.
6. 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, N2.– P. 99–103.

Accepted in 13.05.2008