

УДК: 616-001.18:611.13:57.082:547.42

Алабедалькарим Н. М., Богуславский К. И., Коваленко И. Ф., Легач Е. И., Божок Г. А.

ВЛИЯНИЕ ГИПОТЕРМИЧЕСКОЙ ИНКУБАЦИИ АОРТЫ НЕОНАТАЛЬНЫХ ПОРОСЯТ В КОНСЕРВИРУЮЩИХ РАСТВОРАХ НА ПРИСУТСТВИЕ ГЛАВНОГО КСЕНОГЕННОГО ЭПИТОПА GAL- α -1,3-GAL

Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины
(г. Харьков)

bozhokgaru@gmail.com

Исследование выполнено в рамках научно-исследовательской темы «Властивості кріоконсервованих первинних культур клітин ендокринних залоз неонатальних тварин *in vitro* та *in vivo* при трансплантації» (2.2.6.104, № 0116U003494).

Вступление. Трансплантология ежедневно сталкивается с проблемой нехватки органов. Особенно критично стоит вопрос для пациентов с терминальными нарушениями сердца и легких, когда не существует иного способа лечения, кроме трансплантации. По статистике, за год умирает каждый четвертый пациент, занесенный в лист ожидания по поводу трансплантации легких или сердца [6].

Проблема столь актуальна, что после долгого перерыва в исследованиях возможности применения органов животных для трансплантации человеку, мировое медицинское сообщество снова возвращается к этой идее, особенно после создания генетически модифицированных свиней [12, 16].

Главный ксеноантигенный эпитоп Gal- α -1,3-Gal (α -Gal-эпитоп) – галактозный остаток, присоединенный молекулами гликолипидов и гликопротеинов к мембранам клеток животных. У человека в организме эта углеводная структура не синтезируется по причине врожденной инактивации фермента α -1,3-галактозилтрансферазы (1,3-GT) [3]. Проблема заключается в том, что α -Gal-эпитоп широко распространен в животном мире, в том числе и среди бактерий, заселяющих желудочно-кишечный тракт человека. Это приводит к тому, что в крови человека существует высокий титр антител к α -Gal-эпитопу. Поскольку эндотелиальные клетки сосудов обычных свиней высоко экспрессируют данный эпитоп [15], связывание с ними антител при пересадке органа от свиньи активирует каскад комплемент-зависимых реакций. В результате наступает тромбоз сосудов ксенографта и его деструкция. Вследствие такой реакции, которая называется реакцией гиперострого отторжения, свиной орган отторгается в течение нескольких часов [7].

В организме генетически модифицированных свиней экспрессия α -Gal-эпитопа подавлена [10], что дает надежду на преодоление иммунологического барьера для ксенотрансплантации. Такие животные могут быть выращены в свободных от патогенов условиях для предотвращения трансмиссии вирусов

от свиньи человеку. Начиная с 2010-х годов, вопрос об использовании трансгенных и нокаутных свиней в качестве доноров органов стал настолько серьезно рассматриваться, что финансирование проектов, направленных на доклинические испытания легочных и сердечных ксенографтов, исчисляется миллионами долларов [17].

Однако при изучении α -Gal-дефицитных пород свиней оказалось, что они все же экспрессируют незначительное, но детектабельное количество эпитопа [18]. В связи с этим для будущего использования органов от этих животных остается актуальным вопрос о полной элиминации α -Gal-эпитопа, поскольку даже незначительные его количества могут вызвать иммунный ответ.

Ранее было показано, что перфузия сердца свиньи в течение нескольких часов кардиоплегическими растворами снижает процент ксенографтов, подвергшихся гиперострому отторжению [1]. На культуре клеток эндотелия аорты было обнаружено уменьшение количества α -Gal-эпитопов при гипотермической инкубации в консервирующих растворах НТК и UW [8].

С другой стороны, известно, что клетки субэндотелиальных слоев сосуда тоже экспрессируют α -Gal-эпитопы [11, 14], что в долгосрочной перспективе является достаточным для инициирования хронического отторжения. Исходя из этого, целесообразным является проведение исследований влияния гипотермического хранения (ГХ) в консервирующих средах не на одиночных эндотелиальных клетках, а на фрагментах сосудистой ткани, где представлены все типы клеток.

Выбор среды для гипотермического хранения и консервации органов представляет собой отдельную проблему. В условиях извлечения донорского органа из тела и его дальнейшей трансплантации наблюдается синдром ишемии-реперфузии. Для уменьшения гипоксии органа, неизбежно возникающей в условиях прекращения кровотока, снижают температуру хранения органа. При 4°C потребность тканей в кислороде уменьшается на 80-90% [2], чем и объясняется антигипоксический эффект гипотермического хранения. Однако процессы активного транспорта ионов тоже замедляются, что приводит к изменению трансмембранных градиентов веществ.

В связи с этим при гипотермическом хранении используют специальные среды, способствующие уменьшению выхода ионов калия из клеток (высококалиевые среды) и препятствующие отеку (с добавками крахмала, маннитола, сахарозы, раффинозы) [5]. Популярными средами для ГХ органов являются растворы Университета Висконсина (UW solution), раствор Коллинза в модификации Евро-Коллинз (Euro-Collins), НТК (Custodiol), Celsior [5].

В представленной работе было изучено влияние трех сред, различных по составу ионов натрия и калия: раствор Евро-Коллинз, НТК и DMEM. Раствор Евро-Коллинз содержит высокий уровень калия и низкий натрия, что является приближенным к составу внутриклеточной среды. Питательная среда DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium), используемая для культивирования клеток, является низко-калиевой и высоко-натриевой, что соответствует составу внеклеточной жидкости. Раствор НТК содержит низкие концентрации обоих ионов.

Цель исследования – изучение влияния гипотермического хранения в растворах НТК, Евро-Коллинз, среде DMEM на присутствие эпитопа α -Gal в ткани аорты неонатальных свиней.

Объект и методы исследования. Фрагменты аорты были получены от 1-3 суточных поросят первого поколения гибридов пород крупная белая/ландрас и макстер/дюрок. Эксперименты проведены в соответствии с «Общими принципами экспериментов на животных», одобренными I Национальным конгрессом по биоэтике (20.09.01 г., Киев, Украина) и согласованными с положениями «Европейской Конвенции о защите позвоночных животных, используемых для экспериментальных и других научных целей».

Наркотизированных животных декапитуировали, аорту извлекали, помещали в охлажденный физиологический раствор и отмывали от крови. Аорту разрезали скальпелем на кольцевые фрагменты длиной 0,8-1 см.

Фрагменты аорты помещали на 2, 7 и 24 часа в условия ГХ при 4°C в: 1) раствор НТК («Dr.F.Kohler Chemie GmbH», Германия), 2) среду DMEM (PAA, Австрия), 3) раствор Евро-Коллинз.

После ГХ образцы фиксировали в 4%-м параформальдегиде (pH=7,4, «Sigma») в течение 4 часов, перенесли на ночь в раствор 25%-й сахарозы на фосфатно-солевом буфере (PBS), после чего медленно замораживали и хранили в жидком азоте. В качестве нативного контроля использовали отмытые от крови и немедленно зафиксированные фрагменты аорты.

Для приготовления криостатных срезов образцы заливали в монтирующую среду Tissue-Tek («Sakura», Япония) и изготавливали поперечные срезы ткани толщиной 5-7 мкм на криомикротоме MEV (Германия).

Для идентификации α -Gal-эпитопа широко применяется лектин из растения *Bandeiraea simplicifolia* [4,9]. В экспериментах использовали FITC-конъюгированный изолектин BSI-B4 (Sigma) в разведении 1:24.

Регидратированные в PBS срезы аорты инкубировали с меченым изолектином в течение 40 мин при комнатной температуре, после чего трижды от-

мывали. Для окраски клеточных ядер использовали Hoechst 33342 (Sigma) в концентрации 5 мкг/мл, с которым срезы инкубировали в течение 20 мин при комнатной температуре. Срезы заключали в монтирующую среду под покровные стекла и анализировали флуоресценцию на лазерном сканирующем микроскопе LSM 510 META Carl Zeiss (Германия) при следующих установках: точечная апертурная диафрагма (pinhole) 284 мкм, длина волны возбуждения лазера 488 нм и фильтр эмиссии 505-575 нм для FITC-BSI-B4; длина волны возбуждения лазера 405 нм и фильтр эмиссии 443-476 нм для Hoechst 33342.

Анализ фотографий осуществляли с помощью программ для обработки изображений LSM image examiner (Германия) и Photoshop («Adobe», США). Тестировали не менее 5 срезов каждого образца, фотографируя не менее 10 полей зрения на каждом срезе на увеличении $\times 400$. Для анализа отбирали микрофотографии, полученные при одинаковом увеличении, интенсивности возбуждающего лазера, размере пинхола.

Относительную интенсивность флуоресценции образцов, окрашенных FITC-BSI-B4, рассчитывали после преобразования микрофотографий, полученных при записи в канале зеленой флуоресценции, в битовую карту (bitmap-анализ). Измеряли средневзвешенный уровень яркости изображения и нормализовали его относительно яркости фона, который принимали за нулевую точку. В качестве показателя количества ядер клеток в ткани аорты использовали показатель интегральной плотности, определяя его для образцов, окрашенных Hoechst 33342.

Для выявления гистоморфологических отличий ткани аорты, подвергнутой обработке в разных инкубационных средах, проводили окрашивание срезов с пикрофуксином по ван Гизону.

Статистическую обработку результатов осуществляли с помощью программ «Excel» и «Stasticica 10». Количественные данные представлены в виде среднего значения \pm стандартное отклонение. Данные проверяли на нормальность распределения с помощью теста Колмогорова и Смирнова, для сравнения двух выборок использовали однофакторный дисперсионный анализ, достоверными считались различия при $p < 0,05$.

Результаты исследований и их обсуждение.

Нативные образцы характеризовались стойким мечением с изолектином BSI-B4, наблюдающимся как в люминальной области аорты, так и в толще ткани (рис. 1, а). Визуальный анализ изображений показывает, что через 2 часа (рис. 1, г) и 7 часов (фотографии не представлены) гипотермического хранения (ГХ) в растворе Евро-Коллинз уменьшается окрашивание образцов FITC-меченым изолектином.

Анализ интенсивности зеленой флуоресценции образцов позволил установить изменение связывания изолектина BSI-B4 с α -Gal-эпитопами клеток аорты в зависимости от времени ГХ в разных средах. Установлено, что интенсивность флуоресценции значимо не изменяется при инкубации в растворах НТК и DMEM (рис. 2). При ГХ в течение 2 ч в растворе Евро-Коллинз наблюдается уменьшение окрашивания ткани аорты на 53% по сравнению с нативными

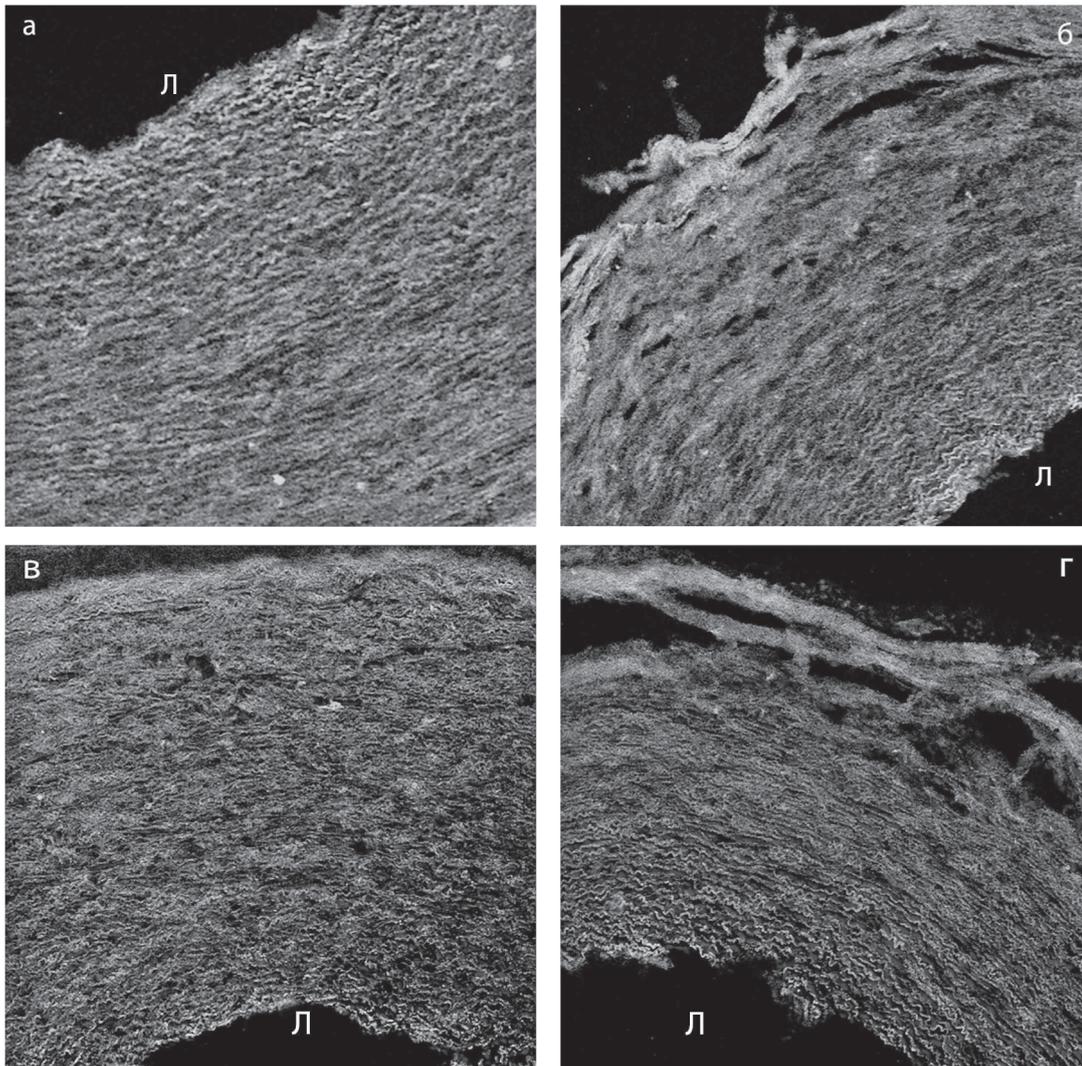


Рис. 1. Репрезентативные образцы срезов аорты неонатального поросенка, окрашенные FITC-коньюгированным изолектином BSI-B4 (зеленая флуоресценция). Контрастирование ядер с помощью окрашивания Hoechst 33342 (синяя флуоресценция). А – нативная аорта, Б – инкубация в DMEM 2 часа, В – инкубация в НТК 2 часа, Г – инкубация в Евро-Коллинз 2 часа, Л – люминальная поверхность аорты.

образцами. При дальнейшей инкубации в течение 7 и 24 ч данный показатель составляет 57 и 69%, соответственно.

Инкубация в консервирующих средах, особенно в течение длительного времени, негативно действует на структурные компоненты стенки аорты, в том числе ее соединительнотканые и мышечные элементы. Для изучения гистоморфологических характеристик ткани после ГХ нами была использована окраска по ван Гизону, позволяющая оценить эти изменения.

Поверхность интимы нативной аорты неонатального поросенка выстлана эндотелиальными клетками, подэндотелиальный слой выражен слабо. Коллагеновые и эластиновые волокна меди аорты представляют собой упорядоченные параллельно расположенные концентрические тяжи. В адвентиции волокна расположены менее упорядоченно, представляя собой переплетающиеся пучки и скопления (рис. 3, а).

Наименьшие изменения при ГХ аорты наблюдались в растворе Евро-Коллинз. В данных образцах волокна в целом сохраняли нативную архитектуру на протяжении 2 и 7 ч (рис. 3, г). Частичное разрушение ткани и очаги деструкции наблюдались после ГХ в данном растворе в течение 24 ч (данные не представлены).

Об изменении количества клеток в ткани аорты косвенно судили по изменению интегральной плотности микрофотографий образцов аорты, окрашенных ядерным красителем Hoechst 33342. После ГХ в течение 2 ч в растворах НТК и DMEM выявилось уменьшение данного показателя на 23,5% и 29,1%, соответственно, тогда как в растворе Евро-Коллинз – на 1,8% (рис. 4). Тенденция к разрушению клеток в условиях хранения увеличивалась с течением времени, однако для растворов НТК и DMEM этот показатель составлял около 30%, а для раствора Евро-Коллинз – 9,8 (7 ч) и 13,5% (24 ч).

Таким образом, уменьшение связывания меченого изолектина наблюдается при ГХ ткани аорты в

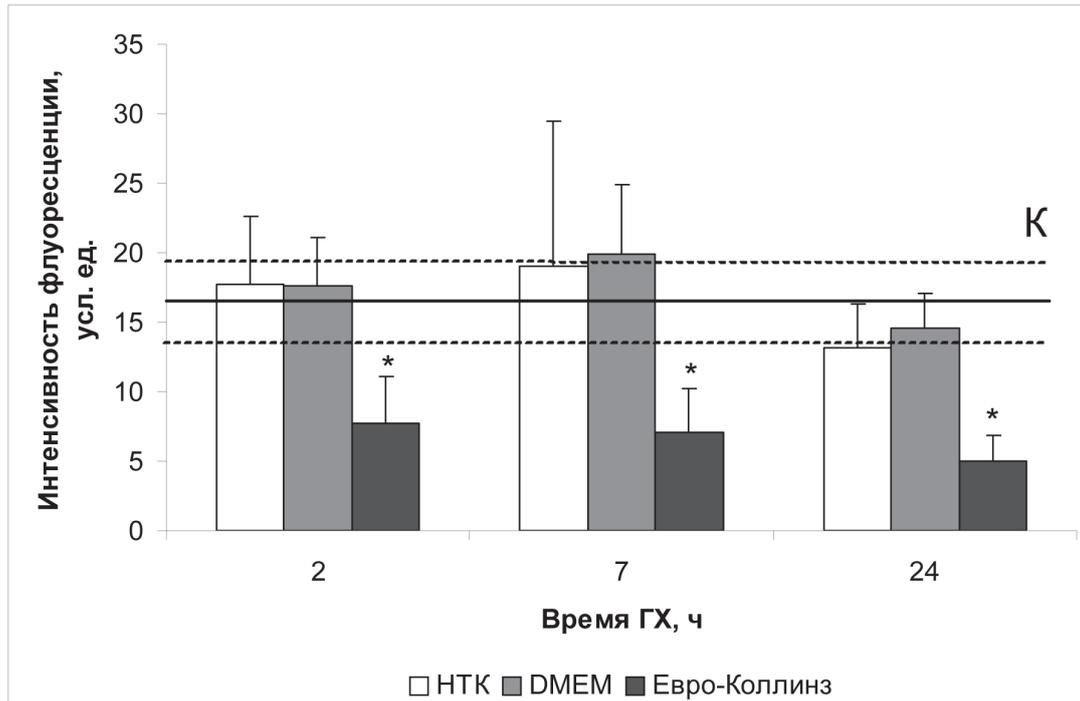


Рис. 2. Влияние ГХ в различных средах на интенсивность флуоресценции FITC-конъюгированного изолектина BSI-B4, связанного с α -Gal-эпистопами клеток аорты неонатального поросенка. К – нативный контроль, сплошная линия – значение интенсивности флуоресценции для нативного контроля, прерывистые линии – стандартное отклонение значения интенсивности флуоресценции для нативного контроля.
* – $p < 0,05$ по сравнению с нативным контролем.

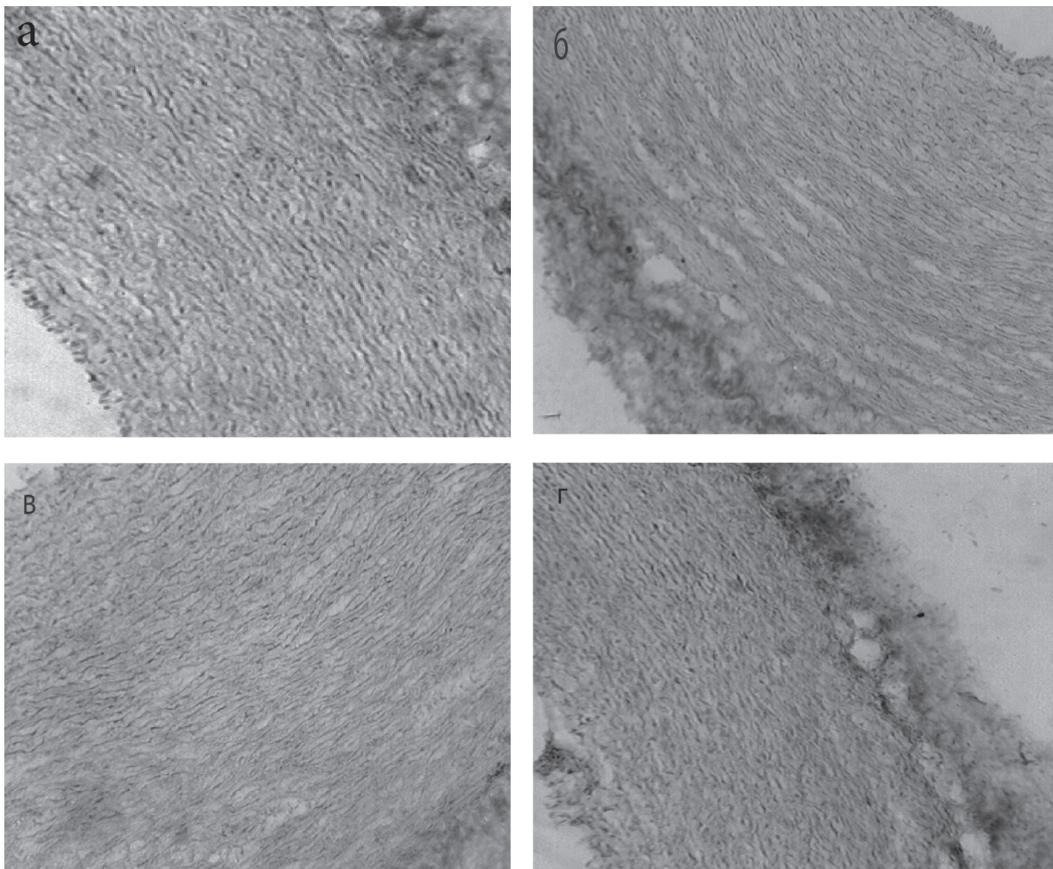


Рис. 3. Образцы срезов ткани аорты неонатального поросенка, окрашенные по ван Гизону. А – нативная аорта, Б – инкубация в DMEM 2 часа, В – инкубация в НТК 2 часа, Г – инкубация в Евро-Коллинз 7 ч.

растворе Евро-Коллинз. Это косвенно свидетельствует об уменьшении присутствия эпитопа α -Gal в данных условиях. Нужно отметить, что эффект достигается при достаточной сохранности структуры ткани аорты. ГХ в растворах НТК и DMEM было менее результативным, поскольку количество α -Gal эпитопа значительно не уменьшалось, а ткань претерпевала необратимые деструктивные изменения.

Полученные нами данные частично совпадают с результатами других авторов, которые наблюдали уменьшение присутствия α -Gal эпитопа (на 50%) при инкубации культивированных клеток эндотелия аорты в течение 4 ч в растворе университета Висконсина (UW-раствор) [8]. Как и раствор Евро-Коллинз, UW-раствор содержит высокую концентрацию ионов калия. При гипотермической инкубации в питательной среде L-15, которую использовали авторы, не происходило значимых отклонений в содержании α -Gal эпитопа. Этот факт совпадает с полученным нами при ГХ ткани аорты в питательной среде DMEM.

При использовании раствора НТК существуют расхождения в данных, ранее полученных этими авторами, и нашими результатами. Keller с соавт. установили уменьшение окрашивания α -Gal эпитопа на эндотелиальных клетках (на 32%) после 6 ч инкубации в НТК [8], что в наших экспериментах не наблюдалось. Расхождения могут быть связаны с тем, что авторы проводили опыты на культуре клеток. В нашем случае использовалась ткань аорты, в состав которой входят и другие клеточные элементы, самые многочисленные из которых – гладкомышечные клетки (ГМК) и фибробласты, экспрессирующие α -Gal эпитоп [11]. Таким образом, возможно, инкубация одиночных клеток эндотелия в растворе НТК позволяет добиться уменьшения присутствия этого

эпитопа, однако более глубокие медиальные слои аорты остаются резистентными к данному виду обработки.

Интересным является вопрос о механизме уменьшения α -Gal эпитопа при инкубации в консервирующих средах. В природных условиях экспрессия этого структурного компонента клеточных мембран зависит от активности фермента α -1,3-галактозилтрансферазы (1,3-GT), который участвует в преобразовании олигосахаридов для последующего синтеза мембранных гликопротеинов [3]. Однако предположение об уменьшении присутствия α -Gal эпитопа в результате ингибирования данного фермента сомнительно в связи с непродолжительностью времени инкубации и гипотермическими условиями.

Для объяснения данного феномена Keller с соавт. было предложено три гипотезы [8]. Согласно первой, компоненты консервирующих растворов вызывают такие изменения в химической структуре α -Gal эпитопа, которые делают невозможным связывание лектина с ним. Вторая говорит о том, что происходит элиминация α -Gal эпитопа с клеточной мембраны вследствие разрыва межмолекулярных связей. И третье возможное объяснение состоит в том, что имеет место маскировка α -Gal эпитопа молекулами веществ, входящих в состав гипотермических растворов.

В наших экспериментах обнаружено, что из трех использованных сред лишь раствор Евро-Коллинз обладал свойством уменьшать присутствие α -Gal эпитопа. Кроме хлорида калия в высокой концентрации (108 ммоль/л), данная среда содержит еще 4 компонента: хлорид натрия (10 ммоль/л), гидрокарбонат натрия (10 ммоль/л), глюкозу (180 ммоль/л) и фосфаты (60 ммоль/л) [5]. Маскирующий эффект

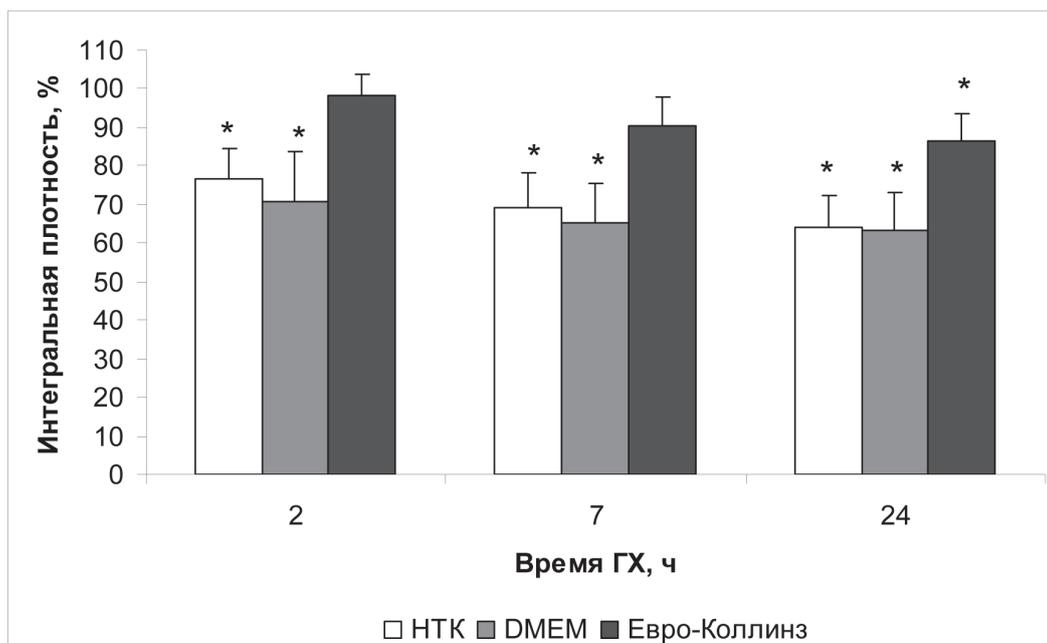


Рис. 4. Влияние ГХ в различных средах на количество клеток в ткани аорты неонатального поросенка. Изменение количества клеток определяли по изменению интегральной плотности на микрофотографиях образцов, окрашенных ядерным красителем Hoechst 33342. * – $p < 0,05$ по сравнению с нативным контролем, принятым за 100%.

раствора возможен при наличии высокомолекулярных компонентов, которые не входят в состав раствора Евро-Коллинз.

Согласно наблюдениям Keller с соавт. [8], высокий элиминационный эффект относительно α -Gal эпитопа имел раствор UW. Он содержит высокомолекулярные компоненты (крахмал, раффинозы и лактобионат), гормоны (инсулин, дексаметазон), которые могут гипотетически маскировать экспрессию эпитопа. В то же время, раствор UW, аналогично раствору Евро-Коллинз, содержит высокую концентрацию ионов калия, а также ионы фосфатов, сульфатов.

В предыдущих работах установлено, что изменение топографии клеточной поверхности делает α -Gal эпитоп недоступным для связывания со специфическими антителами [13]. Возможно, высокая концентрация калия, присутствующая в консервирующих растворах UW и Евро-Коллинз, приводит к изменениям в четвертичной структуре мембранных гликопротеинов, в результате чего экспонирование α -Gal эпитопа уменьшается.

Выводы. Таким образом, использование низкокальциевых растворов НТК и DMEM не целесообразно для ГХ аорты, поскольку приводит к деструкции ткани и не влияет на присутствие α -Gal эпитопа. Высококальциевый раствор Евро-Коллинз лучше подходит для

этой цели, поскольку ГХ в нем не приводит к значительным деструктивным изменениям в структуре ткани и способствует уменьшению количества α -Gal эпитопов на клетках аорты.

Перспективы дальнейших исследований. Несмотря на большой опыт использования органо-сохраняющих сред, остается немало вопросов, связанных с влиянием их на антигенные структуры клеток. В свете установленного в нашей работе факта уменьшения присутствия главного ксеноантигена α -Gal эпитопа в ткани аорты после гипотермической инкубации в растворе Евро-Коллинз, представляется целесообразным проведение дальнейших исследований в двух направлениях. Во-первых, возможно разработать протоколы перфузии и краткосрочного хранения органов, полученных от трансгенных свиней, с использованием высококальциевых растворов в целях элиминации ксеноантигенов. Во-вторых, необходимо подробнее изучить физико-химические явления, лежащие в основе данного феномена. Это является важным для трансплантологической практики, в которой широко используются сосудистые биопротезы свиного происхождения, поскольку остается открытым вопрос о возможной демаскировке ксеноантигенов после трансплантации.

Литература

1. Brenner P. Influence of ischemic time on hyperacute xenograft rejection of pig hearts in a working heart perfusion model with human blood / P. Brenner, M. Hinz, H. Huber [et al.] // *Transpl. Int.* – 2000. – Vol. 13 (Suppl. 1). – P. 494-503.
2. Eltzhig H.K. Ischemia and reperfusion – from mechanism to translation / H.K. Eltzhig, T. Eckle // *Nature medicine.* – 2011. – Vol. 17. – P. 1391-1401.
3. Galili U. Man, apes and Old World monkeys differ from other mammals in the expression of α -galactosyl epitopes on nucleated cells / U. Galili, S.B. Shohet, E. Kobrin [et al.] // *J. Biol. Chem.* – 1988. – Vol. 263 (33). – P. 17755-17762.
4. Goldstein I.J. Carbohydrate binding studies on the *Bandeiraea simplicifolia* 1 isolectins. Lectins which are mono-, di-, tri-, and tetraivalent for N-acetyl-D-galactosamine / I.J. Goldstein, D.A. Blake, S. Ebisu [et al.] // *J. Biol. Chem.* – 1981. – Vol. 256. – P. 3890-3893.
5. Guibert E.E. Organ Preservation: Current Concepts and New Strategies for the Next Decade / E.E. Guibert, A.Y. Petrenko, C.L. Balaban [et al.] // *Transfus. Med. Hemother.* – 2011. – Vol. 38 (2). – P. 125-142.
6. Johnson R.J. Organ donation and transplantation in the UK-the last decade: a report from the UK national transplant registry / R.J. Johnson, L.L. Bradbury, K. Martin [et al.] // *Transplantation.* – 2014. – Vol. 97 (Suppl. 1). – P. 1-27.
7. Joziase D.H. Xenotransplantation: the importance of the Gal α 1,3Gal epitope in hyperacute vascular rejection / D.H. Joziase, R. Oriol // *Biochem Biophys Acta.* – 1999. – Vol. 1455 (2-3). – P. 403-418.
8. Keller M. Influence of hypothermia and cardioplegic solutions on expression of alpha-Gal epitope on porcine aortic endothelial cells / M. Keller, A. Beiras-Fernandez, M. Schmoedel [et al.] // *Exp. Clin. Transplant.* – 2010. – Vol. 8 (3). – P. 250-257.
9. Kirkeby S. Binding of *Griffonia simplicifolia* 1 isolectin B4 (GS1 B4) to α -galactose antigens / S. Kirkeby, D. Moe // *Immunol. Cell Biol.* – 2001. – Vol. 79. – P. 121-127.
10. Klymiuk N. Genetic modification of pigs as organ donors for xenotransplantation / N. Klymiuk, B. Aigner, G. Brem, E. Wolf // *Mol. Reprod. Dev.* – 2010. – Vol. 77 (3). – P. 209-221.
11. Konakci K.Z. Alpha-Gal on bioprostheses: xenograft immune response in cardiac surgery / K.Z. Konakci, B. Bohle, R. Blumer // *Eur. J. Clin. Invest.* – 2005. – Vol. 35 (1). – P. 17-23.
12. Lai L. Production of alpha-1,3-galactosyltransferase knockout pigs by nuclear transfer cloning / L. Lai, D. Kolber-Simonds, K.W. Park [et al.] // *Science.* – 2002. – Vol. 295 (5557). – P. 1089-1092.
13. Lin S.S. Differential recognition by proteins of alpha-galactosyl residues on endothelial cell surfaces / S.S. Lin, W. Parker, M.L. Everett, J.L. Platt // *Glycobiology.* – 1998. – Vol. 8 (5). – P. 433-443.
14. Mangold A. Alpha-Gal specific IgG immune response after implantation of bioprostheses / A. Mangold, T. Szerafin, K. Hoetzenecker [et al.] // *J. Thorac. Cardiovasc. Surg.* – 2009. – Vol. 57 (4). – P. 191-195.
15. Oriol R. Carbohydrate antigens of pig tissues reacting with human natural antibodies as potential targets for hyperacute vascular rejection in pig-to-man organ xenotransplantation / R. Oriol, Y. Ye, E. Koren, D.K. Cooper // *Transplantation.* – 1993. – Vol. 56 (6). – P. 1433-1442.
16. Phelps C.J. Production of alpha 1,3-galactosyltransferase-deficient pigs / C.J. Phelps, C. Koike, T.D. Vaught [et al.] // *Science.* – 2003. – 299 (5605). – P. 411-414.
17. Reardon S. New life for pig-to-human transplants / S. Reardon // *Nature.* – 2015. – Vol. 527 (7577). – P. 152-154.
18. Sharma A. Pig cells that lack the gene for alpha1-3 galactosyltransferase express low levels of the gal antigen / A. Sharma, B. Naziruddin, C. Cui [et al.] // *Transplantation.* – 2003. – Vol. 75 (4). – P. 430-436.

УДК: 616-001.18:611.13:57.082:547.42

ВПЛИВ ГІПОТЕРМІЧНОЇ ІНКУБАЦІЇ АОРТИ НЕОНАТАЛЬНИХ ПОРОСЯТ В КОНСЕРВУЮЧИХ РОЗЧИНАХ НА ПРИСУТНІСТЬ ГОЛОВНОГО КСЕНОГЕННОГО ЕПІТОПА GAL- α -1,3-GAL

Алабедалькарім Н. М., Богуславський К. І., Коваленко І. Ф., Легач Є. І., Божок Г. А.

Резюме. Головний ксеноантиген Gal- α -1,3-Gal (епітоп α -Gal) – галактозний залишок, приєднаний до молекул гліколіпідів і глікопротеїнів на мембранах клітин тварин. Він є основним бар'єром для ксенотрансплантації органів, оскільки його взаємодія з імунною системою людини викликає гіпергостре відторгнення. В роботі вивчено вплив гіпотермічного зберігання (ГЗ) в розчинах НТК, Євро-Коллінз, середовищі DMEM на присутність епітопів α -Gal в тканині аорти неонатальних поросят. За допомогою імуногістохімічного мічення зразків тканини аорти з FITC-кон'югованим ізолектином BSI-B4 показано, що використання низько-калієвих розчинів НТК і DMEM недоцільно для ГЗ аорти, оскільки призводить до часткової деструкції тканини і не впливає на присутність α -Gal епітопів. Високо-калієвий розчин Євро-Коллінз краще підходить для цієї мети, оскільки ГЗ в ньому сприяє зменшенню кількості α -Gal епітопів на клітинах аорти, але не призводить до значних деструктивних змін в структурі тканини на досліджуваному терміні часу. При ГЗ протягом 2 год в розчині Євро-Коллінз спостерігається зменшення забарвлення тканини аорти на 53% в порівнянні з нативними зразками. При подальшій інкубації протягом 7 і 24 год даний показник становить 57 і 69%, відповідно.

Ключові слова: α -Gal епітоп, гіпотермічне зберігання, розчин Євро-Коллінз, розчин НТК, середовище DMEM, ізолектин BSI-B4, неонатальні поросята.

УДК: 616-001.18:611.13:57.082:547.42

ВЛИЯНИЕ ГИПОТЕРМИЧЕСКОЙ ИНКУБАЦИИ АОРТЫ НЕОНАТАЛЬНЫХ ПОРОСЯТ В КОНСЕРВИРУЮЩИХ РАСТВОРАХ НА ПРИСУТСТВИЕ ГЛАВНОГО КСЕНОГЕННОГО ЭПИТОПА GAL- α -1,3-GAL

Алабедалькарим Н. М., Богуславский К. И., Коваленко И. Ф., Легач Е. И., Божок Г. А.

Резюме. Главный ксеноантиген Gal- α -1,3-Gal (эпитоп α -Gal) – галактозный остаток, присоединенный к молекулам гликолипидов и гликопротеинов на мембранах клеток животных. Он является основным барьером для ксенотрансплантации органов, поскольку его взаимодействие с иммунной системой человека вызывает гиперострое отторжение. В работе изучено влияния гипотермического хранения (ГХ) в растворах НТК, Евро-Коллинз, среде DMEM на присутствие эпитопа α -Gal в ткани аорты неонатальных поросят. С помощью иммуногистохимического мечения образцов ткани аорты с FITC-конъюгированным изолектином BSI-B4 показано, что использование низко-калиевых растворов НТК и DMEM нецелесообразно для ГХ аорты, поскольку приводит к частичной деструкции ткани и не влияет на присутствие α -Gal эпитопов. Высоко-калиевый раствор Евро-Коллинз лучше подходит для этой цели, поскольку ГХ в нем способствует уменьшению количества α -Gal эпитопов на клетках аорты, но не приводит к значительным деструктивным изменениям в структуре ткани в исследованный промежуток времени. При ГХ в течение 2 ч в растворе Евро-Коллинз наблюдается уменьшение окрашивания ткани аорты на 53% по сравнению с нативными образцами. При дальнейшей инкубации в течение 7 и 24 ч данный показатель составляет 57 и 69%, соответственно.

Ключевые слова: α -Gal эпитоп, гипотермическое хранение, раствор Евро-Коллинз, раствор НТК, среда DMEM, изолектин BSI-B4, неонатальные поросята.

UDC: 616-001.18:611.13:57.082:547.42

THE INFLUENCE OF HYPOTHERMIC INCUBATION OF NEONATAL PIG AORTA IN THE PRESERVATION SOLUTIONS ON THE PRESENCE OF THE MAIN XENOGENIC EPITOPE GAL- α -1,3-GAL

Alabedalkarim N. M., Boguslavsky K. I., Kovalenko I. F., Legach E. I., Bozhok G. A.

Abstract. The main xenoantigen is a galactose residue Gal- α -1,3-Gal (epitope α -Gal), which is attached to molecules of glycolipids and glycoproteins on the membranes of animal cells. It is the main barrier for organ xenotransplantation, since its interaction with the human immune system causes hyperacute rejection. The influence of hypothermic storage (HS) in solutions of HTK, Euro-Collins, DMEM medium on the presence of α -Gal epitope in aorta tissue of neonatal pigs was studied in the work.

Using immunohistochemical labeling of aorta tissue with FITC-conjugated BSI-B4 isolectin, it has been shown that HS in the low-potassium solutions HTK and DMEM is unsuitable for the aorta, since it leads to partial tissue destruction and does not affect the presence of α -Gal epitopes. The high-potassium solution Euro-Collins is better suited for this purpose, since HS in it leads to reduce the α -Gal epitopes on the aortic cells, but does not lead to significant destructive changes in the tissue structure during period of study. At HS for 2 h in the Euro-Collins solution, the staining of the aortic tissue is reduced by 53% compared to native samples. With further incubation for 7 and 24 h this index is 57 and 69%, respectively. A decrease in the isolectin binding indirectly indicates a decrease in the presence of the α -Gal epitope under these conditions.

Taking into consideration the fact about the reduced presence of the main xenoantigen of the α -Gal epitope in the aortic tissue after HS in the Euro-Collins solution, it seems appropriate to conduct further studies in two directions. First, it is possible to develop protocols for perfusion and short-term storage of organs derived from an α -Gal-deficient transgenic pigs using high-potassium solutions. Secondly, it is necessary to study the physico-chemical basis of this phenomenon. This is important for transplantation practices, in which vascular bioprostheses of porcine origin are widely used, since the issue of possible unmasking of xenoantigens after transplantation remains open.

Keywords: α -Gal epitope, hypothermic storage, Euro-Collins solution, HTK solution, DMEM medium, isolectin BSI-B4, neonatal piglets.

Рецензент – проф. Компанієць А. М.

Стаття надійшла 22.07.2017 року