

УДК 577.152.34

ЭКСПРЕССИЯ ПРОТЕАСОМ В ГЕТЕРОТОПИЧЕСКИХ АЛЛОТРАНСПЛАНТАТАХ ЯИЧНИКОВ КРЫС ВИСТАР И АВГУСТ ПРИ ИНДУКЦИИ ДОНОРСПЕЦИФИЧЕСКОЙ ТОЛЕРАНТНОСТИ

© 2019 г. Т. М. Астахова^а, Г. А. Божок^б, Н. М. Алабедаькарим^б, Я. Д. Карпова^а, Ю. В. Люпина^а, Е. М. Ушакова^а, Е. И. Легач^б, Т. П. Бондаренко^б, Н. П. Шарова^а. *

^аФГБУН Институт биологии развития им. Н.К. Кольцова РАН, ул. Вавилова, 26, Москва, 119334 Россия

^бИнститут проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины ул. Переяславская, 23, Харьков, 61016 Украина

*e-mail: npsharova@bk.ru

Поступила в редакцию 18.03.2019 г.

После доработки 26.04.2019 г.

Принята к публикации 08.05.2019 г.

Цель настоящей работы – исследовать динамику приживления ткани яичников крыс инбредной линии Август, трансплантированной аутобредным крысам Вистар, и наоборот, на фоне индукции донорспецифической толерантности, и выявить особенности пулов протеасом в прижившихся трансплантатах и ткани, замещающей отторгнутые трансплантаты, у животных обеих групп. К 14 сут после трансплантации у исследуемых реципиентов выявлена незначительная разница в приживлении трансплантатов: 87% у крыс Вистар и 80% у крыс Август. В то же время, на 37 сут аллотрансплантаты ткани яичников с хорошо сохранившейся структурой и значительной васкуляризацией составляют 76% у крыс Вистар и лишь 29% у крыс Август. Выявленная в отдаленный период разница связана, по-видимому, с особым состоянием центральной нервной системы крыс Август, обусловленным повышенным содержанием моноаминов и белка теплового шока 70. Общий уровень протеасом на 37 сут был одинаков как в интактной донорской ткани, так и прижившихся трансплантатах, а также в ткани, замещающей отторгнутые трансплантаты, и не зависел от донор-реципиентных различий. Однако в прижившихся трансплантатах и замещающей ткани обнаружена повышенная экспрессия иммунных протеасом по сравнению с интактной донорской тканью. При этом прижившиеся трансплантаты были обогащены протеасомами с иммунной субъединицей LMP2, а ткань, замещающая отторгнутые трансплантаты, протеасомами с иммунной субъединицей LMP7 в равной степени у крыс Август и Вистар. Кроме того, прижившиеся трансплантаты у обеих групп животных характеризовались одинаково высокой экспрессией активатора PA28 $\alpha\beta$ протеасом по сравнению с замещающей и интактной донорской тканями. Таким образом, протеасомы трансплантатов, содержащие иммунную субъединицу LMP2, и, вероятно, связанные с активатором PA28 $\alpha\beta$, служат одним из ключевых факторов, обеспечивающих приживление независимо от генетически обусловленных особенностей реципиентов.

Ключевые слова: иммунные протеасомы, активаторы протеасом, гетеротопические аллотрансплантаты яичников, донорспецифическая толерантность, крысы Вистар, крысы Август

DOI: 10.1134/S0475145019050021

ВВЕДЕНИЕ

Трансплантация ткани яичников рассматривается как один из возможных способов восстановления гормонального и репродуктивного статуса у женщин, подвергшихся противоопухолевой терапии (Bedaiwy et al., 2008). Современные клинические протоколы аллогенной трансплантации и новейшие иммуносупрессорные препараты позволяют продлить срок жизни трансплантата, однако не предотвращают полностью индукцию иммунных процессов в организме реципиента, направленных на отторжение (Gourishankar et al., 2010). Кроме того, потенциально

опасные побочные эффекты долговременной иммуносупрессии снижают качество жизни пациентов. В связи с этим проблема развития донорспецифической толерантности (ДСТ), позволяющей организму реципиента “принимать” пересаженные органы или ткани при сохранении компетентности иммунной системы, остается ключевой. В настоящее время разрабатывается стратегия индукции ДСТ трансфузией клеток донора с последующей (или одновременной) пересадкой органа от того же донора (Brennan et al., 1995; Божок и др., 2009; Leventhal et al., 2013). Вместе с тем, механизм развития ДСТ во многом остается

неясным, что определяет актуальность исследований в данном направлении.

Ранее нами было показано, что индукция ДСТ у крыс линии Август путем введения в воротную вену клеток селезенки доноров-крыс Вистар увеличивает жизнеспособность аллотрансплантатов ткани яичников и активирует экспрессию иммунных протеасом с субъединицей LMP2 в печени и ткани яичников к 30 сут после трансплантации (Карпова и др., 2012). Кроме того, было показано влияние генетически детерминированных донор-реципиентных различий на экспрессию иммунных протеасом в клетках печени крыс-реципиентов и выявлено два важных факта. Во-первых, как у крыс Вистар, так и у крыс Август приживление гетеротопических аллотрансплантатов ткани яичников связано с увеличением числа моноклеарных клеток печени, экспрессирующих иммунные протеасомы с субъединицей LMP2, но не LMP7. Во-вторых, у реципиентов-крыс Вистар эта разница была более выражена, чем у реципиентов-крыс Август (Карпова и др., 2018), что можно объяснить повышенным содержанием моноаминов и белка теплового шока 70 в головном мозге крыс Август (Erokhov et al., 2017). Поскольку клетки печени обеспечивают развитие толерантности к чужеродным антигенам (Карпова и др., 2017), неслучайно влияние различных факторов на этот процесс. Вместе с тем, остается неясным, существует ли зависимость экспрессии иммунных протеасом в аллотрансплантате от комбинаций пар “донор-реципиент” или не существует. В связи с различным влиянием активаторов протеасом на образование паттерна эпителиальных клеток аллоантигенов важно также иметь информацию об их экспрессии в аллотрансплантатах у разных пар “донор-реципиент”.

Цель настоящей работы – исследовать динамику приживления ткани яичников крыс инбредной линии Август, трансплантированной аутобредным крысам Вистар, и наоборот, на фоне индукции донорспецифической толерантности, и выявить особенности пулов протеасом в прижившихся трансплантатах и ткани, замещающей отторгнутые трансплантаты, у животных обеих групп.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Животные. Эксперименты проводили на 5–6-месячных самках крыс инбредной линии Август и аутобредных крыс Вистар в соответствии с положениями Комиссии по биоэтике ФГБУН Института биологии развития им. Н.К. Кольцова РАН. Животных группировали в разных комбинациях пар “донор-реципиент”: 1 группа – крысы Август доноры, крысы Вистар реципиенты ($n = 25$);

2 группа – крысы Вистар доноры, крысы Август реципиенты ($n = 30$).

Индукция ДСТ и трансплантация. ДСТ индуцировали путем введения клеток селезенки донорского происхождения в воротную вену печени крысам реципиентам, как описано ранее (Карпова и др., 2012). Яичники от неонатальных крыс трансплантировали реципиентам через 7 сут после индукции ДСТ под капсулу почки в соответствии с опубликованным протоколом (Карпова и др., 2012) за исключением того, что реципиентам не проводили овариэктомию с целью сохранения физиологического уровня репродуктивных гормонов и их воздействия на трансплантат.

Оценка приживления трансплантатов. Ткань яичников исследовали на 7, 14, 30 и 37 сут после трансплантации (по 5 животных для каждой точки). Почки с аллотрансплантатами фиксировали в 4% параформальдегиде. Для морфологической диагностики отторжения/приживления из ткани трансплантатов, собранной на разных сроках после операции, готовили криостатные срезы и окрашивали гематоксилином и эозином по стандартной методике. Площадь сохранившейся ткани яичника оценивали в 7–8 серийных срезах трансплантатов, полученных от каждого животного, с помощью программы AxioVision Rel. 4.8. Результат нормировали на общую площадь трансплантата и выражали в процентах.

Антитела. Для иммуногистохимии и Вестерн-блоттинга использовали моноклональные антитела мыши к субъединицам $\alpha 1, 2, 3, 5, 6, 7$ протеасом, иммунным субъединицам LMP2 и LMP7 протеасом, субъединице Rpt6 активатора PA700 протеасом, поликлональные антитела кролика к субъединице PA28 α активатора PA28 $\alpha\beta$ протеасом (Enzo Life Sciences, США), моноклональные антитела мыши к β актину (Santa Cruz Biotechnology, США), антитела осли к IgG мыши, меченные Alexa 594 (Invitrogen, США), антитела козы к IgG мыши и кролика, конъюгированные с пероксидазой (Amersham Biosciences, Великобритания).

Имуногистохимия. Криостатные срезы интактной ткани яичников доноров, прижившихся аллотрансплантатов яичников и ткани, замещающей трансплантат при его отторжении, обрабатывали первыми антителами мыши к субъединицам LMP2 и LMP7 (1 : 500) и вторыми антителами к IgG мыши, мечеными Alexa 594 (1 : 700), в соответствии с процедурой, описанной ранее (Erokhov et al., 2017). Иммунофлуоресценцию исследовали с помощью конфокального лазерного микроскопа Carl Zeiss Axio Observer Z1 (Германия). Для обработки изображения использовали программу LSM Image Examiner (Carl Zeiss, Германия).

Вестерн-блоттинг. Осветленные гомогенаты тканей получали в соответствии с опубликован-

ным протоколом (Карпова и др., 2012). После электрофореза осветленных гомогенатов в 13%-ном ПААГ в присутствии SDS (5 мкл на дорожку) полипептиды переносили с помощью мокрого блоттинга на нитроцеллюлозную мембрану. Обработку мембраны антителами к β актину (1 : 1000), субъединицам протеасом (1 : 1000) и активаторов протеасом (1 : 1500) осуществляли стандартным методом (Erokhov et al., 2017). Оптическую плотность полос на рентгеновской пленке анализировали с помощью стандартной программы ImageJ.

Статистический анализ. Статистическую обработку данных проводили с помощью программ Excel и Statistica 7.0. Значимость различий между выборками оценивали с помощью непараметрического критерия Манна–Уитни. Приживление трансплантатов анализировали с помощью метода Каплана–Майера, сравнение кривых приживания производили с использованием логарифмического рангового критерия.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Приживление аллотрансплантатов яичников. Незначительная разница в приживлении аллотрансплантатов яичников при их гетеротопической пересадке под капсулу почки крысам Вистар и Август на фоне индукции ДСТ выявлена на 14 сут после операции (рис. 1а). Эта разница увеличилась к 30 сут, а на 37 сут доля аллотрансплантатов ткани яичников с хорошо сохранившейся структурой и значительной васкуляризацией у крыс Вистар в 2.6 раз превышала таковую у крыс Август. Обнаруженный факт, очевидно, связан с особым состоянием центральной нервной системы крыс Август, обусловленным повышенным содержанием моноаминов и белка теплового шока 70 (Erokhov et al., 2017). Следует отметить, что при гетеротопической пересадке ткани яичников под капсулу почки в отсутствие индукции ДСТ происходит ее отторжение и полное замещение соединительной тканью вследствие развития иммунного ответа на 22–25 сут после операции у 100% реципиентов (Божок и др., 2009).

Прижившиеся трансплантаты на фоне индукции ДСТ у обеих групп реципиентов на 37 сут содержали фолликулы различных стадий зрелости, а также небольшие очаги лимфоцитарно-макрофагальной инфильтрации и незначительные участки формирования соединительной ткани (рис. 1б). Образцы ткани, замещающей отторгнутые трансплантаты яичников у животных обеих групп, представляли собой преимущественно рыхлую волокнистую соединительную ткань (рис. 1в). Фолликулы в этих образцах не обнаруживались, однако выявлялись обширные зоны лимфоцитарно-макрофагальной инфильтрации в

толще ткани и на границе с паренхимой почки. В дальнейших экспериментах использовали собранные на 37 сут образцы трансплантатов с целью выявления возможных различий в протеасомных механизмах, обеспечивающих приживание или отторжение ткани яичников у крыс Вистар и Август.

Экспрессия иммунных протеасом в трансплантатах. Общий уровень протеасом оценивали Вестерн-блоттингом по экспрессии субъединиц α 1,2,3,5,6,7, входящих в состав всех форм протеасом. К 37 сут после трансплантации общий уровень протеасом был одинаков в интактной донорской ткани яичников, прижившихся трансплантатах и ткани, замещающей отторгнутые трансплантаты, и не зависел от донор-реципиентных различий (рис. 2а). Однако картина экспрессии иммунных протеасом в этих тканях была иной. Отметим низкий базовый уровень иммунных протеасом в интактной донорской ткани яичников. Это касается как субтипов, содержащих иммунную субъединицу LMP7, так и субтипов, содержащих иммунную субъединицу LMP2 (рис. 2а), а, следовательно, и субтипов с иммунной субъединицей LMP10 (MECL-1), встраивающейся во вновь образующиеся протеасомы, главным образом, в связке с субъединицей LMP2 (Groettrup et al., 1997). Низкое содержание иммунных протеасом в железистой ткани объяснимо, так как в норме ее функции не связаны с развитием иммунных реакций. Вместе с тем, в прижившихся трансплантатах и замещающей ткани обнаружена увеличенная экспрессия иммунных протеасом по сравнению с интактной донорской тканью яичников (рис. 2а, 2б). При этом прижившиеся трансплантаты были обогащены протеасомами с иммунной субъединицей LMP2, а замещающая ткань – протеасомами с иммунной субъединицей LMP7 в равной степени у крыс Август и Вистар.

С помощью иммунофлуоресцентного анализа в прижившемся трансплантате у крыс Август и Вистар обнаружены протеасомы с иммунной субъединицей LMP2 в фолликулах и клетках стромы ткани яичников, а также в единичных клетках, локализующихся возле сосудов и, возможно, представляющих собой макрофаги (рис. 3а). При этом протеасомы с субъединицей LMP7 выявлялись по всей площади трансплантата гораздо слабее (рис. 3б). В замещающей ткани у крыс обеих групп обнаружены обширные очаги лимфоцитарно-макрофагальной инфильтрации, обогащенные иммунными протеасомами с субъединицей LMP7. Менее выраженная экспрессия протеасом с субъединицей LMP2 обнаружена также в очагах инфильтрации в ткани, замещающей отторгнутые трансплантаты, у крыс Август и Вистар. Данные представлены для реципиентов-

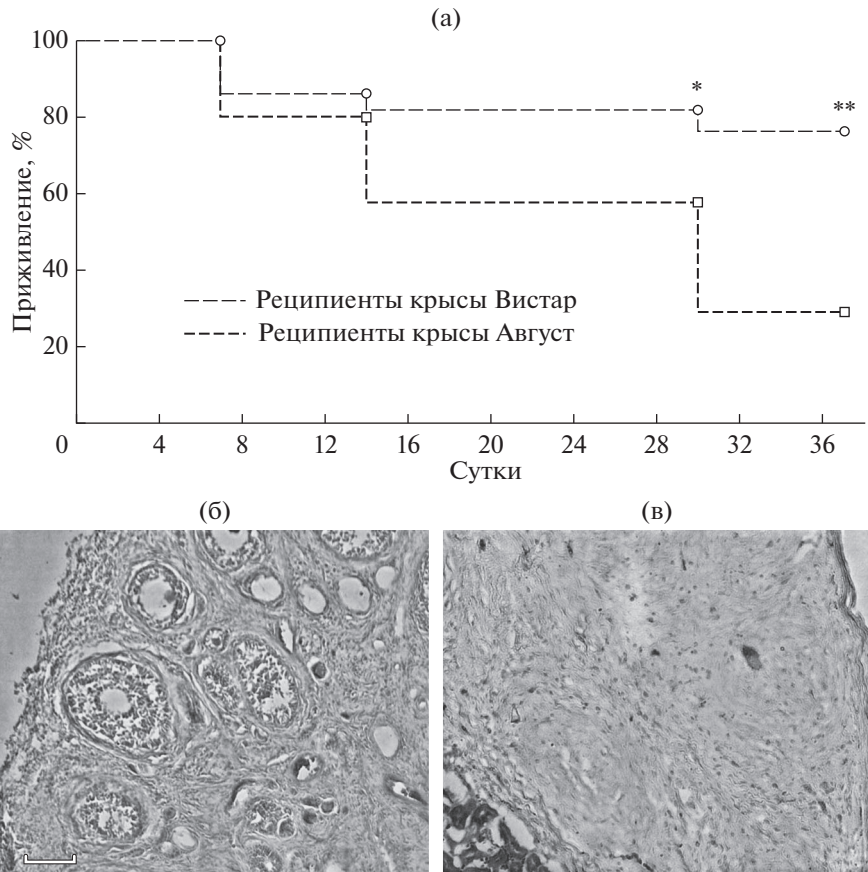


Рис. 1. Приживление гетеротопических аллотрансплантатов яичников у крыс Вистар и Август после индукции донор-специфической толерантности (а). Кривые приживления представлены для двух комбинаций пар “донор-реципиент”. Отличие от приживления трансплантата в тот же период у крыс Август при * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$. Гистологические препараты аллотрансплантата яичника (б) и ткани, замещающей отторгнутый трансплантат (в), на 37 сут после трансплантации крысам Вистар. Шкала, 50 мкм.

крыс Вистар (рис. 3в, 3г). В интактной ткани яичников доноров иммунная субъединица LMP2 практически не выявлялась (рис. 3д). Вместе с тем, в мозговом слое присутствовали единичные клетки, экспрессирующие протеасомы с иммунной субъединицей LMP7 (рис. 3е). Они расположены, в основном, в строме яичника рядом с кровеносными сосудами. В кортикальном слое яичников LMP7-позитивные клетки практически отсутствовали. Экспрессия протеасом с субъединицей LMP7 в строме интактной ткани яичников, связана, вероятнее всего, с тканевыми макрофагами, которые осуществляют регуляторную связь между иммунной и репродуктивной системами, а также участвуют в процессах ремоделирования ткани в фазах созревания фолликула, овуляции и образования желтого тела (Wu et al., 2004). В целом, результаты, полученные с помощью метода иммуногистохимии, совпадают с результатами Вестерн-блоттинга по интенсивности экспрессии иммунных субъединиц протеасом.

Инфильтрация клеток иммунной системы, обогащенных иммунными протеасомами, в ткань трансплантата при его отторжении объясняется классическим протеканием иммунных процессов, направленных на уничтожение чужеродных клеток (Sharova, 2006; Morozov, Karpov, 2018). Ведущая роль в этом процессе, очевидно, принадлежит субтипу протеасом с иммунной субъединицей LMP7, которая важна не только для образования антигенных эпитопов, но и для контроля пролиферации Т-лимфоцитов (Caudill et al., 2006).

Однако высокая экспрессия протеасом с иммунной субъединицей LMP2, присущая клеткам прижившейся ткани яичников, не может быть связана с образованием антигенных эпитопов для представления клеток-мишеней цитотоксическим Т-лимфоцитам. В данном случае функции субтипа протеасом с субъединицей LMP2 не соответствуют сложившимся представлениям об иммунных протеасомах как участниках иммунных процессов против чужеродной ткани. Напротив, этот субтип

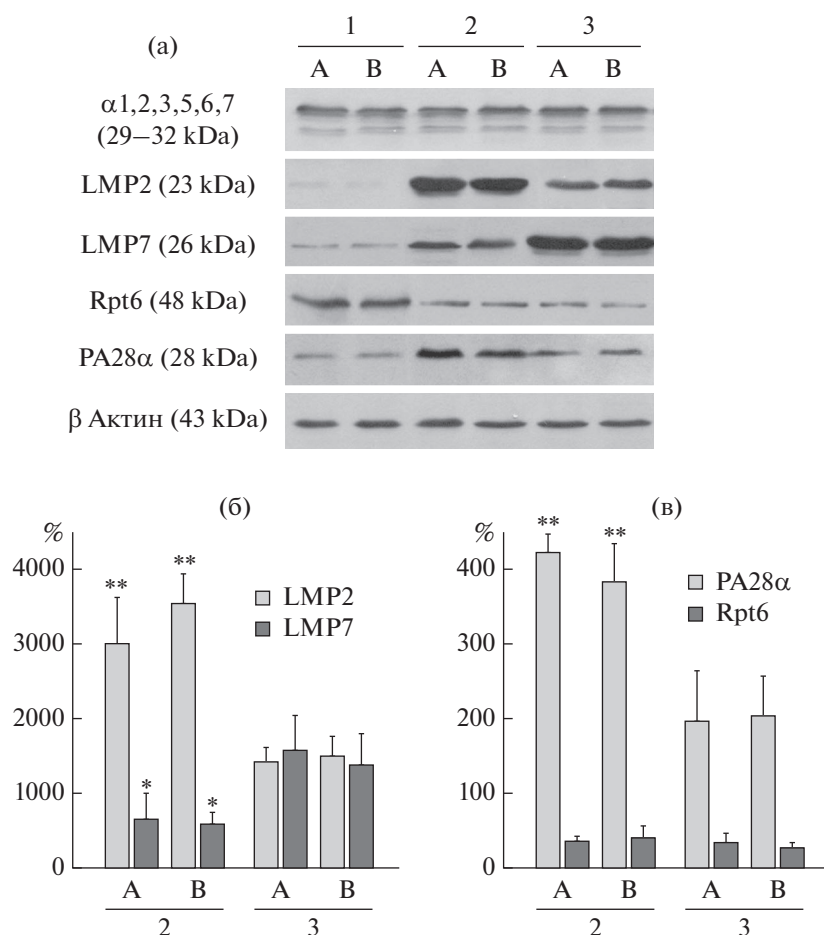


Рис. 2. Содержание субъединиц протеасом в интактной донорской ткани яичников (1), прижившихся гетеротопических аллотрансплантатах яичников (2) и ткани, замещающей отторгнутые трансплантаты, на 37-е сут после трансплантации (3). (а) – крысы Август реципиенты, (в) – крысы Вистар реципиенты. (а) Вестерн блоты с использованием соответствующих антител, (б, в) – относительное содержание субъединиц протеасом в прижившихся аллотрансплантатах и замещающей ткани по отношению к интактной донорской ткани яичников. Данные нормализованы на содержание β актина и представлены как среднее ± стандартное отклонение. Отличие от соответствующего значения у крыс с отторгнутыми трансплантатами при * $p < 0.01$ и ** $p < 0.005$.

иммунных протеасом, по-видимому, образует пептиды, функции которых направлены на поддержание жизнеспособности фолликулов чужеродных яичников. Активация экспрессии субъединицы LMP2, возможно, осуществляется под действием комплекса сигналов от макрофагов печени, где при индукции ДСТ происходит “первая встреча” чужеродных антигенов донора с организмом реципиента.

Экспрессия активаторов протеасом в трансплантатах. В донорской интактной ткани яичников крыс Август и Вистар выявлены субъединицы Rpt6 и PA28α, входящие в состав активаторов PA700 и PA28αβ протеасом соответственно (рис. 2а). В прижившихся трансплантатах яичников и ткани, замещающей отторгнутые трансплантаты, у крыс обеих групп экспрессия субъединицы Rpt6, а, следовательно, активатора PA700 была снижена, в то

время как экспрессия субъединицы PA28α и, следовательно, активатора PA28αβ была значительно повышена по сравнению с донорской тканью (рис. 2а, 2в). Прижившиеся трансплантаты у крыс Август и Вистар отличались самым высоким содержанием активатора PA28αβ.

Очевидно, рутинное расщепление убиквитинированных белков комплексом конститутивных протеасом и активатора PA700, свойственное интактной ткани яичников, отступает на второстепенный план в активном процессе ее приживления. Главная роль в этом процессе, по-видимому, принадлежит биологически активным пептидам, образующимся иммунными протеасомами с субъединицей LMP2 в связке с активатором PA28αβ. В пользу данного предположения служит факт преимущественного “нарезания” пептидов малой длины (менее 8 аминокислотных остатков) под

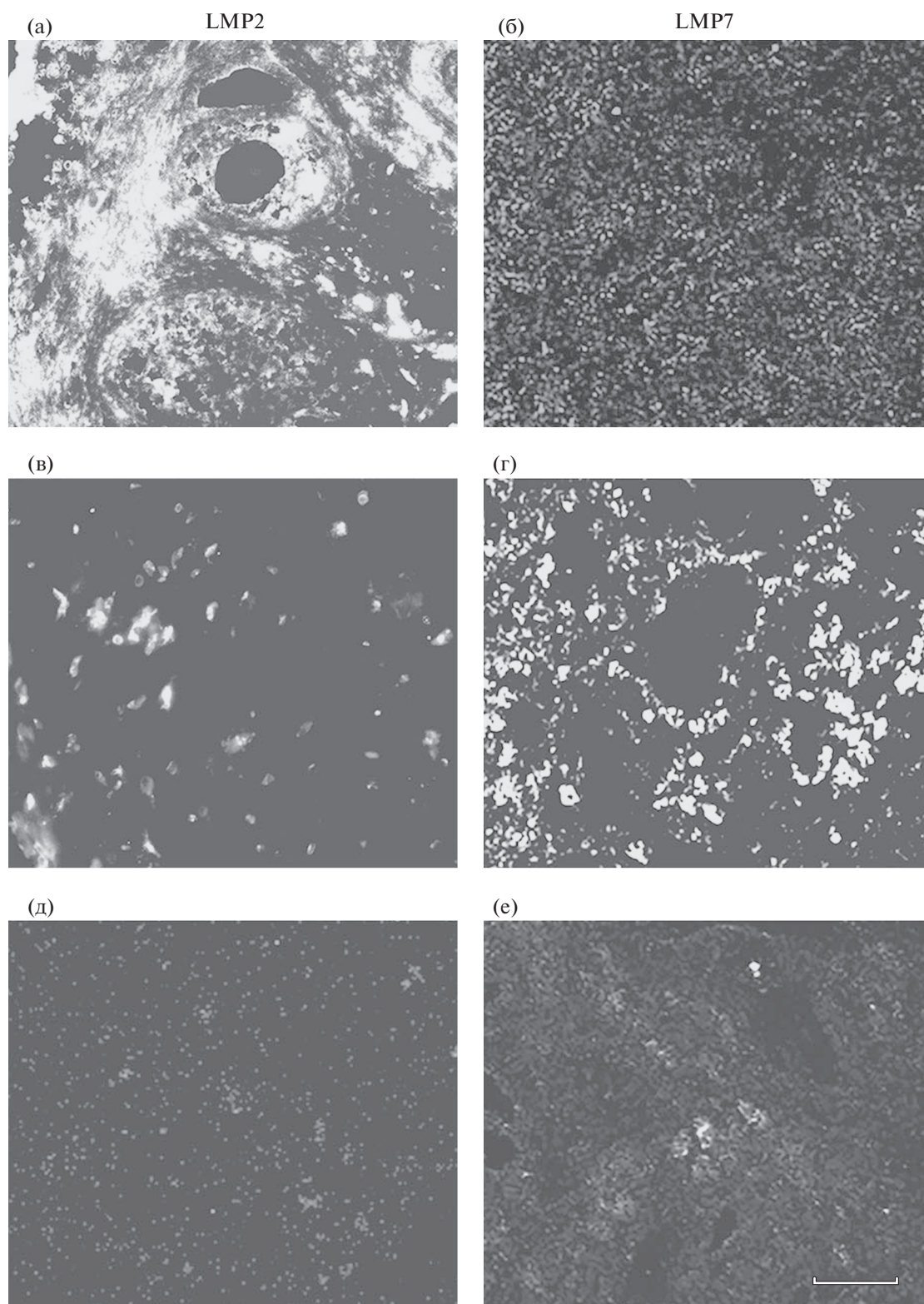


Рис. 3. Иммунофлуоресцентное мечение клеток на срезах прижившихся гетеротопических аллотрансплантатов яичников (а, б), ткани, замещающей отторгнутые трансплантаты (в, г), и intactной донорской ткани яичников (д, е) антителами к субъединицам LMP2 (а, в, д) и LMP7 (б, г, е). Шкала, 50 мкм. Доноры – крысы Август, реципиенты – крысы Вистар.

действием активатора PA28 $\alpha\beta$ по сравнению с активатором PA700 (Cascio, 2014). Функция образующихся в трансплантате пептидов может быть связана с их участием в межклеточных взаимодействиях, обеспечивающих приживание.

Ранее нами опубликованы результаты, указывающие на участие субтипа иммунных протеасом LMP2–PA28 $\alpha\beta$ в адаптации головного мозга крыс Август к повышенному содержанию моноаминов (Erokhov et al., 2017). Нельзя исключить наличие универсальной функции у данного субтипа протеасом в различных адаптивных процессах, включая адаптацию аллотрансплантатов к организму реципиента.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В настоящей работе впервые проанализированы пулы протеасом прижившихся аллотрансплантатов яичников и ткани, замещающей отторгнутые трансплантаты, на фоне индукции ДСТ в зависимости от генетически детерминированных различий в организации адаптационных реакций организма крыс-реципиентов. Протеасомы аллотрансплантатов яичников, содержащие иммунную субъединицу LMP2, и, вероятно, связанные с активатором PA28 $\alpha\beta$, служат одним из ключевых факторов, которые обеспечивают их приживание независимо от этих особенностей реципиентов.

Полученные в настоящей работе результаты вносят вклад в понимание молекулярных механизмов развития толерантности у животных с различной генетической основой и указывают на новую функцию иммунных протеасом с субъединицей LMP2 в процессе, направленном на приживание чужеродной ткани, а не на ее уничтожение.

Работа выполнена в рамках Государственного задания (№ 0108-2019-0002) и проекта РФФИ (№ 16-34-60083 мол_а_дк).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Божок Г.А., Киروشка В.В., Тищенко Ю.О., Легач Е.И.* Предтрансплантационное введение донорских лимфоцитов пролонгирует выживаемость аллогенной ткани яичников у овариэктомированных животных-реципиентов // Проблемы эндокринной патологии. 2009. № 4. С. 79–84.
- Карпова Я.Д., Божок Г.А., Алабедалькарим Н.М., Люпина Ю.В., Астахова Т.М., Легач Е.И., Шарова Н.П.* Протеасомы и трансплантология: современное состояние проблемы и поиск перспективных направлений // Известия РАН. Сер. биол. 2017. № 3. С. 218–227.
- Карпова Я.Д., Божок Г.А., Люпина Ю.В., Легач Е.И., Астахова Т.М., Степанова А.А., Бондаренко Т.П., Шарова Н.П.* Изменение функции протеасом после индукции донор-специфической толерантности у крыс при аллотрансплантации ткани яичника // Известия РАН. Сер. биол. 2012. № 3. С. 296–302.
- Карпова Я.Д., Люпина Ю.В., Алабедалькарим Н.М., Легач Е.И., Божок Г.А., Шарова Н.П.* Изменение содержания мононуклеарных клеток печени, экспрессирующих иммунные протеасомы, при трансплантации ткани яичников в зависимости от донор-реципиентных различий у крыс // Бюлл. эксп. биол. мед. 2018. Т. 165. № 6. С. 732–736.
- Bedaiwy M.A., El-Nashar S.A., El-Saman A.M., Evers J.L., Sandadi S., Desai N., Falcone T.* Reproductive outcome after transplantation of ovarian tissue: A systematic review // Hum. Reprod. 2008. V. 23. № 12. P. 2709–2717.
- Brennan D.C., Mohanakumar T., Flye M.W.* Donor-specific transfusion and donor bone marrow infusion in renal transplantation tolerance: a review of efficacy and mechanisms // Am. J. Kidney Dis. 1995. V. 26. № 5. P. 701–715.
- Cascio P.* PA28 $\alpha\beta$: The enigmatic magic ring of the proteasome? // Biomolecules. 2014. V. 4. P. 566–584.
- Caudill C., Jayarapu K., Elenich L., Monaco J., Colbert R., Griffin T.* T cells lacking immunoproteasome subunits MECL-1 and LMP7 hyperproliferate in response to polyclonal mitogens // J. Immunol. 2006. V. 176. P. 4075–4082.
- Erokhov P.A., Lyupina Yu.V., Radchenko A.S., Kolacheva A.A., Nikishina Yu.O., Sharova N.P.* Detection of active proteasome structures in brain extracts: Proteasome features of August rat brain with violations in monoamine metabolism // Oncotarget. 2017. V. 8. P. 70941–70957.
- Gourishankar S., Leduc R., Connett J., Cecka J.M., Cosio F., Fieberg A., Gaston R., Halloran P., Hunsicker L., Kasiske B., Rush D., Grande J., Mannon R., Matas A.* Pathological and clinical characterization of the “troubled transplant”: data from the DeKAF study // Am. J. Transplant. 2010. V. 10. № 2. P. 324–330.
- Groettrup M., Standera S., Stohwasser R., Kloetzel P.-M.* The subunits MECL-1 and LMP2 are mutually required for incorporation into the 20S proteasome // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1997. V. 94. P. 8970–8975.
- Leventhal J., Abecassis M., Miller J., Gallon L., Tollerud D., Elliott M.J., Bozulic L.D., Houston C., Sustento-Reodica N., Ildstad S.T.* Tolerance induction in HLA disparate living donor kidney transplantation by donor stem cell infusion: durable chimerism predicts outcome // Transplantation. 2013. V. 95. № 1. P. 169–176.
- Morozov A.V., Karpov V.L.* Biological consequences of structural and functional proteasome diversity // Heliyon. 2018. V. 4. № 10. e00894.
- Sharova N.P.* Immune proteasomes and immunity // Russian Journal of Developmental Biology. 2006. V. 37. № 3. P. 139–145.
- Wu R., Van der Hoek K.H., Ryan N.K., Norman R.J., Robker R.L.* Macrophage contributions to ovarian function // Hum. Reprod. Update. 2004. V. 10. № 2. P. 119–133.

Proteasome Expression in Ovarian Heterotopic Allografts of Wistar and August Rats under Induction of Donor Specific Tolerance

T. M. Astakhova¹, G. A. Bozhok², N. M. Alabedal'karim², Ya. D. Karpova¹, Yu. V. Lyupina¹,
E. M. Ushakova¹, E. I. Legach², T. P. Bondarenko², and N. P. Sharova^{1,*}

¹*Koltzov Institute of Developmental Biology, Russian Academy of Sciences, ul. Vavilova 26, Moscow, 119334 Russia*

²*Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine, National Academy of Sciences of Ukraine,
ul. Pereyaslavskaya 23, Kharkov, 61015 Ukraine*

**e-mail: npsharova@bk.ru*

Received March 18, 2019; revised April 26, 2019; accepted May 8, 2019

The aim of this work is to investigate the dynamics of the engraftment of the ovarian tissue of inbred August rats, transplanted to outbred Wistar rats, and vice versa, on the background of the induction of donor specific tolerance, and to identify the features of proteasome pools in the survived grafts and tissue, replacing the rejected grafts, in animals of both groups. By day 14 after transplantation, a slight difference in graft engraftment was revealed in studied recipients: 87% in Wistar rats and 80% in August rats. At the same time, on day 37 ovarian tissue allografts with well-preserved structure and significant vascularization represented 76% in Wistar rats and only 29% in August rats. The difference revealed in the remote period is connected, apparently, with the special condition of the central nervous system of August rats, caused by the increased content of monoamines and heat shock protein 70. The total proteasome level on day 37 was the same both in intact donor tissue and in the survived grafts, as well as in the tissue replacing the rejected grafts, and did not depend on the donor-recipient differences. However, the increased expression of immune proteasomes was found in the survived tissue and tissue replacing the rejected grafts compared to intact donor tissue. The survived grafts were enriched with proteasomes with immune subunit LMP2, and the tissue replacing the rejected grafts was enriched with proteasomes with immune subunit LMP7 equally in August and Wistar rats. In addition, the survived grafts in both groups of animals were characterized by equally high expression of proteasome activator PA28 $\alpha\beta$ compared to the replacing and intact donor tissues. Thus, transplant proteasomes containing immune subunits LMP2, and probably associated with the activator PA28 $\alpha\beta$, serve as one of the key factors for engraftment, regardless of the genetically determined differences of the recipients.

Keywords: immune proteasomes, proteasome activators, ovarian heterotopic allografts, donorspecific tolerance, Wistar rats, August rats