

НАЦИОНАЛЬНАЯ АКАДЕМИЯ НАУК УКРАИНЫ
ИНСТИТУТ ПРОБЛЕМ КРИОБИОЛОГИИ И КРИОМЕДИЦИНЫ

На правах рукописи

БОЖОК ГАЛИНА АНАТОЛЬЕВНА

УДК 57.043:616.43/44-089.843

**КРИОКОНСЕРВИРОВАНИЕ И ИНДУКЦИЯ ТОЛЕРАНТНОСТИ КАК
ФАКТОРЫ ВЛИЯНИЯ НА СТРУКТУРНО-ФУНКЦИОНАЛЬНУЮ
СОХРАННОСТЬ ЭНДОКРИННЫХ ТКАНЕЙ В УСЛОВИЯХ
ТРАНСПЛАНТАЦИИ**

03.00.19 – криобиология

ДИССЕРТАЦИЯ

на соискание ученой степени
доктора биологических наук

Научный консультант:

д.б.н., проф. Бондаренко Т.П.

Харьков 2013

СОДЕРЖАНИЕ

ПЕРЕЧЕНЬ УСЛОВНЫХ СОКРАЩЕНИЙ	6
ВВЕДЕНИЕ	8
РАЗДЕЛ I ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ	21
1.1. Криоконсервирование и трансплантация ткани эндокринных желез	21
1.1.1. Трансплантация криоконсервированной ткани щитовидной железы	23
1.1.2. Трансплантация криоконсервированной эндокринной ткани/клеток половых желез	28
1.1.3. Трансплантация криоконсервированной ткани/клеток надпочечников	33
1.1.4. Трансплантация криоконсервированной ткани других эндокринных желез	34
1.2. Трансплантационный иммунитет	38
1.2.1. Основные типы иммунной реакции на трансплантат	38
1.2.2. Особенности иммунного ответа на тканевые трансплантаты аллогенного и ксеногенного происхождения	40
1.3. Способы иммуномодуляции тканевого трансплантата	45
1.3.1. Культивирование ткани	45
1.3.2. Криоконсервирование ткани	46
1.3.3. Другие способы иммуномодуляции	48
1.4. Основы иммунологической толерантности к трансплантату	51
1.4.1. Основные механизмы иммунологической толерантности	51
1.4.2. Предтрансплантационная донор-специфическая трансфузия как стратегия индукции толерантности к аллогraftу	53
1.4.3. Иммунная толерантность печени	55
1.4.4. Введение донорских клеток в портальную вену как способ индукции толерантности	60
1.4.5. Реакция «трансплантат-против-хозяина» при индукции донор-специфической толерантности	66
1.5. Роль протеасом в молекулярных механизмах презентации антигена	68

1.5.1. Основные механизмы процессинга антигена	68
1.5.2. Роль протеасом в реализации механизмов презентации антигена и индукции портальной толерантности	71
РАЗДЕЛ II МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ	76
2.1. Животные	76
2.2. Органотипическое культивирование эндокринных желез	76
2.3. Криоконсервирование фрагментов и органотипических культур эндокринных желез	77
2.4. Рекультивирование фрагментов и органотипических культур эндокринных желез	77
2.5. Получение суспензии клеток эндокринных желез	78
2.6. Получение суспензии спленоцитов	78
2.7. Криоконсервирование суспензии спленоцитов	78
2.8. Получение моноклеарных клеток печени	79
2.9. Оценка жизнеспособности клеток	79
2.10. Хирургические модели гормональной недостаточности	79
2.11 Трансплантация под капсулу почки	80
2.12. Интрапортальная трансплантация	80
2.13. Ингибирование функции макрофагов печени	81
2.14. Измерение уровня гормонов эндокринных желез	81
2.15. Измерение уровня некоторых биохимических показателей в крови и гомогенатах	82
2.16. Определение адгезирующей способности перитонеальных макрофагов и количества розеткообразующих клеток	82
2.17. Проточная цитофлуориметрия	82
2.18. Гистологическое исследование трансплантантов	83
2.19. Иммуногистохимическое исследование ткани и трансплантантов	84
2.20. Получение осветленных гомогенатов органов и вестерн-блоттинг	85
2.21. Общий дизайн исследования	88
2.22. Статистическая обработка результатов	91

РАЗДЕЛ III РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ	92
3.1. Выживаемость свежевыделенных трансплантатов ткани эндокринных желез	92
3.1.1. Выживаемость трансплантатов свежевыделенной ткани щитовидной железы	95
3.1.2. Выживаемость трансплантатов свежевыделенной ткани семенников	103
3.1.3. Выживаемость трансплантатов свежевыделенной ткани надпочечников	109
3.2. Влияние криоконсервирования на количество и фенотипический состав антиген-представляющих клеток надпочечных желез	125
3.3. Влияние криоконсервирования и органотипического культивирования на выживаемость трансплантатов ткани эндокринных желез	148
3.3.1. Влияние органотипического культивирования на выживаемость трансплантатов ткани эндокринных желез	149
3.3.2. Влияние криоконсервирования на выживаемость трансплантатов ткани эндокринных желез	158
3.4. Влияние донор-специфической трансфузии спленоцитов на выживаемость трансплантатов ткани эндокринных желез	180
3.4.1. Влияние донор-специфической трансфузии спленоцитов на выживаемость трансплантатов овариальной ткани	182
3.4.2. Влияние донор-специфической трансфузии спленоцитов на выживаемость трансплантатов ткани семенников	188
3.4.3. Влияние донор-специфической трансфузии спленоцитов на выживаемость трансплантатов ткани надпочечников	196
3.4.4. Влияние донор-специфической трансфузии спленоцитов на выживаемость трансплантатов ткани щитовидной железы	199
3.5. Влияние криоконсервирования спленоцитов, предназначенных для донор-специфической трансфузии, на выживаемость аллогraftов эндокринных желез	209
3.6. Исследование экспрессии иммунных протеасом и содержания	

CD4 ⁺ CD25 ⁺ Foxp3 ⁺ клеток у реципиентов после индукции донор- специфической толерантности	219
ОБОБЩЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ	242
ВЫВОДЫ	254
СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ	258

ПЕРЕЧЕНЬ УСЛОВНЫХ СОКРАЩЕНИЙ

АКТГ – адренокортикотропный гормон
АПК – антиген-представляющие клетки
А/т – аллотрансплантация
БСА – бычий сывороточный альбумин
в/б – внутрибрюшинно
в/в – внутривенно
ГКГ – главный комплекс гистосовместимости
ДК – дендритные клетки
ДМСО – диметилсульфоксид
ДПЖ – добавочные половые железы
ДСТ – донор-специфическая толерантность
ДСТф – донор-специфическая трансфузия
ЗГТ – заместительная гормональная терапия
и/п – интрапортально
КК – клетки Купфера
НЖ – надпочечные железы
НК – натуральные киллеры
НКТ – натуральные киллерные Т-клетки
ОК – органотипическая культура
ПМ – перитонеальный макрофаг
ПЭО – полиэтиленоксид
РТПХ – реакция трансплантат против хозяина
СВФ – свежевыделенные фрагменты
Т3 – трийодтиронин
Т4 – тироксин
ТТГ – тиреотропный гормон
ФрТС – фрагменты ткани семенников
ФСБ – фосфатно-солевой буфер
ФР – физиологический раствор

ФТС – фетальная телячья сыворотка

ЩЖ – щитовидная железа

APC – аллофикоцианин

GdCl₃ – гадолиний хлорид

FITC – флуоресцеин изотиоцианат

HSC – звездчатые клетки печени

LSEC – эндотелиальные клетки синусоидов печени

NGS – нормальная сыворотка козла

PE – фикоэритрин

T reg – регуляторные Т-лимфоциты

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность темы.

Эндокринная система является жизненно важной частью организма, которая интегрирует все метаболические, физиологические и поведенческие процессы. Нарушение любого звена эндокринной системы неизбежно приводит к нарушению функций органов и возникновению изнурительных или опасных для жизни болезней. Озабоченность в связи с наблюдаемым в современном обществе увеличением числа случаев эндокринных заболеваний и расстройств выразилась в заявлении Всемирной организации здравоохранения «Состояние научных данных о химических веществах, разрушающих эндокринную систему» (Женева, 2013).

Трансплантация эндокринных желез, их тканей или клеток является перспективным методом лечения эндокринной недостаточности, особенно в условиях роста онкологических, сердечно-сосудистых и прочих осложнений заместительной гормональной терапии (ЗГТ) [43, 71, 183]. Такой способ имеет множество преимуществ по сравнению с ЗГТ, среди которых главными являются: включенность гормонально-активного трансплантата в нейро-гуморальную систему, аутокринная и паракринная регуляция, способность поддерживать суточные и циркадные ритмы, реагировать на стресс и другие физиологические запросы организма, наличие резерва стволовых/прогениторных клеток. Таким образом, трансплантация может использоваться в комплексе регенеративно-восстановительных мероприятий при лечении эндокринопатий, как вспомогательный метод при использовании ЗГТ, позволяя снижать дозу экзогенного гормона, а также в профилактике возрастных гормональных нарушений.

Одной из основных задач криобиологии является разработка долгосрочных сберегающих технологий для трансплантации органов и тканей. В настоящее время разработаны способы низкотемпературного криоконсервирования клеток и тканей щитовидной железы, надпочечников,

семенников [11, 20, 32] и показана возможность применения их при трансплантации больным с гормональной недостаточностью [17, 18, 25, 34]. Однако роль факторов криоконсервирования в сохранении морфофункциональных особенностей эндокринной ткани после трансплантации детально не изучалась.

Эндокринные железы представляют собой упорядоченные ансамбли, в которых клетки взаимодействуют таким образом, чтобы поддерживать оптимальный гормональный выход. Сохранение тканевой архитектуры и регуляторных взаимоотношений между клетками является важным для полноценного гормонопоза, поэтому существует необходимость криоконсервирования именно ткани эндокринных желез, а не их одиночных клеток. Несмотря на то, что ткани и клетки эндокринных желез являлись одними из первых объектов, на которых были отработаны технологии замораживания [9, 12, 31, 48], до сих пор отсутствует сравнительный анализ их устойчивости к факторам криоконсервирования.

Общепринято, что основными причинами повреждения клеток при замораживании являются образование внутриклеточного льда и повышение концентрации солей в связи с вымораживанием воды, так называемый «эффект раствора» [302]. При этом, вклад того или иного фактора в криоповреждение зависит от скорости охлаждения. Данный постулат справедлив как для суспензий одиночных клеток, так и для их конгломератов (агрегатов, фрагментов и срезов ткани). Однако при замораживании ткани, представляющей собой трехмерную пространственную организацию нескольких типов клеток, нужно учитывать и другие факторы, а именно: неодинаковую скорость насыщения клеток криопротектором; различную криоустойчивость клеток к замораживанию; увеличение внутриклеточной кристаллизации вследствие существования межклеточных контактов. В связи с этим, актуальным является сравнительное изучение влияния различных режимов охлаждения на структурно-функциональную сохранность тканей эндокринных желез.

Получение трансплантата предполагает использование современных технологий забора, подготовки и хранения ткани эндокринных желез, что неизбежно изменяет ее структурно-функциональные свойства. Некорректное проведение подготовительных этапов может инициировать некротические процессы в ткани эндокринных желез и потерю ее гормональной функции. Кроме того, пересадку фрагментов ткани осуществляют, как правило, без восстановления сосудистых связей и в разные сайты организма [42, 323, 389], что влияет на скорость и степень реваскуляризации трансплантата, а значит, и на параметры его трофической поддержки. Следствием этого является сложность дозировки и прогнозирования длительности функции трансплантата. В связи с этими соображениями актуальным является определение сроков выживаемости и гормональной активности культивированной и криоконсервированной ткани эндокринных желез при гетеротопической трансплантации.

В современной клинической трансплантологии основным методом поддержания выживаемости аллогенного трансплантата является пожизненное применение иммуносупрессантов. Возможность применения иммуносупрессивных препаратов при трансплантации ткани эндокринных желез ограничена вследствие негативного влияния их на гормонопоэз [346], а риск развития смертельных осложнений у реципиентов велик [50]. Данные обстоятельства определяют необходимость поиска и разработки методов индукции толерантности к трансплантату.

Экспериментально показано, что трансфузия крови либо иммунокомпетентных клеток (спленоцитов, Т- или В-лимфоцитов, дендритных и костномозговых клеток) от донора, сделанная за несколько дней до аллотрансплантации органа или ткани от того же донора, уменьшает частоту и силу кризов отторжения, а в некоторых случаях приводит к перманентной выживаемости трансплантата без применения иммуносупрессии [333, 376, 395, 396]. Это явление получило название индукции донор-специфической толерантности (ДСТ). Однако данный подход практически не изучался на

тканях эндокринных желез, имеющие свои особенности, которые могут влиять на активность иммунного ответа реципиента. Паренхима желез внутренней секреции содержит значительное количество дендритных клеток и макрофагов [208, 307], что должно отражаться на выживаемости ткани после трансплантации и делает актуальным исследование данного вопроса.

Несмотря на то, что индукция ДСТ активно используется в экспериментальной и клинической практике трансплантологии на протяжении последнего десятилетия, до сих пор не было сделано попытки применения в качестве индуцирующего агента криоконсервированных клеток. Криоконсервирование донорского трансфузионного материала позволит выполнять трансплантацию не в экстренном режиме, а планировать сроки операции в зависимости от состояния реципиента. Таким образом, изучение влияния криоконсервирования иммунокомпетентных клеток, выбранных для предтрансплантационной трансфузии, на выживаемость трансплантатов ткани эндокринных желез является важной задачей, требующей решения.

Долгосрочное выживание трансплантатов в настоящее время базируется на постоянном медикаментозном подавлении иммунитета. На данный момент отсутствует универсальная панель биомаркеров для выявления толерантности к трансплантату. В связи с этим существует необходимость разработки тестовых систем для их выявления, что позволит безопасно минимизировать либо отменить иммуносупрессию, основываясь на показателях индивидуального иммунологического профиля реципиента.

Одним из вероятных кандидатов на роль биомаркеров при трансплантации является содержание регуляторных Т-лимфоцитов с фенотипом $CD4^+CD25^+FoxP3^+$ (Treg). Однако недостаточность и противоречивость данных относительно пула данных клеток у здоровых людей, толерантных реципиентов и у пациентов с хроническим отторжением [53, 84, 85, 175, 283, 314] требует поиска новых показателей, которые с большей долей вероятности показывали бы реактивность иммунной системы, направленную на отторжение либо толерантность к трансплантату.

В связи с тем, что молекулярные основы презентации антигена включают в себя каскад реакций, среди которых система направленного протеолиза белков протеасомами определяет иерархию антигенных эпитопов клетки [362, 403], является актуальным изучение роли иммунных протеасом при трансплантации. Несмотря на то, что в последние годы ингибитор протеасом бортезомиб активно используется в качестве иммуносупрессанта [153, 345, 347], практически не существует исследований экспрессии иммунных субъединиц протеасом у реципиентов аллографтов различных органов или тканей. Соотношение иммунных субъединиц протеасом, отражающее процесс распознавания и презентации антигена, является вероятным кандидатом на роль биомаркеров при трансплантации. В связи с вышеизложенным, сравнительный анализ изменения субпопуляции $CD4^+CD25^+FoxP3^+$ Т-лимфоцитов и содержания иммунных протеасом у реципиентов ткани эндокринных желез в условиях индукции толерантности является актуальным для выявления механизмов и закономерностей развития ДСТ, а также может явиться важным для разработки панели биомаркеров при трансплантации.

Таким образом, актуальность вышеперечисленных проблем обусловила необходимость выполнения данной диссертационной работы и определила ее цель и задачи.

Связь работы с научными программами, планами, темами. Диссертация выполнена в отделе криобиохимии и фармакологии нейрогуморальных систем Института проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины в рамках следующих научно-исследовательских тем, в которых автор была ответственным исполнителем: «Дослідження механізмів функціонування кріоконсервованих органних культур ендокринних тканин» (шифр 2.2.6.03, № 0101U003478), «Властивості ендокринних тканин за умов кріоконсервування та трансплантації експериментальним тваринам» (шифр 2.2.6.32, № 0106U002163) и «Структурно-функціональні властивості та

проліферативний потенціал ендокринних тканин при культивуванні, криоконсервуванні та трансплантації (шифр 2.2.6.64, № 0111U001196).

Цель и задачи исследования.

Цель работы – изучить влияние криоконсервирования и индукции донор-специфической толерантности на структурно-функциональную сохранность трансплантатов тканей эндокринных желез, а также определить биологические маркеры трансплантационной толерантности у реципиентов.

В соответствии с поставленной целью предполагалось решить следующие задачи.

1. Определить сроки выживаемости и гормональную функцию ауто-, алло- и ксенографтов свежевыделенной ткани эндокринных желез (щитовидной железы, семенников, надпочечников) при трансплантации под капсулу почки животным с моделями гормональной недостаточности (тиреоид-, орхи- и адреналэктомией).

2. Установить влияние скорости охлаждения на количественный и фенотипический состав антигенпредставляющих клеток эндокринных желез и выявить условия реализации эффекта снижения иммуногенности ткани при криоконсервировании.

3. Провести сравнительный анализ жизнеспособности, гормональной секреции и структурной целостности тканей эндокринных желез (щитовидной железы, семенников, надпочечников), криоконсервированных с разной скоростью охлаждения, на основе которого отобрать режимы криоконсервирования и предтрансплантационной подготовки (культивирования), которые максимально отвечают условиям снижения иммуногенности для последующего использования при трансплантации.

4. Определить сроки выживаемости и гормональную активность алло- и ксенографтов культивированной и криоконсервированной ткани эндокринных желез (щитовидной железы, семенников, надпочечников) при трансплантации под капсулу почки животным с моделями гормональной недостаточности.

5. Изучить влияние индукции донор-специфической толерантности путем трансфузии свежевыделенных спленоцитов на выживаемость и гормональную активность трансплантатов ткани эндокринных желез (щитовидной железы, надпочечников, семенников, яичников) у животных с моделями гормональной недостаточности.

6. Изучить влияние индукции донор-специфической толерантности путем трансфузии криоконсервированных спленоцитов на выживаемость трансплантатов ткани эндокринных желез.

7. Определить количество регуляторных Т-лимфоцитов $CD4^+CD25^+Foxp3^+$ в крови реципиентов после трансплантации тканей эндокринных желез в условиях нормы и индукции донор-специфической толерантности.

8. Определить экспрессию иммунных протеасом в трансплантатах ткани эндокринных желез, а также в печени, селезенке и тимусе реципиентов после трансплантации в условиях нормы и индукции донор-специфической толерантности.

9. Выявить наиболее эффективную стратегию трансплантации, включающую в себя максимальную структурно-функциональную сохранность трансплантата, для разработки подходов к использованию метода трансплантации эндокринных тканей в регенеративно-восстановительной и профилактической медицине, а также при лечении гормональной недостаточности.

Объект исследования — влияние криоконсервирования и индукции донор-специфической толерантности на структурно-функциональную сохранность фрагментов ткани эндокринных желез (щитовидной железы, семенников, надпочечников, яичников) при трансплантации экспериментальным животным, а также на экспрессию иммунных протеасом и содержание регуляторных Т-лимфоцитов $CD4^+CD25^+Foxp3^+$ у реципиентов.

Предмет исследования – ткани эндокринных желез (щитовидной железы, семенников, надпочечников, яичников) экспериментальных животных при культивировании, криоконсервировании и трансплантации, а также содержание иммунных субъединиц протеасом в трансплантате, печени, селезенке, тимусе и регуляторных Т-лимфоцитов $CD4^+CD25^+Foxp3^+$ в крови реципиента.

Методы исследования. В работе были использованы современные методы молекулярной и клеточной биологии, экспериментальной медицины, биохимии гормонов, световая и флуоресцентная микроскопия, гистологический анализ, морфометрический анализ, иммуногистохимический анализ, цитофлуориметрический анализ, статистический анализ результатов.

Научная новизна полученных результатов. В диссертационной работе впервые проведены сравнительные исследования и получены данные о чувствительности тканей эндокринных желез (щитовидной железы, семенников, надпочечников) к криоконсервированию с использованием низкой ($1^\circ\text{C}/\text{мин}$) и высокой ($>100^\circ\text{C}/\text{мин}$) скоростей охлаждения.

Впервые проведен сравнительный анализ выживания тканей различных эндокринных желез при гетеротопической трансплантации под капсулу почки и выделены их индивидуальные особенности, включая иммуногенность и устойчивость к предтрансплантационной обработке путем криоконсервирования и культивирования. Результаты анализа привели к выводу, что скорость отторжения трансплантатов тканей эндокринных желез зависит от вида железы, причем выживаемость ткани надпочечников достоверно выше, чем других использованных желез.

В работе впервые был определен иммунофенотип дендритных клеток надпочечников мыши, а также проведен количественный анализ антиген-представляющих клеток (АПК) в условиях иммуномодуляции ткани надпочечников путем варьирования скоростей охлаждения при

криоконсервирования, что позволяет применять этот подход для снижения иммуногенности тканей других желез.

Впервые детально изучены сроки выживаемости тканей эндокринных желез в обычных условиях, а также при иммуномодуляции трансплантата (путем культивирования или криоконсервирования) или реципиента (при индукции донор-специфической толерантности).

Впервые экспериментально был апробирован метод донор-специфической трансфузии спленоцитов при трансплантации тканей эндокринных желез, что позволило достичь максимальной выживаемости аллографтов и их гормональной функции без использования иммуносупрессантов. Полученные экспериментальные данные дают теоретическое обоснование использования биоматериала эндокринных желез для трансплантации в отсутствие иммуносупрессантов в регенеративно-восстановительной и профилактической медицине.

В работе были получены новые данные, касающиеся механизма индукции донор-специфической толерантности, и обосновано использование в качестве индуцирующего агента криоконсервированных клеток.

Полученные результаты о количественном и качественном изменении экспрессии иммунных субъединиц протеасом при трансплантации имеют фундаментальное значение для понимания механизмов развития толерантности иммунной системы реципиента к трансплантату.

Теоретическое и практическое значение полученных результатов. Разработанные способы криоконсервирования органотипической культуры щитовидной железы (Патент Украины № 9367), ткани (Патент Украины № 80497) и клеток семенников (Патент Украины №91787), а также предтрансплантационной подготовки ткани надпочечников и щитовидной железы (Патент Украины № 4845 и № 46440) позволяют добиться высокой функциональной активности культур эндокринных желез после замораживания-отогрева.

Полученные в работе данные о различной чувствительности паренхиматозных и антиген-представляющих клеток эндокринных желез к криповреждению позволяют в дальнейшем разработать стратегию коррекции иммунологического профиля эндокринных тканей путем варьирования скоростей охлаждения при криоконсервировании.

На основе изучения структурно-функциональной сохранности трансплантатов тканей эндокринных желез у реципиентов с моделями гормональной недостаточности выявлена наиболее эффективная стратегия трансплантации, которая включает в себя максимальный срок выживаемости и уровень гормональной активности трансплантата, что дает возможность в дальнейшем использовать метод трансплантации с высокой прогнозируемостью результатов, а также сделать выводы о терапевтической ценности препаратов эндокринных тканей для использования в эндокринологии, трансплантологии, регенеративно-восстановительной и профилактической медицине.

Впервые было проведено исследование пула иммунных протеасом при трансплантации и сделано научное обоснование применения показателя их экспрессии в трансплантате и печени реципиента в качестве биомаркеров толерантности наряду с используемым в настоящее время показателем содержания регуляторных Т-лимфоцитов $CD4^+CD25^+Foxp3^+$. Показано, что соотношение иммунных субъединиц протеасом LMP2/LMP7 может использоваться как показатель принятия или отторжения алогraftа, на основе чего может быть создана соответствующая диагностическая тест-система.

Полученные в диссертационной работе результаты имеют практическое значение для разработки клинических подходов к оптимизации лечения гормонодефицитных состояний, обосновывая возможность трансплантации ткани эндокринных желез без использования иммуносупрессантов при мониторинге биомаркеров толерантности в крови реципиента.

Материалы диссертационного исследования применяются в учебном процессе на кафедрах Харьковского национального университета им. В.Н.

Каразина, кафедрах Харьковского национального медицинского университета, в Украинском научно–практичном центре эндокринной хирургии, трансплантации эндокринных органов и тканей МОЗ Украины.

Теоретическое и практическое значение выбранного научного направления и полученных результатов демонстрирует поддержка дальнейших исследований в данной области международным Украинским научно-технологическим центром (проекты № 3919 и 5509) и Российским фондом фундаментальных исследований (проект № 12-04-90914-мол_снг).

Личный вклад соискателя. Выбор темы диссертационного исследования, планирование цели и задач, методологическая структура работы принадлежат автору. Вынесенные на защиту результаты работы получены автором лично. Диссертантом самостоятельно проведен патентный и информационный поиск, выдвинута основная концепция работы, осуществлен анализ полученных результатов, написаны все разделы диссертации, сформулированы выводы.

Автор выражает сердечную благодарность коллективу отдела криобиохимии и фармакологии нейро-гуморальных систем ИПКиК НАН Украины, лично д.м.н. Легачу Е.И., к.б.н. Алабедадькарем Н.М., научному консультанту д.б.н. Бондаренко Т.П., а также всем соавторам научных публикаций за помощь в проведении экспериментов, гипотезы и научные дискуссии, позволившие наилучшим образом спланировать и выполнить законченное диссертационное исследование. Особенную благодарность автор выражает коллективу лаборатории биохимии Института биологии развития им. В.К. Кольцова (Москва, Россия), лично руководителю лаборатории д.б.н. Шаровой Н.П., к.б.н. Люпиной Ю.В., к.б.н. Карповой Я.Д. за предоставленную возможность проведения молекулярно-биологических исследований, ценные рекомендации и совместное плодотворное сотрудничество.

Апробация результатов диссертации. Основные положения диссертации доложены и обсуждены: на заседаниях секций Ученого Совета Института проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, Института биологии развития им. В.К. Кольцова (Москва, Россия); Всеукраинской конференции студентов и молодых ученых «Трансплантологія сьогодні» (Донецк, 2000); Всеукраинской научной конференции «Успехи и перспективы развития криобиологии и криомедицины» (Харьков, 2001); 13th и 18th European Students' Conferences for promising biomedical scientists and future doctors (Берлин, 2002, 2007); III Международной научной конференции «Medicine – Health XXI century» (Донецк, 2002); конференции молодых ученых «Актуальні проблеми фундаментальної та прикладної біохімії» (Киев, 2002, 2004); Установочном съезде Украинского общества клеточной биологии (Львов, 2004); научно-практических конференциях «Фундаментальні питання експериментальної та клінічної ендокринології» (Харьков, 2002, 2003, 2004, 2005); Съездах трансплантологов Украины (Запорожье, 1995; Киев, 2000; Донецк, 2005; Киев, 2007, 2009; Харьков 2011); 5th Parnas Conference «Molecular mechanisms of cellular signaling» (Киев, 2005); IX Украинском биохимическом съезде (Харьков, 2006); научно-практической конференции «Профілактика, діагностика та лікування – основні складові терапії» (Харьков, 2006); Всероссийских симпозиумах с международным участием «Актуальные вопросы тканевой и клеточной трансплантологии» (Москва, 2007; Самара 2009; Санкт-Петербург 2011; Уфа 2012); 12th European Congress of Endocrinology (Прага, 2010); Всероссийских съездах трансплантологов (Москва 2008, 2010, 2012); 36th Congress Biochemistry for Tomorrow Medicine (Торонто, Италия, 2011); Международной научно-практической конференции «Биотехнологии в клинической медицине» (Донецк, 2012); научно-практической конференции с международным участием «Актуальные проблемы регенеративной медицины» (Киев, 2012); научной конференции с международным участием «Актуальные проблемы криобиологии и криомедицины» (Харьков, 2012).

Публикация материалов. Основные положения диссертации изложены в 35 статьях, опубликованных в специализированных и международных научных изданиях с импакт-фактором, в разделе коллективной монографии, а также 36 публикациях материалов конференций. Получено 5 декларационных патентов Украины.

Объем и структура диссертации. Диссертация изложена на 309 страницах машинописного текста и содержит введение, аналитический обзор литературы, разделы «Материалы и методы исследования», «Результаты собственных исследований и их обсуждение», обобщение результатов, выводы и список литературы на 52 страницах, который включает 493 источника, из которых 441 иностранные. Работа иллюстрирована 14 таблицами, 45 рисунками и 65 микрофотографиями.

РАЗДЕЛ I

ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1. Криоконсервирование и трансплантация ткани эндокринных желез

Низкотемпературное консервирование (криоконсервирование) и гипотермическое хранение биообъектов как область научных знаний и отрасль науки активно начала развиваться с середины прошлого века. В это время наступил прорыв в биотехнологии, когда появились современные методы выращивания культур клеток и штаммов микроорганизмов. Это время также ознаменовалось рядом открытий в иммунологии и формулированием основных принципов трансплантологии: открыт комплекс гистосовместимости (Доссе, 1952); сформулировано понятие «смерть мозга» и определены ее признаки; установлена роль лимфоцитов в реакции отторжения трансплантата (Медавар, 1960); сделаны первые попытки применить стероидные производные как средство иммуносупрессии. Из простейших грибов выделен циклический полиамид циклоспорин А, который в 300 раз эффективнее, чем кортикостероиды угнетал пролиферацию лимфоцитов. Все это давало возможность трансплантологии «шагнуть» из области экспериментов в клиническую практику.

Назревшая необходимость хранения клеток, тканей и органов определила в 60-70-х годах прошлого века зарождение, развитие и расцвет криобиологии как одной из областей человеческих знаний о природе. Исторически сложилась ситуация, когда криобиология оказалась неразрывно связанной с трансплантологией и биотехнологией, что и определило ее основные практические задачи сохранения биообъектов в функциональном состоянии путем замораживания.

Криоконсервированию ткани/клеток эндокринных желез уделялось немало внимания на протяжении всего периода развития криобиологии, прежде всего, как методу, позволяющему сохранить биологический материал

для трансплантации. Было разработано множество способов криоконсервирования с применением различных криопротекторов и режимов замораживания. Наиболее успешные способы дают возможность максимально сохранить исходные свойства клеток желез после размораживания, включая синтез и секрецию гормонов.

В таблице 1.1 приведены данные об использовании криопротекторов и скоростей охлаждения для криоконсервирования ткани различных желез.

Для низкотемпературного сохранения эндокринной ткани применяют как проникающие (пропандиол, ДМСО, глицерин), так и непроникающие (сахароза, ПЭО-1500, трегалоза, ПВП) криопротекторы.

Из сравнительного анализа данных, представленных в таблице, следует, что использованная разными авторами концентрация криопротекторов для ткани одной и той же эндокринной железы, может различаться в 4 раза. С одной стороны, это может указывать о достаточной устойчивости ткани к широкому диапазону концентраций криопротектора. Однако, с другой стороны, это может говорить о недостатке выбранного режима криоконсервирования.

Охлаждения тканей возможно только через поверхность образца, поэтому при криоконсервировании неизбежна пространственная неоднородность температуры и скорости ее изменения в тканях. Чем больше размер фрагмента и выше скорость охлаждения, тем существеннее повреждения тканей в процессе криоконсервирования.

В последующих разделах особенности посттрансплантационной выживаемости тканей эндокринных желез, криоконсервированных с использованием различных режимов, будут рассмотрены более подробно.

Таблица 1.1

Криопротекторы и режимы криоконсервирования, применяемые для замораживания тканей эндокринных желез

Типы ткани	Криопротекторы, режимы криоконсервирования
Надпочечные железы	5% ДМСО [4, 22]; 10% ДМСО [44, 45]; 1–3 град/мин [11]; 12,5% ДМСО, 8–10°С/мин до –70°С [34]; 20% ДМСО [439]
Щитовидная железа	8,5% ПВП; ПЭО–400, 0,35 М сахараза; 1М глицерин [11]; 7% ДМСО [26]; 10% ДМСО [18, 252]; 15% глицерин, 1 град/мин [49]; 5–7 град/мин до -70°С; 85–100 град/мин [11]; 10 град/мин [26]
Семенники	15% глицерин [11]; 6–25 % ДМСО [229]; 10% ДМСО [11]; 5% ДМСО, 1 град/мин до температуры кристаллизации, 10 град/мин до -80°С – ↓LN ₂ [244]; 1,5М ДМСО, 0,3°С/мин до –40°С, 10°С/мин до –140°С [383]

Примечание: в квадратных скобках указана ссылка на литературный источник.

1.1.1. Трансплантация криоконсервированной ткани щитовидной железы

Исторически, первой тканью, использованной для экспериментальной трансплантации, была ткань щитовидной железы (ЩЖ). Шифф в 1884 году

выполнил пересадку кусочков ткани щитовидной железы в брюшную полость собаки перед тиреоидэктомией, что предупреждало развитие послеоперационных нарушений обмена веществ, которые в противном случае развивались через 2-5 недель.

Первые криоконсервированные трансплантаты ткани ЩЖ были заморожены без криопротектора. Очевидно, что их эффективность была крайне низкой. Например, в работе [49] при пересадке замороженных без криопротектора ЩЖ морским свинкам участки трансплантата были обнаружены лишь в 10% случаев. В дальнейшем исследования были направлены на подбор криопротекторов и режимов охлаждения с целью максимального сохранения структурно-функционального состояния фрагментов ткани ЩЖ. Для замораживания ткани ЩЖ использовались криопротекторы глицерин [38, 49], поливинилпирролидон [11], ПЭО-400 [12], наиболее часто – ДМСО [6, 15, 239, 252, 399].

Основная масса клинических наблюдений связана с аутотрансплантацией криоконсервированной ЩЖ. Принцип аутотрансплантации эндокринных желез после тотальной или субтотальной резекции железы для предотвращения послеоперационной гормональной недостаточности был впервые предложен Халстедом в 1909 г. (Halsted, 1909).

В работе [435] ткань ЩЖ больных, оперированных по поводу болезни Гревса, была заморожена и в дальнейшем использована в качестве аутотрансплантата. У 11 из 13 больных после гетеротопической трансплантации в мышцу исчезли симптомы гипотиреоза, увеличился уровень Т4, Т3 и уменьшился уровень ТТГ, причем у двоих пациентов стала возможна полная отмена заместительной гормональной терапии. Захват радиоактивного йода показал наличие функционирующей ткани ЩЖ в сайте трансплантации. Однако авторы данной клинической работы не сообщают о режиме криоконсервирования и выбранном криопротекторе.

Китамура Й. с соавторами установили, что оптимальное замораживание ткани ЩЖ возможно в виде фрагментов размером около 1мм³ в культуральной

среде с добавлением 10% ДМСО, 10% эмбриональной телячьей сыворотки и при медленном охлаждении [252]. 2,5 - 3,5 г криоконсервированных таким образом фрагментов ЩЖ были аутотрансплантированы в мышцы 4 пациентам. У трех пациентов прием заместительных гормональных препаратов был отменен в связи с исчезновением клинических симптомов гипотиреоза и восстановлением нормального уровня тироксина [400].

В 1980 году в Институте проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины был создан банк криоконсервированной ткани ЩЖ. Донорами ткани являлись больные с различной эндокринной патологией, оперированные в Украинском НИИ фармакотерапии эндокринных заболеваний (УкрНИИФЭЗ). В УкрНИИФЭЗ была выполнена трансплантация криоконсервированной ткани ЩЖ 64 пациентам с послеоперационным и идиопатическим гипотиреозом, из них 18 аутотрансплантаций и 46 аллотрансплантаций с подбором пар донор-реципиент по группе крови, резус-фактору и трем локусам системы HLA [17]. Криоконсервирование проводили по методу [32]. У всех реципиентов аутотрансплантатов была отменена ЗГТ, эффект сохранялся на всем сроке наблюдения 5 лет. В результате аллотрансплантации у 62% реципиентов наблюдался уровень Т4 и ТТГ в пределах нормальных значений, а у остальных доза ЗГТ была в 2-3 раза меньше, чем до трансплантации. Авторы работы [33] сообщают, что после аутоимплантации криоконсервированной тиреоидной паренхимы функция аутографта сохранялась на протяжении 18 месяцев, что было подтверждено захватом радиоактивного йода в месте трансплантации и нормализацией уровня тиреоидных гормонов. Клинические исследования Исмаилова С.И. [14] показали восстановление обратной связи гетеротопических аутотрансплантатов ЩЖ, пересаженных в мышцу предплечья больным с гипотиреозом. Способность отвечать на стимуляцию ТТГ была оценена путем измерения Т4 и Т3 в крови разных рук пациентов. Введение ТТГ вызывало увеличение уровня тиреоидных гормонов в крови, оттекающей от трансплантата.

В научной литературе описано незначительное количество результатов клинической аллотрансплантации криоконсервированной ткани ЩЖ. Вероятно, это связано как с недостаточностью донорского материала для трансплантации, так и с неудовлетворительностью результатов операций вследствие отторжения. В работе [18] срезы ЩЖ массой около 1 г были инкубированы в течение 45 мин в 10% ДМСО и заморожены со скоростью 5-7°C/мин. Срезы были трансплантированы в подкожную жировую клетчатку передней брюшной стенки больным с послеоперационным гипотиреозом, ранее оперированных по поводу диффузного токсического зоба. Положительная динамика гипотиреоза позволила в первые месяцы после трансплантации отменить ЗГТ, однако через 1 год наблюдалось уменьшение уровня тиреоидных гормонов, хотя их уровень превышал предтрансплантационный, а ТТГ сохранялся в пределах нормы.

К сожалению, вышеперечисленные клинические наблюдения дают неполную картину выживаемости гетеротопических трансплантатов ткани ЩЖ, так как в этих условиях невозможно было провести биопсию трансплантатов.

Подробный анализ выживаемости и функциональной активности трансплантатов ткани ЩЖ был сделан в экспериментальных работах. Аутоотрансплантация кусочков криоконсервированной железы в мышечную ткань шеи или сальник была проведена на собаках в работах [169, 401]. Авторы [169] отмечают, что нормализация уровня тиреоидных гормонов наступила через 3-4 недели после трансплантации, наблюдался также захват радиоактивного йода в местах трансплантации. После окончания срока наблюдения присутствие жизнеспособной ткани ЩЖ было подтверждено гистологически. В работе [401] наличие пересаженной ткани ЩЖ, криоконсервированной с криопротектором ДМСО, наблюдали через 6-12 недель.

Гистологический анализ состояния аутографта криоконсервированных фрагментов ЩЖ на 20 сутки после гетеротопической пересадки проведен в исследовании [49]. Наряду с нормофолликулярными участками в трансплантате

отмечаются утратившие форму фолликулы с отслоенным от базальной мембраны эпителием, в ряде фолликулов в коллоидном веществе наблюдаются клеточные дескваматы. Центральная часть пересаженных фрагментов (около $\frac{1}{4}$) была подвержена деструкции, вероятно, вследствие некроза и замещена соединительной тканью. На данном сроке наблюдается значительная неоваскуляризация трансплантата, а также образование новых фолликулов. Однако автор предполагает, что обнаруженные перестройки структуры ткани не связаны с криоконсервированием, так как подобная картина наблюдается и после трансплантации незамороженной ЩЖ.

Экспериментальный материал, посвященный алло- и ксенотрансплантации криоконсервированной ткани ЩЖ, в научной литературе представлен крайне незначительно. Известно, что при ксенотрансплантации криоконсервированной фетальной щитовидной железы человека мышам с иммунодефицитом происходит дальнейший рост и дифференцировка органа [189]. Исследованиями, проводимыми на базе Института проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, показано, что при криоконсервировании органотипической культуры ЩЖ в присутствии 7% ДМСО со скоростью замораживания $1^{\circ}\text{C}/\text{мин}$ до -80°C и дальнейшем погружении в жидкий азот наблюдается сохранение гистоструктуры ткани [26]. Аллотрансплантация замороженной таким образом культуры тиреоидэктомизированным кроликам приводила к стойкому гормонокорректирующему эффекту в течение 90 суток, после чего к 120 суткам уровень гормонов снижался [7]. При ксенотрансплантации уровень тиреоидных гормонов в плазме крови реципиентов в первые две недели после трансплантации замороженной по этой программе ткани был в пределах нормальных значений или несколько повышенным, однако далее он имел тенденцию к уменьшению [5]. В месте трансплантации жизнеспособной ткани найдено не было, но в месте резекции щитовидной железы реципиентов отмечались регенеративно-восстановительные процессы.

Тиреоидная гормональная недостаточность развивается по разным оценкам у 34-58% больных, оперированных по поводу заболеваний ЩЖ [17]. В связи с этим метод трансплантации свежевыделенной ткани ЩЖ не только не утрачивает своей актуальности, но и приобретает новые клинические аспекты. Например, современным подходом является хирургическая профилактика послеоперационных гормональных расстройств путем интраоперационной гетеротопической комплексной аутотрансплантации тканей щитовидной и паращитовидной желез [28]. Что же касается криоконсервированной ткани ЩЖ, то до сих пор отсутствует всестороннее изучение ее выживаемости после трансплантации, включающее определение морфологического состояния, оценку гормонопродукции и иммунологического статуса. А это значит, что метод трансплантации криоконсервированной ткани ЩЖ не может быть широко рекомендован для применения в клинике.

1.1.2. Трансплантация криоконсервированной эндокринной ткани/клеток половых желез

В настоящее время основным способом сохранения фертильности людей препубертатного возраста, которые должны подвергнуться противоопухолевой терапии, является криоконсервирование тестикулярной или овариальной ткани [214, 310, 443, 488]. Герминативный компартмент половых желез очень чувствителен к цитотоксическому действию противораковой терапии, поэтому основное внимание уделяется разработке протоколов криоконсервирования, сохраняющих продукцию половых клеток. Однако значительное количество работ свидетельствует о повреждении после химио- и радиотерапии клеток, синтезирующих половые стероиды [110, 111, 122, 147, 174, 215], без которых невозможен нормальный гаметогенез. В связи с этим огромный интерес приобретают работы, в которых исследована возможность восстановления недостаточности половых гормонов посредством трансплантации криоконсервированной ткани половых желез.

В современной научной литературе описаны несколько режимов криоконсервирования фрагментов ткани тестисов человека [243, 244, 262] и млекопитающих [54, 225, 229, 309, 383]. Основная цель этих работ состояла в том, чтобы достичь хорошей сохранности сперматогенного эпителия, однако в некоторых исследовалась и стероидогенная функция криоконсервированных трансплантатов. Например, в работе [383] фрагменты семенников были заморожены со скоростью $0,3^{\circ}\text{C}/\text{мин}$ до -40°C на первом этапе и $10^{\circ}\text{C}/\text{мин}$ до -140°C на втором в присутствии 1,5М ДМСО. На 50-й день после сингенной гетеротопической трансплантации обнаружены семенные каналы с признаками сперматогенеза, а уровень тестостерона в плазме крови реципиентов приближался к значениям, полученным для трансплантатов свежесекретированных фрагментов.

Установлено, что продолжительность хранения ткани семенника при низких температурах влияет на ее функциональную активность после трансплантации [11]. После хранения ткани в течение 1 недели при температуре -79°C и последующей аллотрансплантации ткани были обнаружены признаки гормональной активности, тогда как по мере увеличения продолжительности хранения происходило уменьшение уровня секреторной активности.

Клетки криоконсервированных семенников неполовозрелых животных сохраняют способность дифференцироваться после размораживания и ортотопической трансплантации. В семенных каналах таких трансплантатов обнаруживались нормальные подвижные сперматозоиды, хотя в последующем они подвергались деструкции вследствие реакции отторжения [11].

Существует экспериментальный опыт криоконсервирования тестикулярного комплекса с сохранением сосудистой ножки при использовании 20% раствора ПЭО-400 и скоростями охлаждения: $1^{\circ}\text{C}/\text{мин}$ в диапазоне температур от 4°C до -13°C , $10^{\circ}\text{C}/\text{мин}$ в диапазоне температур от -13°C до -196°C [9]. В результате было установлено, что замораживание семенника приводит к снижению жизнеспособности ортотопического аллотрансплантата.

В работе [488] семенники крыс были перфузированы холодным раствором, содержащим 0,1 М фруктозу и возрастающую концентрацию ДМСО от 0 до 1,5 М, после чего заморожены по четырехэтапной программе. Программа включала охлаждение от 0°C до -7°C со скоростью 2°C/мин, далее после 5-минутной выдержки скорость охлаждения составила 0,3°C/мин до -40°C и 10°C/мин до -85°C, после чего образцы погружали в жидкий азот. Несмотря на сложность программы, ни один из семенников не выжил после аутологичной трансплантации.

Нужно отметить, что как клинические, так и экспериментальные, результаты трансплантации семенников менее успешны, чем яичников. Исследователи связывают это с повышенной чувствительностью этого органа к ишемии и факторам криоконсервирования [329, 488].

Успешная аутоотрансплантация криоконсервированной овариальной ткани была продемонстрирована в экспериментальных исследованиях на лабораторных грызунах [104, 106, 200], сельскохозяйственных животных [68, 181] и обезьянах [384]. Более того, существует немало отчетов об успешном клиническом применении аутоотрансплантации криоконсервированной овариальной ткани наряду с замороженными эмбрионами и яйцеклетками в качестве современного метода вспомогательной репродуктивной технологии.

В клиническом исследовании Oktay K. с соавт. [333] срезы овариальной ткани, полученные в результате овариэктомии, были криоконсервированы с использованием 1,5М пропандиола и низкой скорости охлаждения. Через 6 месяцев срезы были трансплантированы внутрибрюшинно этой же пациентке, после чего через полгода наблюдалось повышение уровня эстрадиола и прогестерона до нижней границы нормы. Эта же группа клиницистов опубликовала другой отчет, в котором была показана функция криоконсервированного трансплантата с восстановлением гормонального профиля и месячного цикла на протяжении 1,5 лет после аутоотрансплантации [334].

Meirow D. с соавт. опубликовал отчет о наступлении беременности после трансплантации криоконсервированной овариальной ткани в яичник женщины, подвергшейся высоко-дозовой химиотерапии [306]. Биопсия овариальной ткани была заморожена перед противоопухолевой терапией. Восстановление нормального гормонального цикла у пациентки наступило через восемь месяцев после пересадки, что позволило осуществить оплодотворение *in vitro*. Реализация данного метода за последние годы позволила достичь рождения 13 детей у женщин, утративших способность к деторождению вследствие химио- и радиотерапии [143]. В целом, по наблюдениям различных групп специалистов, практикующих ортотопическую трансплантацию криоконсервированных кусочков или полосок овариальной ткани, гормональный месячный цикл восстанавливается у реципиентов через 6-8 месяцев после аутооттрансплантации [354, 448]. К сожалению, многие авторы не указывают, какой криопротектор и режим криоконсервирования были использованы.

Другая группа ученых указывает на ограниченную эффективность данного метода в качестве вспомогательной репродуктивной технологии, так как в их исследованиях не наблюдалось уменьшения уровня ФСГ после аутооттрансплантации, хотя из 10 оперированных женщин у 2 наступила беременность [227]. Возможно, результаты этих исследований разнятся вследствие того, что авторы использовали разные методы криоконсервирования.

Распространенность метода лечения во многом определяется успешностью результатов криоконсервирования овариальной ткани. Установлено, что примордиальные фолликулы устойчивы к факторам ишемии и криоконсервирования [329, 488]. Достаточно широкий спектр криопротекторов может быть применен для замораживания ткани яичников. Nugent D. с соавторами показал, что процент фолликулов, сохраняющихся после трансплантации деконсервированной овариальной ткани человека иммунодефицитным мышам, достоверно не отличается между группами с

образцами, замороженными в присутствии ДМСО, этиленгликоля и пропиленгликоля [329]. Глицерин оказался неэффективным в данном случае.

Аллотрансплантация криоконсервированных фрагментов яичников является менее используемым методом. В работе [195] криоконсервирование фрагментов яичников мышей и овец проводили под защитой 1,4М ДМСО по следующей программе: 1) охлаждение от 25°C до 10°C со скоростью 1°C/мин; 2) охлаждение от 10°C до -7°C со скоростью 0,5°C/мин; 3) инициация кристаллизации; 4) охлаждение от -7°C до -55°C со скоростью 0,5°C/мин; 5) погружение в жидкий азот. После этого проводили алло- и ксенотрансплантацию иммунодефицитным овариэктомированным мышам, в результате чего у них наблюдалось восстановление эстрального цикла.

В других экспериментальных работах были получены неоднозначные результаты. В исследовании Green C. с соавт. [185] при аллотрансплантации яичника на сосудистой ножке наблюдалось ускоренное отторжение, а гетеротопическая трансплантация фрагментов ткани была более успешной, если использовалась непрерывная циклоспориновая иммуносупрессия. Yin H. с соавт. показано, что криоконсервированные аллогraftы яичников на сосудистой ножке отторгаются в течение месяца, несмотря на циклоспорин [488].

Таким образом, метод трансплантации криоконсервированной ткани гонад дает возможность сохранения фертильности у больных, которым необходима противоопухолевая терапия. Однако до сих пор существует недостаточное количество работ, посвященных изучению целесообразности использования криоконсервированной ткани половых желез для коррекции уровня половых гормонов, особенно при аллогенной трансплантации, что указывает на актуальность данного направления исследования.

1.1.3. Трансплантация криоконсервированной ткани/клеток надпочечников

Возможность применения ткани или клеток надпочечников для коррекции гормональной недостаточности была показана в ряде работ [145, 149, 188, 321, 427, 438, 440]. Значительно меньше исследований посвящено изучению результатов применения криоконсервированных трансплантатов надпочечников.

В работе [34] ткань надпочечников, удаленная у больных по поводу АКТГ-зависимого синдрома Иценко-Кушинга или доброкачественной кортикостеромы, была заморожена с 12,5% ДМСО при скорости охлаждения 8–10°C/мин до –70°C и последующем погружении в жидкий азот. После аллотрансплантации этой ткани больным болезнью Аддисона было установлено достоверное увеличение уровня кортизола и снижения уровня АКТГ в сыворотке крови в течение 4 месяцев.

Органотипическая культура надпочечных желез новорожденных поросят, замороженная под защитой 5% ДМСО со скоростью 1°C/мин по методу [4], была использована для трансплантации в подкожную жировую клетчатку передней брюшной стенки больным с хронической надпочечниковой недостаточностью, вызванной длительным приемом глюкокортикоидов по поводу основного заболевания. В результате наблюдалось повышение уровня кортизола в крови больных, так что появилась возможность уменьшить дозу препаратов ЗГТ [24, 25].

Долгосрочный позитивный эффект наблюдался при аллотрансплантации фетальных надпочечных желез, замороженных по трехэтапной программе в присутствии 20% ДМСО, адrenaлэктомированным животным [439]. Уровень кортикостерона в крови реципиентов криоконсервированных аллогraftов практически не отличался от уровня, установленного для реципиентов свежесыводенных трансплантатов.

В Институте проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины проводились исследования, посвященные экспериментальной трансплантации

криоконсервированной ткани надпочечников. Было обнаружено влияние обработки криопротектором ДМСО без последующего замораживания на выживаемость и гормональную функцию ксенографтов фрагментов надпочечников, которое выражалось в активации секреции стероидных гормонов [3, 45]. Криоконсервирование как при низкой ($1^{\circ}\text{C}/\text{мин}$), так и высокой (более $100^{\circ}\text{C}/\text{мин}$) скорости замораживания в присутствии 10% ДМСО приводило к уменьшению гормоно-корректирующего действия ксенографтов надпочечников приблизительно в два раза [44].

Как видно из вышеизложенного, сведения, касающиеся выживаемости и гормональной функции криоконсервированных трансплантатов надпочечников, разрозненны и противоречивы. Возможно, это связано с высокой чувствительностью надпочечников к ишемии [11], что осложняет задачу подготовки и замораживания ткани, а также ее посттрансплантационной выживаемости. Однако это, в свою очередь, определяет актуальность и необходимость дальнейших исследований.

1.1.4. Трансплантация криоконсервированной ткани других эндокринных желез

Необходимость описания результативности криоконсервированных графтов поджелудочной и паращитовидной желез, не представленных в дальнейшем в наших исследованиях, связана с недостаточностью сведений о посттрансплантационной выживаемости криоконсервированной ткани прочих эндокринных желез в современной научной литературе.

Наиболее популярной операцией из всех трансплантаций желез внутренней секреции на данный момент является трансплантация островков поджелудочной железы. Была разработана клиническая процедура, включающая этапы выделения островков из 2-3 трупных поджелудочных желез, протокол иммуносупрессии реципиента и трансплантацию островков в портальную вену печени [391], которая получила название «Эдмонтонский протокол». В настоящее время этот протокол признан наиболее успешным для

достижения полной инсулиновой независимости у человека путем трансплантации. Очевидно, что если трансплантация островков становится клинически применимой, то низкотемпературное консервирование может решить проблемы банкинга островков от разных доноров в целях накопления нужного количества биоматериала, проверки трансплантационной совместимости, транспортировки и подготовки реципиента. Однако до сих пор клиническая пересадка криоконсервированных островков широко не применяется в связи с тем, что так не удалось добиться инсулиновой₂₇₇ независимости после трансплантации размороженных островков. Возможно, это связано с высокой чувствительностью островков к изменению осмолярности среды [493], токсичностью ДМСО для этого вида эндокринной ткани [242, 300, 367], крупным размером островков [461].

Первыми возможность нормализации уровня глюкозы после трансплантации криоконсервированных островков продемонстрировали в экспериментальных работах Rajotte R. с соавт. и Ferguson J. с соавт. [155, 355]. Наиболее удачные режимы криоконсервирования были основаны на использовании низкой скорости замораживания (0,25-5°C/мин) и 1,5-2 М ДМСО или этиленгликоля в качестве криопротекторов [260, 264, 356, 359]. В целом, оценивая результативность различных протоколов криоконсервирования, нужно отметить, что жизнеспособность размороженных островков колебалась от 60 до 80%.

Несмотря на то, что на мелких и крупных экспериментальных животных была установлена инсулин-продуцирующая функция криоконсервированных островковых графтов [264, 360, 370], в клинических исследованиях не наблюдалось нормализации уровня глюкозы после трансплантации [65, 283, 469]. При введении только лишь размороженных островков удавалось снизить дозу заместительной и нсулиновой терапии приблизительно в два раза [283], тогда как при трансплантации криоконсервированных островков вместе со свежесекретированными наблюдалось снижение уровня глюкозы и наступление

инсулиновой независимости у 18% пациентов [210]. К сожалению, пока остается невыясненным, почему при достаточно высокой предтрансплантационной жизнеспособности (до 80%) и инсулин-продуцирующей активности размороженных островков, их функционирование в организме реципиента является непродолжительным даже при использовании иммуносупрессии. Существует предположение, что в результате замораживания изменяется нативная паракринная регуляция между тремя типами клеток островка, что ведет к его резистентности по отношению к внешним стимулам [264, 469].

В последние десятилетия возросла роль аутотрансплантации паращитовидной железы в терапии постоперационной гипокальцемии. Хирургическое лечение рака щитовидной железы в 14% случаев приводит к гипопаратиреозу [476]. Пациенты с терминальной стадией хронической почечной недостаточности, находящиеся на диализе, имеют высокий риск развития гиперпаратиреоза. Таким больным выполняют резекцию паращитовидной железы, часто неоднократно. В результате множественных резекций наступает гипопаратиреоз, однако немедленная аутотрансплантация резецированной ткани паращитовидной железы в таком случае может привести к возобновлению гиперпаратиреоза. В связи с этим, многие специалисты считают, что единственно приемлемым способом является аутотрансплантация именно криоконсервированной ткани железы, так как это дает возможность более точно оценить функциональность оставшейся железы и регулировать результат пересаженной [192, 313].

Разработке режимов криоконсервирования паращитовидной железы в настоящее время уделяется немалое внимание. Обобщая их, можно отметить, что наиболее часто в качестве криопротектора используется ДМСО в концентрации от 7,5 до 20% [81, 88, 120, 304] и скорость замораживания 1°C/мин до -55...-80°C с последующим погружением в жидкий азот [120, 191, 211, 380].

Экспериментальные исследования показали нормализацию концентрации кальция в течение 60 дней после трансплантации ткани паращитовидной железы у 67% животных [463]. Практически такая же результативность аутотрансплантации криоконсервированной ткани паращитовидной железы (70%) показана в клинических исследованиях Cohen M. S. с соавт. [120]. Saccitolo J.A. с соавт. указывают, что из 23 реципиентов у 40% установлена секреция гормона в течение 7 месяцев, а 23% пациентов стали нормокальциемическими [98]. В недавно опубликованной работе Flechner S.M. с соавт. описан случай применения паратиреодного аллотрансплантата [156]. Пациенту была сделана аллотрансплантация почки и две последовательные трансплантации ткани паращитовидной железы, после чего в течение 8 месяцев наблюдения концентрация кальция в крови оставалась на контрольном уровне.

Таким образом, обобщая вышеприведенные данные, можно заключить, что трансплантация криоконсервированной ткани эндокринных желез является современным методом коррекции гормональной недостаточности, который становится все более востребованным в комплексном лечении заболеваний эндокринной системы и сопутствующих патологий. Однако анализ литературных источников позволяет отметить относительно небольшое количество данных о трансплантации ткани эндокринных желез, подвергнутых замораживанию, особенно надпочечников и семенников.

1.2. Трансплантационный иммунитет

Под термином «трансплантационный иммунитет» понимают каскад реакций адаптивного и врожденного иммунитета, возникающий при пересадке органа или ткани. Он является основным препятствием для неограниченного существования пересаженной ткани или органа в организме реципиента (реакция «хозяин против трансплантата»), либо приводит к иммунному поражению органов и тканей реципиента после трансплантации (реакция «трансплантат против хозяина»).

Фактически, трансплантационный иммунитет включает комплекс реакций организма: локальную воспалительную реакцию на хирургическое вмешательство, репарацию ткани, распознавание чужеродного антигена и его элиминацию. В связи с этим, иммунологическая реакция на трансплантат, как правило, носит черты как врожденного, так и приобретенного иммунитета, и включает как клеточный, так и гуморальный ответ. Эти положения являются общими для любых графтов, но особенности развития иммунного ответа, а именно, преобладание того или иного процесса в данном комплексе реакций, зависят от происхождения трансплантационного материала (аллогенный или ксеногенный), вида трансплантата (орган или ткань), сенсibilизации реципиента. В зависимости от этого различают такие типы иммунного ответа на трансплантат, как гиперострое, острое или хроническое отторжение.

1.2.1. Основные типы иммунной реакции на трансплантат

Гиперострое отторжение, как известно, является проблемой при трансплантации целых органов с воссоединением сосудистых связей предварительно-сенсibilизированным реципиентам. Оно развивается в максимально короткий срок после операции и приводит к потере трансплантата

в результате интерстициального кровоизлияния и тромбоза в течение часов, редко – дней [363, 386]. Это происходит в связи с активацией системы комплемента реципиента в ответ на антигены, экспрессированные на клетках эндотелия сосудов донорского органа. Данный процесс характерен при ксенотрансплантации для такой пары донор-реципиент как свинья-человек [127], а также при аллотрансплантации, если к антигенам донорского фенотипа у реципиента уже выработаны антитела в связи с предыдущей сенсibilизацией при переливании крови или трансплантации [144, 353]. Причиной гиперострого отторжения, развивающегося в течение первых часов после трансплантации органов животных (за исключением некоторых видов обезьян) человеку являются натуральные антитела против Gal α 1,3Gal антигенов (так называемые анти-Gal антитела) [170].

В отсутствие гиперострого отторжения любой орган или ткань после трансплантации подвергается острому отторжению, кроме тех случаев, когда пересаживаются ткани идентичных сиблингов. Острое отторжение является клеточно-опосредованным и задействует несколько типов клеток [36]. Основной мишенью для такого ответа служат молекулы главного комплекса гистосовместимости (ГКГ), экспрессированные на клетках трансплантата [45]. На этапе инициации ответа происходит презентация чужеродного антигена профессиональными антигенпредставляющими клетками (АПК) Т-лимфоцитам (индуктивная фаза) [36]. Первый сигнал распознавания чужеродного антигена, прошедший через комплекс «ГКГ-рецептор Т-лимфоцита TCR», должен быть подкреплён вторым сигналом, передаваемым посредством костимуляторных молекул CD80/CD86 на АПК и CD28 на Т-лимфоцитах. Это приводит к активации Т-лимфоцитов и их пролиферации под регуляторным влиянием IL-2 и IL-12 (пролиферативная фаза). В эффекторной фазе стимулированные Т-лимфоциты взаимодействуют с распознанным антигеном на клетках-мишенях, приводя к клеточно-опосредованному лизису и деструкции трансплантата. Острое отторжение протекает в течение недель.

Третий вид отторжения, который может развиваться при трансплантации, называется хроническое отторжение. Оно может протекать в течение лет, даже в присутствии иммуносупрессии. Еще десять лет назад большинство органных трансплантатов, которые имели начальную приживаемость $> 90\%$, утрачивались в результате хронического отторжения [328]. Патогенез хронического отторжения связан не только с активацией клеточного [398] и гуморального звена иммунитета [412], но и развитием аутоиммунных процессов и продукцией ауто-антител [388]. Основным патофизиологическим признаком хронического отторжения является фиброз сосудов трансплантата, вследствие чего наблюдается нарушение его кровообращения.

1.2.2. Особенности иммунного ответа на тканевые трансплантаты аллогенного и ксеногенного происхождения

Иммунный ответ на невааскуляризованные тканевые трансплантаты в отличие от органов, трансплантируемых с воссоединением сосудистых связей донора и реципиента, имеет некоторые особенности. Для них скорее характерно развитие острого отторжения, чем гиперострого. И, хотя впоследствии такие трансплантаты становятся неовааскуляризованными, процесс отторжения уже является запущенным через клеточно-опосредованный путь.

Событием, инициирующим отторжение, является презентация донорского антигена иммунной системе реципиента. По общепринятой классификации представление антигена может происходить по прямому и непрямому пути [36]. Прямой путь презентации включает распознавание Т-лимфоцитами молекул ГКГ на АПК донорского происхождения. $CD4^+$ Т-лимфоциты и $CD8^+$ Т-лимфоциты распознают антиген, представленный ГКГ I и II класса, соответственно. К донорским АПК, которые являются инициаторами прямого распознавания, в основном относятся дендритные клетки, пребывающие в интерстициальном пространстве тканей. Однако для тканей эндокринных желез

показана особенность, заключающаяся в том, что эти ткани богаты не только дендритными клетками, но и тканевыми макрофагами [58, 119, 218], которые также являются профессиональными АПК.

Непрямой путь презентации вовлекает в процесс распознавания АПК реципиента. Дендритные клетки и макрофаги реципиента фагоцитируют антигены донорской ткани, процессируют их и представляют в составе ГКГ II класса $CD4^+$ Т-лимфоцитам. Считается, что активация лимфоцитов вследствие представления антигена по непрямому пути менее эффективна в отличие от прямого [382].

Кроме двух вышеописанных путей презентации недавно был описан третий, названный «полу-прямым» [60, 230, 434]. Установлено, что дендритные клетки реципиента могут захватывать молекулы ГКГ из экзосом, секретируемых другими АПК, и представлять процессированный обычным образом антиген $CD4^+$ Т-лимфоцитам, а захваченный – $CD8^+$ Т-лимфоцитам, совмещая таким образом прямой и не прямой пути презентации антигена [230].

Нужно отметить, что вышеописанные механизмы презентации являются достаточно схематичными и не дают исчерпывающих объяснений всем процессам, имеющим место при пересадке чужеродной ткани. В противном случае, элиминация АПК из донорской ткани приводила бы к торможению распознавания антигена по прямому пути и, соответственно, отторжения. Однако показано, что инфильтрация иммунокомпетентными клетками встречается уже через 1 сутки после трансплантации [205]. Использование для трансплантации мышей с дефицитом звена приобретенного иммунитета (Rag-дефицитных) должно было бы приводить к уменьшению/отсутствию инфильтрации, однако в трансплантате обнаруживается клеточная инфильтрация, сравнимая по степени тяжести с животными, имеющими интактную иммунную систему [206]. Такие наблюдения приводят к заключению, что сценарий развития посттрансплантационных событий прежде всего включает в себя врожденные иммунные реакции, не связанные с

распознаванием донорских антигенов по классическому пути, а вовлечение адаптивного иммунного ответа происходит позже.

Установлено, что реакции врожденного иммунитета на трансплантат инициируются посредством так называемых паттерн-распознающих рецепторов (PRR), присутствующих практически во всех иммунокомпетентных клетках [226]. Эта реакция, как и многие реакции врожденного иммунитета, не является специфичной и реализуется в случае ишемического или механического повреждения клеток и высвобождения эндогенных молекул, способных активировать PRR. Такими молекулами, называемыми патоген-ассоциированными молекулярными паттернами (PAMP), являются нуклеотиды, углеводные и липидные молекулы [226, 339], эволюционная вариабельность которых достаточно низкая, независимо от видового происхождения. К семейству PRR принадлежат толл-подобные рецепторы (TLR), играющие важную роль в трансплантационном иммунном ответе [55], рецепторы к маннозе, сиаловым кислотам, β -гликану, лектинам [164, 179, 410].

Получение, подготовка и хранение тканевого трансплантата неизбежно приводит к появлению продуктов клеточного распада вследствие механических, ишемических и свободно-радикальных повреждений. Макрофаги, нейтрофилы и натуральные киллеры являются основным звеном врожденного иммунитета, осуществляющим распознавание повреждения и инфекции посредством PRR [163, 270]. Множество наблюдений свидетельствуют о том, что эти клетки первыми инфильтруют трансплантат в течение суток [162, 184, 197, 232, 484], тогда как Т-лимфоцитарная инфильтрация возникает на третий день [162]. По оценкам Hancock W. с соавт. [197], 40-60% клеток, инфильтрующих почечный трансплантат, составляют макрофаги. Активированные сигналами повреждения через PRR, эти клетки осуществляют первую фазу иммунного ответа на трансплантат, включая фагоцитоз некротического клеточного дебриса, секрецию провоспалительных цитокинов, стимулирующих Т-лимфоциты, а также процессинг антигенов и презентацию их Т-лимфоцитам по непрямому пути [163, 270].

Механизм иммунного ответа на ксеногенный тканевой трансплантат в общем сходен с ответом на аллогенный, однако имеет свои особенности. Основное отличие состоит в том, что Т-лимфоцитарный ответ на ксеноантигены является ослабленным/замедленным в связи с отсутствием (либо альтерацией) прямого пути распознавания [287, 363, 478]. Правомерность этого утверждения зависит от филогенетического родства донора и реципиента. Например, между близкородственными видами (человек-шимпанзе, мышь-крыса, овца-козел, утка-курица) возможна презентация ксеноантигена по прямому пути [318]. В прочих случаях неспособность ксеногенных АПК представить антиген иммунной системе реципиента приводит к реализации непрямого пути распознавания [287, 363, 478].

Несмотря на то, что иммунный ответ, развивающийся по непрямому пути, менее эффективен, отторжение ксенотрансплантата протекает агрессивнее, чем аллогraftа [66]. Это связано со более значимой ролью врожденного иммунитета в отторжении ксеногенного трансплантата по сравнению с аллогенным.

Считается, что нейтрофилы первыми инфильтруют тканевой ксенографт и, выделяя комплекс факторов (TNF- α , MIP-1 α , IP-10, IL-8), рекрутируют макрофагов в очаг отторжения [137, 163]. Известно, что активация системы комплемента индуцирует миграцию и адгезию нейтрофилов [296, 429]. Компоненты системы комплемента, в частности C3c и iC3b, способны напрямую связываться с клетками ксенографта [163, 457] и таким образом вносить свой вклад в индукцию отторжения тканевых ксенографтов.

Макрофаги являются доминирующей популяцией клеток, инфильтрующих ксенографт [161, 483]. Фох А. с соавт. было установлено, что макрофаги активируют Т-лимфоцитарную инфильтрацию и отторжение ксенографта островков свиньи [161]. Истощение макрофагов с помощью липосом, нагруженных хлоридом, уменьшало отторжение островков свиньи [161, 483].

Таким образом, иммунный ответ на тканевой трансплантат изначально стимулируется посредством реакций системы комплемента и PAMP-PRR, интенсивность которых в случае распознавания ксеноткани более высокая, чем аллоткани. Отторжение как алло-, так и ксенографта имеет бимодальный характер, основанный на взаимодействии врожденного и адаптивного иммунитета. Особенности этого процесса в случае распознавания ксеногенного или аллогенного трансплантата состоят в различном участии реактивных субпопуляций клеток иммунной системы в деструкции чужеродной ткани.

1.3. Способы иммуномодуляции тканевого трансплантата

Трансплантационный иммунитет является основным препятствием пролонгированного существования алло- или ксенографта в организме реципиента. Основным способом подавления отторжения трансплантата является иммуносупрессивная терапия, неспецифически подавляющая иммунный ответ организма на любые антигены. Иммуносупрессивная терапия не всегда применяется в тканевой трансплантологии из опасений тяжелых системных осложнений и превышения ее негативного влияния над эффективностью результата. Кроме того, в случае трансплантации клеток эндокринного происхождения применение иммуносупрессивных препаратов нежелательно вследствие негативного влияния их на гормонопоэз [346].

Для пролонгирования выживаемости тканевых трансплантатов используются подходы, основанные на изменении их иммуногенности. Основой для этого являются представления об АПК, присутствующих в норме в любой ткани. Очевидно, что удаление АПК из ткани повлияет на процессы ее распознавания при трансплантации, в частности, сделает невозможным реализацию представления антигена по прямому пути. Для изменения иммуногенности тканевых трансплантатов используются некоторые общепринятые способы, перечисленные ниже.

1.3.1. Культивирование ткани

Более 30 лет назад Лафферти К. с соавт. [265, 425] продемонстрировали, что основные иммуногенные стимулы, приводящие к острому отторжению трансплантата, обеспечиваются мигрирующей популяцией аллогенных пассажирных клеток, присутствующих в ткани трансплантата. Феномен

элиминации АПК из ткани в процессе культивирования был установлен вначале на примере ткани щитовидной железы, и несколько позднее подтвержден на других видах ткани (поджелудочной железе, почке) [82, 271].

Нужно отметить, что установленный факт пролонгирования выживаемости ткани после предтрансплантационного культивирования помог развить концепцию о прямом распознавании антигена при аллотрансплантации, сформулированную Снеллом [405].

Для удаления АПК из ткани использовалось культивирование в субфизиологических условиях, а именно, условиях гипербарической оксигенации (95% O₂) [216, 217, 266, 365, 416, 425, 426], закисления среды [267], пониженной до 22-24°C температуры [72, 263]. Rutzky L. с соавт. было установлено, что иммуногистохимическая реакция на клетки, экспрессирующие ГКГ II класса, в том числе и дендритные, исчезала на 7 сутки культивирования островков поджелудочной железы в условиях повышенного содержания O₂ [365]. Удаление дендритных клеток из ткани, по мнению одних авторов, наблюдается в результате их активации в ответ на «сигналы опасности» и миграции [335], а по мнению других – в связи с их гибелью вследствие высокой чувствительности к условиям среды [272].

Результатом культивирования ткани щитовидной железы в условиях гипербарической оксигенации явилась, по данным Hullett D.A. с соавт. [216], 100%-я выживаемость аллогraftов, в то время как все реципиенты некультивированных graftов отторгли их в течение 35 дней. Интересно, что снижение температуры культивирования до 5°C уменьшало эффективность элиминации АПК на 80% [452]. Отторжение graftов, истощенных по АПК, можно было иницировать вновь введением донорских иммунных клеток реципиенту (спленоцитов, клеток перитонеального экссудата) [268, 315, 470].

Анализируя результаты трансплантации, можно отметить, что культивирование ткани увеличивает ее выживаемость, но не приводит к полному принятию аллогraftов [82, 425]. Это говорит о том, что в отсутствие

прямого пути распознавания антигенов наблюдается переключение реакций распознавания иммунной системой реципиента на другие возможные пути.

1.3.2. Криоконсервирование ткани

Использование гипотермического и низкотемпературного хранения ткани перед трансплантацией, кроме непосредственного органо-сберегающего эффекта, может иметь, как было показано некоторыми исследователями, и иммуномодулирующее действие [246, 249, 322, 407, 489]. Доказательствами этого являлись факты пролонгированной выживаемости криоконсервированных аллографтов по сравнению со свежеполученными. Установлено, что криоконсервированные трансплантаты сосудов, периферических нервов, овариальной ткани, клеток сердца характеризовались меньшей инфильтрацией иммунокомпетентными клетками, чем свежевыделенные [199, 407, 468, 474]. N. Solanes оценивает это уменьшение в 60%, причем при дополнительной аппликации иммуносупрессанта (циклоспорина) краткосрочная выживаемость криоконсервированных трансплантатов увеличилась до 100% [407]. Авторы отмечают, что в свежеполученных аллотрансплантатах наблюдалось острое отторжение, тогда как в криоконсервированных реакция была охарактеризована как хроническое отторжение. В работах [220, 245, 489] было установлено уменьшение стимуляции пролиферации лимфоцитов в смешанной реакции криоконсервированными кардиомиоцитами, клетками клапанов аорты и кожи.

Теоретическая основа для объяснения феномена изменения иммуногенности ткани после криоконсервирования была заложена работами Taylor M.J. с соавторами [430, 431, 432], где было показано, что макрофаги и дендритные клетки, присутствующие в тканях, имеют высокую чувствительность к охлаждению [430, 432]. Оптимум выживаемости лимфоцитов, макрофагов и дендритных клеток был установлен в диапазоне скорости охлаждения 0,3-5°C/мин [430, 432]. Наблюдалось уменьшение количества лимфоидных клеток на 10-40% при охлаждении со скоростью

20°C/мин и полное отсутствие при скорости охлаждения более 75°C/мин [431]. Авторами было высказано предположение, что при использовании режима замораживания, убивающего АПК, но оставляющего жизнеспособными остальные, возможно добиться уменьшения иммуногенности пересаживаемой ткани.

Справедливости ради нужно отметить, что в ряде исследований не было установлено отличий иммуногенности нативных и криоконсервированных аллографтов [87, 91, 381, 442]. Более того, состояние криоконсервированных аллографтов было во многих случаях ухудшенным. Например, фиброзные изменения наблюдались в криоконсервированных аллотрансплантатах ткани аорты скорее, чем в свежих [442].

Таким образом, возможность иммуномодуляции трансплантатов с помощью замораживания остается недостаточно изученной. Основным вопросом, который требует освещения, является вопрос о том, преобладает ли эффект элиминации АПК с помощью использования высоких скоростей охлаждения над эффектом стимуляции повреждения паренхиматозных клеток в процессе криоконсервирования.

1.3.3. Другие способы иммуномодуляции

Кратко характеризуя другие способы иммуномодуляции ткани для последующей трансплантации, можно назвать УФЛ-облучение и обработку антителами, а также некоторыми иммуномодулирующими агентами.

В работе He Y.G. с соавт. установлено, что предобработка аллографта роговицы УФЛ приводит к резкому снижению эпизодов и темпов его отторжения [207].

Резонно было предполагать, что обработка трансплантата антителами к антигенам ГКГ II класса приведет к пролонгированию его выживаемости. Однако в нескольких экспериментальных работах была доказана неэффективность этого способа [56, 91, 157, 180]. Например, несмотря на то, что после обработки моноклональными антителами и комплементом

количество ГКГ класс II -позитивных клеток в островках уменьшалось, улучшения выживаемости их после аллотрансплантации не наблюдалось [157]. Нужно отметить, что, возможно, при этом важен способ обработки антителами, так как в работе Lloyd D.M. с соавт. [281] было показано уменьшение иммуногенности островков после предобработки данными антителами только после 3-часовой нормотермической перфузии. Интересно, что обработка антителами к антигенам ГКГ I класса была более продуктивной для иммуномодуляции островкового аллографта. В работе [418] с помощью смешанной лимфоцитарной реакции было продемонстрировано ингибирование генерации цитотоксических Т-лимфоцитов в ответ на островки, прошедшие предобработку.

Отдельно требует обсуждения данный способ иммуномодуляции в случае ксенотрансплантации ткани свиней. В связи с возможностью в будущем использовать свиней в качестве альтернативного донора для трансплантации, активно ведутся работы по иммуномодуляции различных тканей именно этого вида. Известно, что гиперострое отторжение провоцируется присутствием α -галактозных эпитопов на клетках свиного происхождения. Установлено, что обработка нейрональной ткани свиньи антителами к этим антигенам в комбинации с комплементом отменяет пролиферативный Т-клеточный ответ на ксенотрансплантат и улучшает результативность лечения паркинсонизма в экспериментальной модели на 50% [93, 94]. В целом, этот способ модуляции иммуногенности ксенотрансплантата свиной ткани оценивается как перспективный для избегания реакции гиперострого отторжения [126, 127], хотя и не снимает вопросы, связанные с острым и хроническим отторжением свиных ксенотрансплантатов.

В экспериментальных моделях также существует способ обработки ткани перед трансплантацией некоторыми химическими агентами, которые могут оказывать иммуномодулирующее действие. Например, фосфатидилэтаноламин, ковалентно связанный с гиалуроновой кислотой, ингибирует IFN- γ -индуцированную экспрессию молекул ГКГ класса II при культивировании

клеток эндотелия и почечных канальцев, а также угнетает пролиферацию Т-лимфоцитов в смешанной культуре и секрецию IL-2, IFN- γ , IL-10. [486].

В работе [182] использовали для обработки ткани параситовидной железы донор-специфическую антилимфоцитарную сыворотку, однако эффекта уменьшения иммуногенности не было достигнуто.

Таким образом, обработка растворимыми агентами может привести не только к уменьшению иммуногенности ткани, но и к химической модификации клеточных мембран, что будет негативно сказываться на функции трансплантата в отдаленные сроки.

1.4. Основы иммунологической толерантности к трансплантату

Существует несколько определений иммунологической толерантности. По определению, данному Ройтом А. с соавт. [36], «иммунологическая толерантность – это состояние ареактивности в отношении того или иного антигена; ее индуцирует предшествующий контакт с этим антигеном». Дополнением к этому является определение Womer K.L. [480]: «Иммунологическая толерантность – ареактивность иммунной системы к одному набору антигенов при сохранении реактивности на другие антигены».

Трансплантационная толерантность – частный случай иммунологической толерантности – определяется как «отсутствие деструктивного иммунного ответа к трансплантату без применения генерализованной иммуносупрессии» [479]. При этом трансплантационная толерантность не означает полное отсутствие реакции иммунной системы на трансплантат [422]. В клинике рабочее определение трансплантационной толерантности звучит как «отсутствие острого и хронического отторжения и неопределенно долгая выживаемость трансплантата с нормальной функцией в организме иммунокомпетентного реципиента» [411].

Развитие представлений об иммунитете привело к пониманию того, что ответ организма на чужеродные антигены генетически недетерминирован, а значит, существует возможность его коррекции. Однако для коррекции реактивности иммунной системы на трансплантат необходимо изучение механизмов толерогенеза.

1.4.1. Основные механизмы иммунологической толерантности

Т-лимфоциты являются ключевым элементом иммунной системы, на который направлены стратегии толеризации организма к собственным и чужеродным антигенам.

Существуют три основных механизма индукции иммунологической толерантности на антигены [61, 254, 479, 480]:

- клональная делеция;
- клональная анергия;
- регуляция/супрессия.

Кратко характеризуя каждый из этих механизмов, можно отметить следующее.

Клональная делеция подразумевает физическое удаление Т-клеток из репертуара на той или иной стадии их жизненного цикла [36]. Она совершается как в тимусе (центральная), так и вне его (периферическая). При делеции после активации антигеном Т-клетки погибают в результате апоптоза, индуцированного Fas, TNF и CTLA-4.

Клональная анергия – это непосредственное ингибирование механизма иммунного ответа за счет снижения экспрессии Т-клеточных рецепторов и корецепторных молекул вследствие активирования Т-клеток и в условиях постоянной стимуляции [36]. Отсутствие сигнала 1 (косигналинг без сигнала через Т-клеточный рецептор) или 2 (активация Т-клеточного рецептора без корецепторов) при стимуляции Т-лимфоцитов, а также высокодозовая мощная антигенная стимуляция являются индукторами клональной анергии. Однако в последнее время анергию рассматривают как одно из звеньев непрерывного процесса, включающего активацию Т-клеток, снижение экспрессии рецепторов и их гибель в случае достаточной силы и продолжительности антигенного стимула [36].

Регуляция или супрессия состоит в подавлении Т-клеточной активности в результате взаимодействия с другими клетками, в частности продуцирующими цитокины-ингибиторы, или с идиотип-специфичными лимфоцитами, распознающими антигенспецифичный рецептор. Основными регулирующими

факторами являются: 1) сигналинг посредством цитокинов IL-10, TGF-beta и ингибиторных рецепторов Т-клеток CTLA-4 и PD-1 [36, 118, 240]; 2) регуляторные Т-лимфоциты с фенотипом $CD4^+CD25^+FoxP3^+$ [320]; 3) незрелые дендритные клетки [118, 280]; 4) супрессорные клетки миелоидного происхождения (myeloid derived suppressor cells) с фенотипом $CD11b^+Gr-1^+$ [273].

Современные экспериментальные и клинические подходы в трансплантологии охватывают различные стратегии достижения толерантности к аллографту, однако, механизмы, которые при этом задействованы, так или иначе будут включать три вышеназванных.

1.4.2. Предтрансплантационная донор-специфическая трансфузия как стратегия индукции толерантности к аллографту

Клинические наблюдения за выживаемостью трансплантатов от живого родственного донора продемонстрировали несколько парадоксальный вывод о том, что предтрансплантационное переливание крови в большинстве случаев не сенсibiliзирует иммунную систему реципиента к аллографту, а, напротив, продляет его выживаемость и уменьшает частоту и силу кризов отторжения [368]. Впоследствии эти наблюдения получили многочисленные подтверждения [392, 453, 308, 138, 88, 89].

В клинической практике донор-специфическая трансфузия (ДСТф) крови или лейкомассы проводится обычно за сутки перед трансплантацией и в дальнейшем сочетается с иммуносупрессией циклоспорином, преднизолоном и азатиоприном.

Несмотря на то, что эффект донор-специфической трансфузии известен достаточно давно, конкретный механизм этого явления до конца не выяснен. В различных экспериментальных исследованиях установлено, что механизм иммуномодулирующего действия ДСТф включает клональную делецию [222, 485], клональную анергию [423], генерацию регуляторных Т-лимфоцитов [351,

458], регуляцию цитокинов, микрохимеризм [279] или комбинацию этих факторов [89, 423, 485].

В исследованиях Yang L. с соавт. было установлено, что после трансфузии основная масса донор-реактивных Т-клеток элиминируются в организме реципиента в течение нескольких дней или недель в результате клональной делеции, однако небольшая популяция остается, что может быть необходимым для поддержания периферической толерантности [485]. Авторы предполагают, что возможны три причины пребывания таких клеток на периферии после ДСТф, это клетки: 1) не встретившие донорский антиген; 2) вновь поступившие из тимуса; 3) устойчивые к клональной делеции регуляторные клетки, осуществляющие поддержание толерантности к трансплантату.

На модели трансгенных мышей, дефицитных по антигенам ГКГ класса I и II в работе Kishimoto K. с соавт. [250] была установлена ведущая роль непрямого пути распознавания пептидов антигенного комплекса ГКГ в механизме индукции толерантности после ДСТф.

В 2009 году было проведено масштабное ретроспективное исследование клинических результатов ДСТф с использованием наибольших медицинских баз данных за период 1966-2009 гг. [291]. В исследовании отмечается, что впервые положительное влияние ДСТф при пересадке органов от живого родственного донора, различающегося с реципиентом по одному гаплотипу, было установлено Salvatierra с соавт. [368].

В небольшом (n=30) рандомизированном исследовании Sharma R. с соавт. [393] показали, что ДСТф за 24 часа до трансплантации на фоне иммуносупрессивной терапии циклоспорином за три дня и при последующем непрерывном приеме триады (циклоспорин, преднизолон, азатиоприн), приводила к урежению кризов отторжения в среднем в 4 раза. Sonoda T. с соавт. проанализировали данные трансплантационного регистра Японии (n=1292). Было установлено, что при трансплантации от родственного донора с различием по одному ГКГ гаплотипу на фоне циклоспориновой

иммуносупрессии 4-годовая выживаемость трансплантата при ДСТф составила 93,5%, тогда как выживаемость в группе сравнения (без ДСТф) была 62,7% [408].

Прочие рандомизированные исследования показали не столь успешные результаты ДСТф [57, 59, 297, 135, 159, 274, 275, 337, 379]. Например, Martí Н. с соавт. провели анализ долгосрочной выживаемости аллографтов (n=61) как родственных, так и неродственных доноров [297]. Несмотря на то, что процент выживаемости трансплантата был выше в группе с ДСТф в первый год, однако 6-летняя выживаемость статистически не отличалась от группы сравнения. При этом у 10% реципиентов вследствие ДСТф развивалась сенсibilизация к донорским антигенам, что не позволило сделать трансплантацию.

В исследовании Otsuka М и др. [337] не было установлено никаких существенных различий в выживаемости трансплантата на 5- и 10-летнем сроке между двумя группами (с ДСТф и без таковой), а также не обнаружено разницы в частоте кризов острого отторжения в течение 3 месяцев после трансплантации. Сенсibilизация реципиентов после ДСТф составила 7,5%, а у одного пациента развилась ЦМВ-инфекция.

В целом, современные рандомизированные контролируемые исследования не демонстрируют преимуществ ДСТф для выживаемости аллографтов более 2 лет. Кроме того, авторы отмечают, что потенциальные выгоды от ДСТф должны быть взвешены по сравнению с риском сенсibilизации (около 10%) и инфекции [291].

Таким образом, эффективность ДСТф, показанная в экспериментальных моделях, может быть оспорена клинической нерезультативностью и возможными осложнениями переливаний. Однако, вероятно, выяснение цепи иммунологических событий, приводящих к индукции толерантности после ДСТф, приведет к более предсказуемым результатам трансплантации.

1.4.3. Иммунная толерантность печени

Эффект толерантности печени был впервые описан в 1969 году, когда было продемонстрировано на модели трансплантации у свиньи в ГКГ несовместимой паре донор-реципиент, что печеночный аллогraft принимается без иммуносупрессии [102].

Уникальная толерантность печени развивается в течение жизни вследствие того, что она постоянно сталкивается с чужеродными веществами – производными продуктов питания и микробными антигенами из кишечника. Очевидно, что печени при такой антигенной стимуляции необходимо иметь специальные механизмы толерантности, чтобы предотвратить риск гиперактивации иммунитета.

Более поздние исследования показали, что реципиенты печеночных аллотрансплантатов принимают другие аллогraftы от того же донора (сердце, почки, кожа), в то время как трансплантаты другого происхождения отторгаются [73]. Кроме того установлено, что эффект оральной толерантности связан с печенью, так как он может быть отменен при портокавальном шунтировании [100, 472]. Более того, хронические инфекционные заболевания, такие как гепатиты В, С или шистосомоз, персистируют в организме, несмотря на развитие иммунного ответа, что также, вероятно, связано с толерогенными свойствами печени. В пользу толерантности печени также говорят факты о том, что некоторые виды опухолей, такие как злокачественная меланома или рак толстой кишки, часто метастазируют в печень и таким образом, вероятно, уклоняются от иммунного надзора [437].

Очевидно, что для обеспечения подобного толерогенеза, печень должна содержать специализированные клетки, опосредующие уникальные свойства этого органа.

В печени наблюдается уникальный тип межклеточных взаимоотношений, связанный с анатомическими особенностями ее микроциркуляции. Подсчитано, что весь объем крови организма проходит через печень 360 раз в день [255]. Функциональной микроциркуляторной единицей печени является синусоид. Стенку синусоида выстилает один ряд эндотелиальных клеток (liver sinusoidal

endothelial cells, LSEC), которые имеют отверстия (фенестрации) приблизительно 100 нм в диаметре. Таким образом, стенка печеночного синусоида является прерывистой, что облегчает обмен между кровью и гепатоцитами. В пространстве синусоида находятся резидентные макрофаги печени, называемые клетками Купфера (КК), а между гепатоцитами и эндотелием синусоидов существует перисинусоидное пространство (пространство Диссе), в котором находятся звездчатые клетки (hepatic stellate cell, HSC). Узкий диаметр синусоидов (5-7 мкм) и низкая скорость тока крови в них облегчает контакт между лейкоцитами крови и клетками печени. Проходя через печень с кровотоком, антигены и лейкоциты прежде всего взаимодействуют с КК и LSEC.

LSEC и КК имеют фенотип и свойства, присущие классическим антиген-представляющим клеткам [130, 255, 471]. Предполагается, что особенности процесса презентации антигена этими клетками и лежат в основе явления порտальной толерантности.

LSEC являются той самой клеточной популяцией печени, которая первой входит в контакт с антигеном и может представлять его классическим образом через ГКГ II класса $CD4^+$ Т-лимфоцитам [256], а также кросс-презентацией через ГКГ I класса $CD8^+$ Т-лимфоцитам [441]. В эксперименте было показано, что патоген-ассоциированные молекулярные комплексы вызывают полное функциональное созревание LSEC с последующим превращением их в профессиональные АПК, несущие на своей поверхности не только молекулы ГКГ классов I и II, но и все необходимые для активации Т-лимфоцитов корцепторы. Удобная локализация LSEC дает им возможность постоянно контактировать с циркулирующими лимфоцитами и влиять на их активность. Активация эффекторных Т-клеток является потенциально опасной для печени и должна быть строго контролируемой во избежание ее аутоиммунного поражения.

В связи с этим, представление антигена LSEC наивным $CD4^+$ Т-лимфоцитам направляет их дифференцировку не в провоспалительные

эффекторные клетки, а в сторону развития иммуносупрессорного регуляторного фенотипа $CD4^+CD25^+Foxp3^+$ Т лимфоцитов (Treg cells), которые поддерживают развитие иммунологической толерантности. В ответ на стимуляцию липополисахаридами в LSEC наблюдается уменьшение экспрессии молекул адгезии, а также молекул CD80, CD86, ГКГ II класса [256]; дефицит выработки IL-12, ответственного за стимуляцию провоспалительного ответа по Th1-пути [256]; Fas/FasL, опосредующий апоптоз Th1-клеток [336]. Кросс-презентация захваченных антигенов через ГКГ I класса $CD8^+$ Т-лимфоцитам в печени вызывает ингибирование развития наивных $CD8^+$ Т-лимфоцитов в эффекторные цитотоксические лимфоциты, обеспечивая таким образом иммунологическую клеточную толерантность к пищевым антигенам [441].

КК составляют примерно 30% от всех клеток печеночного синусоида [341]. Одной из важнейших функций КК является очищение циркулирующей крови от различных эндотоксинов. Они отлично поглощают вирусы, бактерии, грибы, раковые клетки, липосомы и др. микрочастицы. Выделяют три субтипа КК по месту их локализации: околопортальные (periportal), промежуточные (midzonal) и околососудистые (perivenous) [341]. Между собой они имеют некоторые различия. Околопортальные КК крупнее, имеют более высокую лизосомальную и фагоцитарную активность, нежели КК двух других зон. Выделяемые КК цитокины также различаются, например: более крупные КК выделяют преимущественно IL-1 и α -TNF, в то время как высокий уровень секреции NO был отмечен в мелких макрофагах. Таким образом, различные регионы печени имеют различные профили эффекторных и сигнальных молекул, что особенно важно в случае локально действующих молекул, таких как NO.

КК играют важную роль в обеспечении толерантности организма как к тканевым аллографтам, так и к растворимым антигенам. Была показана сниженная способность КК активировать Т-лимфоциты *in vitro* в сравнении с макрофагами и дендритными клетками костного мозга и селезенки [471]. Кроме

того, Т-лимфоциты, активированные КК, продуцируют значительно меньшее количество IL-2. В опытах на культуре КК показали, что это может зависеть от нескольких факторов. Для эффективной активации лимфоцитов необходимо два сигнала: от ГКГ 1, связанного с антигеном (первый сигнал), и от корецепторов CD40 и B7-1, B7-2 (второй сигнал). Причиной сниженной способности КК активировать лимфоциты является редуцированное проведение первого сигнала и неэффективное представление антигена. Кроме того, макрофаги выделяют PGE₂ и 15d-PGJ₂, которые оказывают сильное ингибирующее влияние на активируемые лимфоциты. Эти клетки в норме экспрессируют лиганд иммуноингибиторного рецептора PD-1 [471]. Взаимодействие между PD-1L лигандом КК и PD-1 рецептором активированного Т-лимфоцита приводит к угнетению пролиферации последнего [151]. Также было показано, что КК играют основную роль в аккумуляции активированных CD8⁺ Т-лимфоцитов в печени, модифицируя таким образом общий иммунный ответ организма [130].

Под постоянным воздействием липополисахаридов КС и LSEC продуцируют иммуносупрессорные цитокины IL-10 и TGF- β , а в ответ на паракринное или аутокринное выделение TGF- β гепатоциты также продуцируют IL-10. HSC также способны выделять TGF- β при активации. Под действием иммуносупрессорных цитокинов происходит направление дифференцировки наивных CD4⁺Th0 не в Th1 или Th2, а в сторону развития регуляторного фенотипа CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ Т лимфоцитов (Treg cells), которые поддерживают развитие иммунологической толерантности. Кроме того, эти цитокины не только влияют на дифференцировку Т-клеток, но и способны поддерживать толерантность в печени за счет ингибирования созревания АПК и снижения вследствие этого эффективности воздействия последних на Т-клетки. В дендритных клетках печени в присутствии высоких количеств липополисахаридов и других эндотоксинов был отмечен низкий уровень экспрессии TLR4 [256]. Это частично объясняет их невосприимчивость ко многим специфическим лигандам, что ведет к редуцированной или измененной

активации адаптивного ответа и поддержанию иммунологической толерантности печени

Нужно отметить, что спектр иммунных клеток печени не ограничивается вышеописанными типами и содержит также резидентные лимфоциты печени: натуральные киллеры (НК), натуральные киллеры-Т (НКТ), $CD4^+$ Т-лимфоциты, $CD8^+$ Т-лимфоциты, В-лимфоциты, TCR- $\gamma\delta$ клетки, а также миелоидные $CD11c^+CD8\alpha^-CD11b^+$ и лимфоидные $CD11c^+CD8\alpha^+CD11b^-$ дендритные клетки. Экспериментальные исследования, проведенные в работе [103], позволяют говорить о том, что гепатоциты также действуют как специализированные АПК и вносят свой вклад в поддержание состояния толерантности печени. Звездчатые клетки печени обладают иммуномодулирующими свойствами и способны осуществлять локальный ингибиторный эффект. В работе [112] было показано, что аллогенные островки, трансплантированные совместно с HSC, были защищены от отторжения.

В последние годы установлено, что характерной чертой иммунологического профиля печени является большое количество НК и НКТ клеток, преобладание $CD8^+$ Т-лимфоцитов над $CD4^+$ Т-лимфоцитами, дефицит В-лимфоцитов [130]. Так, в периферической крови соотношение $CD4^+$ Т-лимфоцитов к $CD8^+$ составляет 2:1, в печени же оно смещено в сторону $CD8^+$ лимфоцитов и составляет 1:2,5, а значительное количество Т-лимфоцитов имеет не $\alpha\beta$ TCR, а $\gamma\delta$ TCR рецепторы. Кроме того, лишь 6% от всех лимфоцитов печени составляют В-лимфоциты. Такой особый набор иммунокомпетентных клеток задает свои условия развития иммунного ответа.

Таким образом, особенности развития иммунного ответа на антиген в печени связаны с уникальностью ее клеточного «оркестра», где каждый тип иммунокомпетентных клеток играет свою роль на определенном этапе.

1.4.4. Введение донорских клеток в портальную вену как способ индукции толерантности

Использование печени как сайта для трансфузии донорских клеток в целях индукции донор-специфической толерантности (ДСТ) имеет глубокий физиологический смысл. Естественно полагать, что, если печень толеризует организм к множеству пищевых антигенов, то таким же образом можно попытаться добиться индукции толерантности к донорскому органу при трансплантации. Однако в таком случае принципиально важным является маршрут попадания донорского антигена в организм для первичной его презентации. Он должен соответствовать природному, который включает в себя попадание богатой антигенными пептидами крови в портальный кровоток печени. Доказательством важности использования портальной системы печени для индукции толерантности являются факты достижения ДСТ после перорального приема антигена [139, 177, 319], а также сравнительный анализ результатов введения донорских клеток в периферический кровоток либо портальную вену. Множество фактов указывает на значительную эффективность последнего способа для индукции ДСТ к трансплантируемому органу. Например, в экспериментальной работе Dhanireddy K. K. с соавт. [141] средняя выживаемость почечного трансплантата при введении клеток костного мозга интрапортально (и/п) составила 24 суток, а внутривенно (в/в) – 14. Gorczynski R.M. с соавт. указывает сроки для выживаемости почечного трансплантата около 20 суток для групп без обработки и с в/в введением клеток, тогда как и/п трансфузия приводила к двукратному увеличению срока выживаемости [177]. Сходный результат увеличения выживаемости был получен при трансплантации кожи у свиней, когда средняя выживаемость аллографтов при в/в введении равнялась 28 суткам, а при и/п >300 [316].

В [324] с помощью флуоресцентного маркера РКН26 было показано, что меченные спленноциты, введенные в/в также обнаруживаются на 3 сутки в печени, однако их в три раза меньше, чем при и/п инъекции. Интересно, что на 7 сутки количество меченых клеток статистически не отличалось между собой. Вероятно, для индукции толерантности необходим повышенный уровень

донорского антигена, который и приводит к специфической гипореактивности организма к трансплантату.

Эффект ДСТ достаточно подробно изучен на экспериментальных моделях [142, 294, 317, 467, 481], а также в клинике [376, 445, 446]. Несмотря на это полной ясности в механизме индукции интрапортальной ДСТ до сих пор нет. Существует множество фактов, свидетельствующих об одной или другой стороне феномена, однако полной картины пока так и не сложилось.

Известно, что повторные и/п донор-специфические трансфузии позволяют быстро снизить дозу иммуносупрессантов без опасности кризов острого отторжения при трансплантации печени от АВО-несовместимого донора в клинике [338, 375, 378]. В эксперименте Diaz-Peromingo J.A. с соавт. [142] установили наибольшее увеличение срока выживаемости кожного трансплантата наблюдалось после повторных и/п трансфузий. Авторы работы [338] предположили, что повторные трансфузии крови через портальную вену приводят к образованию анти-идиотипических антител, предотвращая сенсibilизацию и активацию гуморального отторжения. В этом механизме авторы отводят ведущую роль донорским НКТ-клеткам CD3+CD56+, которые могут индуцировать толерантность через механизмы вето и/или анти-идиотипической иммунной сети.

Для реализации эффекта и/п ДСТ используют клетки селезенки [219, 231, 295, 312, 364, 441], костного мозга [141, 316, 324, 397], лимфоузлов [237, 350], дендритные клетки [177, 395], мононуклеары периферической крови. В последние годы в экспериментах по индукции портальной ДСТ стали использоваться стволовые клетки [107, 446].

Эффект ДСТ был показан при аллотрансплантации целых органов (почки, сердце, печень), тканей (кишечник, кожа, периферический нерв, трахея) и островков поджелудочной железы [109, 223, 241, 295, 340, 341, 344, 376, 395, 450]. Наступление состояния толерантности к трансплантату зависит не только от места введения (периферические сосуды или портальная вена печени), но и отрезка времени между введением донорских клеток и трансплантацией.

Установлено, что наиболее эффективным способом индукции ДСТ является введение донорского антигена в портальную вену минимум за 7 дней до трансплантации [141, 374].

Вопрос о дозе вводимого донорского антигена имеет очень большое значение в иммунологии. Что касается описываемого феномена, то при индукции ДСТ используется достаточно широкий ряд концентраций вводимых клеток. Dhanireddy K. K. с соавт. установил, что повышение дозы вводимых клеток костного мозга до $1,5 \times 10^8$ кл/кг ингибирует индукцию ДСТ у приматов [141]. В работе Nakagawa K. с соавт. дозу $1,5 \times 10^8$ спленоцитов используют на одну крысу [324]. Мышам вводили $1-3 \times 10^7$ спленоцитов на одно животное в работах [177, 441] или $1,5 \times 10^8$ в работе [139]. Дозу клеток костного мозга 6×10^8 кл/свинью применяли в работе [316]. В экспериментах по трансплантации легких на собаках описаны дозы спленоцитов от 10^7 до 10^{10} , причем результат в большей степени зависел не от дозы вводимого антигена, а от использования иммуносупрессии [219]. Количественное различие вводимого антигена, вероятно, связано с разнообразием экспериментальных моделей (разные виды животных, трансплантируемые органы, типы клеток-индукторов ДСТ), причем, до сих пор не проведено исчерпывающего исследования, в котором было бы изучено влияние дозы донорского трансфузата на индукцию портальной ДСТ.

Важная роль клеток Купфера (макрофагов печени) в индукции ДСТ была установлена с помощью специфического ингибитора фагоцитоза макрофагов – хлорида гадолиния $GdCl_3$ [100, 142, 238, 324]. Введение $GdCl_3$ за сутки до трансфузии донорских клеток приводит к отмене эффекта ДСТ, причем повторные трансфузии в этом случае ускоряют отторжение последующего трансплантата [317].

Нужно отметить, что индукция ДСТ удается не в 100% случаев. Более стабильные результаты наблюдаются при использовании ДСТ в комбинации с иммуносупрессивной терапией (FK506, сиролимусом, циклоспорином) [141, 177, 223, 316, 395] или блокадой костимуляции [278]. Интересно, что

применение стероидных иммуносупрессантов предотвращает развитие толерантности [466].

В целом, даже если с помощью интрапортальной трансфузии донор-специфических клеток выживаемость трансплантата увеличивается, то впоследствии во многих случаях наступает отторжение [317]. В связи с этим, в настоящее время исследователи толерогенеза разделяют этот процесс на индукцию толерантности и поддержание толерантности. Эти звенья тесно взаимосвязаны между собой, но отличаются механизмами их реализации.

О механизмах развития алло-специфической трансплантационной толерантности написано много, как существует и множество гипотез развития ДСТ, часто противоречащих друг другу.

Например, один из сценариев развития портальной ДСТ, показанный в основном на печеночных трансплантатах [75], включает на первом этапе функциональную делецию/анергию аллореактивных Т-клеток, стимуляцию развития регуляторной субпопуляции Т-клеток на втором и возможное поддержание микрохимеризма в организме реципиента на третьем за счет существенного содержания гемопоэтических стволовых клеток в печени донора [428].

В противоречии с данными о необходимости химеризма для поддержания толерантности находится работа [141]. В ней авторы указывают, что, несмотря на то, что они дважды интрапортально вводили реципиентам клетки костного мозга в достаточном количестве, ими не было обнаружено периферического химеризма, хотя толерантность к аллогraftу наблюдалась.

Участие тимуса в индукции и поддержании портальной толерантности не требуется, так как предтрансплантационная тимэктомия у реципиентов не отменяет этот эффект [257], что говорит не о центральной, а о периферической толерантности.

Sato Y. с соавт. [373] предлагают иной сценарий, в котором основная роль отводится натуральным киллерным Т-клеткам. Они предполагают, что интрапортальное введение донорского антигена индуцирует макрохимеризм

донорских НКТ в печени реципиента, ускоряя продукцию IL-10 в раннем посттрансплантационном периоде (1 сутки) и активируя субпопуляцию $CD4^+CD25^+FoxP3^+$ регуляторных клеток в позднем.

Во многих работах отмечается необходимость персистенции донорского антигена в организме реципиента для поддержания толерантности через поляризацию продукции Th2-цитокинов Т-клетками [177, 331, 436]. В противоположность этому мнению, Morita Н. с соавт. считают, что толерантность достигается посредством анергии цитотоксических аллореактивных Т-лимфоцитов [316], однако через 2 недели после интрапортальной инъекции донор-специфическая анергия постепенно исчезает в связи с повышением продукции провоспалительных цитокинов IL-2 и IFN- γ в ответ на презентацию донорского антигена посредством АПК реципиента. Следовательно, для поддержания толерантности активность Th1-клеток должна быть подавлена, что предлагается делать с помощью циклоспориновой иммуносупрессии.

В экспериментальной работе Tokita D. с соавт. показано с использованием нокаутных мышей с недостаточностью экспрессии ГКГ II класса, что у них выживаемость сердечного трансплантата после индукции ДСТ была значительно выше, чем у обычных мышей [441]. Это говорило о том, что индукция портальной толерантности в большей степени зависит от Т-клеток с непрямой аллоспецифичностью. Соответственно, в случае презентации антигена по непрямому пути очевидной становится важная роль собственных АПК печени. В подтверждение этого предположения, в работе [441] установлено, что уже через 12 часов после и/п введения спленоцитов они были поглощены в основной своей массе клетками синусоидов печени LSEC. Поглотившие антиген LSEC начинают экспрессировать молекулы ГКГ II класса и CD80, поэтому они могут представить антиген наивным Т-лимфоцитам. Кроме того, после захвата донорского антигена в LSEC происходит активация экспрессии так называемого «рецептора смерти» FasL. Авторы предполагают,

что последующее ингибирование иммунного ответа в печени происходит посредством прямого взаимодействия LSEC и активированных Т-лимфоцитов.

Наряду с LSEC толерирующей субпопуляцией АПК печени считаются также клетки Купфера. Они секретируют значительное количество IL-10, опосредуя стимуляцию субпопуляции Т-регуляторных клеток, и кроме того могут напрямую, как и LSEC, ингибировать аллореактивные Т-клетки [490].

1.4.5. Реакция «трансплантат-против-хозяина» при индукции донор-специфической толерантности

При введении клеток иммунной системы необходимо учитывать возможность возникновения реакции «трансплантат-против-хозяина» (РТПХ). РТПХ может развиваться при условии, что происходит трансфузия клеток, обладающих иммунологической активностью, между иммунологически несовместимыми донором и реципиентом, особенно, если реципиент иммунологически некомпетентен.

В клинических условиях РТПХ в основном наблюдается как осложнение при пересадке костного мозга, когда к реципиенту применяют протокол миелоабляции, включающий облучение. В экспериментальных работах РТПХ также широко моделируется при изучении вопросов создания и поддержания макрохимеризма. Интересно, что РТПХ в эксперименте поддается моделированию у крыс, но не у мышей [123, 231].

В связи с возможностью возникновения РТПХ при индукции ДСТ в некоторых экспериментальных работах применяют трансфузию предварительно облученных донорских клеток [171, 172, 173, 204, 424, 477]. Однако в прочих исследованиях по ДСТ, несмотря на то, что вводится достаточно большое количество иммунокомпетентных клеток (10^7 - 10^8 клеток), авторы не используют облучение трансфузата [109, 141, 142, 223, 237, 295, 316, 324, 374, 397, 450].

Несмотря на важность вопроса, в литературе встречаются лишь отрывочные сведения о РТПХ при индукции ДСТ. Например, в экспериментальной работе Eid A. с соавт. [148] отмечается, что при интрапортальной инъекции клеток костного мозга облученным реципиентам в 80% случаев развивается РТПХ, в то время, как в результате введения клеток иммунокомпетентным мышам наблюдалось пролонгирование выживаемости последующего кожного трансплантата без осложнений.

В исследовании Jin Y. с соавт. [231] в сравнительном аспекте изучали введение в качестве индуцирующего портальную ДСТ агента клеток костного мозга или спленоцитов, а также их смесь. Работа интересна тем, что, во-первых, в ней был проведен контроль РТПХ, а, во-вторых, крысам вводили значительные дозы иммунных клеток: 5×10^7 спленоцитов, 10^8 клеток костного мозга или совместно в названных концентрациях. В результате ни клинических, ни гистологических проявлений РТПХ обнаружено не было.

В противоречии с этими данными находятся результаты работы Miyauchi T. с соавт. [312], в которой перед трансплантацией тонкого кишечника крысам вводили и/п либо в/в 10^8 спленоцитов. Авторы диагностировали слабую или смертельную степень РТПХ практически у всех экспериментальных групп животных. Однако, по мнению самих авторов, эти результаты все же вызывают некоторое сомнение, так как диарея могла быть вызвана самой трансплантацией кишечника, не будучи симптомом РТПХ. Кроме того, гистологических исследований состояния кожных покровов и массы селезенки проведено не было. Нужно также отметить, что слабая выраженность РТПХ в этом исследовании была у животных с и/п трансфузией спленоцитов, тогда как летальная степень наблюдалась в группах с в/в введением.

Результаты работы Gruessner R.W. с соавт. [190] прямо противоположны, хотя в ней также изучалась трансплантация кишечника. Таким образом, контролирование РТПХ после индукции ДСТ является необходимым, особенно для разработки клинических протоколов.

В заключении можно отметить, что индукция аллоспецифической трансплантационной толерантности путем предварительной инокуляции донорского антигена является перспективным подходом, однако он должен быть тщательно выверен в связи с риском аллоспецифической сенсibilизации и РТПХ у реципиента.

1.5 Роль протеасом в молекулярных механизмах презентации антигена

Презентация антигена Т-клеткам, как известно, происходит в обязательной его ассоциации с молекулами ГКГ на АПК (ГКГ-рестрикция). Для того, чтобы быть представленным в составе комплекса гистосовместимости, антиген должен претерпеть процессинг, в ходе которого внутриклеточные системы расщепляют его и загружают лишь небольшой фрагмент в ГКГ.

1.5.1. Основные механизмы процессинга антигена

Процессинг антигена условно делят на два этапа: фагоцитоз антигенного агента (эндоцитоз, пиноцитоз) и расщепление его клетками иммунной системы, способными к фагоцитозу [36, 46, 52]. К профессиональным фагоцитирующим клеткам относятся макрофаги, нейтрофилы, моноциты, дендритные клетки [152].

Фагоцитоз включает в себя несколько стадий: 1) хемотаксис; 2) распознавание объекта и адгезия; 3) активация мембраны фагоцита и образование фагосомы; 4) образование фаголизосомы; 5) киллинг и расщепление антигена; 6) выброс продуктов деградации антигена [36, 46, 52].

Положительный хемотаксис осуществляется за счет веществ, выделяемых в очаге воспаления, к которым относятся цитокины группы

хемокинов, гистамин, компоненты системы комплемента, тромбин, фибрин, некоторые продукты протеолиза.

Распознавание объекта фагоцитоза осуществляется за счет рецепторов, представленных на мембране фагоцита. К таким рецепторам, прежде всего, относятся специфические рецепторы к Fc-фрагменту иммуноглобулинов (FcγR, FcαR, FcεR), связывающие иммунные комплексы и опсонизированные объекты [234, 361]. Основными опсонинами являются четыре группы сывороточных белков: IgG, C3 (C3b), фибронектин, С-реактивный белок. Другая большая группа рецепторов – семейство лектинов С-типа – распознают фрагменты полисахаридных групп (глюкозы, галактозы, фукозы, маннозы), в значительном количестве содержащиеся в стенках бактерий [36, 46, 52].

Фагоцитоз также запускается при взаимодействии с паттерн-распознающими рецепторами (PRR), в том числе с толл-подобными (TLR) [78, 305], рецепторами белков теплового шока [70, 404], а также рецепторами комплемента [36].

После рецепции и запуска каскада сигнальных реакций через семейство Rho-ГТФаз [196] происходит инвагинация мембраны фагоцита, которая включает в себя Ca²⁺-зависимые реакции цитоскелетных и цитоплазматических белков, обволакивание объекта, замыкание мембраны с образованием фагосомы. Наряду с фагоцитозом в профессиональных АПК происходит процесс макропиноцитоза, позволяющий захватывать большие количества жидкости из окружающей среды. Такой «забор проб» позволяет АПК организма постоянно осуществлять контроль иммунологического состояния.

Слияние фагосомы с лизосомой и гранулами на следующем этапе приводит к созданию фаголизосомы, в которой и происходит расщепление объекта фагоцитоза. Выделяют два пути внутриклеточного расщепления: кислород-независимый и кислород-зависимый [36, 46]. В первом случае происходит киллинг объекта фагоцитоза посредством выброса из гранул лактоферрина, лизоцима, катионных белков. При втором способе наблюдается

резкое повышение интенсивности метаболизма кислорода в фагоците – «дыхательный взрыв», при котором продуцируются высокореактивные кислород-содержащие соединения (супероксид, синглетный кислород, гидроксильный радикал (ОН⁻), пероксид водорода, НСlО⁻) способные эффективно обезвреживать патогены. Химическая деградация объекта фагоцитоза протекает при участии протеолитических и гидролитических ферментов.

Некоторые пептиды, образовавшиеся в ходе деградации, участвуют в качестве «визитной карточки» для презентации поглощенного объекта фагоцитоза иммунной системе организма. Презентация антигена далее может проходить двояким образом – посредством представления в комплексе с молекулами ГКГ I либо II классов [447]. Экзогенный антигенный объект процессируется для представления в составе молекулы ГКГ II класса и является ключевым этапом иммунного ответа на различные патогены, а также трансплантат. Процессинг антигена для презентации в составе молекулы ГКГ I класса в большей степени служит для самотестирования организма на предмет дефектных и мутировавших клеток. Однако существует возможность презентации экзогенного антигена в составе ГКГ I класса – кросс-презентация [36, 46, 52].

Молекулы ГКГ II класса поступают в фаголизосомы, где встречаются с фрагментами процессированных экзогенных антигенов. Сборка молекул ГКГ II класса происходит в эндоплазматическом ретикулуме под защитой связи с инвариантной цепью I_i от случайного образования комплекса с пептидами внутриэндоплазматического пространства. После чего происходит транспорт молекул в составе самостоятельной вакуоли через комплекс Гольджи в фаголизосому [36]. В фаголизосоме протеолитическое разрушение цепи I_i регулируется соотношением между катепсином S и цистатином C [348]. После снятия таким образом «запрета» молекулы ГКГ II класса могут свободно взаимодействовать с антигенными пептидами. Комплексы ГКГ II-пептид

перемещаются к плазматической мембране АПК и становятся доступны для распознавания эффекторными клетками.

Протеолиз, протекающий в фаголизосомах, является неспецифическим процессом, в то время как направленная деградация 80–90% внутриклеточных белков осуществляется мультисубъединичным белковым комплексом – протеасомой. Процессинг антигенного белка в том числе осуществляется и протеасомно-зависимым образом [362]. При гидролизе иммунными протеасомами образуются антигенные эпитопы длиной 8-11 аминокислотных остатков, которые соединяются в цитоплазме с белками-транспортёрами (Transporter Associated with Antigen Presentation, TAP1/TAP2) и переносятся в эндоплазматический ретикулум, где связываются с молекулами ГКГ I класса. Молекулы ГКГ класса I представляют собой белковый димер, образованный α и β цепями. Домены α цепи формируют замкнутую с обоих концов щель Бьёркмана, которая по длине соответствует 8-9 аминокислотным остаткам. В случае незначительного превышения этой длины антигенный олигопептид “выпячивается” из щели, образуя арку, поскольку место для него ограничено и оба его конца фиксированы. Комплекс молекул ГКГ и антигенного пептида, как и в предыдущем случае, выносится на поверхность клетки в составе трансмембранной везикулы для презентации [36].

1.5.2. Роль протеасом в реализации механизмов презентации антигена и индукции порտальной толерантности

В 80-х годах прошлого века был обнаружен внутриклеточный высокомолекулярный белковый комплекс, который осуществляет избирательную деградацию белка в клетках эукариот и некоторых прокариот [63, 465].

26S-протеасома (где 26S – коэффициент седиментации) состоит из 20S-протеасомы, в которой происходит расщепление белка, и регуляторных субчастиц 19S (PA700) [465]. Регуляторных субъединиц может быть одна или две, и расположены они могут быть с одной или с двух сторон

20S-частицы. Протеолизу в 26S-протеасоме подвергаются белки, меченные молекулами белка убиквитина. 20S-протеасомы служат резервом для образования 26S-протеасом и расщепляют некоторые белки, независимым от убиквитина образом [233].

Протеасомы млекопитающих можно разделить на две основные группы – конститутивные и иммунные. Протеолитическим «сердцем» конститутивной протеасомы являются белковые субъединицы $\beta 1$, $\beta 2$ и $\beta 5$, обладающие соответственно каспаза-, трипсин- и химотрипсинподобной активностями. Под воздействием γ -интерферона на клетки три β -субъединицы могут быть заменены на их изоформы, называемые иммунными субъединицами $\beta 1i$ (LMP2), $\beta 2i$ (MECL1) и $\beta 5i$ (LMP7) [187, 362]. Вместе с тем, на базовом уровне эти изоформы синтезируются постоянно во всех органах, причем их количественное соотношение с конститутивными субъединицами зависит и от типа ткани, и от стадии дифференцировки органа [394].

Протеасомы регулируют клеточные процессы, включая репликацию и репарацию ДНК, дифференцировку, апоптоз, клеточный цикл и деление, участвуют в образовании антигенных эпитопов, связывающихся с молекулами ГКГ классов I и II [129, 433, 447, 460]. Содержание иммунных протеасом в селезенке и тимусе выше, чем в других органах [132, 133].

Кроме того, что протеасомная система участвует в процессинге антигена в АПК, она регулирует сигналинг рецепторов Т-лимфоцита и костимуляторных молекул, а также экспрессию генов многих воспалительных цитокинов, адгезионных молекул посредством активации NF- κ B [454].

Субстратом для протеасом являются два пула белков: так называемые медленно деградирующие белки (slowly degraded polypeptides, SDPs) с временем деградации до 16 часов и быстро деградирующие белки (rapidly degraded polypeptides, RDPs), которые процессируются в течение 10 минут [487]. Таких быстро деградирующих белковых субстратов в клетке содержится до 70%, основная масса которых приходится на дефектные рибосомальные продукты (defective ribosomal products, DRiPs). В результате ошибок транскрипции,

трансляции, сворачивания и процессинга в клетке постоянно встречаются дефектные белки, накапливаясь которым не позволяет система быстрой их деградации через протеасомы [419]. Интересно, что в значительное количество антигенных эпитопов образуется вследствие распада быстро деградирующих белков, особенно, DRiPs, что ускоряет процесс представления антигена.

Интересно, что множество работ детально освещает роль протеасом в организации иммунного ответа, но практически не изучено, какова регуляция системы протеасомной деградации белка в развитии толерантности. Однако есть основания предполагать важную роль протеасом в регуляции иммунного ответа, о чем свидетельствует факт применения протеасомного ингибитора бортезомиба в трансплантологии в качестве иммуносупрессанта [464].

Известно, что при действии на незрелые дендритные клетки ингибитором протеасом происходит угнетение экспрессии молекул распознавания и костимуляции (ГКГ класса II, CD86 и CD40), а также секреции IL-12, но не IL-10. Такие дендритные клетки уже не могут стимулировать дифференцировку наивных CD4⁺ Т-лимфоцитов в эффекторные клетки, но индуцируют их развитие в Tregs [124].

Blanco В. с соавт. [76, 77] показали, что длительная обработка наивных CD4⁺ Т-лимфоцитов бортезомибом результируется появлением регуляторных Т-лимфоцитов при очень низком уровне эффекторных Т-хелперов.

В клетках печени обнаружены добавочные формы протеасом, несущие смешанный ассортимент конститутивных и иммунных субъединиц [194, 459]. Такие смешанные формы протеасом являются распространенными в опухолевых и дендритных клетках, а также составляют приблизительно половину протеасомного пула клеток печени [194]. Для нормальной ткани печени был показан следующий состав протеасом: 31% конститутивных, 15% иммунных, 50% смешанной формы с каталитическими субъединицами $\beta 1$, $\beta 2$ и $\beta 5i$ и 4% смешанной формы с каталитическими субъединицами $\beta 1i$, $\beta 2$ и $\beta 5i$. Существование таких смешанных форм протеасом изменяет репертуар

представляемых на поверхности клеток антигенных пептидов, что также может влиять на реализацию иммунного ответа в печени.

В равной степени на реализацию этого процесса может влиять уровень экспрессии ГКГ класса I, который коррелирует с эффективностью распознавания клеток-мишеней цитотоксическими Т-лимфоцитами. Гепатоциты экспрессируют молекулы ГКГ класса I в количестве, сравнимом с уровнем экспрессии этих молекул в спленоцитах. Однако уровень транскрипции LMP2, LMP7 и TAP2 в гепатоцитах оказался в 5 раз, а TAP1 в 10 раз ниже, чем в спленоцитах [113]. Таким образом, образование антигенных олигопептидов, осуществляемое иммунными и/или смешанными протеасомами, в гепатоцитах уменьшено по сравнению со спленоцитами. Вероятно, как клеточный ГКГ-статус клеток печени, так и набор множественных форм протеасом, являются важными критериями, определяющими существование иммунологической толерантности печени.

В последние годы ингибитор протеасом бортезомиб активно используется в качестве иммуносупрессанта в трансплантологической практике [153, 345, 347], что указывает на их значительную роль в реакции организма на трансплантат. Однако сведений о вовлеченности протеасом в процесс индукции толерантности к трансплантату в современной научной литературе практически не существует, хотя вышеназванные предпосылки говорят о весьма возможной их роли. Фактически, на данный момент существует лишь одна работа, в которой установлено повышение содержания субъединицы MECL-1 в трансплантатах и крови реципиентов при остром и хроническом отторжении почечных аллотрансплантатов [64].

Подводя итог аналитическому обзору имеющихся на данный момент научных сведений, касающихся темы диссертационной работы, можно отметить нижеследующее.

Анализ литературных данных указывает на значительный пробел в научных наблюдениях, касающихся не столько опосредованных эффектов

трансплантации криоконсервированных эндокринных тканей на организм в целом, сколько конкретной оценки структурно-функционального состояния алло- или ксенотрансплантата. Практически неизученным остаются вклад факторов криоконсервирования в изменение иммуногенности эндокринных тканей и эффект подобной иммуномодуляции на их посттрансплантационную выживаемость.

Возможность пролонгирования выживаемости трансплантата путем индукции донор-специфической толерантности установлена во многих предыдущих исследованиях при трансплантации сердца, почек, печени, что предполагает успешность данного подхода и при трансплантации эндокринных тканей. Однако, как и любой другой подход, он требует верификации и определения особенностей и пределов использования, что возможно только при проведении отдельных исследований.

Имеющиеся в научной литературе сведения говорят о том, что индукция ДСТ к трансплантату требует задействования природных механизмов иммунной регуляции, включая этапы процессинга, презентации и распознавания антигена. Изучение экспрессии протеасом в посттрансплантационном периоде позволит глубже понять их роль в процессе распознавания и презентации антигена и приблизиться к пониманию механизмов развития толерантности.

Таким образом, проведенный анализ литературы подчеркивает важность поставленных в работе цели и задач и определяет необходимость проведения научных исследований в выбранном направлении.

РАЗДЕЛ II

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

2.1. Животные

Работа была выполнена на 5-6 месячных мышах линий BALB/c, C57BL/6 и bm1, 4-6 месячных беспородных белых крысах, аутбредных крысах Вистар, инбредных крысах Август, содержащихся в виварии ИПКиК НАН Украины, а также новорожденных поросятах первого поколения пород крупная белая и украинская мясная, поставляемых из Агрокомплекса “Слобожанский” с. Граково, Чугуевского района, Харьковской области. Экспериментальные животные содержались в условиях вивария ИПКиК НАНУ при свободном доступе к пище и воде и на рационе питания, соответствующем нормативам ГОСТа «Содержание экспериментальных животных в питомниках НИИ». Все манипуляции с животными проводились в соответствии с методическими рекомендациями «Биоэтическая экспертиза доклинических и других научных исследований, которые проводятся на животных», разработанным авторским коллективом под руководством член-кор. НАН и АМН Украины А.Г. Резникова (утверждены на заседании научно-экспертного совета МОЗ Украины), материалами IV Европейской конвенции о защите позвоночных животных, используемых для экспериментальных и других научных целей (ETS 123 (1986), «Общими этическими принципами экспериментов на животных»,

одобренных Первым национальным конгрессом по биоэтике (20 сентября 2001 г., г. Киев, Украина) и разрешением Комитета по биоэтике Института проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины.

2.2 Органотипическое культивирование эндокринных желез

Извлечение эндокринной железы (надпочечника, щитовидной железы, семенника, яичника) проводили в стерильных условиях. Сразу после выделения железу помещали в охлажденную питательную среду 199 (Sigma, США; РАА, Австрия) либо DMEM (РАА, Австрия) с антибиотиками (200ЕД/мл пенициллина ("Sigma", США); 150 мкг/мл канамицина ("Здоров'я", Украина) либо 200 мг/мл стрептомицина; ("Sigma", США), в которой производили измельчение ткани на фрагменты размером около 1 мм. Отмывали 3-4 раза от крови и культивировали при 37°C в питательной среде 199 либо DMEM (фрагменты одной железы на 2 мл среды) с добавлением 10% инактивированной фетальной телячьей сыворотки (ФТС, Sigma, США; РАА, Австрия) и антибиотиков (100ЕД/мл пенициллина; 75мкг/мл канамицина либо 100 мг/мл стрептомицина) по методу [42]. Культивирование осуществляли в течение 3-х или 5-ти суток с заменой питательной среды каждые сутки.

2.3. Криоконсервирование фрагментов и органотипических культур эндокринных желез

Свежеполученные фрагменты и органотипические культуры эндокринных желез отмывали от сывороткосодержащей среды культивирования, переводили в бессывороточную среду 199 в стерильные пластиковые криоконтейнеры (Nunc, Дания) в объем 0,5 мл. Далее добавляли равный объем криозащитной среды, содержащей двойную концентрацию криопротектора ДМСО. Замораживание осуществляли с помощью программного замораживателя Cryoson (Германия). Изменение температуры в процессе замораживания контролировали с помощью медь-константановой термопары, соединенной с самописцем Endim 622.01 (Германия). Отогрев образцов проводили при температуре +42°C до появления жидкой фазы, после

чего осуществляли пятикратную ступенчатую замену среды замораживания на среду 199.

2.4. Рекультивирование фрагментов и органотипических культур эндокринных желез

Рекультивирование проводили по методу [2]. После удаления криозащитной среды в условиях стерильного бокса размороженные образцы помещали в питательную среду 199 (либо DMEM) с добавлением 10% инактивированной ФТС и антибиотиков (100ЕД/мл пенициллина; 75мкг/мл канамицина либо 100 мг/мл стрептомицина) в течение 2-х суток. Замену среды культивирования осуществляли каждые сутки.

2.5. Получение суспензии клеток эндокринных желез

Свежевыделенные фрагменты либо органотипические культуры эндокринных желез помещали в среду 199, содержащую коллагеназу типа V (1 мг/мл, Sigma, США) и ДНКазу I (0,1 мг/мл, Sigma, США) и инкубировали на водяной бане при 37°C в 3 этапа: 30, 10, 10 мин. Супернатант после каждого этапа инкубации собирали и добавляли к нему 0,5 мл ФТС. Ткань разрушали путем пипетирования, после чего объединяли вместе с супернатантом и отмывали средой 199 с 0,2% БСА (Sigma, США). После этого суспензию клеток фильтровали через нейлоновый фильтр с диаметром пор 100 мкм и отмывали двукратно средой 199. В некоторых случаях клетки интерстиция семенников получали неферментативным методом. Для этого семенники освобождали от оболочек, осаждали тубулярные структуры. Супернатант фильтровали через нейлоновый фильтр, отмывали полученные клетки несколько раз средой 199.

2.6. Получение суспензии спленоцитов

Спленоциты получали из селезенки крыс по методу [21] в стерильных условиях. Для этого выделяли селезенку, измельчали на фрагменты и продавливали ткань через нейлоновое сито с диаметром пор 100 мкм. Эритроциты из клеточной суспензии удаляли путем трехкратной обработки

раствором, содержащим 154 мМ хлорида аммония, 10 мМ бикарбоната натрия, 0,082мМ ЭДТА. Отмывали полученные клетки два раза средой 199.

2.7. Криоконсервирование суспензии спленоцитов

Криоконсервирование суспензии спленоцитов осуществляли по методу [209]. Криозащитная среда была приготовлена на основе среды 199 и содержала 10% ДМСО (объем/объем) и 25% ФТС («Биолот», Россия). Замораживание проводили на программном замораживателе «Cryoson» со скоростью охлаждения 1°C/мин до –40°C с последующим погружением в жидкий азот.

2.8. Получение моноклеарных клеток печени

Печень крыс перфузировали через портальную вену сначала безкальциевым буфером (5мМ ЭДТА на 0,1М PBS, pH 7,4) в течение 5 минут, затем печень выделяли и перфузировали буфером, содержащем 0,4 мг/мл коллагеназы, 3,7 М CaCl₂, 25 нг/мл ДНКазы I типа, 5 мМ MgCl₂ на 0,1 М PBS pH 7,4, при 37°C в течение 10 мин, измельчали ножницами, инкубировали в буфере с коллагеназой при 37°C в течение 30 мин. После этого протирали через нейлоновое сито и центрифугировали в течение 2 мин на при 1000 об/мин с использованием центрифуги ОПН-3. Супернатант отбирали и центрифугировали при 1500 об/мин в течение 3 мин (центрифуга ОПН-3). Осадок ресуспензировали в 30% перколле (Pharmacia) и центрифугировали при 12000об/мин в течение 30 минут при 4°C на центрифуге Jouan BR4i. Отбирали слой клеток, сконцентрированный на границе раздела фаз и отмывали ФСБ при 1500 об/мин в течение 3 мин.

2.9 Оценка жизнеспособности клеток

Жизнеспособность полученных клеток определяли с помощью окрашивания трипановым синим по методу [21]. Для окрашивания 0,05 мл клеточной суспензии смешивали с равным объемом 0,4%-ного раствора трипанового синего. Клетки подсчитывали с помощью гемоцитометра и светового микроскопа. Жизнеспособность рассчитывали как отношение количества неокрашенных клеток к общему количеству клеток, выраженное в процентах. Сохранность клеток после криоконсервирования рассчитывали как

отношение общего количества клеток (живых и мертвых), полученных после оттаивания, к общему количеству замороженных клеток, выраженное в процентах.

2.10. Хирургические модели гормональной недостаточности

Модели недостаточности гормонов щитовидной железы, надпочечников, семенников и яичников осуществляли путем удаления соответствующих желез. Тиреоидэктомию проводили по методу [23], билатеральную адреналэктомию по методу [149], билатеральную орхи- и овариэктомию по методу [16]. Тиреоидэктомию, адреналэктомию и овариэктомию выполняли при помощи микроскопа МБС-10 с оптическим увеличением в 6 раз. Для предотвращения кровотечения осуществляли коагуляцию видимых кровеносных сосудов с использованием электрокоагулятора. Для всех операций применяли внутривентрально комбинированный наркоз: кетамин и ксилазин в концентрации 2,5 мг и 0,5 мг на 100г массы тела животного. В послеоперационном периоде животным с двусторонней адреналэктомией вводили однократно в/м 0,5 мл дексаметазона (KRKA). Для поддержания электролитного баланса животным с адреналэктомией обеспечивали питье, содержащее 0,9% раствор NaCl; животным с тиреоидэктомией – 1% CaCl₂.

2.11. Трансплантация под капсулу почки

Трансплантацию эндокринного материала осуществляли непосредственно после удаления желез. В случае тиреоидэктомии в некоторых экспериментах трансплантацию проводили через 7 суток после операции. Во время длительных операций животных держали на согревающей столике. С помощью операционного микроскопа и микрохирургического инструментария на левой почке реципиентов формировали маленький «карман» между капсулой и паренхимой почки. Фрагменты желез помещали в «карман». Доза трансплантированного материала составляла 35-40 мг. После контроля гемостаза, на операционную рану накладывали швы послойно, смазывали ее 3% раствором йода. В послеоперационном периоде иммуносупрессанты не использовались.

2.12. Интрапортальная трансплантация

Интрапортальную трансплантацию осуществляли за 7 суток до трансплантации по методу [332]. Животное фиксировали на операционном столике брюшной стороной кверху. Производили верхнесрединную лапаротомию, делали доступ, осторожно отодвигая кишечник. Вводили в портальную вену инсулиновым шприцем 0,5 мл физиологического раствора, содержащего спленоциты. Для остановки кровотечения использовали гемостатическую губку Tabotamp (Johnson&Johnson) либо препарат транексамовой кислоты Tranex (Lusofarmaco, Италия). Орошали брюшную полость 0,9% раствором NaCl с антибиотиками (100ЕД/мл пенициллина; 75мкг/мл канамицина либо 100 мг/мл стрептомицина). Накладывали послойные швы на рану и смазывали ее 3% раствором йода.

2.13. Ингибирование функции макрофагов печени

Некоторым группам крыс за день до введения спленоцитов делали внутрибрюшинную инъекцию раствора хлорида гадолиния $GdCl_3$, 1 мг/100 г массы тела по методу [142].

2.14. Измерение уровня гормонов эндокринных желез

Определение уровня гормонов в среде культивирования, а также в плазме крови животных проводили радиоиммунологическим методом [35]. Количество гормонов в среде культивирования нормировали на белок, который измеряли по методу Бредфорд. При измерении гормонов в среде культивирования использовали калибровочные кривые, которые были получены при использовании бессывороточной питательной среды в качестве нулевого уровня гормона и ряд последовательных разведений калибровочных растворов. Таблица использованных тест-наборов для определения уровня гормонов представлена ниже (табл. 2.1).

Таблица 2.1.

Тест-наборы для определения уровня гормонов.

№ п/п	Тест-набор	Гормон-мишень	Фирма, страна- производитель
----------	------------	---------------	------------------------------------

1	РИА-Т4-СТ	Тироксин, Т4	Беларусь
2	РИА-Т3-СТ	Трийодтиронин, Т3	Беларусь
3	РИА-СТ-Тестостерон	Тестостерон	Беларусь
4	РИА-КОРТИЗОЛ-СТ	Кортизол	Беларусь
5	РИА-Эстрадиол-СТ	Эстрадиол	Беларусь
6	РИА-Прогестерон-СТ	Прогестерон	Беларусь
7	TOTAL T4 RIA KIT	Тироксин, Т4	Immunotech, Франция
8	TOTAL T3 RIA KIT	Трийодтиронин, Т3	Immunotech, Франция
9	RIA Aldosterone	Альдостерон	Immunotech, Франция
10	RIA Corticosterone	Кортикостерон	Biermann GMBH Diagnostika, Германия).

2.15. Измерение уровня некоторых биохимических показателей в крови и гомогенатах

Активности аминотрансфераз измеряли в сыворотке крови и гомогенате печени с помощью тест-наборов АЛТ “ДДС” и АСТ “ДДС” («Диакон», Россия) методом Райтмана-Френкеля. Определение оптической плотности проводили на спектрофотометре КФК-2-УХЛ4.2 на длине волны 540 нм с использованием кювет с длиной оптического пути 1 см. Активность АЛТ в печени определяли в пересчете на белок гомогената, который измеряли по методу Бредфорд.

2.16. Определение адгезирующей способности перитонеальных макрофагов и количества розеткообразующих клеток

Адгезирующую способность перитонеальных макрофагов и количество розеткообразующих клеток определяли по методу [27]. Перитонеальную полость животных промывали средой 199 с 10% ФТС, после чего полученный экссудат инкубировали при 37°C в течение 30 мин. Концентрацию клеток подсчитывали до и после инкубации с использованием гемоцитометра. Количество адгезивных клеток определяли по разности между количеством клеток до и после инкубации.

Для определения количества розеткообразующих клеток получали суспензию лимфоцитов из мезентеральных лимфатических узлов

экспериментальных и контрольных животных. Лимфоциты смешивали с эритроцитами барана (1%) в соотношении 1:1. Смесь центрифугировали при 1000 об/мин в течение 5 минут и выдерживали при 4°C в течение 1 часа. После этого к смеси добавляли 0,075% глютарового альдегида в соотношении 1:2 и инкубировали 20 минут при 22°C. По окончании срока инкубации образцы центрифугировали при тех же условиях. Из осадка готовили мазки, фиксировали и окрашивали по Романовскому-Гимзе.

2.17. Проточная цитофлуориметрия

Фенотипический анализ клеточных субпопуляций в суспензиях клеток проводили с помощью проточной цитофлуориметрии. Антитела, использованные для анализа, представлен в таблице 2.2. Окрашивание осуществляли в соответствии со стандартными протоколами [203]. Вкратце, для прямого мечения мембраносвязанных антигенов около 1×10^6 клеток ресуспендировали в 0,25 мл ФСБ, содержащего 10% ФТС и 1% азида натрия. Инкубировали с первичными антителами, конъюгированными с флуорохромами, в течение 30 минут при 4°C, отмывали, ресуспендировали в FACS-буфере (BD Bioscience, США). Для идентификации мертвых клеток использовали 7-AAD (eBioscience, San Diego, США) либо пропидий йодид (PI, Sigma, США). Для непрямого мечения после инкубации с первичными антителами (в течение 12 часов при 4°C) использовали соответствующие флуорохром-меченные вторичные антитела, с которыми инкубировали в течение 30 минут при 4°C.

Для идентификации внутриклеточных маркеров клетки фиксировали 4% параформальдегидом (Sigma, США) в течение 15 минут, затем обрабатывали 0,1% сапонином (Calbiochem) на 0,1 М ФСБ, после чего инкубировали последовательно с первичными и вторичными антителами.

Неспецифическая флуоресценция определялась с помощью соответствующих изотипических контрольных антител, меченных фикоэритрином (PE) и флуоресцеин изотиоцианатом (FITC).

Клетки анализировали на проточном цитофлуориметре BD FACSCalibur (BD Bioscience, США) и Cell Lab Quanta SC («Beckman-Coulter», США) с использованием программного обеспечения CellQuestPro.

2.18. Гистологическое исследование трансплантатов

Животных забивали на разные сроки после трансплантации. Почки с трансплантатами для гистологического исследования фиксировали в 10%-ом растворе нейтрального формалина, по стандартной методике заливали в парафин. Приготовленные на микротоме срезы 5-7 мкм окрашивали гематоксилином и эозином, исследовали под световым микроскопом с окуляром 10 и объективами 5, 10, 20, 40, 60. Микрофотосъемку образцов осуществляли с помощью микроскопов Olympus IX-71 (Япония), Carl Zeiss Axio Observer Z1 (Германия), DM RXA2 Leica (Германия). Анализ серийных срезов осуществляли с помощью программы для обработки изображения AxioVision Rel 4.7.

2.19. Иммуногистохимическое исследование ткани и трансплантатов

Подготовка криостатных срезов

Трансплантаты эндокринной ткани выделяли вместе с почкой, фиксировали в 4%-м растворе параформальдегида 4 часа при 4°C. После фиксации образцы помещали в 20%-й раствор сахарозы на 0,1 М ФСБ на ночь при 4°C, после чего замораживали и хранили при -80°C или в жидком азоте. Криостатные срезы органов толщиной 5-8 мкм изготавливали на криостате Cryocut (Германия) и монтировали на полилизиновые стекла («Thermo», Великобритания).

Иммунопероксидазное мечение

Были использованы первичные антитела против антигенов ГКГ II класса (I-E^{k,d}, clone 14.4.4s), CD4 (clone RM4-5/L3T4) и CD8 (clone 53-6.7) производства PharMingen (США). Биотинилированные вторичные антитела применяли для идентификации первичных антител против ГКГ II класса. Образцы были окрашены с использованием авидин/биотин

иммунопероксидазного теста в соответствии с инструкцией фирмы-производителя.

Для идентификации остальных первичных антител против CD4⁺ и CD8⁺ Т-лимфоцитов, инфильтрующих трансплантат, применяли вторичные goat anti-rabbit IgG, конъюгированные с пероксидазой хрена. Образцы блокировали 3% перекисью водорода, инкубировали с 5% NGS в течение 1 часа, после чего – с первичными антителами в течение 2 часов при комнатной температуре. После этого образцы инкубировали с вторичными антителами в течение 1 часа и связанное антитело визуализировали с 3,3'-диамнобензидин тетрагидрохлоридом (Sigma, США). Образцы контрастировали гематоксилином, заливали в заключующую среду Tissue-Tek (Sakura Finetek, США). Количественный анализ позитивно окрашенных клеток осуществляли в трех срезах каждого вида. В каждом образце выбирали 10 полей зрения и подсчитывали количество позитивных клеток при увеличении окуляра 12,5 и объектива 40.

Мечение флуорохром-конъюгированными антителами

Криостатные срезы блокировали в 7% NGS и пермеабелизовали в растворе 0,3% тритона X-100 на ФСБ в течение 30 мин при 20°C. Антитела в необходимом разведении (таблица 2.2) готовились на 0,1 М буфере ФСБ (pH 7,4), содержащем 0,15% тритон X-100 и 5% NGS. Срезы инкубировали с первичными антителами в течение ночи при комнатной температуре, отмывали 15 мин в 0,1 М ФБС (pH 7,4), инкубировали с соответствующими вторичными антителами, меченными флуорохромом, в течение 2-х часов при комнатной температуре, отмывали дважды по 15 мин в 0,1 М ФБС (pH 7,4) и проводили анализ с использованием флуоресцентного микроскопа DM RXA2 Leica (Германия).

Специфичность первичных антител подтверждалась с помощью контролей, при которых реакция проводилась только с вторичными антителами. Отсутствие перекрестной реакции между первичными и вторичными антителами проверялось путем инкубации каждого из первичных

антител с противоположными вторичными антителами, например, первичные моноклональные антитела мыши инкубировали с антителами против иммуноглобулинов кролика, и наоборот. Отсутствие флуоресцентной метки во всех контролях свидетельствовало о специфичности реакции.

2.20. Получение осветленных гомогенатов органов и вестерн-блоттинг

Методом вестерн-блоттинга исследовали содержание субъединиц протеасом LMP2 и LMP7 в трансплантатах.

К исследуемому органу в соотношении 1:3 (масса:объем) добавляли буфер, содержащий 50 мМ Tris-HCl (pH 7,5), 100мМ NaCl, 1мМ ЭДТА, 1мМ дитиотреитол, 10мМ Na₂S₂O₅, лейпептин (0,5мкг/мл), пепстатин (1мкг/мл), апротонин (1мкг/мл), и гомогенизировали в микроцентрифужных пробирках («Ахуген», США) сначала с помощью тefлонового пестика, затем гомогенизатором («Ika», Германия). Полученные гомогенаты центрифугировали при 15400g при 4°C в течение 30 мин. Измеряли общий белок по методу Бредфорд и гомогенаты приводили к одному значению белка добавлением буфера.

К супернатантам добавляли буфер для нанесения проб, содержащий 0,25 М Tris-HCl (pH 6,8), 50% глицерин, 0,01% SDS, 9% меркаптоэтанол, 0,003% бромфеноловый синий, в соотношении 4:1 (по объему), соответственно, и инкубировали 5 минут при 95°C. После электрофореза в 13% ПААГ с SDS (5-10 мкл осветленного гомогената на дорожку) полипептиды переносили Вестерн-блоттингом с геля на нитроцеллюлезную мембрану Hybond ECL («Amersham», США). Мембраны инкубировали 2 часа при 20°C в буфере ТНТ, содержащем 10мМ Трис-HCl (pH7,5), 150мМ NaCl, 0.1% Tween-20. Затем инкубировали 20 минут в буфере ТНТ, содержащем 10% обезжиренного молока, отмывали один раз в буфере ТНТ, после чего мембраны инкубировали в буфере ТНТ, содержащем 5% обезжиренное молоко и первичные антитела (таблица 2.2) в необходимом разведении в течение 2 часов при 20°C или 12 часов при 4°C, отмывали несколько раз в буфере ТНТ и инкубировали 1 час в буфере ТНТ, содержащем 5% обезжиренное молоко и вторичные антитела (Amersham

Biosciences, Великобритания), меченные пероксидазой, в разведении 1:2500. После отмывки в буфере ТНТ мембраны подвергали стандартной обработке ECL системой. Оптические плотности полос на рентгеновской пленке анализировали в программе “ImageJ”. Предварительно строили графики зависимости оптической плотности от общего количества белка, подвергаемого Вестерн-блоттингу. Для дальнейшей работы выбирали тот диапазон количества белка, в котором указанная зависимость носила линейный характер. В качестве маркеры молекулярной массы использовали овальбумин (45кДа), карбангидраза (29кДа), ингибитор трипсина (20кДа).

Таблица 2.2.

Антитела для проточной цитофлуориметрии, иммуногистохимического окрашивания и вестерн-блоттинга.

№ п/п	Антитело	Мишень	Конъюгат	Клон	Изо-тип	Фирма, страна-производитель
1	Anti-Rat Macrophage Marker	Макрофаг крысы	PE	HIS36	IgG2a, к	eBioscience, San Diego, США
2	Anti-Rat CD45RA	В-лимфоцит крысы	PE	OX-33	IgG1	Invitrogen, Life Technologies Corporation, США
3	Anti-Rat CD8a	Цитотоксический Т-лимфоцит	-	OX8	IgG1	eBioscience, San Diego, США
4	Anti-Rat CD4	Хелперный Т-лимфоцит	-	OX35	IgG2a	eBioscience, San Diego, США
5	Secondary F(ab') ₂ Anti-Mouse IgG	Mouse IgG	PE	Poly-clonal	IgG	eBioscience, San Diego, США
6	Anti-Rat CD 4	Хелперный Т-лимфоцит	APC	OX35	IgG2a K	eBioscience, San Diego, США
7	Anti-Rat CD25	Рецептор к IL-2	eFluor 450	OX39	IgG1 K	eBioscience, San Diego, США

8	Anti-mouse/Rat Foxp3	Регулятор транскрипции семейства FORKHEAD BOX P3, Treg	PE	FJK-16s	IgG2a К	eBioscience, San Diego, США
9	Hamster anti-mouse CD11c	Дендритная клетка мыши	PE	N418	IgG	Abcam, Cambridge, Великобритания
10	Rat anti-mouse CD11b	Макрофаг мыши	FITC	5C6	IgG2b	Abcam, Cambridge, Великобритания
11	Rat anti-mouse CD45	Лейкоцит	PE	I3/2.3	IgG2b	Abcam, Cambridge, Великобритания
12	Rat anti-mouse CD8a	Цитотоксический Т-лимфоцит	FITC	53-6.7	IgG2a	Abcam, Cambridge, Великобритания
13	Rat anti-mouse Dec205	Нелимфоидные дендритные клетки	FITC	NLD C-145	IgG2a	Abcam, Cambridge, Великобритания
14	Rat anti-mouse CD3	Т-лимфоцит	FITC	C363.29B	IgG2c	Abcam, Cambridge, Великобритания
15	Rat anti-mouse to Ly6g (Gr-1)	Гранулоцит	FITC	RB6-8C5	IgG2b	Abcam, Cambridge, Великобритания
16	Rat anti-mouse TER-119/Erythroid cells (Ly-76)	Эритроцит	PE	TER-119	IgG2b, к	BD Biosciences, San Jose, США
17	Rabbit anti-rat LMP7	Иммунная субъединица протесом LMP7	-	Poly-clonal	IgG	Biomol, Великобритания
18	Rabbit anti-rat LMP2	Иммунная субъединица протесом LMP2	-	Poly-clonal	IgG	Biomol, Великобритания
19	Mouse anti-rat LMP2	Иммунная субъединица протесом LMP2	-	Poly-clonal	IgG	Biomol, Великобритания
20	Mouse anti-rat α 1,2,3,5,6,7	Конститутивные субъединицы протеасом	-	Poly-clonal	IgG	Biomol, Великобритания
21	Secondary anti-rabbit	Rabbit IgG	Alexa 488	-	IgG	Invitrogen, США
22	Secondary anti-rabbit	Rabbit IgG	Alexa 546	-	IgG	Invitrogen, США

23	Secondary anti-mouse	Mouse IgG	Alexa 546	-	IgG	Invitrogen, США
----	----------------------	-----------	-----------	---	-----	-----------------

2.21. Общий дизайн исследования

При разработке дизайна исследования руководствовались принципом соответствия используемых методов и подходов поставленной цели и задачам. Согласно концепции диссертационной работы дизайн исследования состоял из 5 последовательных этапов.

Первый этап предполагал определение сроков выживаемости ауто-, алло- и ксенографтов свежевыделенной ткани эндокринных желез (щитовидной железы, семенников, надпочечников) при трансплантации под капсулу почки животным с моделями гормональной недостаточности. Пространство под капсулой почки часто используется в экспериментальной трансплантологии в качестве конвенционального (неиммунопривелегированного) сайта трансплантации. К таким сайтам трансплантации относятся субкапсулярное пространство почки, подкожная жировая клетчатка, мышцы, селезенка [420]. На данном этапе были задействованы: хирургические методы моделирования гормональной недостаточности и трансплантации эндокринной ткани; биохимический и радиоиммунологический методы определения уровней гормонов; гистологический и морфо-метрический метод оценки состояния трансплантатов.

На втором этапе предполагалось оценить возможность использования факторов криоконсервирования, а именно, варьирования скоростей охлаждения, для изменения иммуногенных свойств эндокринной ткани, на примере аллотрансплантации ткани одной из эндокринных желез. На данном этапе были задействованы: криобиологические методы замораживания-отогрева эндокринной ткани; цитофлуориметрический метод определения количественного и качественного состава АПК эндокринной ткани; радиоиммунологический метод определения уровней гормонов; гистологический метод оценки состояния трансплантата;

иммуногистохимический метод оценки количества и фенотипа клеток, инфильтрирующих трансплантат.

Учитывая показанную при выполнении предыдущего этапа возможность уменьшения иммуногенности эндокринной ткани путем криоконсервирования, целью третьего этапа становилось получение криоконсервированной ткани всех, использованных в работе, эндокринных желез и оценка результативности данного подхода иммуномодуляции при алло- и ксенотрансплантации. На данном этапе были задействованы: криобиологические методы замораживания-отогрева эндокринной ткани; методы культивирования; хирургические методы моделирования гормональной недостаточности и трансплантации эндокринной ткани; биохимический и радиоиммунологический методы определения уровней гормонов; гистологический и морфо-метрический метод оценки состояния трансплантатов.

На четвертом этапе исследования планировалось использовать подход иммуномодуляции реципиента путем индукции ДСТ (с использованием свежевыделенных и криоконсервированных спленоцитов в качестве индуцирующего агента) и изучить его результативность при трансплантации эндокринных тканей. На данном этапе были задействованы: хирургические методы моделирования гормональной недостаточности, трансплантации эндокринной ткани и индукции ДСТ; биохимический и радиоиммунологический методы определения уровней гормонов; биохимический метод оценки активности аминотрансфераз; иммунологический метод оценки клеточного иммунитета реципиентов; гистологический и морфо-метрический метод оценки состояния трансплантатов; криобиологические методы замораживания-отогрева спленоцитов; цитофлуориметрический метод определения количественного и качественного состава субпопуляций спленоцитов.

Пятый этап исследования предполагал изучение молекулярно-клеточных основ индукции толерантности к трансплантату и включал изучение субпопуляции регуляторных Т-лимфоцитов $CD4^+CD25^+Foxp3^+$ и экспрессии

иммунных субъединиц протеасом как возможных биомаркеров толерантности у реципиентов. На данном этапе были задействованы: хирургические методы моделирования гормональной недостаточности, трансплантации эндокринной ткани и индукции ДСТ; иммуногистохимический, иммунофлуоресцентный, цитофлуориметрический методы оценки экспрессии иммунных субъединиц протеасом в печени, селезенке и тимусе реципиентов; вестерн-блоттинг для оценки экспрессии иммунных субъединиц протеасом в трансплантатах; цитофлуориметрический метод оценки субпопуляции регуляторных Т-лимфоцитов.

2.22. Статистическая обработка результатов

Обработку полученных результатов проводили с помощью вариационно-статистических методов: проверка нормальности распределения количественных значений с помощью критерия Колмогорова-Смирнова, непарный критерий Стьюдента, однофакторный дисперсионный анализ. Выживаемость животных рассчитывали по методу Каплана-Мейера, различия между группами сравнивались с помощью логрангового критерия. Использовали программное обеспечение Statistica и Excel.

Данные представлены как среднее значений, полученных не менее, чем в 2 аналогичных экспериментах и измеренных в двух параллельных пробах, $\pm$ стандартная ошибка. Статистическую достоверность оценивали с помощью однофакторного дисперсионного анализа, достоверными считались различия при $p < 0,05$ и $p < 0,01$.

РАЗДЕЛ III

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

3.1. Выживаемость свежевыделенных трансплантатов ткани эндокринных желез

Тканевые фрагменты и клеточные суспензии часто являются объектом трансплантации в современной регенеративной и восстановительной медицине. Такие типы трансплантатов стоят особняком в проблематике выживаемости и функционирования аллографтов по нескольким причинам.

Первая причина связана с существованием различных целевых показателей, которые желательно достичь при трансплантации ткани/клеток. С одной стороны, широко известны факты о стимуляции защитных и регенеративных процессов в организме после гетеротопической трансплантации фрагментов биологически-активной ткани, например, плаценты [10, 51]. И, хотя детальный механизм такого явления до конца не выяснен, общепринято мнение, что реализация стимулирующего эффекта в этом случае должна происходить при резорбции трансплантата [10, 51]. В таком случае от трансплантата не требуется функциональности и долгосрочной выживаемости. С другой стороны, первые попытки трансплантации ткани были

проведены с целью замены утраченной организмом функции, т.е. в ожидании заместительного эффекта. В этом случае существует необходимость как можно более длительного или пожизненного существования трансплантата в организме реципиента. Таким образом, существует как минимум две стороны одного вопроса, хотя это не отвергает возможной стимулирующей роли заместительного трансплантата, и наоборот.

Вторая причина состоит в том, что тканевые и клеточные трансплантаты практически всегда трансплантируются гетеротопически и без соединения сосудистых связей между донором и реципиентом. Это позволяет избежать гиперострого отторжения, но в то же время трансплантат претерпевает ишемию и недостаточность трофической поддержки до тех пор, пока не произойдет его реваскуляризация.

Третьей причиной является мнение о том, что тканевые/клеточные трансплантаты не требуют использования специальных органо-сберегающих подходов и технологий, принятых в «большой» трансплантологии, а именно перфузии и гипотермического хранения в специальных растворах для максимального сохранения качества трансплантата, применения протокола иммуносупрессии, постоянного контроля функции после пересадки и т.д.

Исторически сложилось так, что трансплантаты эндокринной ткани в большей мере относятся к тем, целью пересадки которых являлся заместительный эффект. Например, в 19 веке проводились попытки лечения гипокортицизма с помощью надпочечных желез животного происхождения [417], а первый гормонально-активный экстракт коры надпочечников был получен и применен F.A.Hartmann и J.M.Rogoff в 1927–1929 гг. [201]. В 1930 г. описан случай лечения аддисоновой болезни водным экстрактом коры НЖ – кортином, с помощью которого удалось вывести больного из состояния аддисоновой комы [202].

Эндокринная ткань обладает рядом преимуществ, делающих ее привлекательной в качестве объекта трансплантации для терапии гормонально-дефицитных состояний. Это, прежде всего, возможность отвечать на

физиологический запрос организма, суточные, циркадные ритмы, стресс; осуществлять аутокринную и паракринную регуляцию; включаться в нейро-гуморальную систему с осуществлением обратной связи и тропной регуляции. Кроме того, небольшой объем ткани для трансплантации и необязательность восстановления сосудистых связей дает возможность проводить гетеротопическую трансплантацию с минимально-инвазивным хирургическим вмешательством (вплоть до инъекции). Очевидно, что если бы удалось создать условия неосложненного пожизненного существования трансплантата эндокринной ткани, то это было бы идеальный вариант решения проблемы лечения гормональной недостаточности по сравнению с медикаментозной ЗГТ. Однако подобный вариант лечения пока может быть лишь вспомогательным на фоне приема ЗГТ в связи с достаточно серьезными недостатками метода, которые состоят в следующем. Подготовка трансплантата включает, как правило, этапы забора ткани, ее хранения, транспортировки и подготовки к трансплантации, например, перфузии, обработки антибиотиками, растворами для гипотермического или низкотемпературного хранения, что ухудшает качество трансплантата в связи с гибелью клеток. Алло- и ксенотрансплантация неизбежно сталкивается с реакцией отторжения, которая может быть подавлена с помощью современных протоколов иммуносупрессии. Однако, иммуносупрессивные препараты, с одной стороны, негативно влияют на гормональную функцию трансплантата [346], а с другой стороны, приводят к риску осложнений [13, 50], который часто превышает пользу трансплантации. Кроме того, эффект от трансплантации эндокринной ткани не может наступать в скором времени, так как для полноценного осуществления ее функции требуется васкуляризация. С этим же связана проблема дозировки трансплантируемой ткани и прогнозирования длительности ее функционирования.

Таким образом, все вышеизложенное говорит о необходимости изучения принципов и механизмов выживаемости тканевого эндокринного

трансплантата для определения перспектив их использования в клинической эндокринологии и регенеративно-восстановительной медицине.

На начальном этапе работы нами была изучена выживаемость свежевыделенных фрагментов (СВФ) ткани эндокринных желез (щитовидной железы, надпочечников, семенников) при гетеротопической трансплантации под капсулу почки. Выживаемость трансплантатов была оценена по двум основным параметрам: содержанию гормонов в сыворотке крови реципиентов и сохранности ткани в гистологических образцах. Были использованы следующие группы животных: 1) интактный контроль; 2) с гормональной недостаточностью (удаление соответствующих эндокринных желез); 3) с гормональной недостаточностью и ауто трансплантацией; 4) с гормональной недостаточностью и аллотрансплантацией; 5) с гормональной недостаточностью и ксенотрансплантацией. Аллогенную трансплантацию проводили между крысами Вистар (доноры) и Август (реципиенты), ксеногенную трансплантацию между новорожденными поросятами (доноры) и крысами Вистар (реципиенты).

3.1.1. Выживаемость трансплантатов свежевыделенной ткани щитовидной железы

Динамика изменения уровня Т4 у тиреоидэктомированных крыс при ретроградном способе удаления ЩЖ по методу [23] носила убывающий характер (Рис. 3.1). Убывание гормона на 50% наблюдалось через неделю. Плавная динамика уменьшения гормона в крови после тиреоидэктомии связана с тем, что период полураспада Т4 в крови составляет 7 суток [29]. К 21 суткам уровень Т4 составлял около 32%, а к 35 суткам – 26% от контроля.

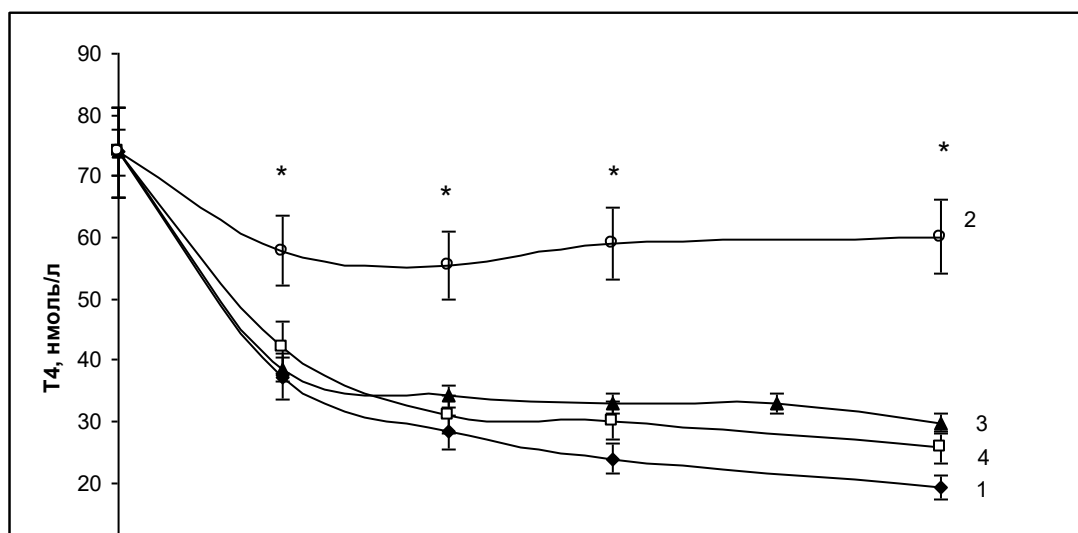


Рис. 3.1. Динамика уровня Т4 в сыворотке крови тиреоидэктомированных крыс: 1 – без трансплантации; 2 – ауто трансплантация; 3 – алло трансплантация; 4 – ксено трансплантация. * – различия достоверны по сравнению с тиреоидэктомией ($p < 0,05$).

При ауто трансплантации СВФ ЩЖ не наблюдалось значительного уменьшения уровня гормона, что свидетельствовало о сохранности функции ауто графта при гетеротопической трансплантации. Уровень Т4 был понижен до 75% от контроля и оставался таким практически на всем сроке наблюдения. При алло- и ксено трансплантации фрагментов ЩЖ гормональный уровень достоверно не отличался от тиреоидэктомированных крыс без трансплантации, что говорило о несостоятельности гормонозаместительной функции использованных алло- и ксено графтов.

Гистологический анализ образцов ауто трансплантатов выявил достаточно хорошую сохранность ткани ЩЖ (рис. 3.2). В трансплантатах наблюдались упорядоченно расположенные фолликулы, выстланные кубическим эпителием. Основная масса фолликулов заполнена коллоидом с вакуолями резорбции. В отдельных участках трансплантата определялись фолликулы с уплощенным эпителием, а также группы клеток ЩЖ, неорганизованные в фолликулы. Отмечается наличие кровеносных сосудов и небольших участков рыхлой соединительной ткани. Явные признаки отторжения были установлены при изучении гистологических препаратов алло- и ксено графтов СВФ ЩЖ. На 7 сутки после алло трансплантации наблюдалась лейкоцитарная инфильтрация трансплантата, особенно выраженная в паранефральной области, некроз тироцитов, нарушение характерной фолликулярной структуры щитовидной

железы и замещение ее соединительной тканью (рис. 3.3). На 25 сутки уже не наблюдалось участков с характерным для ЩЖ строением, происходило активное формирование рыхлой соединительной ткани (рис. 3.4). На дальнейшем сроке наблюдения (30-35 суток) происходило уплотнение соединительной ткани под капсулой почки и формирование соединительно-тканного рубца (рис. 3.5). При ксенотрансплантации процесс отторжения трансплантата протекал сходным образом. На 30-35 сутки наблюдалось замещение ткани трансплантата соединительной тканью, однако сохранялись зоны лейкоцитарной инфильтрации, что свидетельствовало о том, что процесс продуктивного воспаления еще не завершен (рис. 3.6).

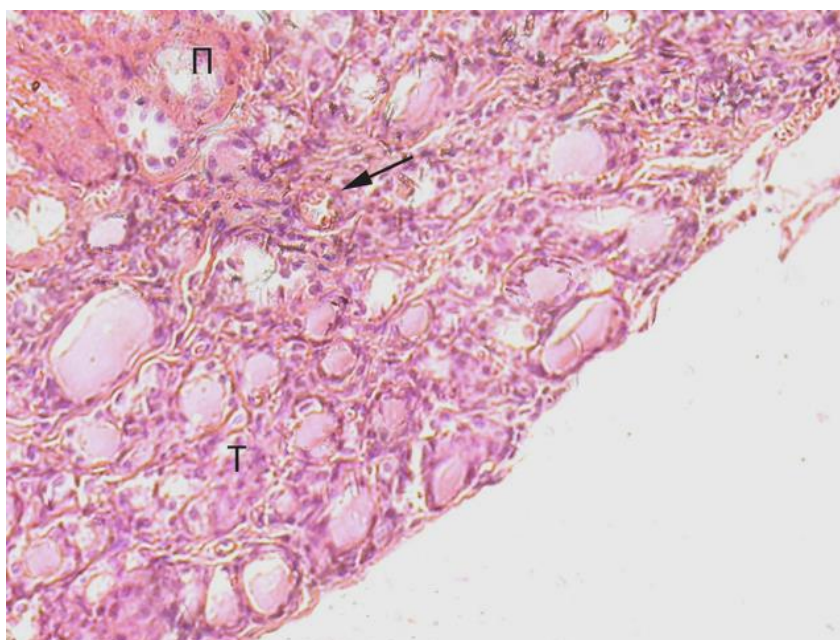


Рис. 3.2. Аутологичный трансплантат СВФ ЩЖ на 35 сутки после трансплантации. Т – трансплантат, П – ткань почки, стрелкой указан кровеносный сосуд. Окраска гематоксилином и эозином. Ок. 10, об. 20.

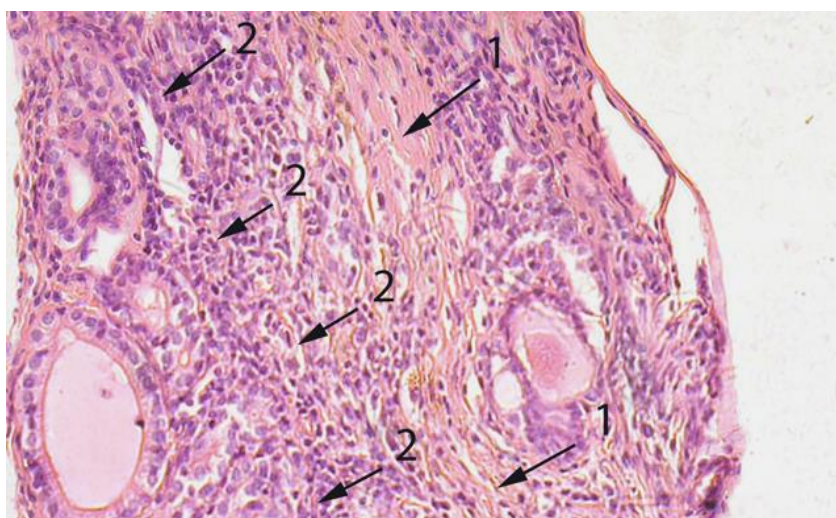


Рис. 3.3. Аллогенный трансплантат СВФ ЩЖ на 7 сутки после трансплантации. Стрелками указаны: 1 – соединительная ткань, 2 – лейкоцитарная инфильтрация. Окраска гематоксилином и эозином. Ок. 10, об. 20.

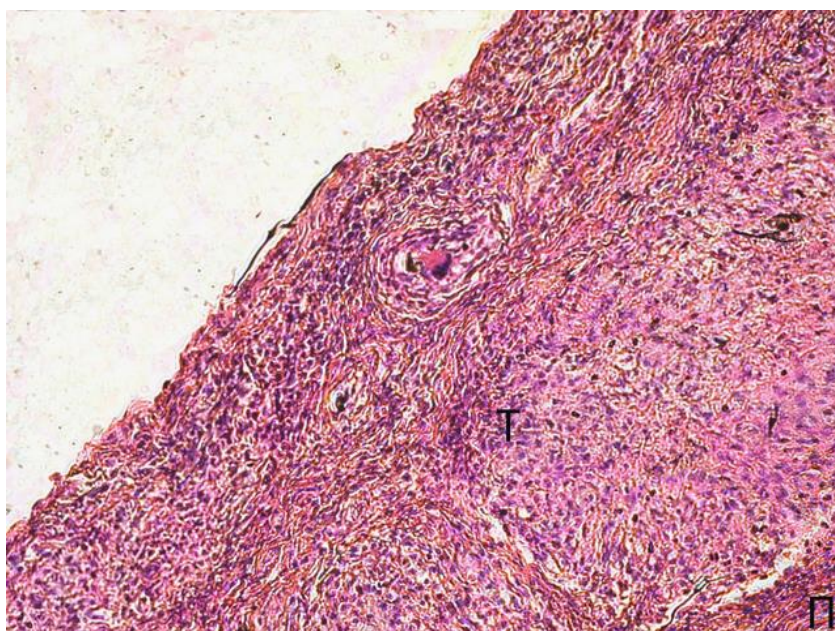


Рис. 3.4. Аллогенный трансплантат СВФ ЩЖ на 25 сутки после трансплантации. Т – трансплантат, П – ткань почки. Окраска гематоксилином и эозином. Ок. 10, об. 20.

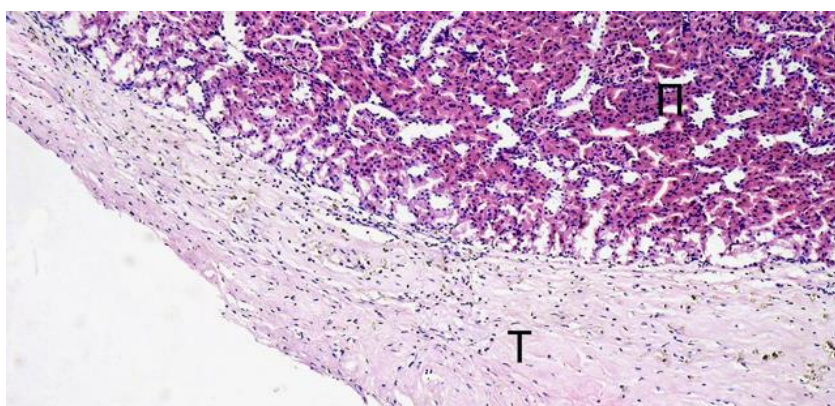


Рис. 3.5. Аллогенный трансплантат СВФ ЩЖ на 35 сутки после трансплантации. Т – трансплантат, П – ткань почки. Окраска гематоксилином и эозином. Ок. 10, об. 10.

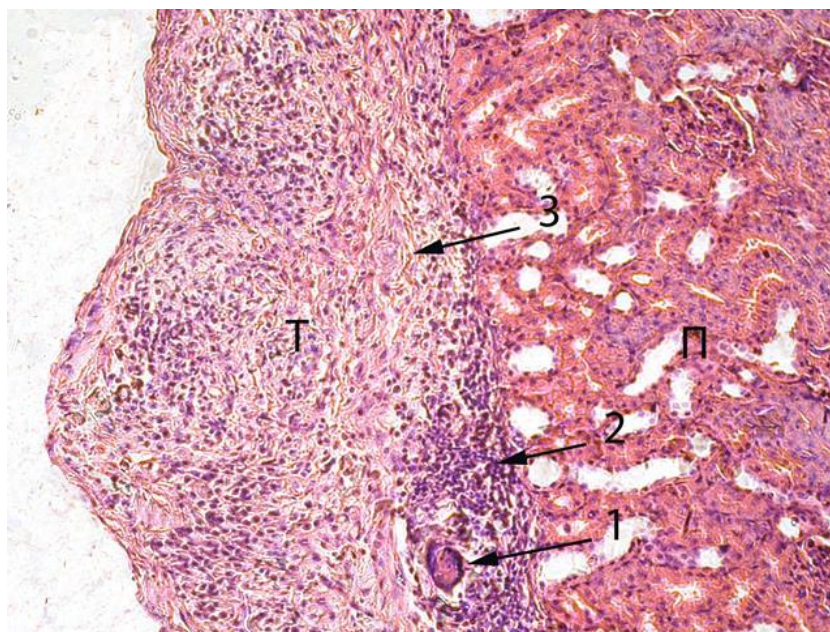


Рис. 3.6. Ксеногенный трансплантат СВФ ЩЖ на 35 сутки после трансплантации. Т – трансплантат, П – ткань почки, стрелками обозначены: 1 – остатки фолликулов, 2 – лейкоцитарная инфильтрация, 3 – соединительная ткань. Окраска гематоксилином и эозином. Ок. 10, об. 20.

Для количественной оценки морфологических признаков трансплантатов нами был применен морфометрический анализ, который включал оценку трех основных показателей выживаемости графтов: 1) площадь ткани с

неповрежденной структурой; 2) площадь ткани с лейкоцитарной инфильтрацией; 3) площадь соединительной ткани. Данные морфометрические показатели нормировали на общую площадь трансплантата. Анализ проводили в серийных срезах трансплантата с помощью программы для обработки изображения AxioVision. На рисунке 3.7 на примере аллотрансплантата свежевыделенной ткани ЩЖ схематично указаны определяемые показатели. При этом нужно отметить, что трансплантаты могли изначально иметь некоторую часть соединительной ткани в связи с анатомическими особенностями, например, капсулой желез.

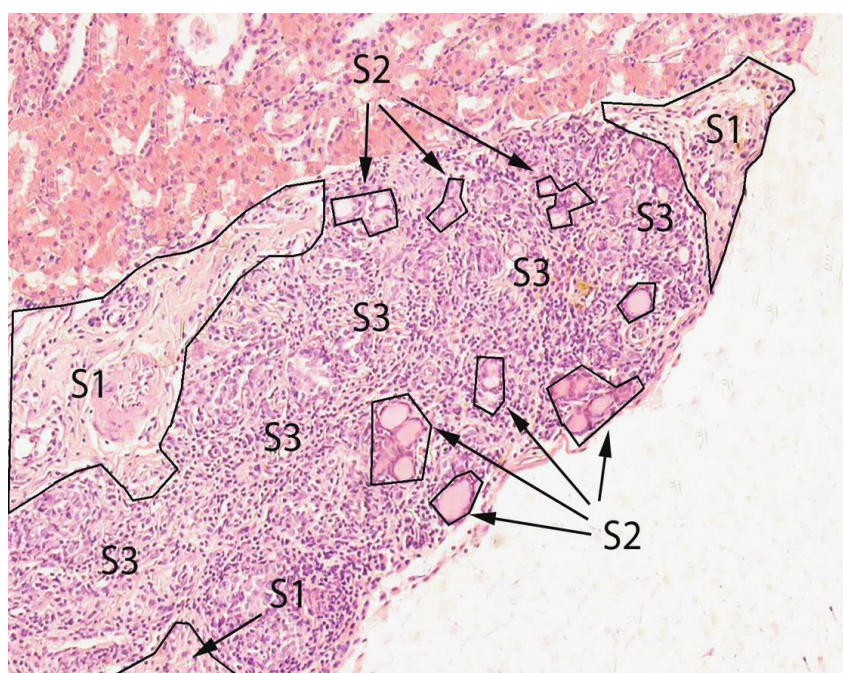


Рис. 3.7. Морфометрические индексы, использованные для определения выживаемости трансплантатов под капсулой почки (представлена репрезентативная фотография среза ЩЖ): S1 – площадь соединительной ткани; S2 – площадь ткани с неповрежденной структурой; S3 – площадь ткани с лейкоцитарной инфильтрацией. Для подсчета использовали программное приложение AxioVision.

На рисунке 3.8 представлены зависимости, полученные при количественном СВФ ЩЖ. Анализ морфометрических данных отражает динамику процесса распознавания и отторжения аллогенного трансплантата СВФ ЩЖ, при котором лейкоцитарная инфильтрация развивается с первых посттрансплантационных дней, достигает своего максимума на 5-7 сутки, после чего наблюдается некоторый спад количества инфильтрирующих клеток и стабилизация его на постоянном уровне в течение периода наблюдения 35 суток. При этом наблюдается два взаимообразных процесса: уменьшение площади ткани аллотрансплантата ЩЖ и увеличение площади соединительной ткани, в результате которых трансплантат практически полностью замещается соединительной тканью к 35 суткам. Замещение ткани ЩЖ происходит довольно быстро, приблизительно 70% ткани ЩЖ замещается соединительной уже на 14 сутки (Рис. 3.8).

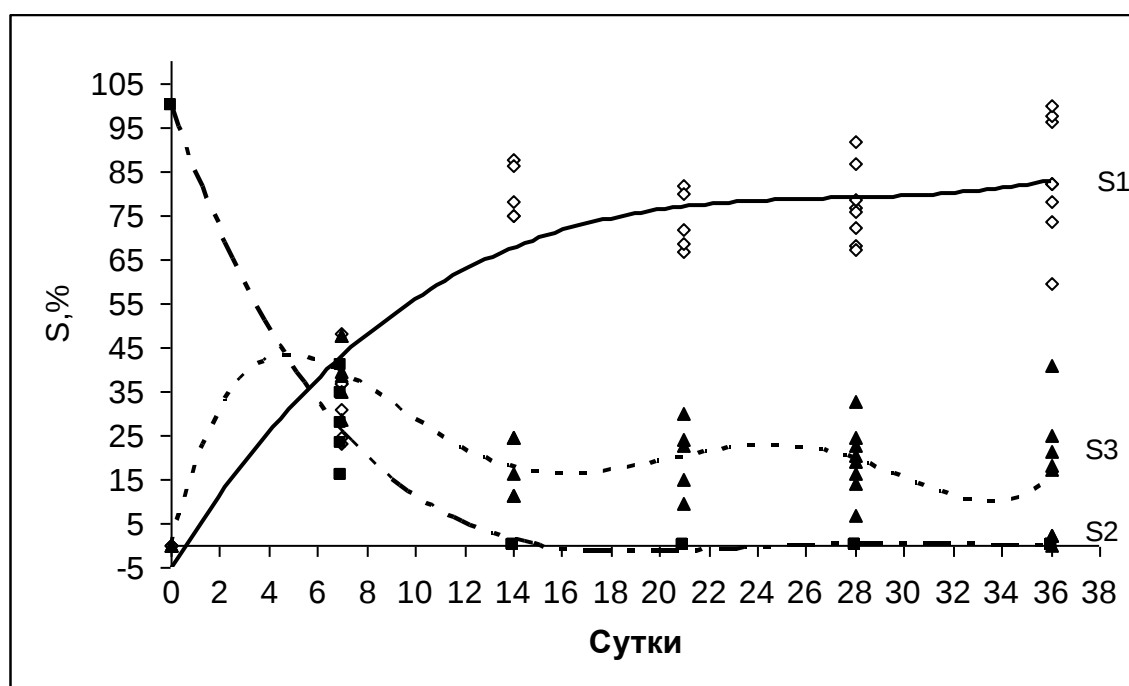


Рис. 3.8. Зависимость изменения морфометрических индексов выживаемости аллогraftа СВФ ЩЖ под капсулой почки: S1 – линия тренда для данных площади соединительной ткани; S2 – линия тренда для данных площади ткани с неповрежденной структурой; S3 – линия тренда для данных

площади ткани с лейкоцитарной инфильтрацией. Точками представлены значения, полученные для каждого образца.

При ксенотрансплантации динамика изменения морфометрических индексов выживаемости ксенографта в целом похожа на ту, которая наблюдается при аллотрансплантации (Рис. 3.9). Однако процесс отторжения развивается медленнее, инфильтрация достигает максимума на 14 сутки, и на конечный срок наблюдения (к 35 суткам) сохраняется еще достаточно высокий ее уровень ($34,7 \pm 22,1\%$ при ксенотрансплантации против $17,7 \pm 11,1\%$ при аллотрансплантации). При этом ткани ЩЖ с неповрежденной структурой и в одном, и в другом случае практически не наблюдается.

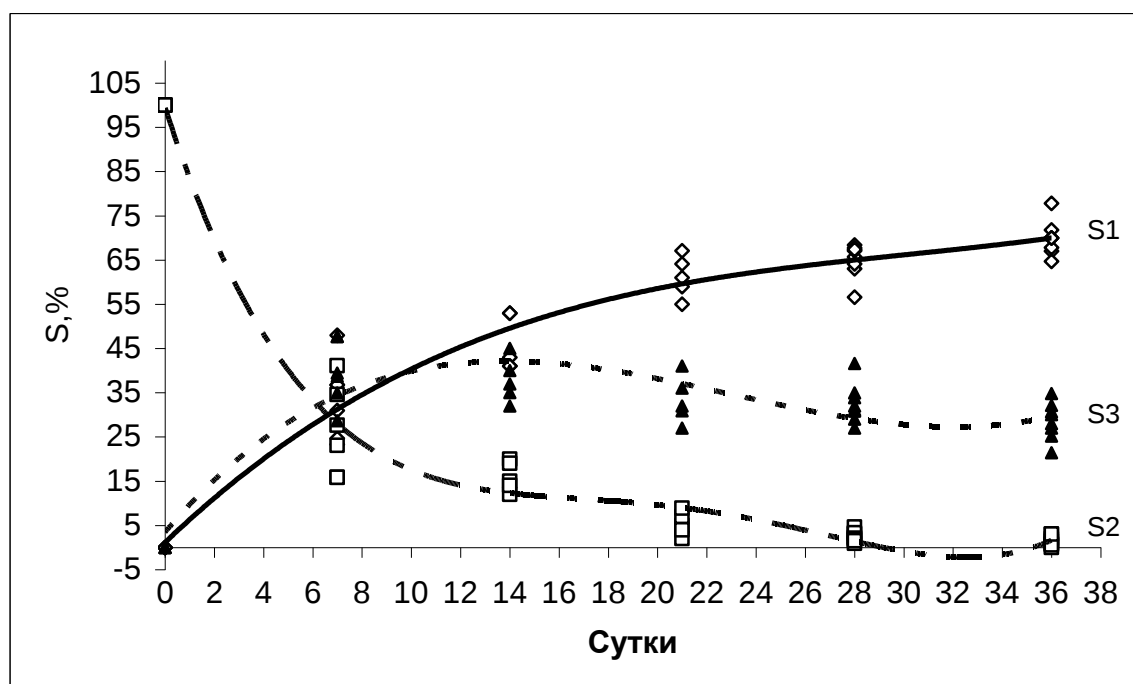


Рис. 3.9. Зависимость изменения морфометрических индексов выживаемости ксенографта СВФ ЩЖ под капсулой почки: S1 — линия тренда для данных площади соединительной ткани; S2 — линия тренда для данных площади ткани с неповрежденной структурой; S3 — линия тренда для данных площади ткани с лейкоцитарной инфильтрацией. Точками представлены значения, полученные для каждого образца.

Интересно, что при аутологичной трансплантации (Рис. 3.10) также наблюдается небольшой уровень лейкоцитарной инфильтрации ($1,7 \pm 5,1\%$) хотя процесса отторжения ткани в этом случае не наблюдается. Это, вероятно, связано с реакцией иммунной системы на повреждение тканей, в том числе и паренхимы почки, при оперативном вмешательстве.

При аутоотрансплантации к 35 суткам также наблюдается замещение ткани ЩЖ соединительной тканью, площадь которой может составлять от 5 до 15%. Это может объясняться некротическим повреждением ткани аутографта после трансплантации под капсулу почки, где до восстановления сосудистых связей трансплантат испытывает ишемию и недостаточность трофической поддержки. В результате отмирания ткани возможна стимуляция процессов ремоделинга и формирования соединительной ткани.

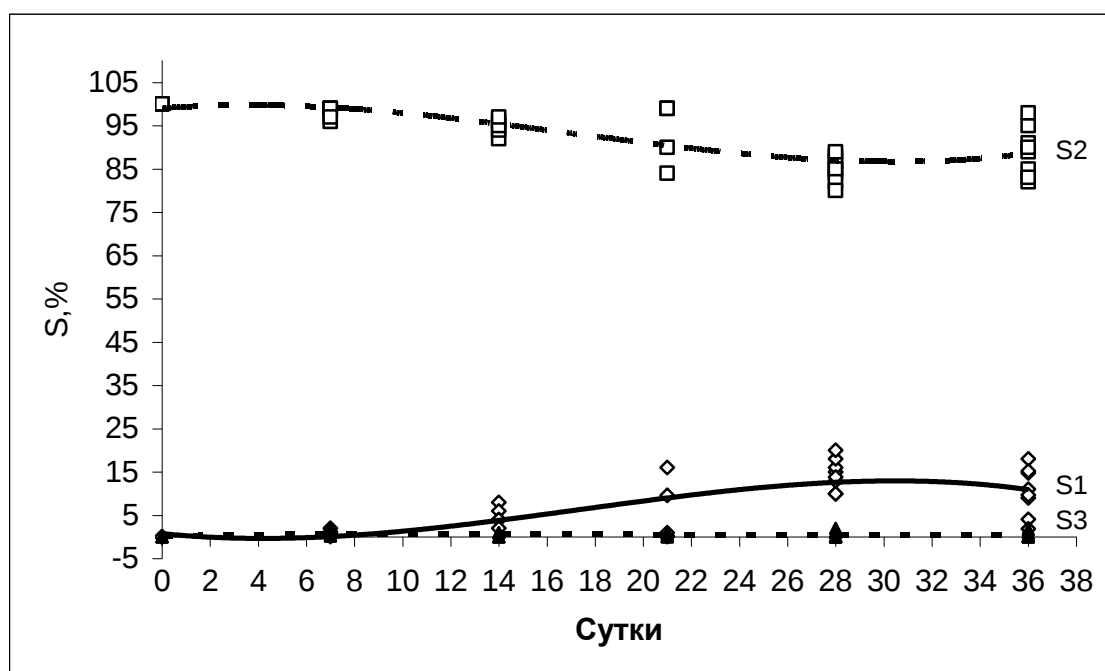


Рис. 3.10. Зависимость изменения морфометрических индексов выживаемости аутографта СВФ ЩЖ под капсулой почки: S1 — линия тренда для данных площади соединительной ткани; S2 — линия тренда для данных площади ткани с неповрежденной структурой; S3 — линия тренда для данных

площади ткани с лейкоцитарной инфильтрацией. Точками представлены значения, полученные для каждого образца.

3.1.2. Выживаемость трансплантатов свежевыделенной ткани семенников

При изучении выживаемости трансплантата СВФ семенников были получены следующие результаты.

Изменение уровня тестостерона в крови у орхиэктомированных крыс на 30 суток после трансплантации представлено на рисунке 3.11. Заметно, что орхиэктомия приводит к достоверному снижению уровня тестостерона в сыворотке крови животных. Масса добавочных половых желез (ДПЖ), которая является чувствительной к уровню тестостерона [40], также претерпевает достоверное уменьшение.

Ни один из использованных видов трансплантации СВФ семенников не позволил достичь значительного уровня гормональной компенсации. Ожидаемого повышения уровня тестостерона не происходило и при аутооттрансплантации. Это, вероятно, связано с тем, что пересаживаемая ткань имеет не только эндокринный компонент (тестостерон-продуцирующие клетки Лейдига), но и прочие элементы ткани семенников. Так как доза пересаживаемого материала составляла 30–35 мг, эндокринных клеток в ней было недостаточно для компенсации уровня андрогенов. Нельзя также не учитывать тот факт, что для нормального синтеза тестостерона температура брюшной полости, куда производится пересадка ткани, является неблагоприятной [29, 40].

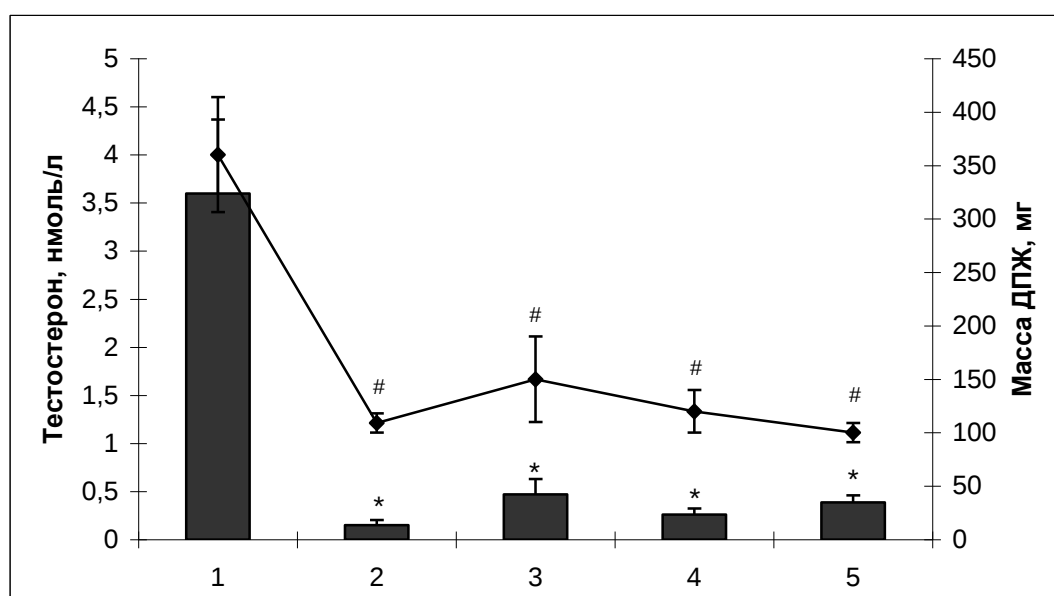


Рис. 3.11. Изменение уровня тестостерона в сыворотке крови и массы ДПЖ после орхизектомии у крыс на 30 суток: 1 – интактный контроль; 2 – без трансплантации; 3 – ауто трансплантации СВФ семенников; 4 – алло трансплантации СВФ семенников; 5 – ксено трансплантации СВФ семенников. *, # – различия признака достоверны по сравнению с интактным контролем ($p < 0,05$).

Морфологическая структура семенника половозрелой крысы представляет собой множество извитых семенных канальцев и расположенный между ними интерстиций (рис. 3.12). Внутри канальцы выстланы эпителио-сперматогенным слоем клеток. Он состоит из клеток Сертоли, имеющими небольшие ядра неправильной формы, часто смещенные к внешней части канальца, и сперматогенных клеток. Ближе к базальной мембране располагаются базофильно-окрашенные сперматогонии типа А. В области, обращенной в просвет канальца, концентрическими кругами располагаются половые клетки на разных стадиях сперматогенеза (сперматоциты I и II порядков, сперматиды и сперматозоиды). Кнаружи от базальной мембраны различаются миоидные клетки. В межканальцевом пространстве хорошо заметны клетки Лейдига со сферическими или овальными базофильными ядрами, содержащими более темно-окрашенные ядрышки, и вакуолизированной эозинофильной цитоплазмой.

Гистологический анализ аллогraftов СВФ семенников на 30 суток показал, что в образцах наблюдается значительная лейкоцитарная инфильтрация, особенно в непосредственной близости к оболочке канальцев (рис. 3.13). В межканальцевом пространстве наблюдается разрастание соединительной ткани. В трансплантате в достаточном количестве сохраняются

семенные каналы, наполненные гомогенной массой, являющейся продуктом клеточного распада.

Динамика процесса отторжения аллогенного трансплантата СВФ семенников в течение 30 суток характеризовалась развитием массивной инфильтрации, которая к 14 суткам занимала приблизительно половину площади трансплантата, и оставалась на этом уровне в течение последующих суток наблюдения (рис. 3.14). При этом формирование соединительной ткани наблюдалось в незначительном размере (около 15% от площади трансплантата). Также интересной особенностью было сохранение морфологических признаков канальцев семенников на 30 сутки.

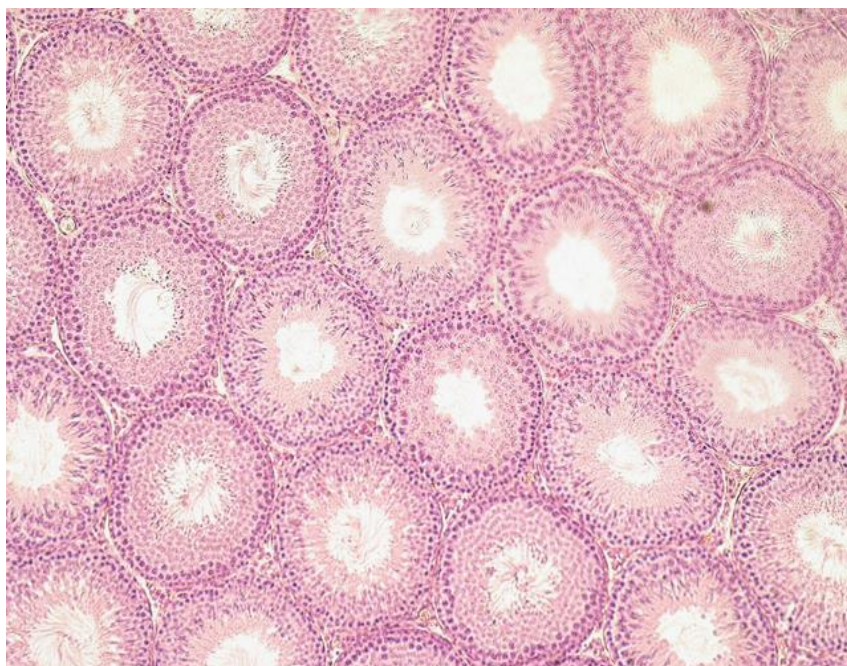


Рис. 3.12. Семенник половозрелой крысы. Окраска гематоксилином и эозином. Ок. 10, об. 10.

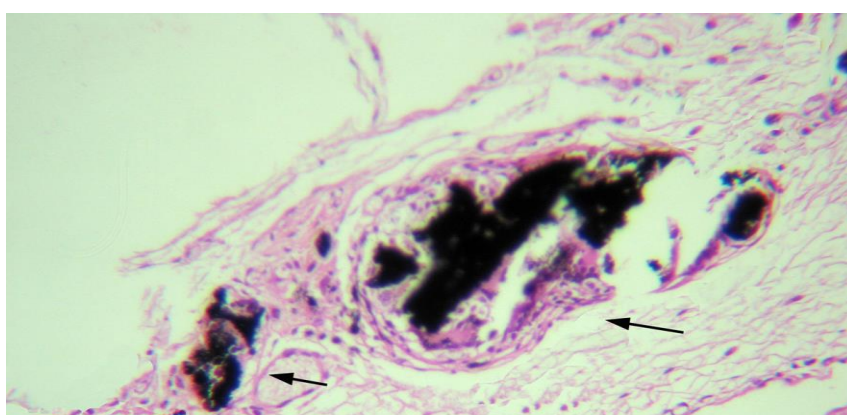


Рис. 3.13. Аллогенный трансплантат СВФ семенников на 30 сутки после трансплантации. Т – трансплантат, П – ткань почки. Стрелками указаны семенные каналы. Окраска гематоксилином и эозином. Ок. 10, об. 20.

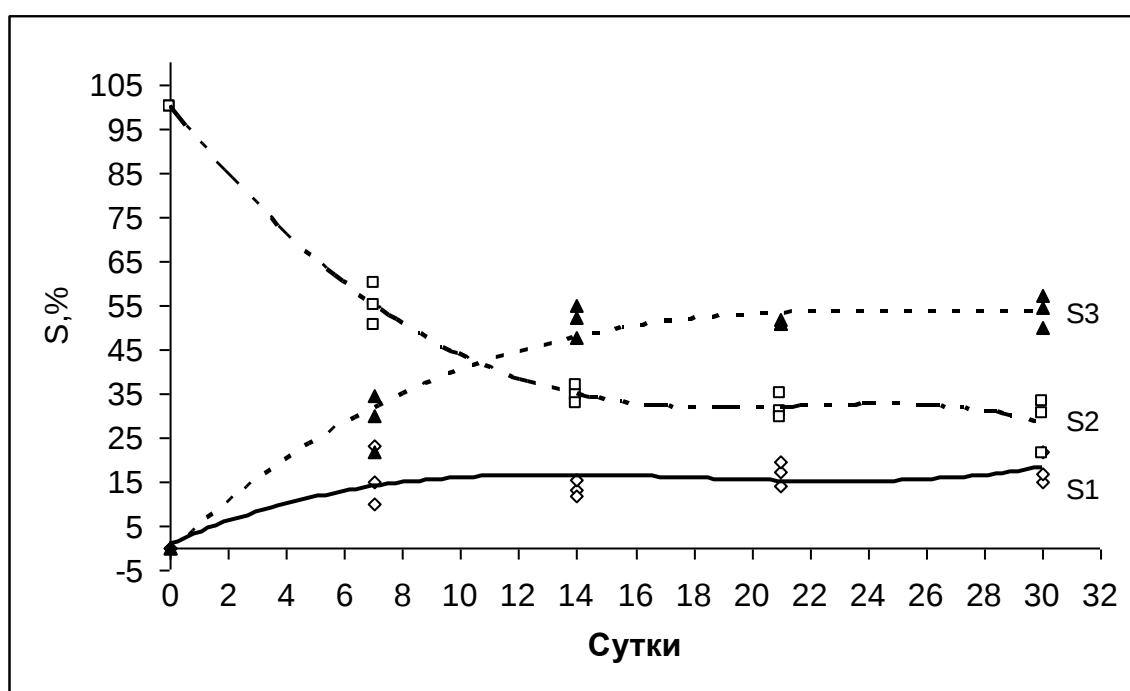


Рис. 3.14. Зависимость изменения морфометрических индексов выживаемости аллогraftа СВФ семенников под капсулой почки: S1 – линия тренда для данных площади соединительной ткани; S2 – линия тренда для данных площади ткани с неповрежденной структурой; S3 – линия тренда для данных площади ткани с лейкоцитарной инфильтрацией. Точками представлены значения, полученные для каждого образца.

И, хотя, как показал гистологический анализ, жизнеспособных клеток семенников не наблюдалось, около 25% от площади трансплантата составляла ткань с характерным канальцевым строением.

Ксенографты СВФ семенников на 30 сутки характеризовались отсутствием морфологических признаков, отвечающих семенным канальцам (рис. 3.15). Наблюдалась диффузная лейкоцитарная инфильтрация по всей площади трансплантата и замещение его соединительной тканью.

Подсчет динамики изменения морфометрических индексов ксеногенного трансплантата СВФ семенников (рис. 3.16) в течение 30 суток в целом был сходен с динамикой, наблюдаемой для ксеногенных СВФ ЩЖ (рис. 3.9).

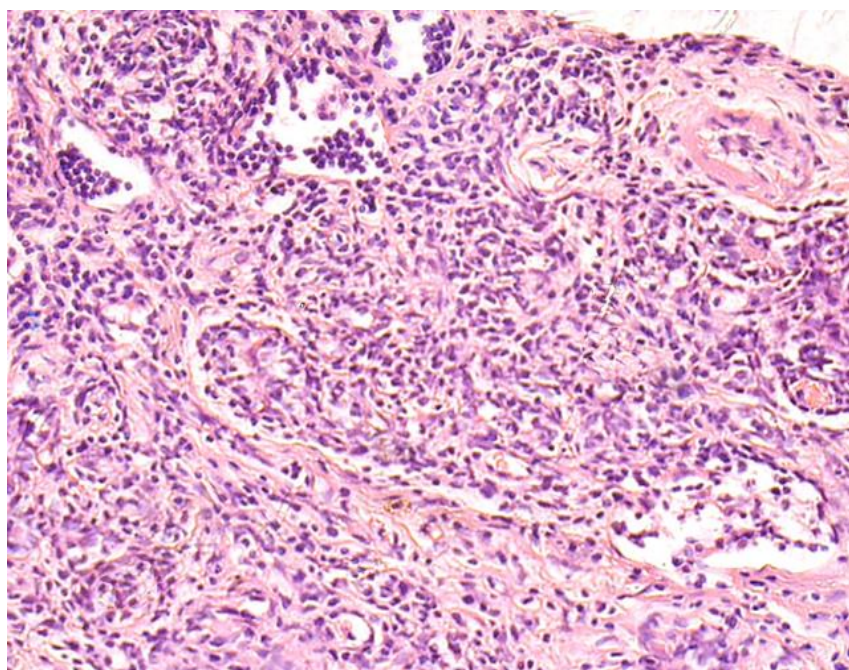


Рис. 3.15. Ксеногенный трансплантат СВФ семенников на 30 сутки после трансплантации. Окраска гематоксилином и эозином. Ок. 10, об. 40.

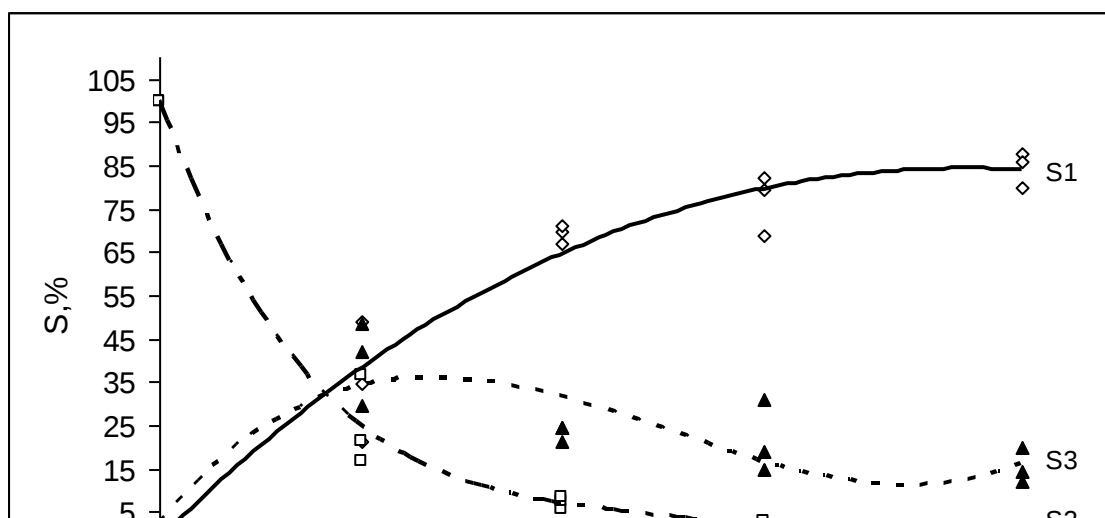


Рис. 3.16. Зависимость изменения морфометрических индексов выживаемости ксенографта СВФ семенников под капсулой почки: S1 – линия тренда для данных площади соединительной ткани; S2 – линия тренда для данных площади ткани с неповрежденной структурой; S3 – линия тренда для данных площади ткани с лейкоцитарной инфильтрацией. Точками представлены значения, полученные для каждого образца.

Максимум инфильтрации был зафиксирован на 10 сутки, практически полное замещение ткани семенников соединительной тканью наблюдалось уже на 21 сутки после трансплантации.

3.1.3. Выживаемость трансплантатов свежевыделенной ткани надпочечников

Изучение выживаемости трансплантата свежевыделенных фрагментов эндокринной ткани было также проведено на модели адреновенозной недостаточности и трансплантации ткани надпочечных желез (НЖ). Крысам была выполнена двусторонняя адреналэктомия и одновременно – трансплантация СВФ НЖ.

Известно, что тотальная адреналэктомия без ЗГТ приводит к летальному аддисоновому кризу. Трансплантация ткани/клеток надпочечников может предотвратить смерть животного-реципиента от гормональной недостаточности в том случае, если трансплантат обладает активной гормональной функцией [188, 438, 440, 444]. Если гормонопродуцирующие клетки трансплантата подвергаются отторжению и замещению соединительной тканью, результат трансплантации будет негативным и реципиент умрет от аддисонового криза. В

связи с этим, достаточно показательным параметром гормональной активности трансплантата ткани НЖ является выживаемость адреналэктомированных животных [149, 321].

Результаты анализа выживаемости животных по методу Каплана-Мейера показали, что основная масса крыс (около 50%) умирает на 14 сутки после двусторонней адреналэктомии (рис. 3.17). До 21 суток происходит полное вымирание животных этой группы. Животные с аутологичными трансплантатами СВФ НЖ выживали в течение всего срока наблюдения, несмотря на адреналэктомию, т.е. трансплантаты предотвращали смерть адреналэктомированных животных.

Доля выживших животных была значительно уменьшена в группах животных с аллогенными и ксеногенными трансплантатами СВФ НЖ (рис. 3.18). Она составляла 20% и достоверно не отличалась между группами (логранковый критерий $P=0,888 (<0,05)$).

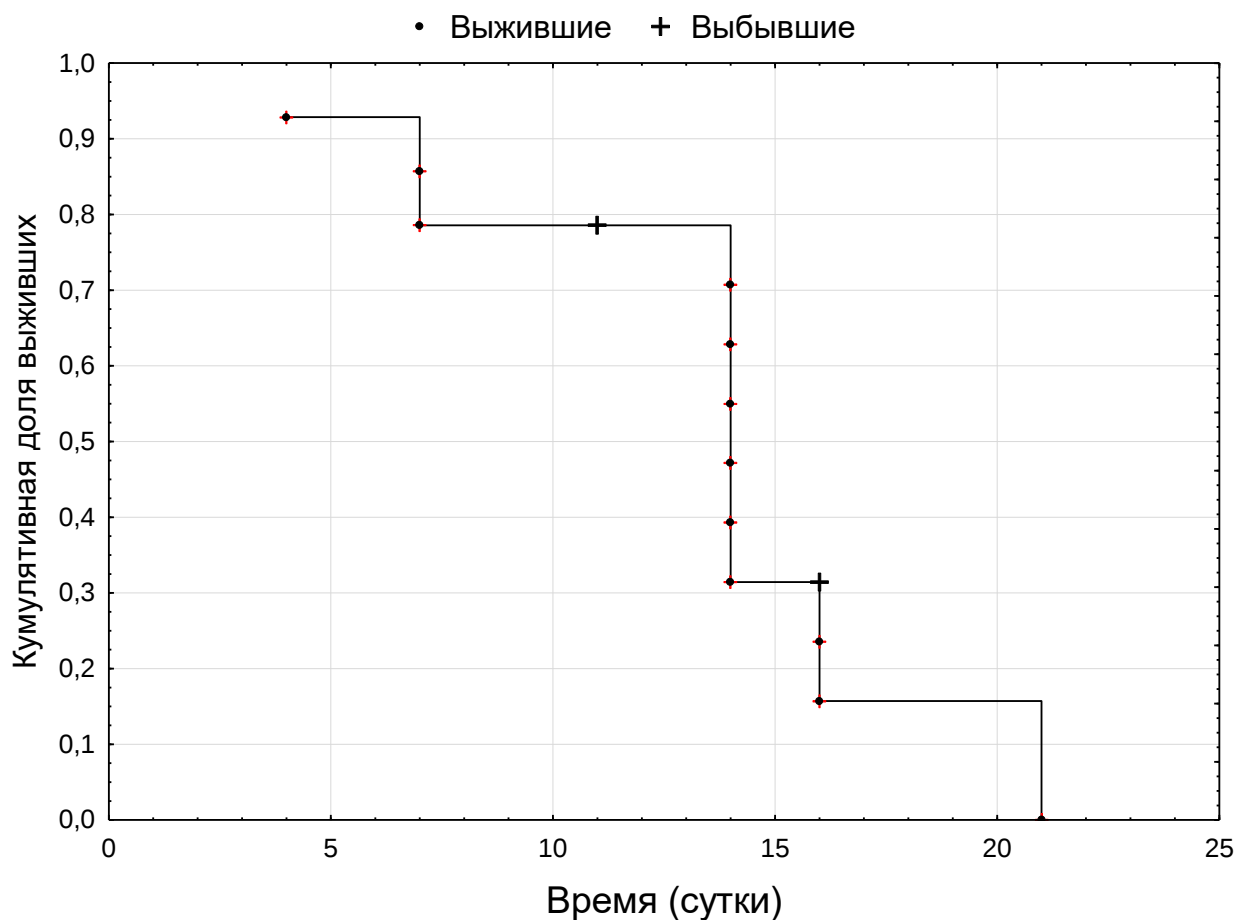


Рис. 3.17. Выживаемость крыс после двусторонней адреналэктомии.

У крыс главным из 11-оксикортикостероидов, циркулирующих в крови, является кортикостерон, тогда как у свиней – кортизол, поэтому присутствие этого гормона в сыворотке крови крыс-реципиентов отражает гормонопродуцирующую функцию трансплантата НЖ при ксенотрансплантации.

На рисунке 3.19 представлена динамика изменения уровня кортизола после адреналэктомии и ксенотрансплантации СВФ НЖ. Значения кортизола 0-х суток (77,4 нмоль/л) отражают неспецифическое связывание метки с белками сыворотки.

После ксенотрансплантации СВФ НЖ уже на 7 сутки отмечалось повышение уровня кортизола в крови реципиентов по сравнению с уровнем адреналэктомизированных крыс. Уровень гормона возрастал в 2,8 раза на 20 сутки после трансплантации, после чего на 35 сутки наблюдалось его снижение практически до исходных значений. Это свидетельствовало об угасании гормональной активности ксенотрансплантата, вероятно, вследствие его отторжения. Гистологический анализ трансплантатов был проведен для подтверждения этого предположения.

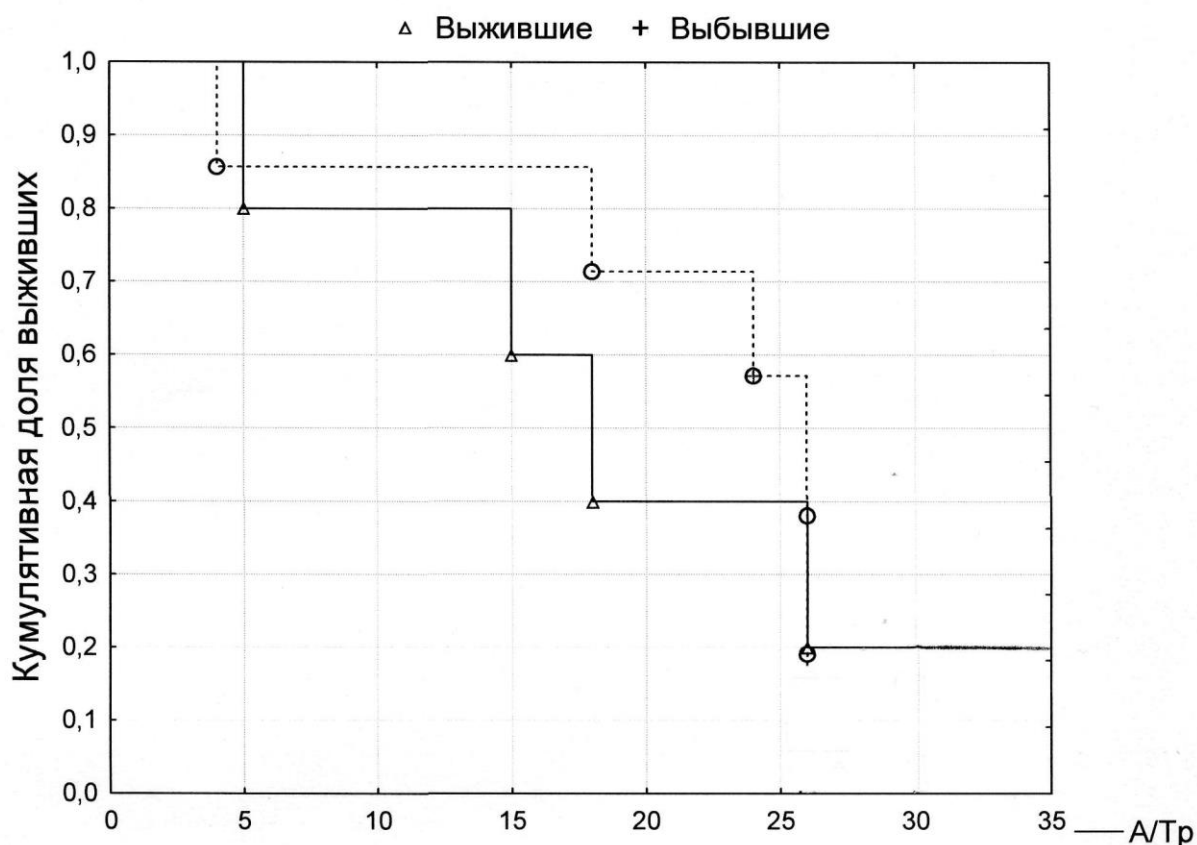


Рис. 3.18. Выживаемость крыс после двусторонней адреналэктомии и последующей алло- и ксенотрансплантации СВФ НЖ. А/Тр – аллотрансплантация; К/Тр – ксенотрансплантация.

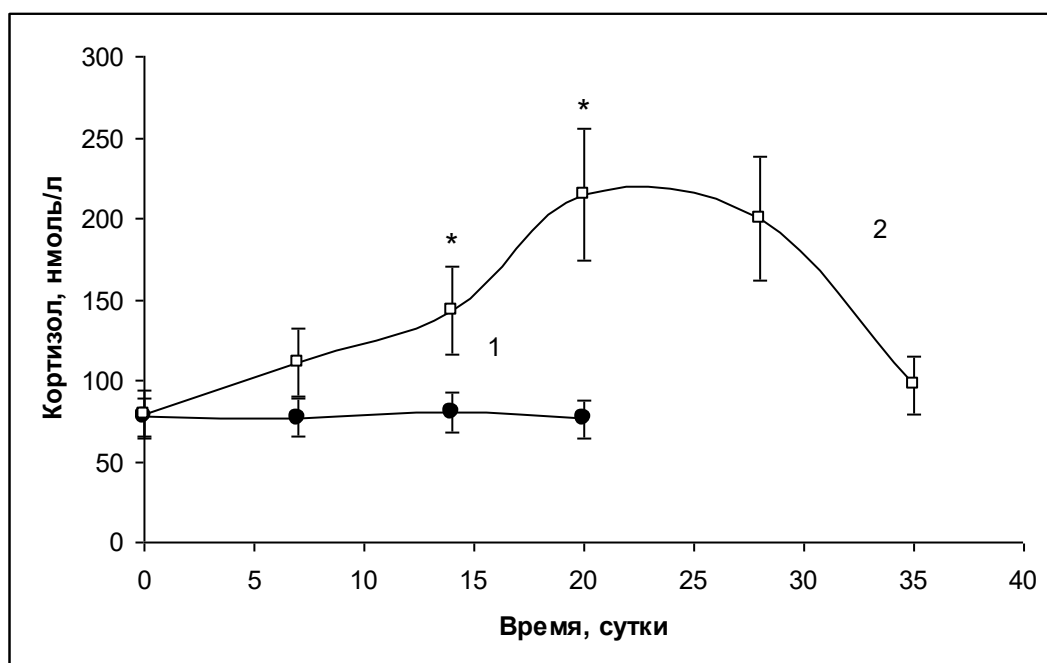


Рис. 3.19. Динамика содержания кортизола в сыворотке крови крыс: 1 – с адреналэктомией без трансплантации; 2 – с трансплантацией СВФ НЖ. * – значения кортизола достоверны по сравнению с адреналэктомией ($p < 0,05$).

Паренхима нативного надпочечника представлена корковым и мозговым веществом. Морфологически в адренокортексе хорошо различаются клубочковая, пучковая и сетчатая зоны (рис. 3.20). Под капсулой органа находится клубочковая зона, которая образована мелкими, призматической формы клетками с округлыми гиперхромными ядрами, расположенными в виде

небольших скоплений. Заметны вытянутые ядра клеток эндотелия, выстилающего капиллярную сеть железы. Пучковая зона представлена крупными полигональными клетками с четкими границами, эозинофильной, часто мелкозернистой цитоплазмой и относительно мономорфным, эксцентрически расположенным крупным округлым ядром. Клетки этой зоны образуют тяжи, ориентированные перпендикулярно поверхности надпочечника. В данной зоне также определяются клетки меньшего размера, неравномерно окрашивающиеся эозином, и имеющим мелкие гиперхромные ядра. Характерной особенностью пучковой зоны является наличие оптически пустых вакуолей, что свидетельствует об умеренной липидизации ткани. Клетки сетчатой зоны по морфологическим признакам близки к клеткам пучковой зоны, хотя имеют меньшие размеры и не образуют радиально направленные тяжи, липидизация слабо выражена. Мозговое вещество надпочечников состоит из хромаффинных клеток содержащих гранулы, округлой, многоугольной или призматической формы, ядра которых располагаются в базальной части.

На 28 сутки после аллогенной трансплантации СВФ НЖ новорожденных поросят при гистологическом анализе наблюдалась обширная лейкоцитарная инфильтрация трансплантата (рис. 3.21). В трансплантате сохраняются небольшие участки, представляющие собой скопления клеточных элементов, расположенных между тяжами соединительной ткани. Эти клеточные скопления имели характерное пучковое строение НЖ. Динамика изменения морфометрических индексов выживаемости аллогraftа СВФ НЖ под капсулой почки (рис. 3.22) была сходна с динамикой, полученной для аллогraftа СВФ ЩЖ (Рис. 3.8). Она характеризовалась лейкоцитарной инфильтрацией уже в первую посттрансплантационную неделю, после чего наблюдалось уменьшение количества инфильтрирующих клеток. Формирование соединительной ткани имело практически линейную зависимость от времени после трансплантации. Около 20% сохранившейся ткани НЖ наблюдалось на 7 сутки после операции, в среднем 13 и 8% сохранялось на 25 и 35 сутки соответственно.

При изучении гистологических образцов ксенографтов обнаружено, что на 20 сутки после трансплантации СВФ НЖ присутствуют участки обширной лейкоцитарной инфильтрации (рис. 3.23). Значительные скопления инфильтрирующих клеток наблюдаются на границе между ксенографтом и паренхимой почки. В центре трансплантированных фрагментов ткани наблюдаются участки некроза без инфильтрации. Некротизированные фрагменты окружены соединительной тканью, обогащенной фибробластами и гистиоцитами. На данном сроке после трансплантации в ксенографте наблюдается активное формирование соединительной ткани.

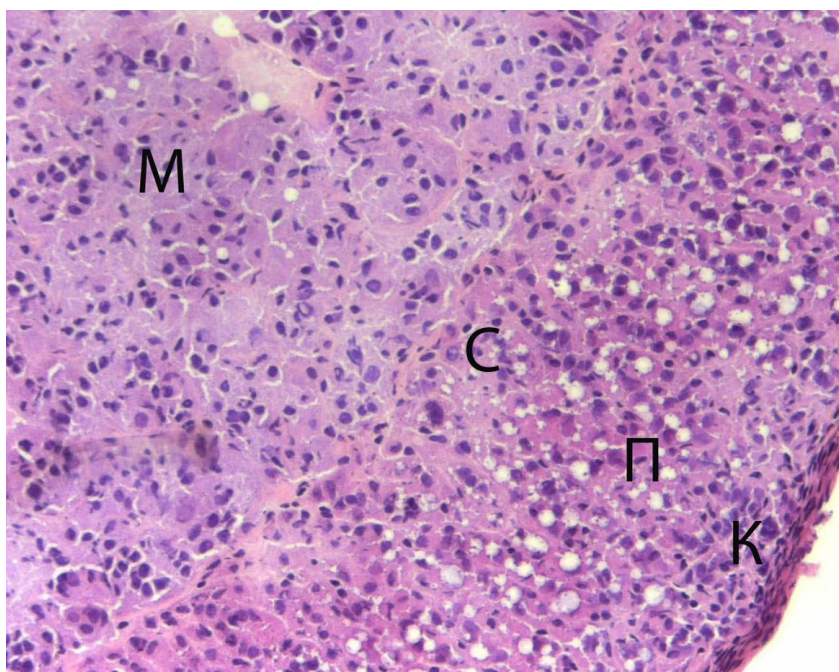


Рис. 3.20. Надпочечник половозрелой крысы: К – клубочковая зона, П – пучковая зона, С – сетчатая зона, М – медулла. Окраска гематоксилином и эозином. Ок. 10, об. 10.

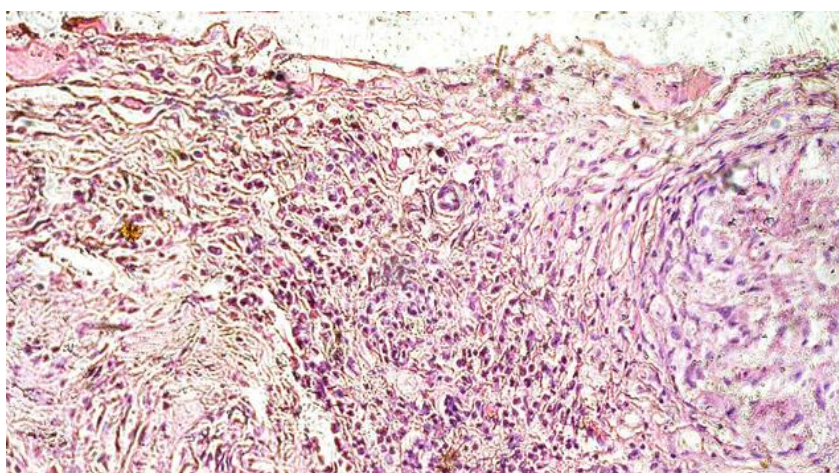


Рис. 3.21. Аллогенный трансплантат СВФ НЖ на 28 сутки после трансплантации. Окраска гематоксилином и эозином. Ок. 10, об. 20.

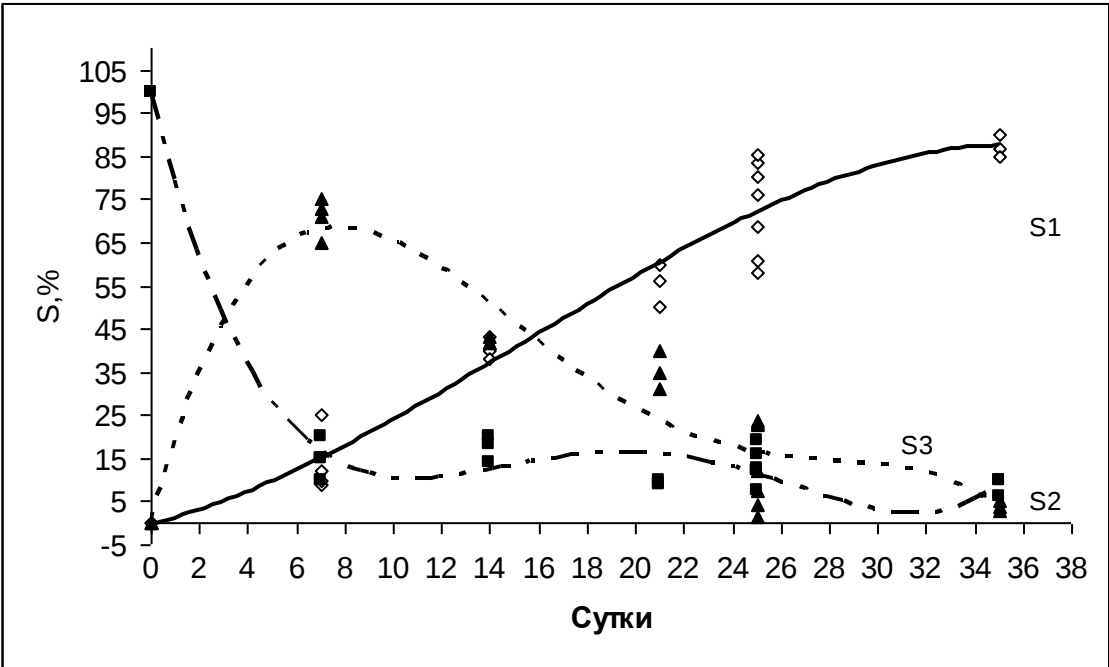


Рис. 3.22. Зависимость изменения морфометрических индексов выживаемости аллогrafta СВФ НЖ под капсулой почки. Линии тренда для данных: S1 – площади соединительной ткани; S2 – площади ткани с неповрежденной структурой; S3 – площади ткани с лейкоцитарной инфильтрацией.

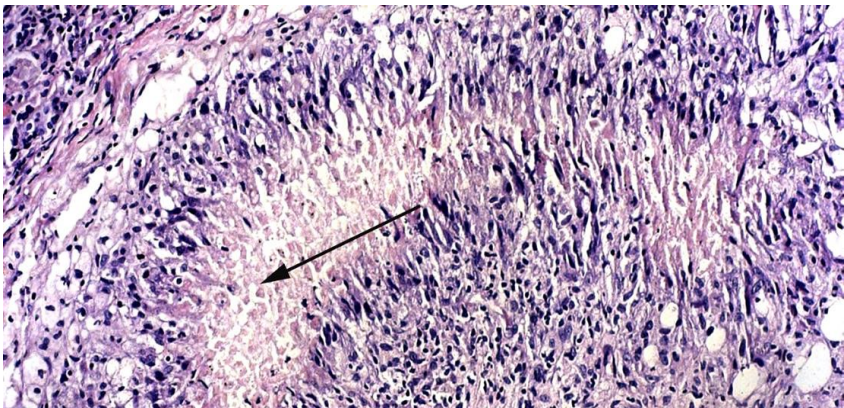


Рис. 3.23. Ксеногенный трансплантат СВФ НЖ на 28 сутки после трансплантации. Стрелкой указана зона некроза. Окраска гематоксилином и эозином. Ок. 10, об. 40.

Анализ изменения морфометрических индексов (рис. 3.24), обнаружил, что на 7-14 сутки около 50% площади ксенографта СВФ НЖ занимает лейкоцитарная инфильтрация. Интересной особенностью данного вида трансплантата являлось то, что в течение периода наблюдения 28 суток сохранялось достаточное количество ткани НЖ (около 25%), не подверженное деструктивным изменениям. Нужно отметить, что этот показатель включал в себя и участки с некрозом в центре фрагмента. Активное формирование соединительной ткани наблюдалось, начиная с 14 суток.

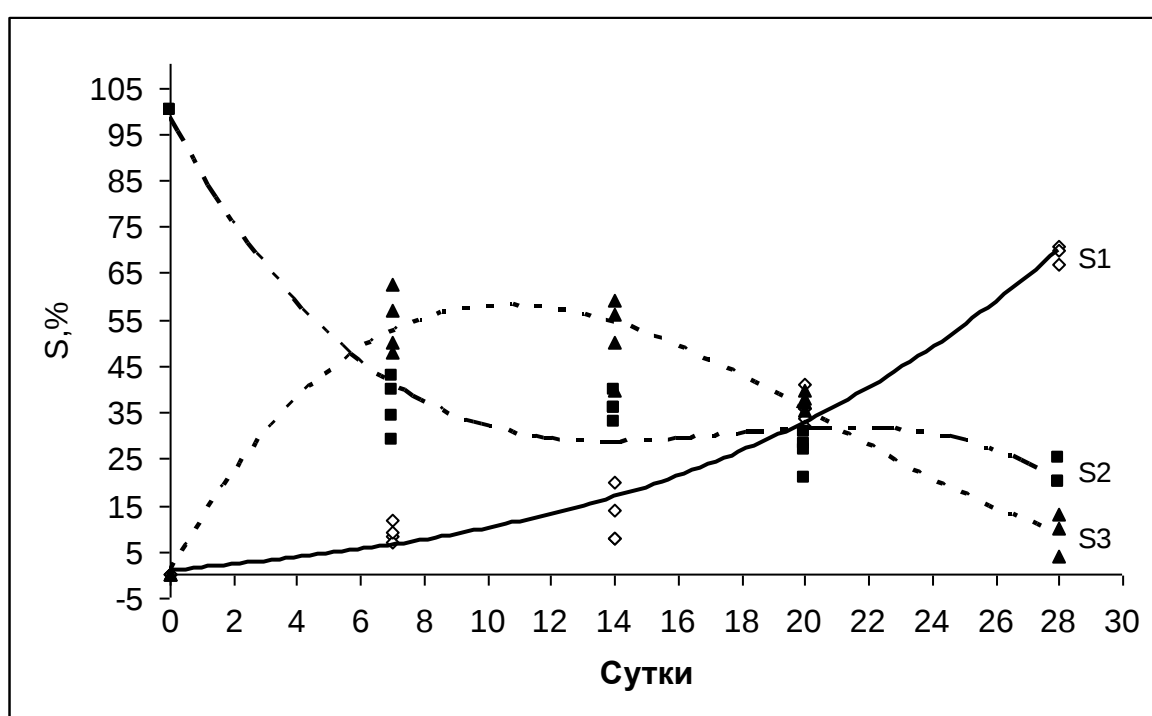


Рис. 3.24. Зависимость изменения морфометрических индексов выживаемости ксенографта СВФ НЖ под капсулой почки: S1 – линия тренда для данных площади соединительной ткани; S2 – линия тренда для данных площади ткани с неповрежденной структурой; S3 – линия тренда для данных площади ткани с лейкоцитарной инфильтрацией. Точками представлены значения, полученные для каждого образца.

Известно, что на выживаемость трансплантата могут иметь влияние не только генетическое родство донора и реципиента, но и некоторые минорные факторы, к которым относят возраст донора и реципиента, вид пересаживаемой ткани/органа и сайт трансплантации.

По данным некоторых авторов, использование фетальных и неонатальных доноров значительно продляет функционирование алло- и ксенографтов в организме иммунокомпетентного реципиента. В работе [357] была продемонстрирована выживаемость островков поджелудочной железы неонатальных поросят > 100 дней при трансплантации их ГКГ класс II-дефицитным мышам. Аллотрансплантация фетальных надпочечников предотвращала летальность после адреналэктомии у крыс [358], трансплантаты длительно выживали в сайте трансплантации, увеличиваясь в размерах [160, 248]. Считается, что иммуномодулирующий эффект неонатальных и фетальных тканей связан как с уменьшенной экспрессией трансплантационных антигенов [475], так и с доминированием в незрелой иммунной системе Th2-ответа на антиген [136], что является одним из факторов трансплантационной толерогенности [114].

Природные иммуномодулирующие свойства некоторых эндокринных желез также используются в трансплантологии, например, свойство клеток Сертоли семенников вызывать апоптоз иммунокомпетентных клеток путем Fas-FasL взаимодействия [150], осуществляя таким образом локальную иммупротекцию. Было установлено, что островки поджелудочной железы

отторгаются на 10-14 день без дополнительной иммуносупрессии при трансплантации под капсулу почки, тогда как при совместной трансплантации с клетками Сертоли наблюдается пролонгирование их выживаемости [259]. Подобный результат наблюдался при ксенотрансплантации хромаффинных клеток в мозг крысы совместно с клетками Сертоли [369, 473]. Надпочечные железы, секретируя природные иммуносупрессорные гормоны – глюкокортикоиды – также могут бы осуществлять локальный иммунный контроль со стороны трансплантата [22].

Некоторые сайты организма могут способствовать пролонгированному функционированию трансплантата. Семенники, мозг и передняя камера глаза являются классическими иммунопривилегированными сайтами гетеротопической трансплантации, способными в силу своих природных свойств сохранить трансплантат от иммунологического отторжения [186, 389]. Доказательствами того, что использование данных сайтов приводит к пролонгации выживаемости трансплантатов представлены в работах [62, 323, 390]. В них было показано, что алло- и ксенокraft островков поджелудочной железы, а также аллогraft паращитовидной железы, способны поддерживать нормогликемию и нормокальцемию у реципиентов в течение длительного времени при трансплантации в семенник.

Встречаются работы о том, что некоторые другие ткани организма могут осуществлять локальную иммунную протекцию. Улучшение выживаемости ксеногraftа островков поджелудочной железы быка было достигнуто при интратимической трансплантации [105]. Аллотрансплантация ткани паращитовидной железы в надпочечник также приводила к удлинению срока ее функционирования, говоря о том, что и этот сайт организма может осуществлять иммунопротекцию [261].

Прочие часто используемые, особенно в экспериментальной трансплантологии, сайты называются конвенциональными. К ним относятся субкапсулярное пространство почки, подкожная жировая клетчатка, мышцы, селезенка [420]. О выживаемости трансплантатов в этих сайтах организма

накоплено некоторое количество противоречивых данных, свидетельствующих как в пользу того, что они могут обладать некоторой иммунной привилегией, так и нет [116, 134, 213, 326].

В связи с этими предпосылками, нами были использованы эндокринные железы как обладающие возможной иммунной привилегией (семенник, надпочечник), так и не обладающие (щитовидная железа). Также в эксперименте были использованы ткани от неонатальных и половозрелых доноров.

Проведенный анализ выживаемости фрагментов ткани эндокринных желез позволил заключить следующее. Во-первых, все использованные виды ткани эндокринных желез (щитовидной железы, семенников, надпочечников) как половозрелых (крысы), так и неонатальных (поросята 1-2 суток после рождения) доноров, пересаженные без использования иммуносупрессии, подвергаются отторжению в сайте трансплантации под капсулой почки до полного исчезновения ткани в течение 4-5 недель.

Сила и скорость иммунного ответа на трансплантат зависит от близости генетического родства донора и реципиента. Одним из первых фактов, установленных в трансплантологии, являлся факт того, что органы однояйцевых близнецов не отторгаются [193]. При аллогенной трансплантации органов без иммуносупрессии острое отторжение может протекать в течение недель, а при ксеногенной возможно гиперострое отторжение в течение нескольких часов [363].

Однако эти постулаты относятся к области трансплантации органов. При трансплантации тканей и клеток вопрос о скорости отторжения трансплантатов различного донорского происхождения детально не изучен.

В связи с этим, нами был проведен сравнительный анализ выживаемости трансплантатов тканей щитовидной железы и надпочечников аллогенного и ксеногенного происхождения (рис. 3.25), в котором были использованы данные морфометрического анализа, а именно, площадь пересаженной ткани, не затронутой лейкоцитарным инфильтратом и имеющей признаки

функциональной активности. При этом в анализ не включали площадь пересаженной ткани с зонами некроза и распада клеток, кальцификатами и т.д.

Оценка логранкового критерия позволяет заключить, что выживаемость алло- и ксенографтов СВФ ЩЖ и семенников достоверно не отличается между собой ($P_{\log\text{-rank}} \text{ ЩЖ} = 0,355$; $P_{\log\text{-rank}} \text{ семенники} = 0,663$). Сходные данные были установлены при изучении выживаемости ксено-и аллогraftов островков поджелудочной железы [292]. Однако при сравнении выживаемости ткани НЖ, нами были получены данные о достоверном увеличении выживаемости ксенографтов СВФ НЖ по сравнению с аллогraftами ($P_{\log\text{-rank}} \text{ НЖ} = 0,004$). Также при оценке выживаемости в зависимости от вида эндокринной железы, то выживаемость ткани НЖ была достоверно выше, чем остальных желез ($P_{\log\text{-rank}} = 0,003$).

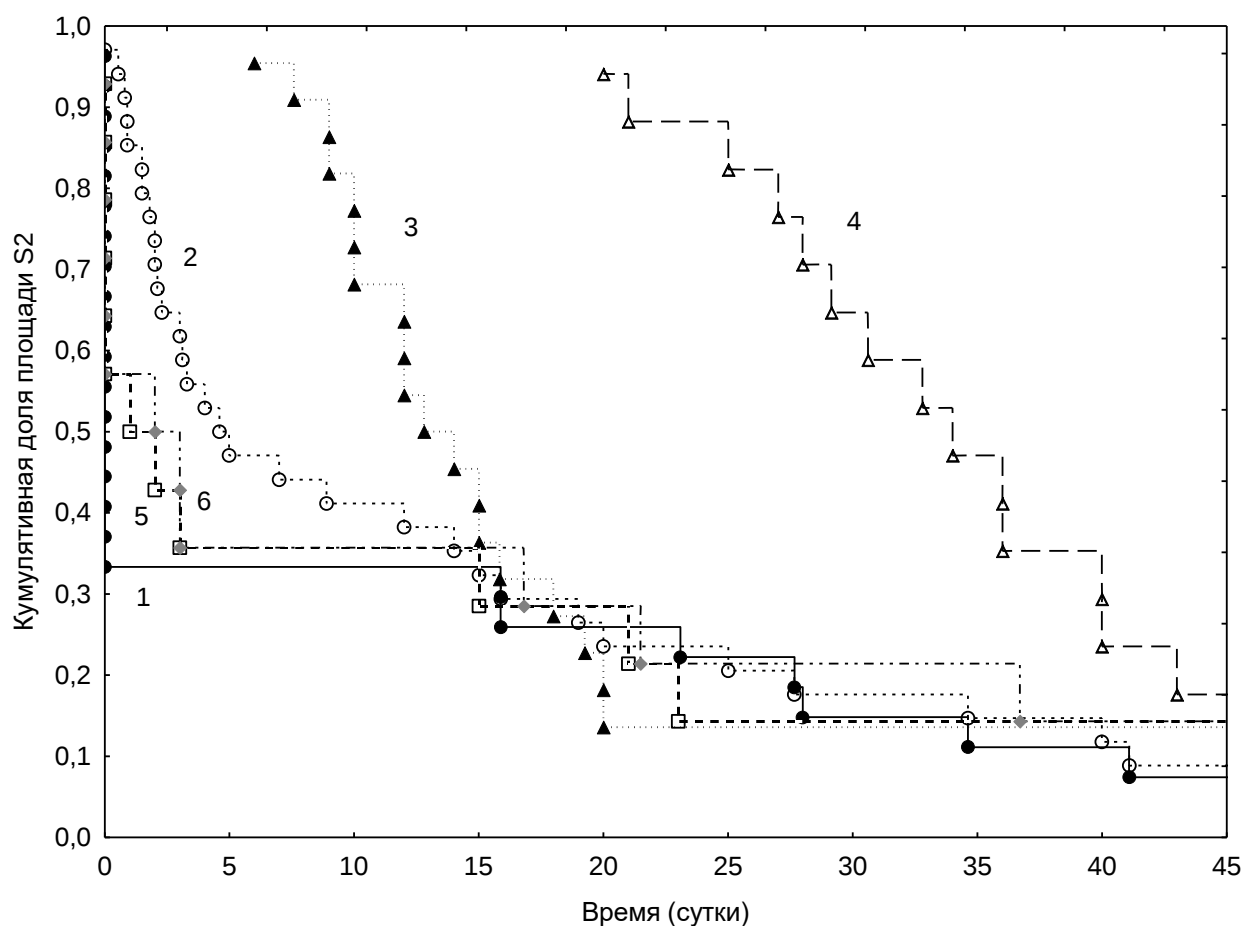


Рис. 3.25. Выживаемость алло- и ксенографтов СВФ эндокринных желез. Значения, представленные по оси Y, были рассчитаны из морфометрических данных площади ткани с неповрежденной структурой S2: 1 –

аллотрансплантация ЩЖ; 2 – ксенотрансплантация ЩЖ; 3 – аллотрансплантация НЖ; 4 – ксенотрансплантация НЖ; 5 – аллотрансплантация семенников; 6 – ксенотрансплантация семенников.

Таким образом, скорость отторжения субкапсулярных трансплантатов ткани эндокринных желез в большей степени зависит не от близости генетического родства донора и реципиента (аллогенный или ксеногенный), а от вида железы. Весьма вероятно, что уменьшение скорости отторжения трансплантатов НЖ связано с их природными иммуносупрессивными свойствами.

Выводы по разделу:

Анализ данных, изложенных в данном разделе, позволяет заключить следующее:

1. Алло- и ксенотрансплантаты ткани щитовидной железы, семенников, надпочечников, пересаженные гетеротопически под капсулу почки без применения иммуносупрессии, подвергаются острому отторжению.
2. Процесс отторжения пересаженной ткани включает в себя лейкоцитарную инфильтрацию, развивающуюся с первых дней и достигающую максимума на 7-14 сутки, прогрессирующее уменьшение площади ткани трансплантата и замещение ее соединительной тканью к 35 суткам.
3. Площадь ткани с неповрежденной вследствие отторжения структурой на 30 сутки после трансплантации для алло- и ксенотрансплантатов составляет соответственно: 0,1 и 0,3 % для ткани щитовидной железы, 25 и 0,1% для ткани семенников и 10,5 и 20% для ткани надпочечников.
4. Скорость отторжения субкапсулярных трансплантатов ткани эндокринных желез зависит от вида железы, причем выживаемость ткани НЖ достоверно выше, чем ткани ЩЖ и семенников.

Результаты, изложенные в данной главе, опубликованы в следующих работах:

1. Самченко И.И. Исследование изменения уровня 11-ОКС и веса органов животных после ксенотрансплантации нативной и криоконсервированной ОКННП / И.И. Самченко, Т.П. Бондаренко, Н.М. Алабедадькарим, Г.А. Божок // Проблемы криобиологии. – 2002. – №2. – С. 64-66.
2. Бондаренко Т.П. Коррекция гормонального статуса у кастрированных и с экспериментальным гипогонадизмом крыс путем алло- и ксенотрансплантации органотипических культур / Т.П. Бондаренко, Салех Абу-Жаяб, Г.А. Божок, Н.М. Алабедадькарим, Е.И. Легач // Проблеми екології та медицини. – 2003. – Т.7, №1-2. – С. 3-7.
3. Бондаренко Т.П. Ксенотрансплантация: исторический аспект и современное состояние проблемы / Т.П. Бондаренко, Г.А. Божок, Н.М. Алабедадькарим, Е.И. Легач // Трансплантологія. – 2004. – Т.7, №3. – С. 130-135.
4. Легач Е.И. Комбинированное культивирование и гетеротопическая трансплантация тестикулярной ткани с эксплантатом гипофиза / Е.И. Легач, Г.А. Божок, А.В. Пахомов, Н.Ф. Губина, Н.П. Бородин, Г.В. Дудецкая, Т.П. Бондаренко // Трансплантологія. – 2005. – Т.8, №3. – С. 28-34.
5. Билявская С.Б. Комбинированная трансплантация ткани щитовидной и надпочечниковых желез при послеоперационном гипотиреозе / С.Б. Билявская, Г.А. Божок, Е.И. Легач, Т.П. Бондаренко // Вісник ХНУ ім. В.Н. Каразіна. Серія: Біологія. – 2006. – Вип. 3, № 729. – С. 256-259.
6. Легач Є.І. Ефект стимуляції тиротропіном на рівень тироксину в плазмі крові гіпотиреодних щурів після трансплантації щитовидної залози / Є.І. Легач, С.Б. Билявська, Г.А. Божок, Т.П. Бондаренко // Науковий вісник Львівської національної академії ветеринарної медицини. – 2007. – Т.9, № 2. – С. 63-67.
7. Пахомов А.В. Восстановление добавочных половых желез крыс после поражения хлоридом кадмия / А.В. Пахомов, Г.А. Божок, Е.И. Легач, Т.П. Бондаренко // Трансплантологія. – 2007. – Т.9, №1. – С.212 – 214.

8. Геращенко А.В. Влияние функционального состояния органной культуры надпочечников на уровень глюкокортикоидов в плазме крыс при ксенотрансплантации / А.В. Геращенко, Т.П. Бондаренко, Н.М. Алабедалькарим, Г.А. Божок // Матеріали науково-практичної конференції, присвяченій 150-річчю з дня народження академіка В.Я.Данилевського. – Харків, 2002. – С.27-28.
9. Alabedalkarim N.M. Investigation of xenograft survival in experimental model / N.M. Alabedalkarim, I.I. Samchenko, G.A. Bozhok // III Міжнародна медична конференція студентів та молодих учених „Медицина-здоров'я-XXI сторіччя”. – Дніпропетровськ, 2002. – С.33.
10. Legach E.I. Clinical Results of Xenotransplantation of Adrenal Gland Organ Culture to Patients with Hypocorticism / E.I. Legach, G.A. Bozhok, N.M. Alabedalkarim // 13th European Students' Conference for promising biomedical scientists and future doctors. – Berlin, 2002. – P.269.
11. Божок Г.А. Секреція тестостерону органотиповою культурою сім'яників в умовах сумісного культивування та сумісної трансплантації / Г.А. Божок, Є.І. Легач, О.В. Пахомов // Укр.біохім.журнал. – 2004. – Т.76, №4. – С.126.
12. Пахомов А.В. Интратестикулярная трансплантация клеток Лейдига при поражении семенников, вызванном введением хлорида кадмия / А.В. Пахомов, Г.А. Божок, Т.П. Бондаренко // Клінічна хірургія. – 2006. – №4-5. – С.105-106.
13. Легач Е.И. Комбинированная трансплантация органотипических культур эндокринных желез в профилактике и лечении эндокринопатий / Е.И. Легач, Н.В. Скрипниченко, Г.А. Божок // Науково-практична конференція «Профілактика, діагностика та лікування – основні складові терапії». – Харків, 2006. – С. 49.
14. Легач Є.І. Биохимические показатели крови гипотиреоидных крыс после ксенотрансплантации органотипических культур щитовидной железы и

- семенников / Є.І. Легач, Г.А. Божок // Матеріали IX Українського біохімічного з'їзду. – Харків, 2006, Т.2. – С.77.
15. Bilyavskaya S.B. Result of experimental hypothyroidism correction by combined transplantation of organ cultures / S.B. Bilyavskaya, G.A. Bozhok, E.I. Legach, T.P. Bondarenko // European J. of Medical Research. – 2007. – Vol. 12, supplement IV. – P. 45.
 16. Легач Е.И. Преимущества комбинированной трансплантации органотипических культур эндокринных желез в лечении гормональной недостаточности / Е.И. Легач, Г.А. Божок, С.Б. Билявская, Н.В. Колот, Т.П. Бондаренко // Материалы IV Всероссийского съезда трансплантологов памяти ак. В.И.Шумакова. – Москва, 2008. – С. 362-363.
 17. Легач Е.И. Новые трансплантационные методы лечения эндокринопатий / Е.И. Легач, Г.А. Божок // Материалы IV Всероссийского конгресса «Профессия и здоровье». – Москва, 2008. – С.543-545.
 18. Legach I. Cryopreserved organ culture of endocrine glands for hormonal insufficiency treatment / E.I. Legach, G.A. Bozhok, T.P. Bondarenko // 12th European Congress of Endocrinology. – Prague, 2010. – P. 190.
 19. Легач Е.И. Повторные трансплантации органотипических культур надпочечных желез больным с хронической надпочечниковой недостаточностью / Е.И. Легач, Г.А. Божок // IV Всероссийский симпозиум “Актуальные вопросы тканевой и клеточной трансплантологии”. – Санкт-Петербург, 2010. – С. 268-269.

3.2. Влияние криоконсервирования на количество и фенотипический состав антиген-представляющих клеток надпочечных желез

Одним из постулатов трансплантологии является то, что инициатором распознавания и отторжения чужеродной ткани служат антиген-представляющие клетки (АПК), которыми в эндокринных тканях являются дендритные клетки и тканевые макрофаги. В настоящее время многочисленные данные свидетельствуют о тесном регуляторном взаимодействии между нейро-эндокринной и иммунной системами. Морфологические исследования показали наличие в гипофизе, надпочечниках, островках Лангерганса, щитовидной железе, интерстиции тестисов, а также в овариальной ткани большого количества резидентных макрофагов и дендритных клеток [58, 117, 119, 176, 218, 253, 377]. Установлено, что эти клетки участвуют в паракринной регуляции синтеза гормонов [86, 117, 131, 253, 288, 330]. Очевидно, что высокое содержание макрофагов и дендритных клеток должно отражаться на выживаемости ткани после трансплантации. В работах Taylor M.J. с соавторами [430, 431, 432] была установлена высокая чувствительность тканевых АПК к замораживанию. Оптимум выживаемости лимфоцитов, макрофагов и дендритных клеток был установлен в диапазоне скорости охлаждения 0,3-5°C/мин [430, 432]. Авторами было высказано предположение, что при использовании режима замораживания, убивающего АПК, но оставляющего жизнеспособными остальные клетки, возможно добиться

уменьшения иммуногенности пересаживаемой ткани. Это является очень важным для пролонгирования выживаемости трансплантата. Таким образом, криоконсервирование может стать не только способом долгосрочного хранения ткани эндокринных желез, но и способом снижения ее иммуногенности.

Этот факт явился предпосылкой для данного этапа нашей работы, на котором мы исследовали влияние криоконсервирования с различной скоростью охлаждения на результат трансплантации фрагментов ткани эндокринной железы. В качестве объекта исследования на данном этапе работы нами были выбраны надпочечные железы как один из общепризнанных компонентов эндокринной системы, имеющий непосредственное влияние на иммунитет, и наиболее богатых АПК. В корковом и медуллярном веществе надпочечной железы находится значительное количество резидентных макрофагов [58, 385], дендритных клеток [372], клеток, экспрессирующих антигены ГКГ классов I и II [301, 307]. Однако, несмотря на достаточное количество сведений о наличии дендритных клеток (ДК) в НЖ, до сих пор не проводилось тестирование их фенотипа.

Известно, что ДК являются гетерогенной популяцией клеток, имеющих различную локализацию в организме, фенотип и функциональные особенности. ДК мыши по происхождению разделяются на две основные субпопуляции: миелоидные и лимфоидные [414, 415, 421]. Все ДК мышей экспрессируют CD11c [118], являющийся основным фенотипическим маркером. Дальнейшее общепринятое фенотипическое разделение ДК основано на идентификации экспрессии CD8 α , отражающего их лимфоидное происхождение, либо CD11b, отражающего принадлежность клеток к миелоидному ряду [118, 298, 462]. Функционально, CD8 α ⁺CD11b⁻ секретируют IL-12 и IFN- γ , индуцируя выработку Th1-цитокинов и активацию цитотоксических Т-лимфоцитов. CD8 α ⁻CD11b⁺ являются сильными стимуляторами Th2-иммунного ответа, для них не характерна секреция IFN- γ и IL-12 [118, 280]. Однако такое деление достаточно условно, так как в последнее время в центральных и периферических органах мышей были обнаружены как минимум 5 субпопуляций ДК. В селезенке

мышей обнаружено 3 фенотипически различных субпопуляции ДК: $CD4^-CD8\alpha^+DEC205^+CD11b^-$, $CD4^+CD8\alpha^-DEC205^-CD11b^+$, $CD4^-CD8\alpha^-DEC205^-CD11b^+$ [236, 462]. В лимфатических узлах кроме трех названных, определяется еще одна с фенотипом $CD4^-CD8\alpha^{low}DEC205^+CD11b^-$ [402]. В тимусе существует уникальная субпопуляция ДК, имеющая фенотип $CD4^-CD8\alpha^-DEC205^+CD11b^-$ [280].

Таким образом, в нашей работе вначале необходимо было определить, к какому фенотипу относятся ДК надпочечников. Для этого в эксперименте были использованы НЖ мышей линий BALB/c и C57BL/6, из которых получали суспензию клеток, как описано в разделе «Материалы и методы». Анализ проводили с помощью проточной цитофлуориметрии, используя прямое мечение антителами, конъюгированными с флуорохромами.

Учитывая, что суспензия клеток НЖ содержит большое количество эритроцитов, вначале были использованы антитела к специфическим антигенам эритроцитов TER119 и лейкоцитов CD45. Было обнаружено, что количество клеток, несущих маркер TER119⁺, т.е. эритроцитов, составляло 67% от общего числа проанализированных клеток, и 98% от клеток региона R1 (рис. 3.26). CD45-позитивные клетки составляли 7% от общего числа клеток и в среднем 44% от клеток региона R2.

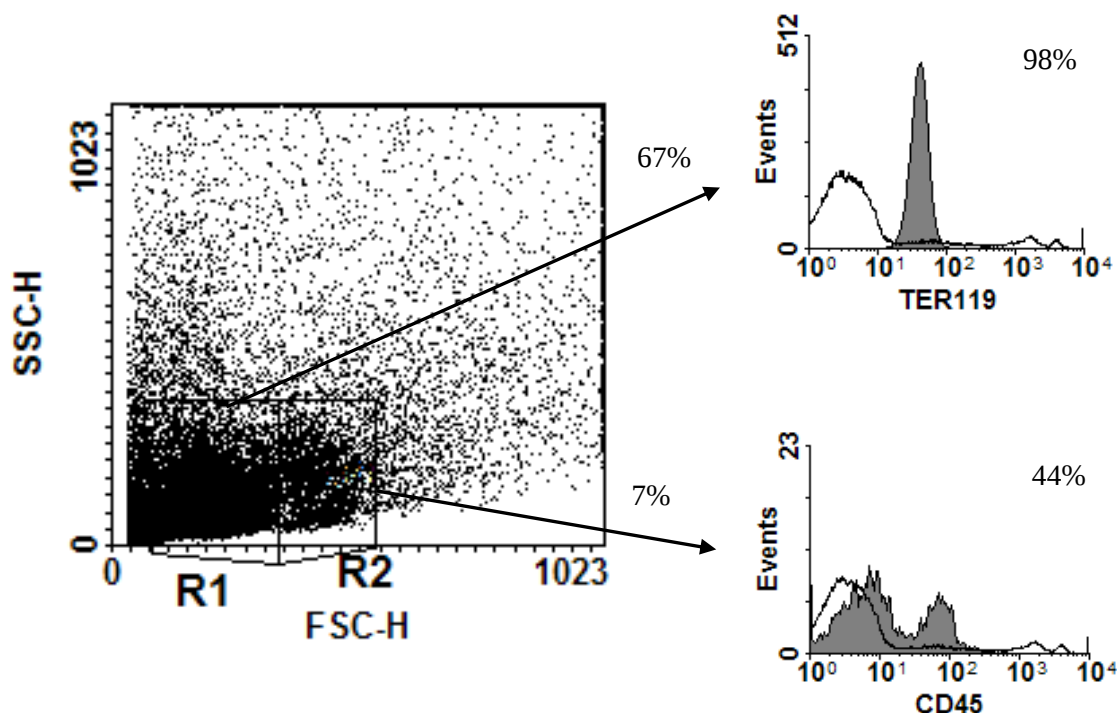
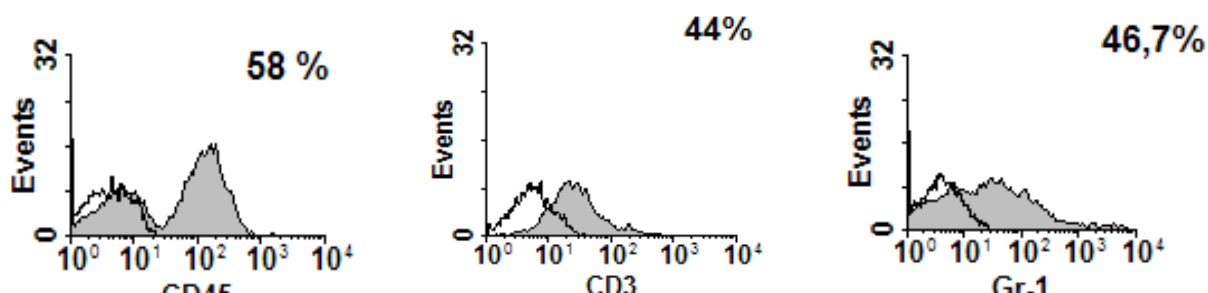


Рис. 3.26. Экспрессия TER119 и CD45 в суспензии клеток, полученной из надпочечников. Открытые гистограммы представляют собой окрашивание с использованием изотип-контроля, тогда как затененные гистограммы - окрашивание антителами. Число на гистограммах показывает процент позитивных клеток в выделенном регионе. Представлены результаты шести экспериментов со сходными результатами.

В последующих экспериментах мы удаляли эритроциты лизирующим буфером и анализировали экспрессию специфических маркеров ДК в регионе R2.

Было установлено, что суспензия клеток НЖ содержит клетки, экспрессирующие общий лейкоцитарный антиген CD45, лимфоцитарный маркер CD3, гранулоцитарный маркер Gr-1, маркеры ДК CD11c и CD11b, но не экспрессируют DEC205 (рис. 3.27).



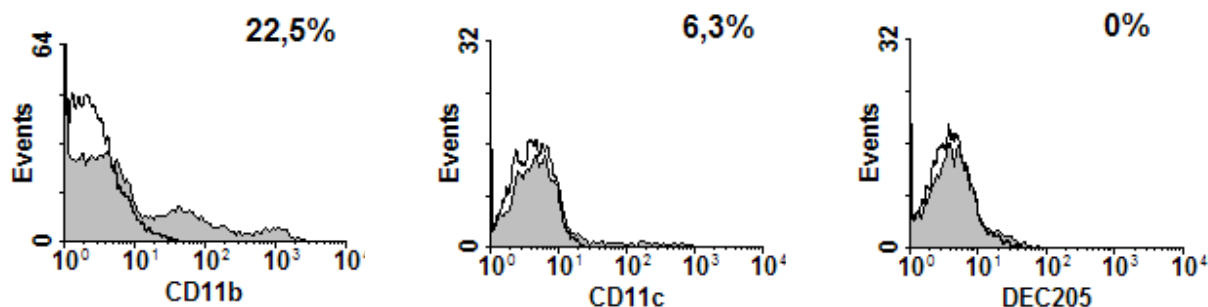


Рис. 3.27. Экспрессия антигенов CD45, Gr-1, CD3, CD11c, CD11b, DEC205 в суспензии клеток, полученной из надпочечников. Открытые гистограммы представляют собой окрашивание с использованием изотип-контроля, тогда как затененные гистограммы - окрашивание антителами. Число на гистограммах показывает процент позитивных клеток в регионе R2. Представлены данные одного репрезентативного эксперимента.

Таким образом, в суспензии клеток надпочечников были идентифицированы маркеры, относящиеся к фенотипу ДК. На следующем этапе работы было проведено двойное попарное мечение специфическим маркером ДК CD11c и остальными (рис. 3.28). Заметно, что все CD11c-позитивные клетки являются также позитивными по маркеру CD11b, но негативны по маркерам CD8 α и DEC205, что позволяет определить фенотип ДК НЖ мышей как CD11c⁺CD8 α ⁻DEC205⁻CD11b⁺ и отнести их к миелоидному ряду. В среднем в суспензии клеток НЖ мышей определяется $7,9 \pm 3,6\%$ клеток с высокой экспрессией CD11c и $15,5 \pm 6,8\%$ клеток с экспрессией CD11b.

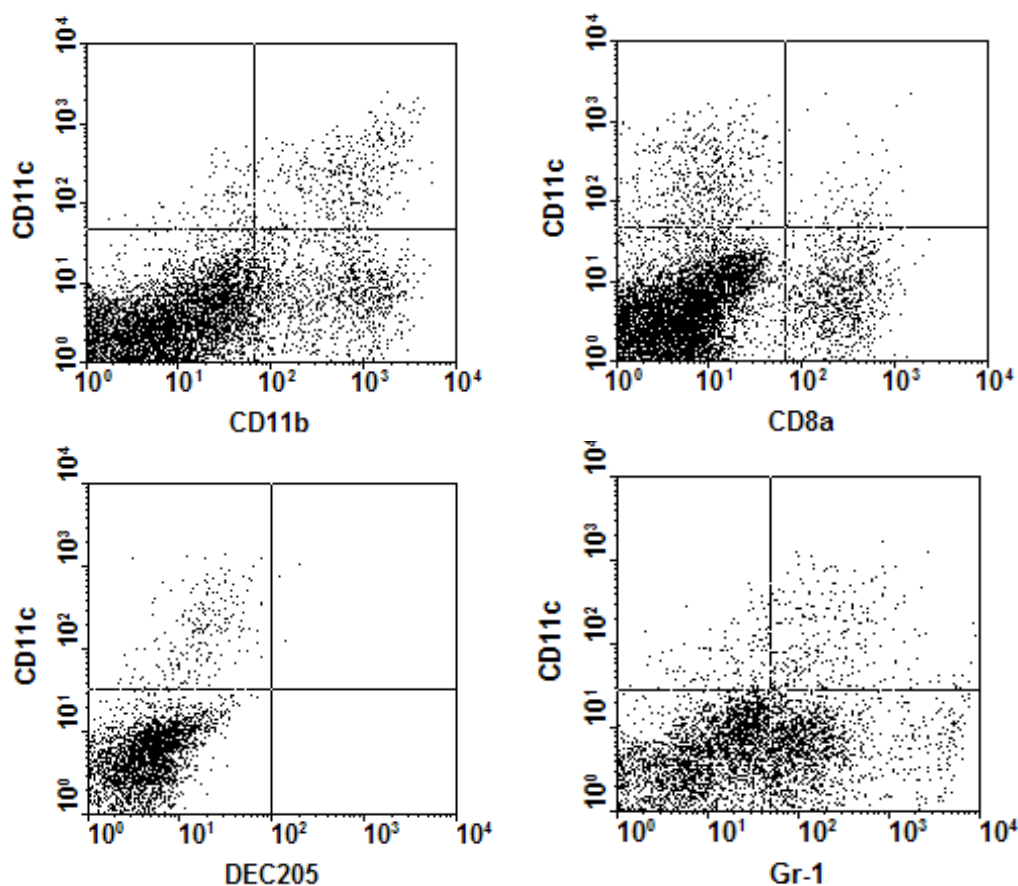


Рис. 3.28. Двойное попарное мечение суспензии клеток НЖ специфическим маркером ДК CD11c и CD11b, CD8 α , DEC205, Gr-1.

Для изучения влияния криоконсервирования на количественный и качественный состав АПК НЖ нами были использованы несколько режимов. Их основное различие заключалось в использовании различных температурных режимов охлаждения: режима медленного двухэтапного охлаждения и режима быстрого одноэтапного охлаждения. Более щадящий режим медленного охлаждения включал использование скорости охлаждения 1 °C/мин до -70 °C на первом этапе, после чего образцы помещали в жидкий азот. Более повреждающий режим быстрого охлаждения реализовался прямым погружением образца в жидкий азот в течение 1,5 минут, при этом реализовалась скорость охлаждения >100 °C/мин. Два указанных режима были выбраны из тех соображений, что они должны были обеспечить разную степень

сохранности АПК при замораживании. В качестве промежуточных режимов охлаждения были выбраны режимы 10 и 40°C/мин. Во всех случаях использовался криопротектор ДМСО в концентрации 10%.

СВФ НЖ были заморожены с данными скоростями, после чего из них была получена суспензия клеток. Клетки были инкубированы с антителами к антигенам CD11c и CD11b. Рецептор CD11b является маркером моноцитарно-макрофагального ряда и представлен не только на ДК, но и на тканевых макрофагах [303]. Учитывая, что в НЖ присутствует достаточное количество макрофагов, мы считали нужным идентифицировать в криоконсервированной суспензии клеток НЖ не только специфический маркер ДК CD11c, но и CD11b, считая, что это более полно отражает экспрессию АПК в ткани НЖ.

В результате проведенных экспериментов было установлено, что уровень экспрессии CD11c и CD11b после криоконсервирования со скоростями охлаждения 10, 40 и >100°C/мин был значительно ниже по сравнению с образцами, замороженными со скоростью охлаждения 1°C/мин (Рис. 3.29). Показатели экспрессии маркеров дендритных клеток CD11c и моноцитарно-макрофагальных клеток CD11b уменьшились, соответственно: на 78,3 и 60% после криоконсервирования со скоростью охлаждения 10°C/мин; на 82,7 и 56,2% после криоконсервирования со скоростью охлаждения 40°C/мин; на 94,1 и 93,4%, после криоконсервирования со скоростью охлаждения >100°C/мин.

В литературе существуют сведения о том, что стероидогенные клетки проявляют достаточную устойчивость к замораживанию. Например, секреция кортизола фрагментами ткани надпочечников новорожденных поросят после замораживания при 100°C/мин была сходной с образцами, замороженными при 1°C/мин [45]. В работе R.R. Santos с соавт. [371] овариальные фолликулы имели похожие значения жизнеспособности при низкой и высокой скоростях охлаждения. Р. Mazur приводит данные о том, что жизнеспособность клеток яичника китайского хомячка, которые были заморожены со скоростью 100°C/мин была довольно высокой (около 75%) [302].

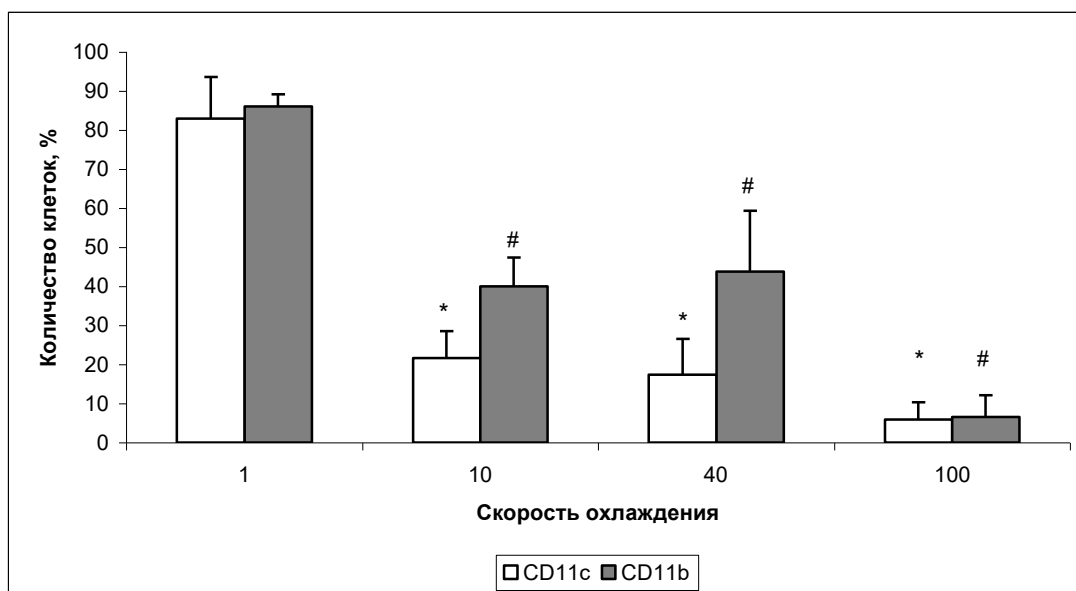


Рис. 3.29. Экспрессия антигенов CD11c и CD11b в суспензии клеток, полученной из НЖ. Данные представлены в процентах относительно незамороженных образцов. *, # – указывают на достоверную разницу в количестве CD11c⁺ и CD11b⁺ клеток от соответствующих показателей, полученных при медленном замораживании (1°C/мин) при P<0,05.

В наших исследованиях было установлено, что количество жизнеспособных клеток после оттаивания существенно не отличается между использованными четырьмя режимами охлаждения (рис. 3.30). В среднем, жизнеспособность клеток варьировала от 52,3±12,8% до 72,0±9,4%. Однако сохранность клеток снижалась по сравнению с величинами, полученными для незамороженного контроля (P<0,05), до 44 и 35% при скорости охлаждения выше 40 и 100°C/мин. С одной стороны, снижение сохранности клеток связано с удалением АПК из ткани, но с другой стороны, этот эффект также может быть связан с гибелью других клеток, в том числе гормоно-продуцирующих.

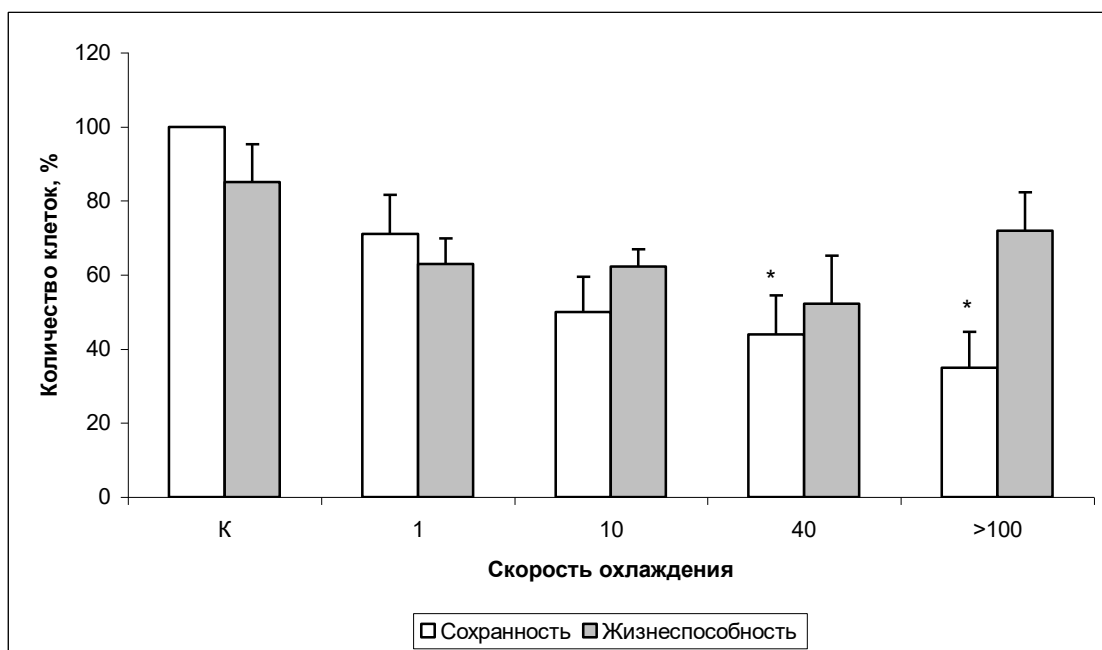


Рис.3.30. Сохранность и жизнеспособность клеток, полученных из криоконсервированных с различными скоростями охлаждения НЖ. * – данные достоверно отличаются от контроля, $P < 0,05$.

Таким образом, наши результаты подтвердили *in vitro* возможность элиминации АПК из ткани эндокринного происхождения с помощью охлаждения. На следующем этапе работы необходимо было проверить, как это отражается на выживаемости трансплантата ткани СВФ НЖ. Однако так как трансплантации подлежали фрагменты ткани, а не суспензия клеток, нами дополнительно был проведен иммуногистохимический анализ экспрессии антигенов АПК во фрагментах ткани.

Молекулы ГКГ II класса в нормальных условиях экспрессируются только на профессиональных АПК [121]. Ранее некоторыми авторами было показано наличие клеток, экспрессирующих ГКГ II класса, в надпочечниках [224, 247, 301, 307]. Нами также были использованы антитела против ГКГ II класса как общий маркер АПК.

На рисунке 3.31 показано распределение ГКГ класс II - позитивных клеток в СВФ НЖ. Как в кортикальной, так и медуллярной зонах надпочечника определялось значительное количество позитивных клеток. Наблюдалось

радиально-направленное расположение ГКГ-меченных клеток, вероятно, находящихся вблизи капилляров синусоидов. Количество ГКГ класс II-положительных клеток в поле зрения с увеличением $\times 40$ в среднем составляло $8,3 \pm 5,4$. Криоконсервирование как с низкой ($1^\circ\text{C}/\text{мин}$), так и с высокой ($>100^\circ\text{C}/\text{мин}$) скоростями охлаждения не влияло на количество и распределение ГКГ класс II-позитивных клеток между зонами надпочечников. На рисунках 3.32 и 3.33 представлены микрофотографии образцов, меченных антителами непосредственно после замораживания.

Количество ГКГ класс II-положительных клеток в поле зрения во ФрТН после отогрева составляло $9,00 \pm 5,63$ (для скорости охлаждения $1^\circ\text{C}/\text{мин}$) и $7,4 \pm 5,34$ (для скорости охлаждения $>100^\circ\text{C}/\text{мин}$).

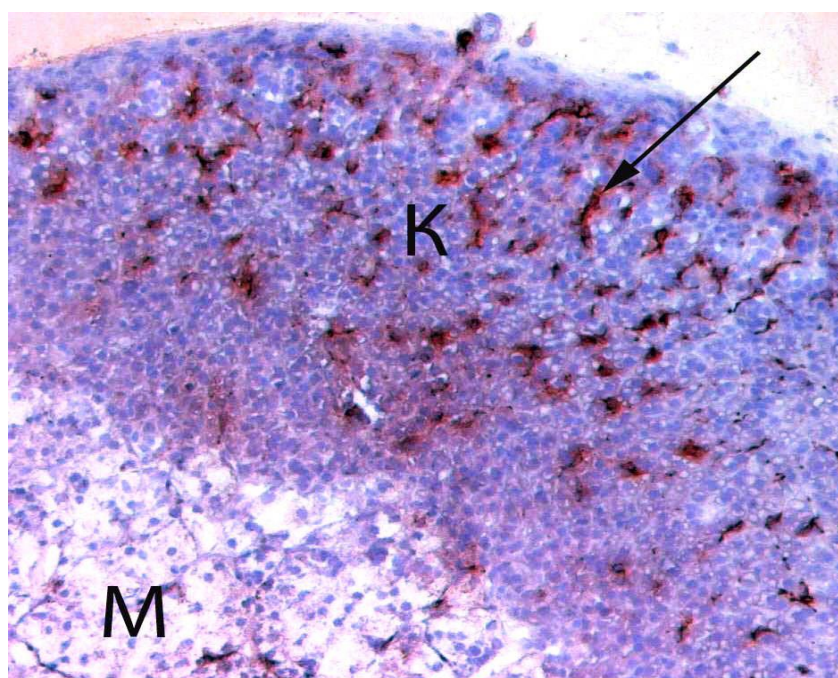


Рис. 3.31. Иммуногистохимическое мечение фрагментов СВФ НЖ с антителами против антигенов ГКГ II класса: К – кортекс, М – медулла, стрелкой указано позитивное мечение. Контрастирование образца гематоксилином. Ок.10, об. 10.

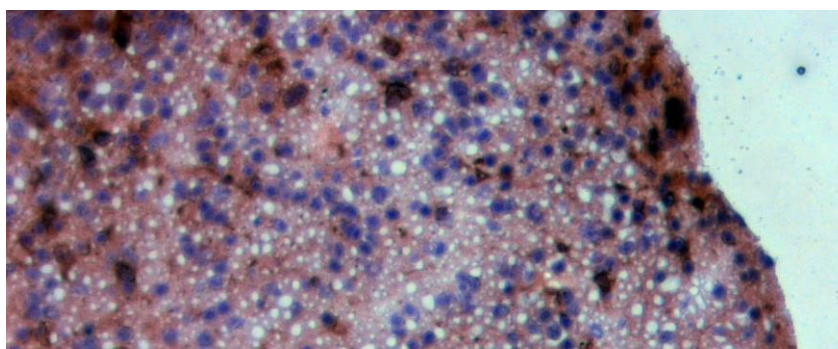


Рис. 3.32. Иммуногистохимическое мечение НЖ, криоконсервированных со скоростью охлаждения $1^{\circ}\text{C}/\text{мин}$, антителами против антигенов ГКГ II класса. Контрастирование образца гематоксилином. Ок.10, об. 20.

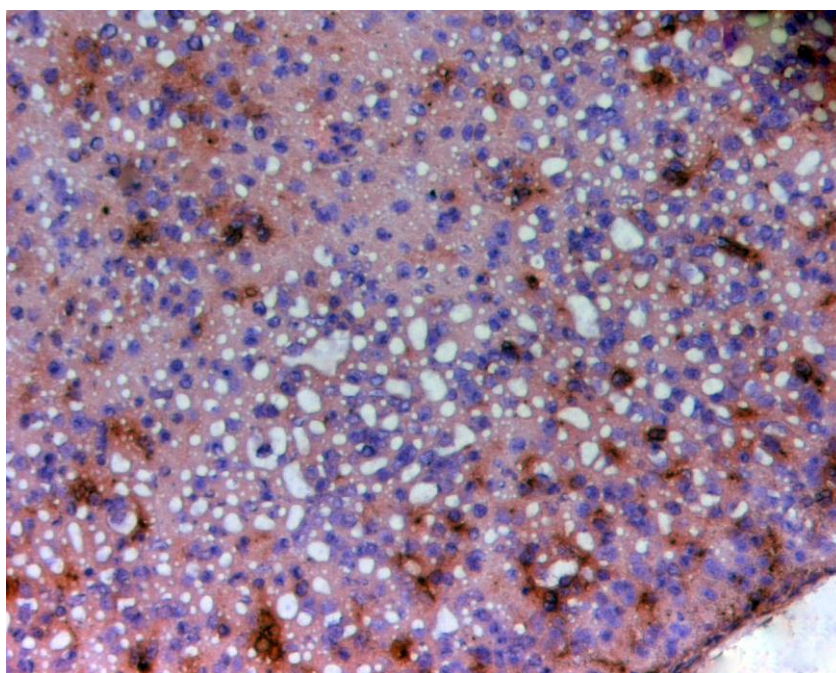


Рис. 3.33. Иммуногистохимическое мечение НЖ, криоконсервированных со скоростью охлаждения $>100^{\circ}\text{C}/\text{мин}$, антителами против антигенов ГКГ II класса. Контрастирование образца гематоксилином. Ок.10, об. 20.

Полученные результаты вступали в противоречие с данными цитофлуориметрического анализа, где была обнаружена достоверная разница в количестве дендритных клеток и макрофагов, присутствующих в

замороженных с различной скоростью охлаждения СВФ НЖ. Мы предположили, что это противоречие связано с тем, что АПК, хотя и повреждаются под действием факторов криоконсервирования, остаются в ткани. Тогда как при получении суспензии клеток для проточной цитофлуориметрии такие клетки элиминируются на этапах ферментации и отмывок. Для проверки этого предположения нами был применен метод органотипического культивирования размороженных фрагментов ткани, в ходе которого при смене питательной среды возможно удаление некротических и апоптических клеток, поврежденных при криоконсервировании. После 48 ч культивирования криоконсервированных фрагментов НЖ нами было обнаружено резкое падение количества клеток, экспрессирующих антигены ГКГ II класса, в образцах, замороженных с обеими скоростями охлаждения (рис. 3.34 и 3.35). Культивирование приводило к достоверному снижению количества этих клеток до $1,00 \pm 1,73$ и $0,9 \pm 0,34$, соответственно для низкой и высокой скоростей. Эти данные находятся в соответствии с результатами работы [158], в которой был установлен явный эффект уменьшения экспрессии антигенов ГКГ в островках поджелудочной железы после криоконсервирования с последующим культивированием. Известно, что культивирование само по себе является фактором, влияющим на процессы регуляции экспрессии антигенов ГКГ в клетках. С одной стороны, при культивировании наблюдается снижение количества ГКГ-позитивных клеток в ткани [92, 365]. Например, в работе [365] было продемонстрировано исчезновение клеток, экспрессирующих ГКГ II класса, на 7 сутки культивирования островков поджелудочной железы. С другой стороны, присутствие некоторых иммунных стимуляторов, например, IFN- γ или лектинов в среде культивирования индуцирует экспрессию ГКГ II класса на паренхиматозных клетках эндокринной железы, например, тироцитах, адренокортикоцитах и клетках островков Лангерганса [349, 482].

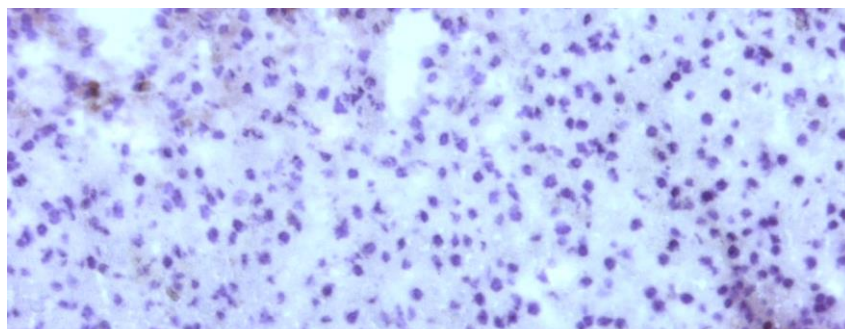


Рис. 3.34. Иммуногистохимическое мечение антителами против антигенов ГКГ II класса фрагментов НЖ, криоконсервированных со скоростью охлаждения $1^{\circ}\text{C}/\text{мин}$ и культивированных в течение 48 ч. Контрастирование образца гематоксилином. Ок.10, об. 20.

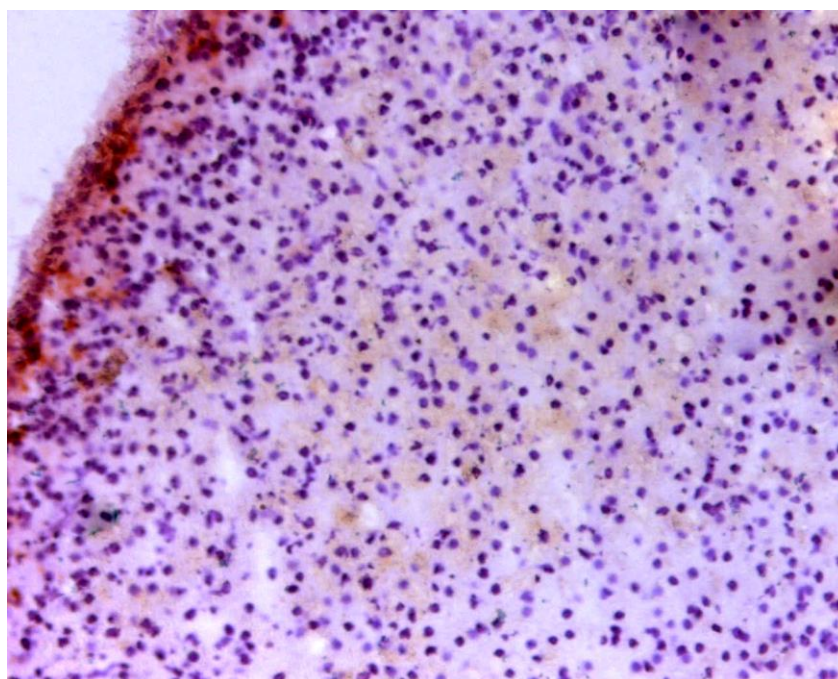


Рис. 3.35. Иммуногистохимическое мечение антителами против антигенов ГКГ II класса фрагментов НЖ, криоконсервированных со скоростью охлаждения $>100^{\circ}\text{C}/\text{мин}$ и культивированных в течение 48 ч. Контрастирование образца гематоксилином. Ок.10, об. 20.

Появление провоспалительных цитокинов в среде культивирования криоконсервированных фрагментов НЖ может быть обусловлено тем, что замораживание приводит к активации секреции данных веществ макрофагами

[220, 455, 456]. В связи с этим, начальный уровень экспрессии антигенов ГКГ II класса в размороженных фрагментах ткани может определяться не присутствием АПК, но повышением экспрессии данных антигенов на остальных клетках.

На следующем этапе работы свежевыделенные и криоконсервированные фрагменты НЖ трансплантировали по капсулу почки сингенным и аллогенным (от BALB/c к C57BL/6) адреналэктомированным мышам. Так как наши предыдущие результаты продемонстрировали, что предобработка размороженных фрагментов НЖ путем культивирования является необходимой для уменьшения количества АПК, перед трансплантацией образцы были культивированы в течение 48 часов.

Ранее установлено, что ауто- или сингенная трансплантация ткани/клеток надпочечников может предотвратить смерть вследствие гормональной недостаточности [118, 438, 440, 444]. Аллогенная трансплантация является менее успешной, например, в работе [387] уровень кортикостерона у адреналэктомированных мышей не восстанавливался, вследствие чего они не выживали после операции.

Результаты наших исследований подтвердили, что адреналэктомированные мыши без трансплантации умирали на 8-9 день после операции (рис. 3.36). При сингенной трансплантации отторжение обычно отсутствует, поэтому, трансплантат не разрушается вследствие отторжения и может предотвратить смерть адреналэктомированных животных в том случае, если он является гормонально активным. Наши данные показывают, что животные с сингенными СВФ НЖ выживали в течение всего срока наблюдения, несмотря на адреналэктомию. Гормональная состоятельность сингенных трансплантатов наблюдалась и после криоконсервирования как со скоростью охлаждения $1^{\circ}\text{C}/\text{мин}$, так и со скоростью $>100^{\circ}\text{C}/\text{мин}$.

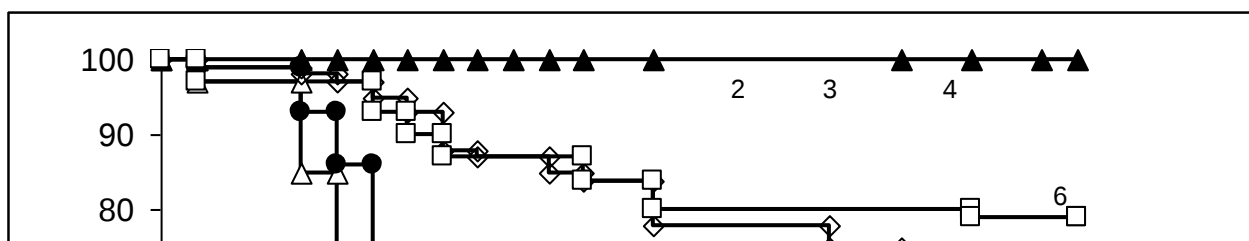


Рис. 3.36. Выживаемость мышей после двусторонней адреналэктомии и последующей трансплантации фрагментов НЖ: 1 – адреналэктомия; 2 – сингенная трансплантация СВФ; 3 – сингенная трансплантация криоконсервированных, скорость охлаждения $1^{\circ}\text{C}/\text{мин}$; 4 – сингенная трансплантация криоконсервированных фрагментов, скорость охлаждения $>100^{\circ}\text{C}/\text{мин}$; 5 – аллотрансплантация СВФ; 6 – аллотрансплантация криоконсервированных фрагментов, скорость охлаждения $1^{\circ}\text{C}/\text{мин}$; 7 – аллотрансплантация криоконсервированных фрагментов, скорость охлаждения $>100^{\circ}\text{C}/\text{мин}$.

В группе животных с аллогенными трансплантатами СВФ НЖ выживаемость мышей составила 30%. Криоконсервирование способствовало более длительному выживанию аллогенных реципиентов. Выживаемость животных после трансплантации фрагментов, криоконсервированных со

скоростью охлаждения $1^{\circ}\text{C}/\text{мин}$, составляла 79%, а криоконсервированных со скоростью $>100^{\circ}\text{C}/\text{мин}$ – 71%. При сравнении выживаемости животных с аллогraftами криоконсервированных и СВФ НЖ установлена достоверная разница (логранковый критерий $P_{\log\text{-rank}}=0.009$). Однако между группами животных с криоконсервированными аллогraftами достоверной разницы выживаемости не наблюдалось (логранковый критерий $P_{\log\text{-rank}}=0.147$).

Для тестирования гормональной активности трансплантатов определяли уровень кортикостерона в плазме крови у реципиентов на 26 день после трансплантации (рис. 3.37). Нами не было установлено достоверных отличий в уровне гормона между реципиентами сингенных трансплантатов, как СВФ (133 ± 15 нг/мл), так и криоконсервированных (106 ± 30 нг/мл для охлаждения со скоростью $1^{\circ}\text{C}/\text{мин}$ и 98 ± 50 нг/мл для охлаждения со скоростью $>100^{\circ}\text{C}/\text{мин}$), по сравнению с контрольными интактными животными (123 ± 19 нг/мл).

Уровень гормона был достоверно ($P<0,05$ по сравнению с контролем) снижен у выживших реципиентов аллогенных СВФ НЖ (8 ± 6 нг/мл). У мышей с трансплантатами, криоконсервированными с 1 и $>100^{\circ}\text{C}/\text{мин}$, уровень кортикостерона в сыворотке крови составлял 30 ± 16 нг/мл и 94 ± 26 нг/мл, соответственно. Таким образом, у реципиентов криоконсервированных аллогraftов уровень гормона был выше по сравнению с реципиентами, имеющими незамороженные трансплантаты ($P<0,05$).

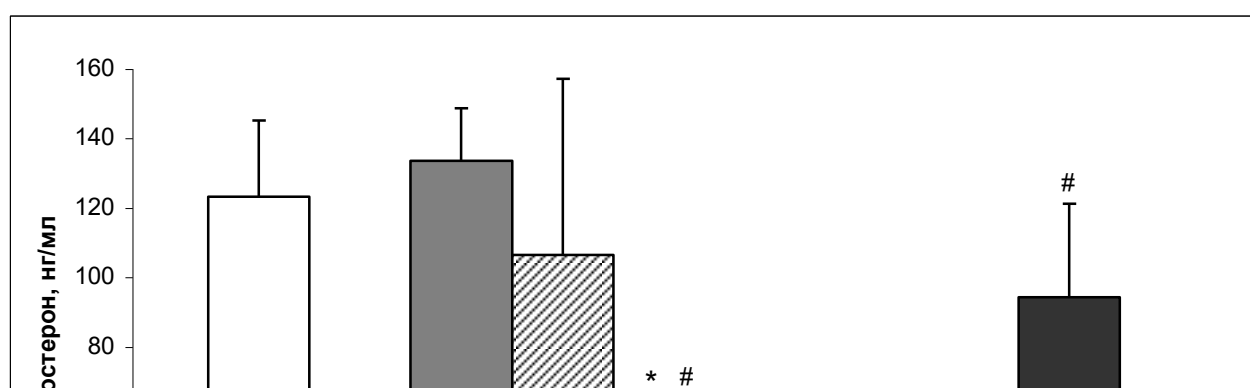


Рис. 3.37. Уровень кортикостерона в сыворотке крови реципиентов свежевыделенных и криоконсервированных фрагментов НЖ на 26 день после трансплантации; * – достоверные различия по сравнению с контролем; # – достоверные различия по сравнению с аллогraftами СВФ НЖ.

Признаками острого отторжения трансплантата является инфильтрация его $CD4^+$ Т - хелперами и $CD8^+$ Т-киллерами. Для определения количества и фенотипа инфильтрирующих Т-лимфоцитов криостатные срезы почек с аллотрансплантатами окрашивали моноклональными антителами к антигенам CD4 и CD8. В аллогraftах СВФ наблюдалось интенсивное мечение клеток, экспрессирующих $CD8^+$ и $CD4^+$ (рис. 3.38 и 3.39). Позитивно окрашенные клетки наблюдали в периферических и центральных областях трансплантатов. Количество $CD4^+$ клеток в среднем составило $8,91 \pm 8,85$, а $CD8^+$ клеток $23,51 \pm 11,56$.

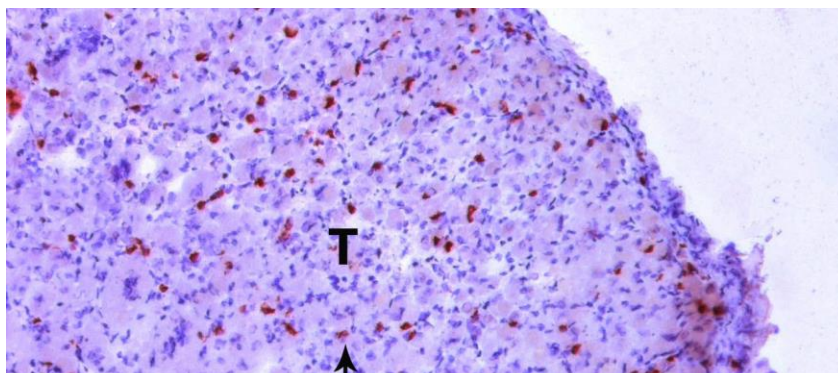


Рис. 3.38. Локализация клеток, экспрессирующих $CD8^+$ в аллографте СВФ НЖ на 26 сутки после трансплантации. П – почка, Т – трансплантат, стрелкой указано позитивное мечение. Контрастирование образца гематоксилином. Ок.10, об.10.

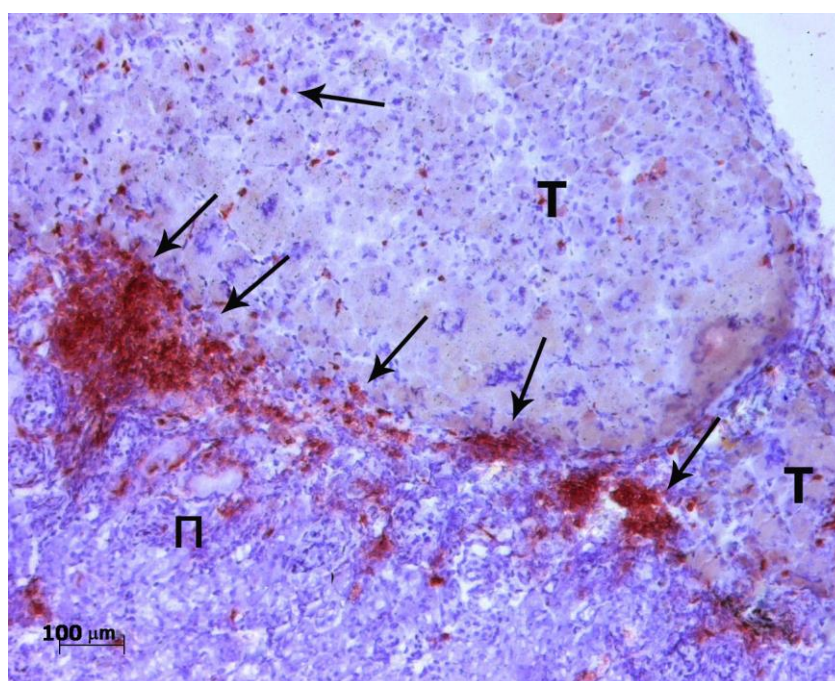


Рис. 3.39. Локализация клеток, экспрессирующих $CD4^+$ в аллографте СВФ НЖ на 26 сутки после трансплантации. П – почка, Т – трансплантат, стрелкой указано позитивное мечение. Контрастирование образца гематоксилином. Ок.10, об.10.

В криоконсервированных аллогraftах наблюдалось достоверное ($P < 0.05$ по сравнению с аллогraftами СВФ НЖ) снижение содержания инфильтрирующих клеток (рис. 3.40-3.43). Они располагались главным образом

на границе между тканью трансплантата и почки. В трансплантатах, криоконсервированных с со скоростью охлаждения $1^{\circ}\text{C}/\text{мин}$, количество CD4^{+} клеток составляло $5,28 \pm 4,92$, количество CD8^{+} клеток было $3,71 \pm 3,04$ в поле зрения. Количество CD4^{+} и CD8^{+} клеток в трансплантатах, криоконсервированных со скоростью охлаждения $>100^{\circ}\text{C}/\text{мин}$ было $4,97 \pm 4,40$ и $3,75 \pm 3,20$, соответственно. Существенных различий в интенсивности инфильтрации трансплантатов, криоконсервированных с обеими скоростями охлаждения, выявлено не было.

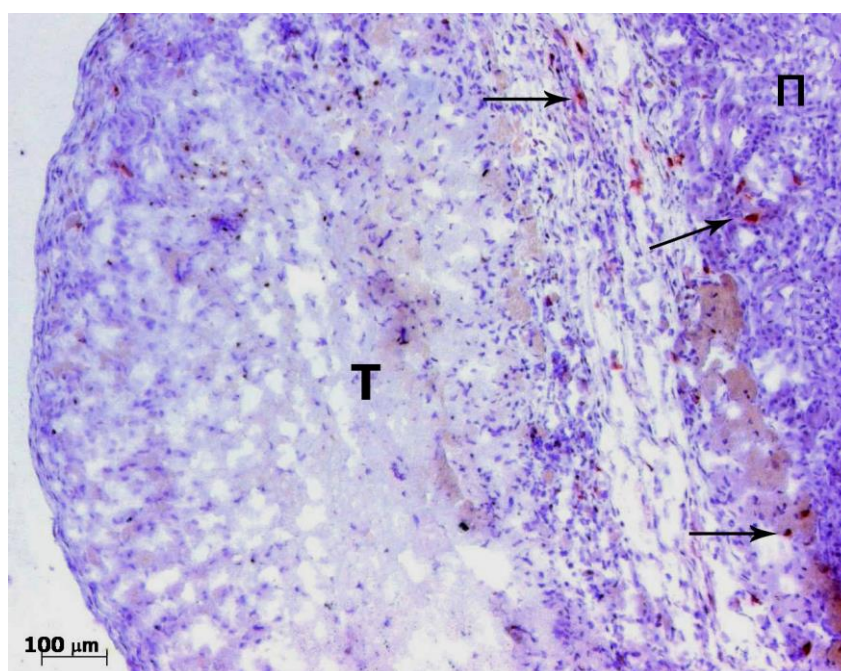


Рис. 3.40. Локализация клеток, экспрессирующих CD8^{+} в аллограффе фрагментов НЖ, криоконсервированных со скоростью $1^{\circ}\text{C}/\text{мин}$, на 26 сутки после трансплантации. П – почка, Т – трансплантат, стрелкой указано позитивное мечение. Контрастирование образца гематоксилином. Ок.10, об.10.

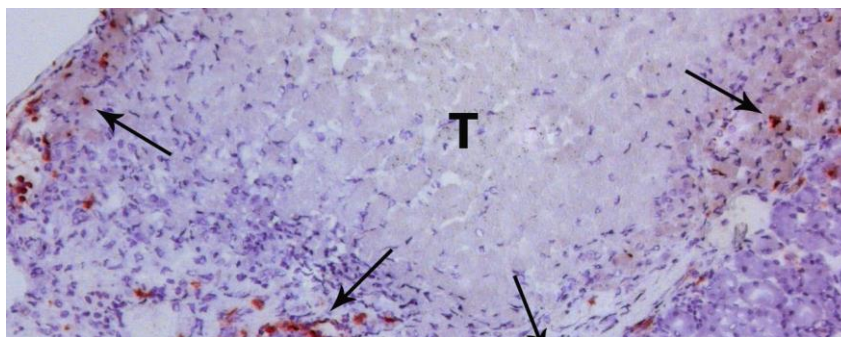


Рис. 3.41. Локализация клеток, экспрессирующих $CD4^+$ в аллографте фрагментов НЖ, криоконсервированных со скоростью $1^\circ\text{C}/\text{мин}$, на 26 сутки после трансплантации. П – почка, Т – трансплантат, стрелкой указано позитивное мечение. Контрастирование образца гематоксилином. Ок.10, об.10.

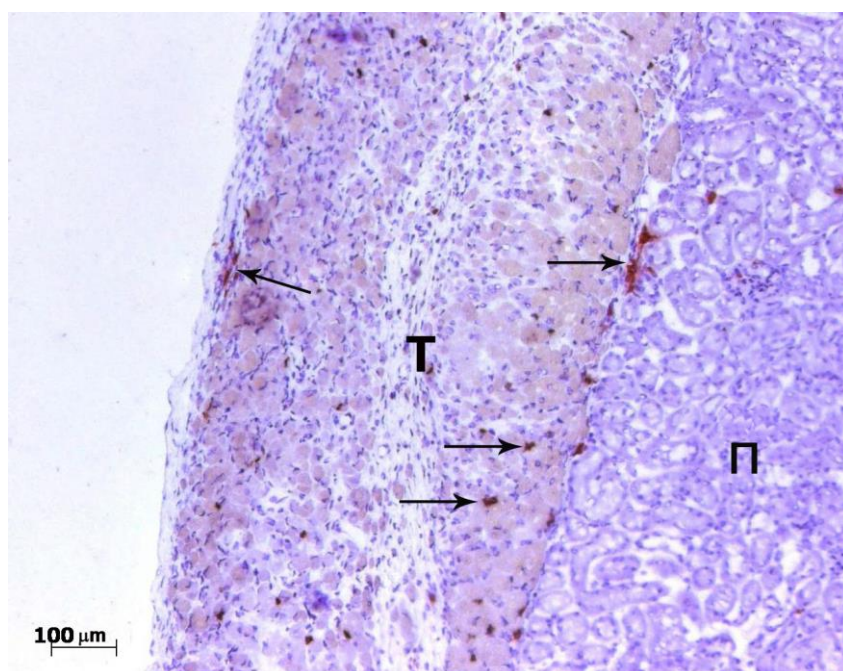


Рис. 3.42. Локализация клеток, экспрессирующих $CD8^+$ в аллографте фрагментов НЖ, криоконсервированных со скоростью $>100^\circ\text{C}/\text{мин}$, на 26 сутки после трансплантации. Контрастирование образца гематоксилином. Ок.10, об.10.

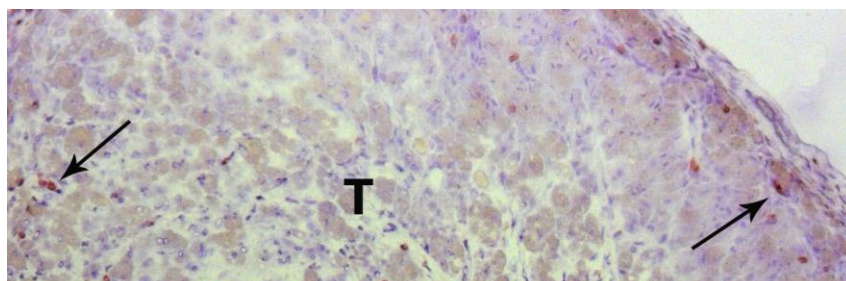


Рис. 3.43. Локализация клеток, экспрессирующих $CD4^+$ в аллографте фрагментов НЖ, криоконсервированных со скоростью $>100^\circ/\text{мин}$, на 26 сутки после трансплантации. Контрастирование образца гематоксилином. Ок.10, об.10.

Таким образом, совокупность полученных данных указывала на то, что криоконсервированные трансплантаты действительно инициируют менее выраженный иммунный ответ, чем свежевыделенные. Однако неожиданным было то, что результат трансплантации фрагментов не зависел от скорости их замораживания, тогда как мы предполагали, что медленное охлаждение должно привести к более выраженному отторжению в связи достаточно высокой сохранностью АПК в ткани в этом случае.

Известны различные техники культивирования и обработки ткани, которые направлены на удаление АПК [216, 265, 290]. В этом случае в связи с отсутствием АПК, непосредственно презентующих донорский антиген, наблюдается инаktivация прямого пути аллогенного распознавания [72, 128, 221, 327]. Тем не менее, Т-клетки реципиента могут быть активированы в ходе непрямого пути, когда донорские антигены процессируются и представляются посредством АПК реципиента. Например, La Rosa F.G. с соавт. [269] наблюдали наличие лимфоцитарной инфильтрации в 60-73%

аллотрансплантатов щитовидной железы, несмотря на культивирование в течение 48 часов. Кроме того, аллотрансплантаты кожи [67], кишечника [99], и почки [293], полученные от нокаутных мышей, лишенных антигенов ГКГ II класса, все же подвергаются отторжению.

Причина таких явлений состоит в том, что в дополнение к адаптивному иммунному ответу, в организме существует также система врожденного иммунитета, который может неспецифически активироваться в организме реципиента против пересаженных тканей. В последнее время все больше исследований направлены на изучение роли ранних реакций врожденного иммунитета в отторжении трансплантата. Существует доказательство того, что трансплантаты, которые были подвергнуты длительной холодовой ишемии [140] или ишемии-реперфузии [277], уже в первые дни (1-5 суток) после пересадки являются инфильтрированными нейтрофилами и макрофагами. Триггерами для активации иммунной системы в таком случае являются молекулы-сигналы повреждения тканей PAMP или DAMP [226, 258].

Опираясь на эти данные, мы предположили, что исход трансплантации криоконсервированной ткани зависит не столько от присутствия в ней АПК, сколько от баланса между факторами адаптивного и врожденного иммунитета, а также между степенью сохранности клеток паренхимы и элиминации АПК. С этой точки зрения, если криоконсервирование привело к значительному повреждению тканей, отторжение будет более выраженным, и эффект от удаления АПК за счет быстрого охлаждения нейтрализуется увеличением стимуляции врожденного иммунного ответа в связи с высокой степенью повреждения паренхиматозных клеток (табл. 3.1).

Таблица 3.1.

Факторы, влияющие на выживаемость криоконсервированных тканевых аллографтов.

Факторы	Быстрое охлаждение	Медленное охлаждение
Количество АПК	—	+
Повреждение паренхиматозных клеток	++	+
Прямой путь презентации антигена	—	+
Непрямой путь презентации антигена	+	+
Активация неспецифического иммунитета	++	+

Выводы по разделу:

Таким образом, анализ результатов, представленных в данном разделе, приводит к следующим выводам:

1. Показатели экспрессии CD11c как маркера дендритных клеток и CD11b как маркера моноцитарно-макрофагальных клеток уменьшаются после криоконсервирования: на 78,3 и 60% при замораживании со скоростью охлаждения 10°C/мин; на 94,1 и 93,4% при замораживании со скоростью охлаждения >100°C/мин, соответственно.

2. Использование краткосрочного органотипического культивирования ткани в комплексе с криоконсервированием приводит к иммуномодулирующему эффекту вследствие элиминации из ткани клеток, экспрессирующих антигены ГКГ II класса.

3. Аллогенные трансплантаты ткани эндокринных желез, которые были обеднены АПК в процессе криоконсервирования и последующего культивирования, вызывают менее выраженный иммунный ответ по сравнению со свежевыделенной тканью.

Результаты, изложенные в данной главе, опубликованы в следующих работах:

1. Божок Г.А. Вплив кріоконсервування на імунно-біологічні властивості фрагментів надниркових залоз при алотрансплантації / Г.А. Божок, Н.М. Алабедалькарім, Є.І. Легач // Трансплантологія. – 2004. – Т.5, №1. – С. 88-92.
2. Алабедалькарім Н.М. Експериментальна трансплантація органотипової культури надниркових залоз в ало- та ксеногенній системах / Н.М. Алабедалькарім, Г.А. Божок, Є.І. Легач, Т.П. Бондаренко // Трансплантологія. – 2004. – Т.7, №3. – С. 223-225.
3. Божок Г.А. Теоретические аспекты трансплантации эндокринных клеток и тканей / Г.А. Божок, Е.И. Легач, Н.М. Алабедалькарим, Т.П. Бондаренко // Трансплантологія. – 2005. – Т.8, №2. – С. 10-21.
4. Бондаренко Т.П. Культивирование, криоконсервирование и трансплантация ткани эндокринных желез / Т.П. Бондаренко, Г.А. Божок, Е.И. Легач, В.В. Кирошка, В.Д. Устиченко, С.Б. Билявкая, А.В. Пахомов, И.И. Самченко, Г.В. Дудецкая // Актуальные проблемы криобиологии и криомедицины : [монография / науч. ред. акад. НАН Украины А.Н. Гольцев]. – Харків: «Райдер», 2012. – С. 361-401.
5. Alabedalkarim N.M. Outcome of adrenal tissue fragments allotransplantation: The impact of cryopreservation / N.M. Alabedalkarim, G.A. Bozhok, E.I. Legach, V.D. Ustichenko, P.M. Zubov, S.B. Bilyavskaya, G.V. Dudetskaya, T.P. Bondarenko, M.W. Hoffmann // Cryobiology. – 2012. – Vol. 65, № 3. – P. 188-195.
6. Бондаренко Т.П. Органні культури ендокринних залоз: кріоконсервування, трансплантація / Т.П. Бондаренко, Г.А. Божок, Є.І. Легач, Н.М. Алабедалькарім // Установчий з'їзд Українського товариства клітинної біології. – Львів, 2004. – С. 237.

3.3. Влияние криоконсервирования и органотипического культивирования на выживаемость трансплантатов ткани эндокринных желез

Биологические объекты имеют различную чувствительность к факторам криоконсервирования, поэтому для каждого из них необходим подбор типа и концентрации криопротектора, условий инкубации с ним, скорости охлаждения.

На предыдущем этапе работы была установлена возможность изменения иммуногенности ткани НЖ с помощью криоконсервирования. Таким образом, на данном этапе работы основной задачей являлась разработка режимов криоконсервирования, оптимально сохраняющих гормонопродуцирующие клетки, и изучение их влияния на выживаемость эндокринной ткани при алло- и ксенотрансплантации.

Исходя из результатов предыдущих исследований, возможным результатом использования криоконсервирования с высокой скоростью охлаждения является гибель не только АПК, но и остальных клеток эндокринной железы, что, естественно, негативно будет сказываться на выживаемости ткани после трансплантации. В связи с этими соображениями, необходимо было тестировать режимы криоконсервирования, скорость охлаждения которых находилась в диапазоне от 1 до 10°C/мин (условно называемое «медленное охлаждение») и >100°C/мин (условно называемое «быстрое охлаждение»).

Полученные на предыдущем этапе результаты свидетельствовали, что иммуномодулирующий эффект криоконсервирования реализуется в комплексе с последующим краткосрочным культивированием. В свою очередь, культивирование может самостоятельно оказывать влияние как на количественный состав АПК в ткани, так и на функцию гормонопродуцирующих клеток.

Помещение фрагментов ткани или эксплантатов органов является органотипическим культивированием (ОК) [8], в отличие от клеточного, при

котором ткань перед помещением в культуру разделяют на клетки. Органотипическая культура является по сути своей переживающей, так как в ней замедлены процессы пролиферации и дифференцировки. При таком культивировании может наблюдаться разрушение структуры ткани за счет недостаточного поступления питательных веществ и обмена газов в глубине фрагмента. Например, при ОК ткани щитовидной железы установлена частичная деградация фолликулярного строения ЩЖ, десквамация тиреоидного эпителия и уменьшение синтеза тироксина [11, 315]. В других работах, напротив, установлена активация секреции гормонов в органотипических культурах эндокринных желез новорожденных поросят [30, 41]. Вариации количества дендритных клеток, а также клеток, экспрессирующих ГКГ II класса, были отмечены при культивировании островков поджелудочной железы и щитовидной железы в работах [91, 342, 365, 416].

Таким образом, одной из вспомогательных задач данного этапа исследования становилось изучение влияния ОК на выживаемость ткани эндокринных желез при трансплантации. При этом для того, чтобы учесть возможный вклад ОК в изменение структурно-функционального состояния паренхиматозных и иммунных клеток желез, была необходимость изучения его влияния как перед замораживанием, так и после него.

3.3.1. Влияние органотипического культивирования на выживаемость трансплантатов ткани эндокринных желез

Состояние фрагментов ткани эндокринных желез после ОК определяли по следующим параметрам: жизнеспособности клеток, уровню гормонов в питательной среде и сохранности структуры трансплантата на гистологических образцах.

Жизнеспособность клеток после ОК щитовидной железы, надпочечников и семенников новорожденных поросят достоверно уменьшалась к 4 суткам (рис. 3.44). При изучении гормональной активности образцов исследуемых

желез также было установлено уменьшение уровня соответствующих гормонов в среде культивирования (рис. 3. 45). Достоверное падение Т4, кортизола и тестостерона обнаруживается уже на 4 сутки и продолжается в последующий срок ОК. В среднем во всех изучаемых культурах на 5 сутки наблюдается 30-35% от начального уровня гормонов (2 сутки).

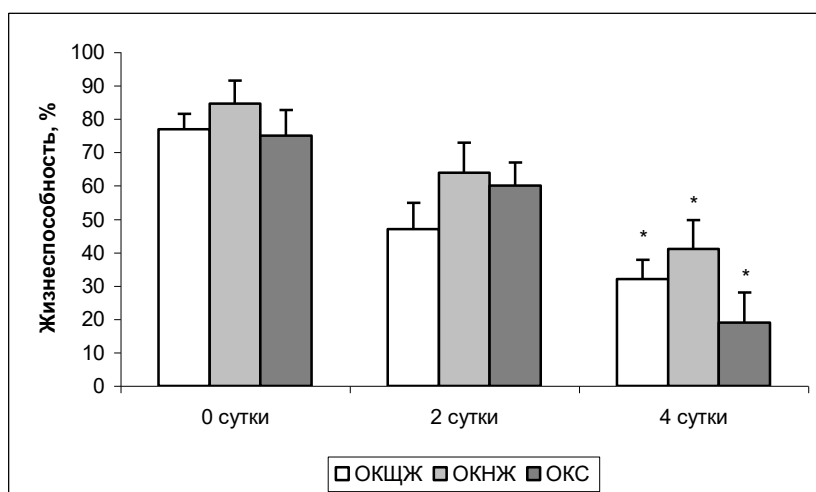


Рис. 3.44. Жизнеспособность клеток в ОК щитовидной железы (ОКЩЖ), надпочечников (ОКНЖ) и семенников (ОКС) новорожденных поросят на разные сутки культивирования. * – отличия достоверны по сравнению с исходной, $P < 0,05$.

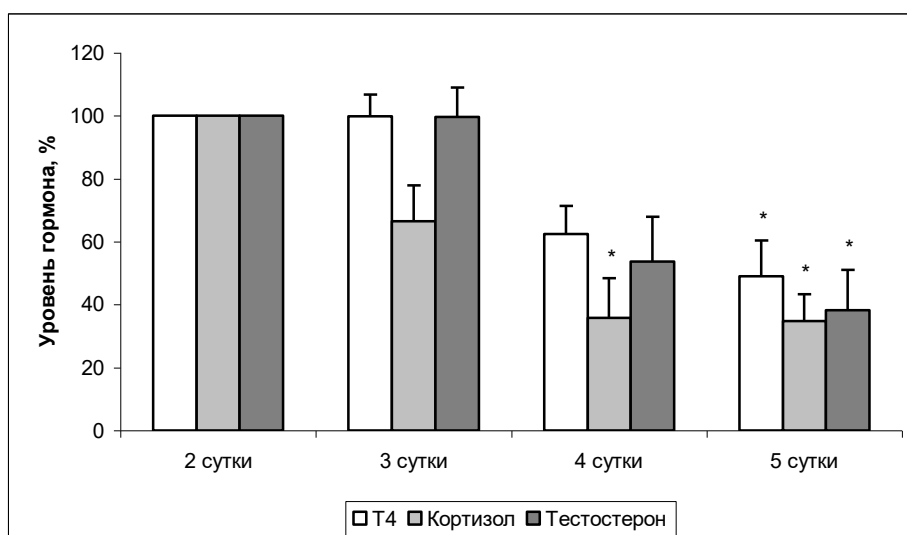


Рис. 3.45. Изменение уровня гормонов в питательной среде при ОК эндокринных желез новорожденных поросят на разные сроки культивирования. * – отличия достоверны по сравнению с 2 сутками, $P < 0,05$.

Нами был проведен гистологический анализ образцов органотипических культур эндокринных желез. Микроскопически паренхима ЩЖ новорожденного поросенка имеет типичное дольчатое строение. Дольки состоят из большого количества фолликулов. В ткани преобладают фолликулы среднего диаметра, округлой формы, полость которых выстлана эпителием в основном призматической формы (рис. 3.46). Фолликулы заполнены светло-розовым коллоидом с участками умеренной краевой вакуолизации. Строма железы умеренно выражена. Уже на 3 сутки ОК проявляются деструктивно-дистрофические процессы в ткани ЩЖ, особенно в центральных участках фрагментов (рис. 3.47). Наблюдается гидропическая дистрофия клеток фолликулярного эпителия, они резко набухшие, с просветленной цитоплазмой. Присутствует слущивание тиреоцитов внутрь фолликулов вплоть до полного отслоения эпителиального пласта от базальной мембраны, видны остатки бледно окрашенного коллоида, подвергшегося значительной резорбции. В краевой части образца сохранившиеся фолликулы имеют уплотненный коллоид со слабой вакуолизацией. Надпочечники новорожденного поросенка имеют типичное строение, паренхима органа состоит из коркового и медуллярного слоя. В корковом слое представлены три зоны (рис. 3.48) – клубочковая, пучковая и сетчатая с преобладанием пучковой. В основном присутствуют клетки с темными и мелкими ядрами, относящиеся к клубочковой зоне, и клетки с крупными светлыми ядрами и крупнопенистой цитоплазмой, принадлежащие к пучковой зоне. Клетки сетчатой зоны незначительны. Наблюдается слабая и умеренная делипидизация цитоплазмы адренокортикоцитов клубочковой и сетчатой зон коры.

В ОК надпочечника новорожденного поросенка наблюдаются дистрофические изменения, сходные с таковыми, обнаруженными при изучении ткани ЩЖ: гидропическая дистрофия клеток, набухание их ядер, потеря четких контуров клеток, тотальная делипидизация всех зон коры (рис. 3.49). Изменения наблюдаются независимо от локализации, и в центре и на периферии культивируемого фрагмента.

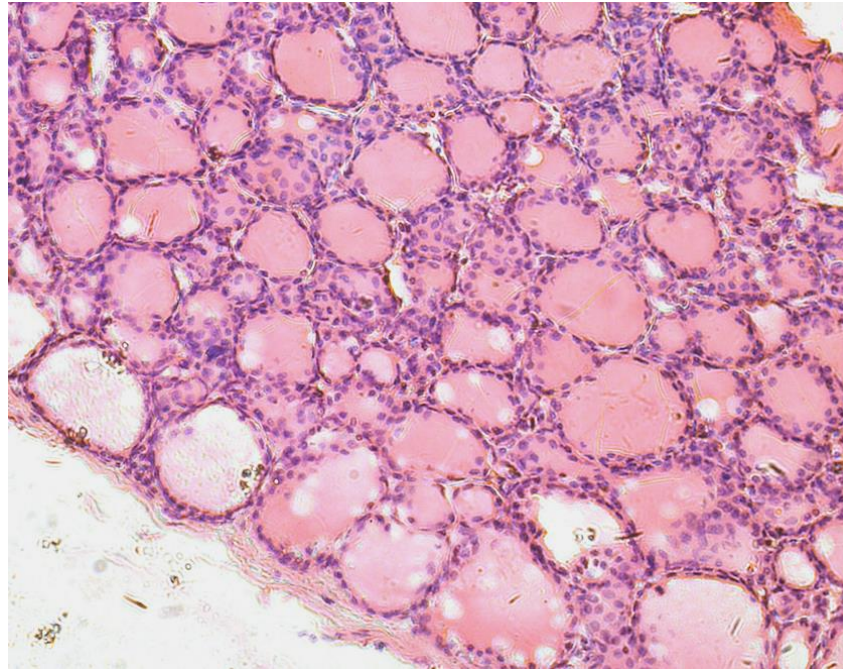


Рис. 3.46. Щитовидная железа новорожденного поросенка. Окраска гематоксилином и эозином. Ок. 10, об. 20.

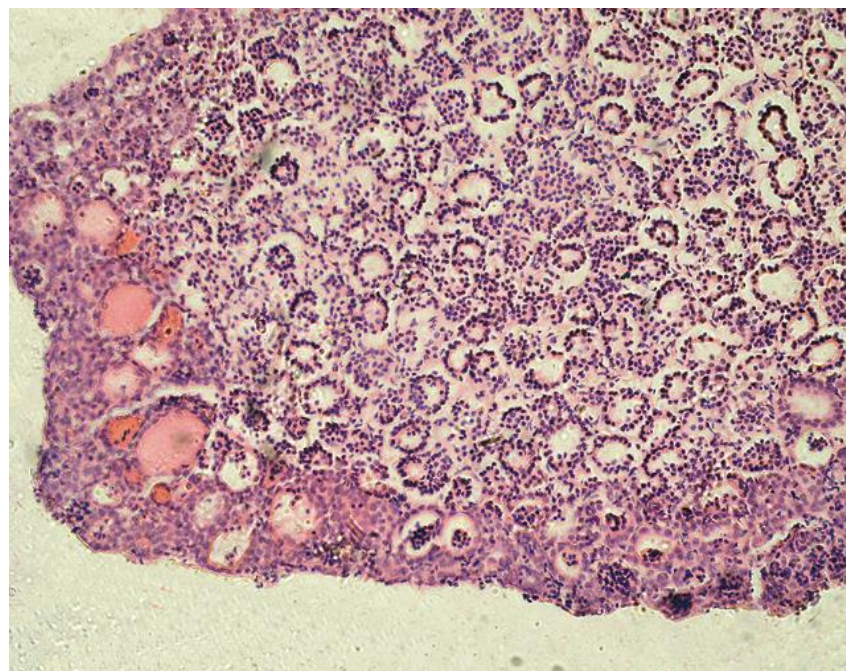


Рис. 3.47. ОК щитовидной железы новорожденного поросенка на 3 сутки. Окраска гематоксилином и эозином. Ок. 10, об. 20.

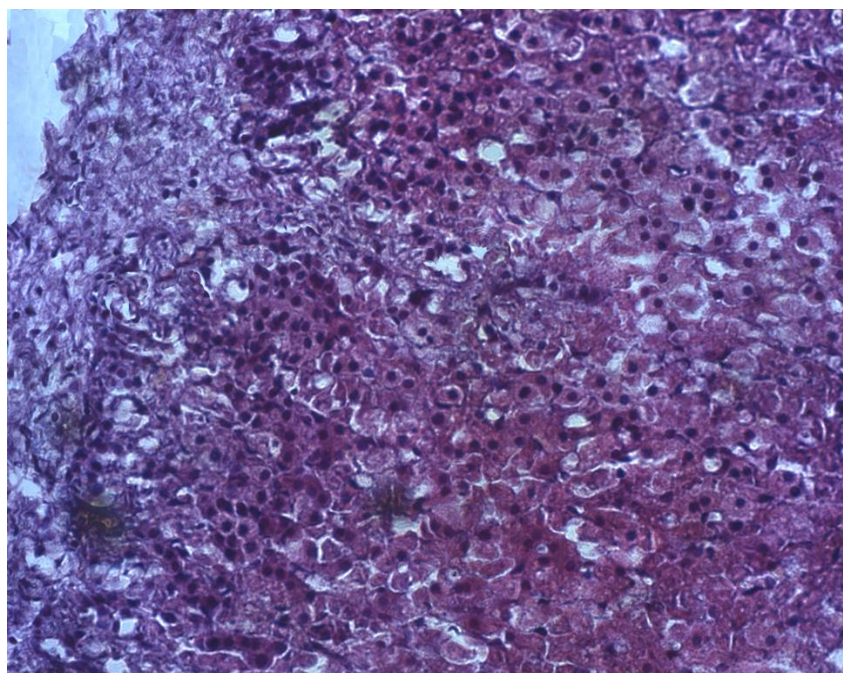


Рис. 3.48. Надпочечник новорожденного поросенка. Окраска гематоксилином и эозином. Ок. 10, об. 40.

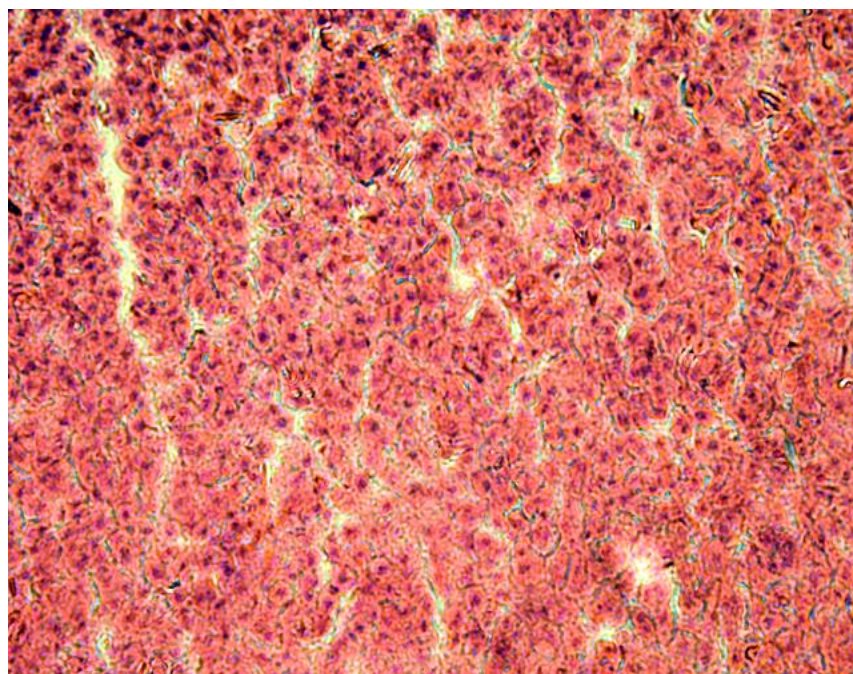


Рис. 3.49. ОК надпочечника новорожденного поросенка на 3 сутки. Окраска гематоксилином и эозином. Ок. 10, об. 40.

В семенниках новорожденного поросенка наблюдается паренхиматозное строение с равномерно расположенными небольшими в диаметре семенными канальцами и участками интерстиция (рис. 3.50). Строма органа хорошо выражена. Канальцы выстланы одним рядом сперматогенного эпителия без признаков заверщенного сперматогенеза. Интерстиций семенника представлен крупными клетками с оксифильной цитоплазмой и липидными включениями, что позволяет идентифицировать их как клетки Лейдига.

На 3 сутки ОК отмечается разволокнение базальной мембраны семенных канальцев и истончение ее отдельных участков, отслоение спермо-эпителиального пласта от базальной мембраны (рис. 3.51). Эпителий канальцев многорядный, уплотненный. В интерстиции наблюдаются процессы гидропической дистрофии. В центре фрагмента наблюдаются очаговый некроз, часто встречаются клетки с просветленной цитоплазмой и признаками кариолизиса.

Известно, что при органотипическом культивировании ткани способны переживать в течение небольшого промежутка времени [8], поскольку в процессе культивирования постепенно происходит дедифференцировка ткани с утратой ее специфической функции. Это связано с тем, что благоприятные условия существования ткани в среде культивирования – газообмен и обмен веществ – могут обеспечиваться лишь в краевой зоне образца, где имеется свободный доступ трофических и ростовых факторов. В центральной части фрагмента при этом в связи с недостатком обмена веществ будут наблюдаться процессы апоптоза и некроза ткани, активации перекисного окисления липидов, а также самоотравления клеток при плохом оттоке метаболитов [1]. В наших исследованиях гистологический анализ целом показал наличие глубоких дистрофических изменений во всех изученных железах при ОК. Изучение жизнеспособности клеток эндокринных желез и их гормональной активности подтверждали данный характер влияния ОК.

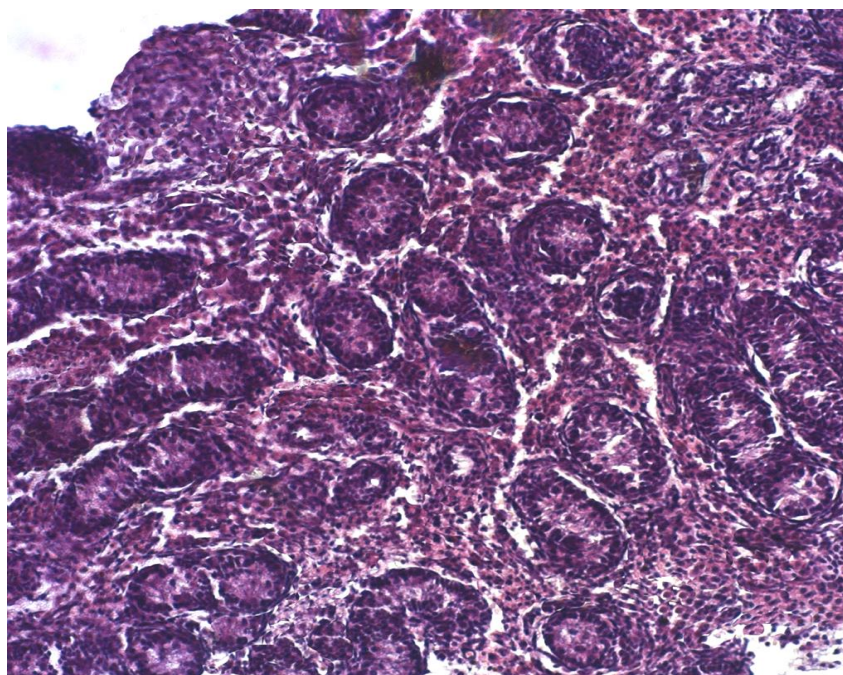


Рис. 3.50. Семенник новорожденного поросенка. Окраска гематоксилином и эозином. Ок. 10, об. 20.

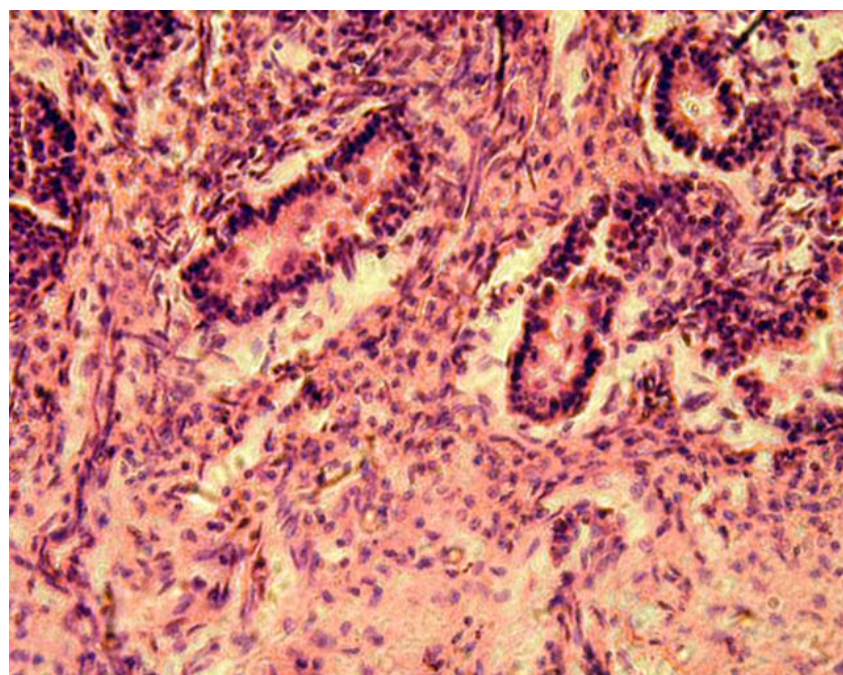


Рис. 3.51. ОК семенника новорожденного поросенка на 3 сутки. Окраска гематоксилином и эозином. Ок. 10, об. 40.

Влияние ОК на выживаемость трансплантатов эндокринных желез была определена в аллогенной (крысы-крысы) и ксеногенной (новорожденные поросята-крысы) системах. Для трансплантации использовали фрагменты щитовидной железы, надпочечников и семенников, культивированные в течение 3 суток. У реципиентов предварительно моделировали недостаточность гормонов путем удаления соответствующей железы. Животных забивали на 30-35 сутки после трансплантации, тестировали уровень соответствующего гормона (тироксина, кортизола или тестостерона) и проводили гистологический анализ трансплантатов.

В таблице 3.2 представлен уровень гормонов в сыворотке крови реципиентов алло- и ксенографтов культивированных фрагментов щитовидной железы, надпочечников и семенников на 30-35 сутки после трансплантации. Заметно, что аллогенная трансплантация приводила к коррекции уровня Т4 в среднем на 38,4%, а ксеногенная – на 54,9% от интактного контроля. Коррекция уровня тестостерона не превышала 12,7% в случае ксенографтов и 6,5 % для аллогграфтов. Однако достоверных отличий между показателями уровня Т4 и тестостерона при аллогенной и ксеногенной трансплантациях не наблюдалось.

Таблица 3.2.

Уровень гормонов в сыворотке крови реципиентов на 30 сутки после трансплантации культивированных фрагментов ЩЖ, НЖ и семенников.

Вид трансплантации	Т4		Кортизол		Тестостерон	
	нмоль/л	% от контроля	нмоль/л	% от контроля	нмоль/л	% от контроля
Аллогенная	20,3±7,8	38,4±5,6	-	-	0,38±0,16	6,5±3,7
Ксеногенная	29,0±9,1	54,9±8,5	14,7±7,5	183,4±19,9	0,76±0,17	12,7±5,3

У крыс главным из 11-оксикортикостероидов крови является кортикостерон, тогда как у свиней – кортизол. В связи с этим наличие кортизола в сыворотке крови крыс должно отражать функцию ксенотрансплантата ОК НЖ новорожденных поросят. Результаты измерения

гормонов показали наличие кортизола в сыворотке крови реципиентов, который составил около 183% от интактного контроля.

Данные морфометрического анализа выживаемости культивированных фрагментов ткани эндокринных желез (щитовидной железы, семенников, надпочечников) на 30 сутки после аллогенной или ксеногенной трансплантации представлены в таблице 3.3.

Таблица 3.3.

Морфометрические индексы выживаемости трансплантатов культивированных фрагментов эндокринных желез на 30 сутки.

Вид ткани	Аллотрансплантация			Ксенотрансплантация		
	S1	S2	S3	S1	S2	S3
ЩЖ	51,2±6,9	2,3±1,2	45,3±8,4	57,9±12,9	0	42,1±7,7
НЖ	38,7±8,8	8,7±6,1	52,6±14,2	34,3±9,6	0	65,7±11,9
Семенник	64,4±10,9	0	35, ±5,7	87,9±11,1	0	12,1±8,5

Примечание: S1 – площадь соединительной ткани; S2 – площадь ткани с неповрежденной структурой; S3 – площадь ткани с лейкоцитарной инфильтрацией.

Возвращаясь к результатам, полученным при трансплантации свежевыделенных фрагментов ЩЖ, нужно отметить, что ОК не улучшает выживаемость ткани. Индекс S2 алло- и ксенографтов свежевыделенных фрагментов ЩЖ на 30 сутки составлял 0 (рис. 3.8 и 3.9). После ОК индекс выживаемости аллогенных ЩЖ равнялся 2,3, а для ксеногенных – 0, что незначительно отличается от предыдущих результатов. При использовании некультивированных фрагментов семенников сохранность ткани в случае аллотрансплантации составлял 25%, а при ксенотрансплантации – 0% (рис. 3.14 и 3.16). При трансплантации ткани после культивирования результат был хуже (0% для обоих видов трансплантации). Выживаемость аллогграфтов некультивированных фрагментов НЖ составляла в среднем 8% (рис. 3.22), что

было сходным с индексом выживаемости культивированных трансплантатов (8,7%). При ксеногенной трансплантации свежевыделенных фрагментов НЖ были получены результаты 25%-й сохранности ткани на 30 сутки (рис. 3.24), тогда как после культивирования – 0%.

На основании полученных результатов можно было заключить, что ОК не улучшало выживаемость алло- и ксенографтов эндокринных желез. Вероятно, негативное влияние условий культивирования на состояние паренхиматозных клеток желез превышало возможный эффект элиминации АПК из ткани.

3.3.2. Влияние криоконсервирования на выживаемость трансплантатов ткани эндокринных желез

Следующим этапом нашей работы явилось криоконсервирование фрагментов эндокринных желез и трансплантация их реципиентам с гормональной недостаточностью.

Исходя из современных представлений криобиологической науки, результат криоконсервирования фрагментов ткани является менее предсказуемым, чем результат замораживания суспензии клеток, так как включает воздействие дополнительных факторов.

Во-первых, перенос воды и криопротектора в ткани имеет свои особенности. Во время замораживания ткани обезвоживание клеток внутренних слоев происходит медленнее, чем в клетках поверхностных слоев, следовательно, клетки внутренних слоев требуют более медленной скорости охлаждения для того, чтобы достичь уровня обезвоживания достаточного для предотвращения внутриклеточного образования льда. Соответственно, концентрация криопротектора также будет существенно отличаться между внешними и внутренними слоями. В то время как внутри фрагмента достигается оптимальная концентрация криопротектора, клетки внешнего слоя уже подвергаются воздействию токсичных концентраций криопротектора.

Во-вторых, в процессе замораживания-отогрева в ткани наблюдается значительный градиент температур между поверхностными и внутренними

слоями фрагмента, вследствие чего скорость охлаждения во фрагменте будет неодинаковой. В связи с тем, что разница в чувствительности клеток к скорости охлаждения достаточно велика для разных видов клеток, неоднородность скорости охлаждения во фрагменте будет влиять на их жизнеспособность. При низких скоростях охлаждения и небольших размерах фрагментах эти отличия будут не столь критичны.

В-третьих, фрагмент ткани состоит из нескольких видов клеток, которые имеют разные коэффициенты проницаемости для воды и криопротектора, и, следовательно, оптимальные скорости охлаждения для них на этапе кристаллизации основной массы воды в образце будут различными.

Для сравнения влияния криоконсервирования на выживаемость трансплантатов были выбраны режимы с низкой ($1-5^{\circ}\text{C}/\text{мин}$) и высокой ($>100^{\circ}\text{C}/\text{мин}$) скоростями охлаждения. В качестве криопротектора во всех случаях использовали ДМСО. Опираясь на данные предыдущих исследований, нами были использованы следующие условно «медленные» режимы криоконсервирования эндокринных желез новорожденных поросят:

- фрагментов ткани ЩЖ с 7% ДМСО и $2^{\circ}\text{C}/\text{мин}$ [6]
- фрагментов ткани НЖ с 10% ДМСО и $1^{\circ}\text{C}/\text{мин}$ [44];
- фрагментов ткани семенников с 10% ДМСО и $5^{\circ}\text{C}/\text{мин}$ [20].

Для условно «быстрого» охлаждения во всех случаях использовали криопротектор ДМСО в концентрации 10%. Высокая скорость охлаждения ($>100^{\circ}\text{C}/\text{мин}$) реализовалась путем погружения криоампулы с образцом вертикально в жидкий азот в течение 1,5 мин.

Жизнеспособность клеток, полученных из криоконсервированных фрагментов ткани ЩЖ, НЖ и семенников новорожденных поросят представлена на рисунке 3.52. Заметно, что жизнеспособность клеток семенников значительно зависит от скорости охлаждения, тогда как клетки ЩЖ и НЖ оказались достаточно устойчивы к варьированию режимов.

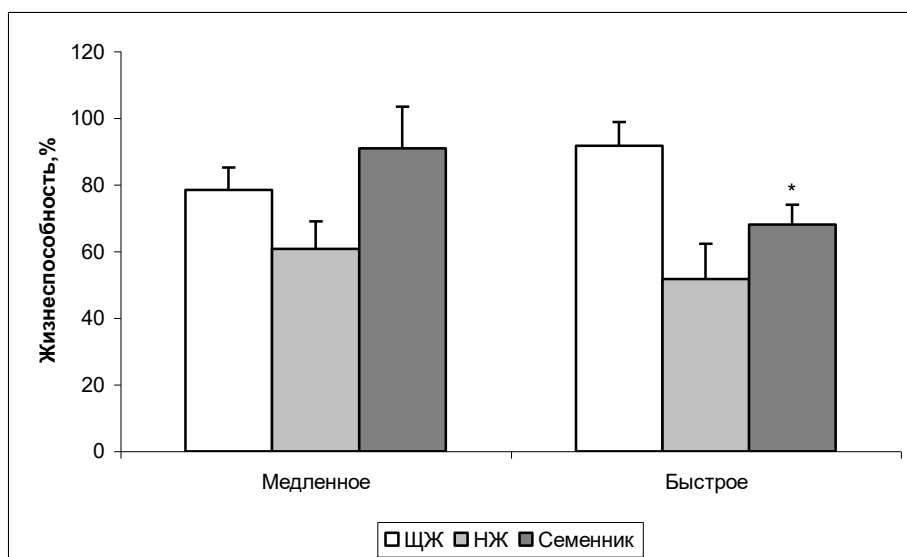


Рис. 3.52. Жизнеспособность клеток ЩЖ, НЖ и семенников новорожденных поросят (в % от интактного контроля) после криоконсервирования. * – отличия достоверны по сравнению с медленным замораживанием.

При изучении гормональной активности фрагментов желез после криоконсервирования было обнаружено, что секреция Т4 ЩЖ выше при использовании быстрого охлаждения, тогда как тестостерона семенниками – при использовании медленного (рис. 3.53). Секреция кортизола достоверно не отличалась между использованными режимами.

Гистологический анализ образцов показал следующее. Фрагменты ЩЖ, замороженной в медленном режиме, характеризовались нарушением нативной структуры ткани (рис. 3.54). Фолликулярная структура сохраняется частично, заметны обширные участки дезинтегрированных тироцитов. Фолликулы в основном не содержат коллоид или видны остатки коллоида, окрашенного в бледно-розовый цвет. Целостность базальных мембран местами нарушена, наблюдается отслоение эпителиального пласта от базальной мембраны, межклеточные и межфолликулярные пространства расширены. Для фрагментов ЩЖ, криоконсервированных с высокой скоростью охлаждения, характерно сохранение морфологической целостности тиреоидной паренхимы (рис. 3.55). Стромальные элементы умеренно выражены. В поле зрения наблюдаются

фолликулы различного диаметра округлой формы, равномерно распределенные по всей площади фрагмента, которые содержат ярко-розовый коллоид. Тиреоидный эпителий в основном уплощен, степень вакуолизации умеренная или слабая. В некоторых участках наблюдаются нарушения межфолликулярного пространства.

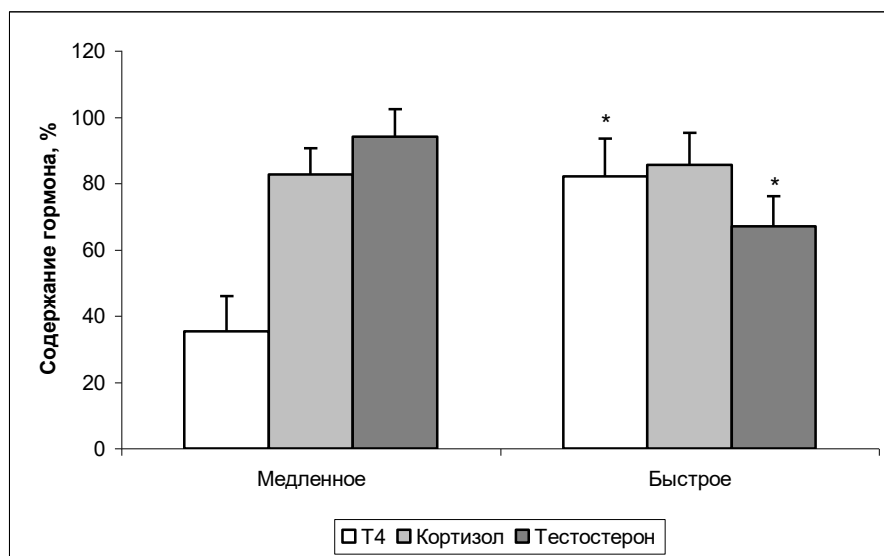


Рис. 3.53. Изменение уровня гормонов в питательной среде (% от незамороженного контроля) после криоконсервирования эндокринных желез новорожденных поросят. * – отличия достоверны по сравнению с медленным замораживанием, $P < 0,05$.

Фрагменты НЖ, замороженные при использовании медленного охлаждения, после размораживания сохраняют характерную гистологическую структуру (рис. 3.56). В корковом слое различаются три зоны: клубочковая, пучковая и сетчатая. Присутствуют клетки с темными и мелкими ядрами, и клетки с крупными светлыми ядрами и вспененной цитоплазмой. Наблюдается слабая и умеренная делипидизация цитоплазмы клеток.

Паренхима НЖ, замороженных в быстром режиме, сохраняет характерную зональную организацию. Во всех зонах различаются крупные светлые клетки с крупнопенистой цитоплазмой, и клетки с мелкими темными ядрами (рис. 3.57).

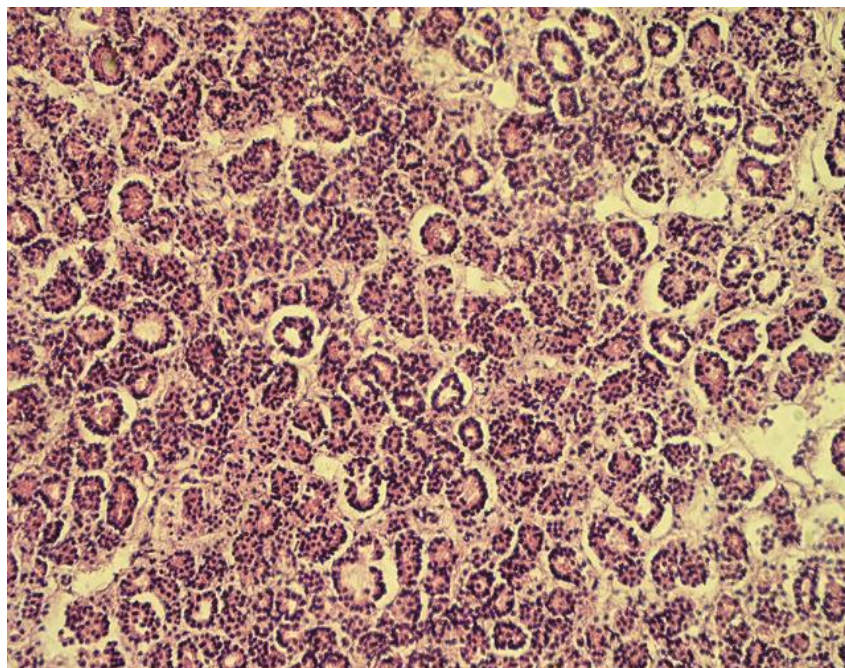


Рис. 3.54. Фрагмент ЩЖ новорожденного поросенка, замороженный в медленном режиме. Окраска гематоксилином и эозином. Ок. 10, об. 20.

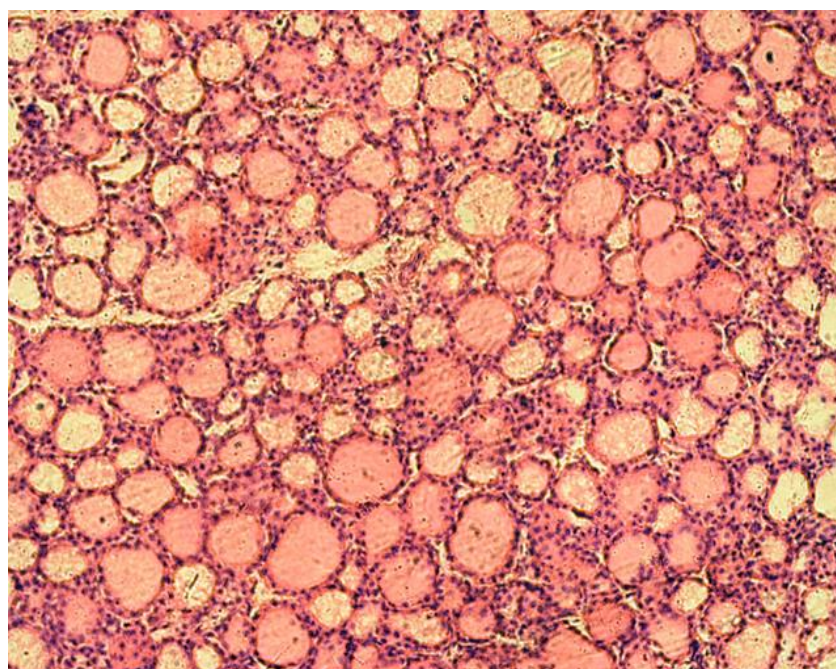


Рис. 3.55. Фрагмент ЩЖ новорожденного поросенка, замороженный в быстром режиме. Окраска гематоксилином и эозином. Ок. 10, об. 20.

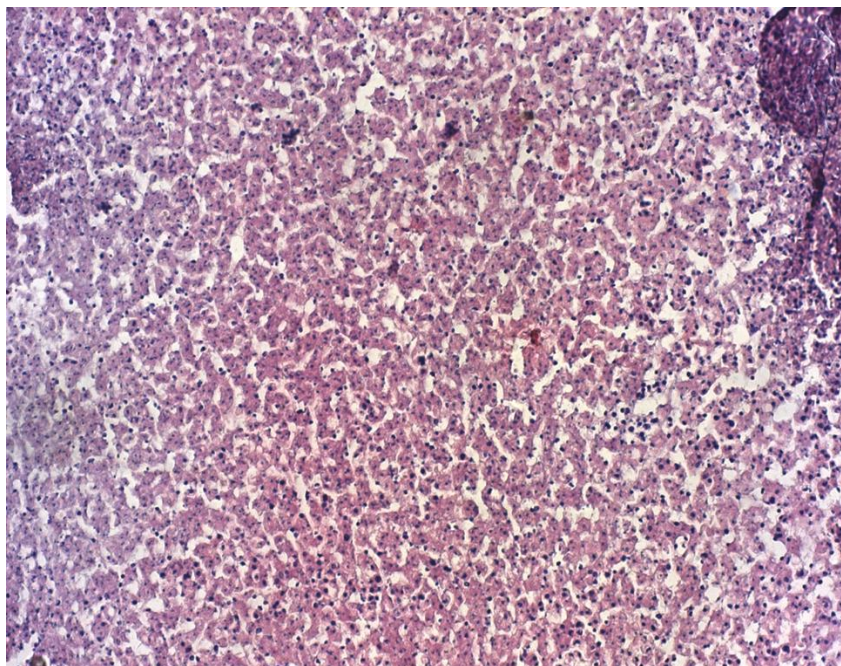


Рис. 3.56. Фрагмент НЖ новорожденного поросенка, замороженный в медленном режиме. Окраска гематоксилином и эозином. Ок. 10, об. 20.

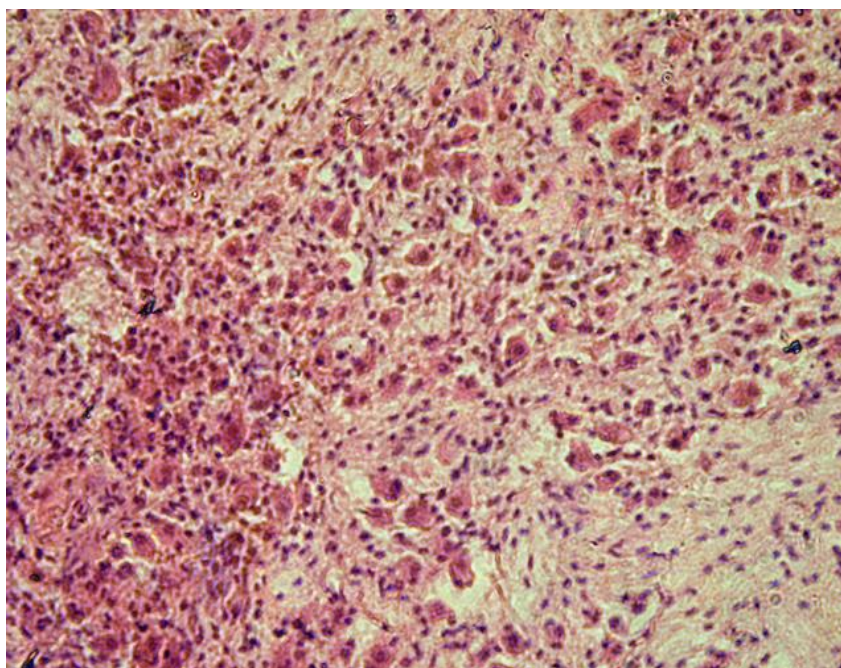


Рис. 3.57. Фрагмент НЖ новорожденного поросенка, замороженный в быстром режиме. Окраска гематоксилином и эозином. Ок. 10, об. 40.

Однако по площади всего фрагмента наблюдаются признаки гидропической дистрофии и некроза клеток.

После криоконсервирования в медленном режиме характерное канальцевое строение паренхимы семенника в целом сохранено (рис. 3.58). На разрезе канальцы имеют круглую, овальную и продолговатую форму, различается спермо-эпителиальный пласт клеток, прилегающий к базальной мембране. В некоторых случаях наблюдается десквамация клеток во внутриканальцевое пространство. Интерстициальные пространства несколько расширены. В интерстиции хорошо различаются крупные клетки с оксифильной цитоплазмой.

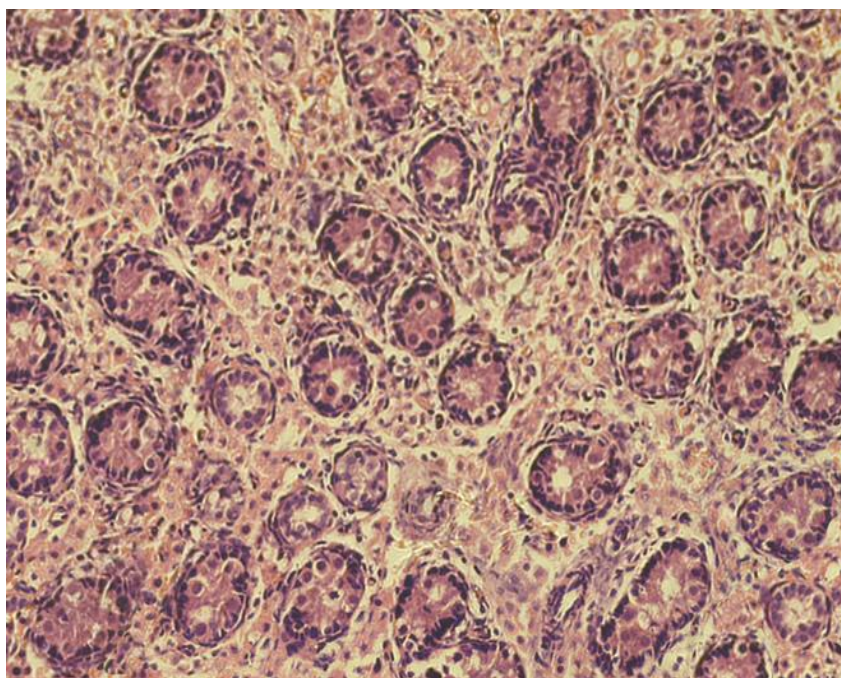


Рис. 3.58. Фрагмент семенника новорожденного поросенка, замороженный в медленном режиме. Окраска гематоксилином и эозином. Ок. 10, об. 20.

При криоконсервировании фрагментов семенников в быстром режиме наблюдались значительные изменения характерной структуры паренхимы (рис. 3.59). Межканальцевые пространства сильно расширены, наблюдается отек

ткани. В канальцах присутствуют разрывы базальной мембраны и выход клеток канальцев в интерстициальное пространство. В канальцах отмечаются пустоты и дезориентация клеточных слоев. Интерстициальные клетки имеют признаки гидропической дистрофии. Распространены участки клеток с неоднородной светлой цитоплазмой и светлыми ядрами, некротические участки.

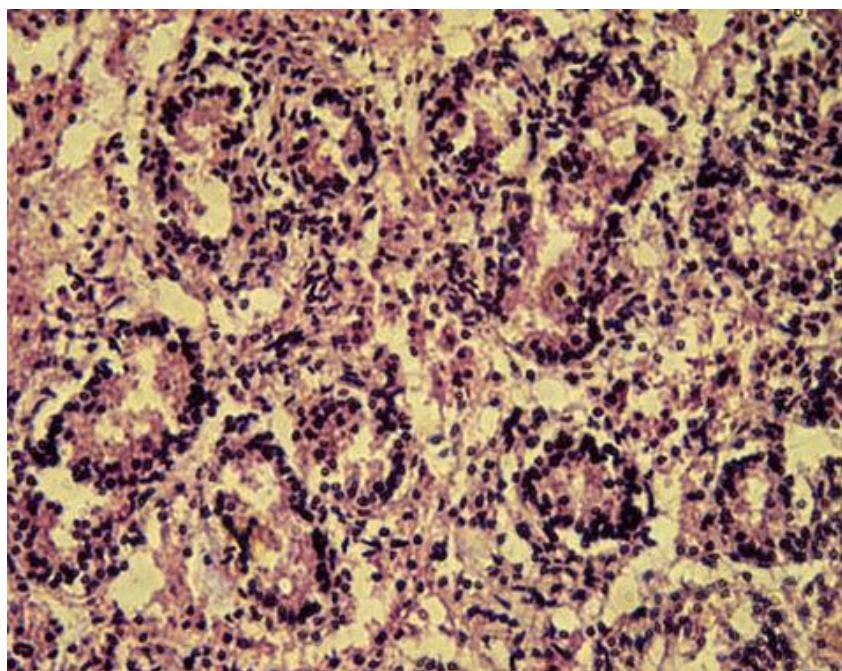


Рис. 3.59. Фрагмент семенника новорожденного поросенка, замороженный в быстром режиме. Окраска гематоксилином и эозином. Ок. 10, об. 40.

На основании полученных данных для дальнейшего использования при трансплантации нами были выбраны режимы охлаждения ткани, максимально способствующие сохранению жизнеспособности и гормональной активности клеток эндокринных желез. При незначительных отличиях между режимами, как в случае криоконсервирования НЖ, выбор был сделан в пользу режима с более высокой скоростью охлаждения в целях реализации эффекта элиминации АПК из ткани. Они представлены в таблице 3.4.

Таблица 3.4.

Режимы криоконсервирования фрагментов эндокринных желез, использованные в экспериментах по трансплантации (↓ LN2 – погружение в жидкий азот).

Вид ткани	Скорость охлаждения в интервале, °C/мин		Концентрация ДМСО, %
	22°C...-70°C	-70°C...-196°C	
ЩЖ	>100	↓ LN2	7
НЖ	>100	↓ LN2	10
Семенник	5	↓ LN2	10

На следующем этапе работы было определено влияние криоконсервирования на выживаемость трансплантатов ЩЖ, семенников и надпочечников. В связи с тем, что предыдущие результаты свидетельствовали о том, что для реализации иммуномодулирующего эффекта криоконсервирования необходимо подвергнуть ткань краткосрочному органотипическому культивированию после отогрева, нами во всех последующих экспериментах был использован этот подход.

В таблице 3.5 представлены показатели уровня гормонов в сыворотке крови реципиентов криоконсервированных фрагментов щитовидной железы, надпочечников и семенников на 30 сутки после ксенотрансплантации. Из данных таблицы видно, что после трансплантации криоконсервированных фрагментов ЩЖ, НЖ и семенников в крови реципиентов наблюдается присутствие Т4, кортизола и тестостерона, соответственно. Однако уровень гормонов не достигает целевых показателей интактного контроля во всех случаях.

Также нельзя однозначно заключить, что выживаемость фрагментов, которые были культивированы после отогрева, выше тех, которые были

подвергнуты лишь криоконсервированию. Возможно, органотипическое культивирование, с одной стороны, приводит к элиминации АПК из ткани после отогрева, но, с другой, в связи с недостаточной диффузией питательных веществ и газов, повреждает гормоно-продуцирующие клетки.

Таблица 3.5.

Уровень гормонов в сыворотке крови реципиентов на 30 сутки после ксенотрансплантации криоконсервированных и культивированных после отогрева фрагментов эндокринных желез новорожденных поросят.

Обработка ткани	Т4		Кортизол		Тестостерон	
	нмоль/л	% от контроля	нмоль/л	% от контроля	нмоль/л	% от контроля
Криоконсервирование	17,05±8,1	32,3±9,6	215,2±8,5	278,3±8,1	0,42±0,23	11,7±2,9
Культивирование	29,5±6,4	56,0±7,9*	124,02±28,1	160,3±14,9*	0,32±0,19	8,9±3,1

Примечание: * – отличия достоверны по сравнению с криоконсервированием, $P < 0,05$.

В таблице 3.6 представлены показатели уровня гормонов в сыворотке крови реципиентов криоконсервированных фрагментов использованных желез на 30 сутки после аллотрансплантации. У животных с трансплантатами ткани НЖ измеряли 11-оксикортикостероиды (11-ОКС), которые включают в себя кортизол. В целом, данные гормонального уровня после трансплантации схожи на те, которые были получены при ксенотрансплантации. Ни в одном из случаев не наблюдается полной коррекции уровня гормона. Также не наблюдается однозначного превосходства использования культивированных после отогрева фрагментов желез по сравнению с криоконсервированными.

О структурном состоянии эндокринной ткани и признаках ее отторжения детально можно было судить после гистологического анализа.

Таблица 3.6.

Уровень гормонов (нмоль/л и % от интактного контроля) в сыворотке крови реципиентов на 30 сутки после аллотрансплантации криоконсервированных и культивированных после отогрева фрагментов эндокринных желез.

Обработка ткани	Т4		11-ОКС		Тестостерон	
	нмоль/л	% от контро- ля	мкг/мг белка	% от контро- ля	нмоль/л	% от контро- ля
Криоконсервиро- вание	33,5±5,8 *	66,0±8,9 *	0,204±0,1 *	25,3±4,6 *	0,53±0,2 *	14,7±3,2 *
Культивирование	27,0±11,5* *	54,0±7,2 *	0,154±0,2* #	19,1±5,9 *	0,38±0,1 *	10,5±2,8 *

Примечание: * – отличия достоверны по сравнению с контролем; # - отличия достоверны по сравнению с криоконсервированием, $P<0,05$.

В ксенографтах ЩЖ, подвергнутых криоконсервированию, на 30 сутки наблюдается характерная картина, свидетельствующая о развитии процесса отторжения (рис. 3.60).

Присутствуют остатки трансплантированной ткани в виде редких одиночных фолликуло-подобных структур с уплотненным гомогенным коллоидом или округлых незаполненных полостей, по-видимому, являющимися остатками фолликулов и представляющих собой базальную мембрану без эпителиальной выстилки. Наблюдаются обширные поля разрастания грубой фиброзной ткани в сочетании с диффузной лейкоцитарной инфильтрацией, особенно выраженной на границе трансплантата и почки.

Ксенографт криоконсервированных фрагментов НЖ на 30 сутки после трансплантации представляет собой участки соединительной ткани, обогащенной характерными клеточными элементами (рис. 3.61). Определяется диффузная лейкоцитарная инфильтрация, особенно выраженная в

паранефральной области. В субкапсулярной области ксенографта расположены упорядоченные тяжи клеток, имеющих оксифильную вспененную цитоплазму и определяемых как клетки пучковой зоны НЖ.

Гистологическая картина образцов криоконсервированных семенников новорожденных поросят характеризовалась полным отсутствием семенных канальцев, сохраняющих очертания и форму (рис. 3.62). В трансплантате, особенно в паранефральной области, различаются очаги лейкоцитарного инфильтрата; по всей площади наблюдается формирование фиброзной ткани, которая к исследуемому сроку практически замещает трансплантированную ткань. Отмечается значительная васкуляризация трансплантата.

Сходная морфологическая картина была характерна и для трансплантатов криоконсервированных фрагментов эндокринных желез, которые были культивированы после отогрева, в связи с чем микрофотографии для этих образцов не приведены.

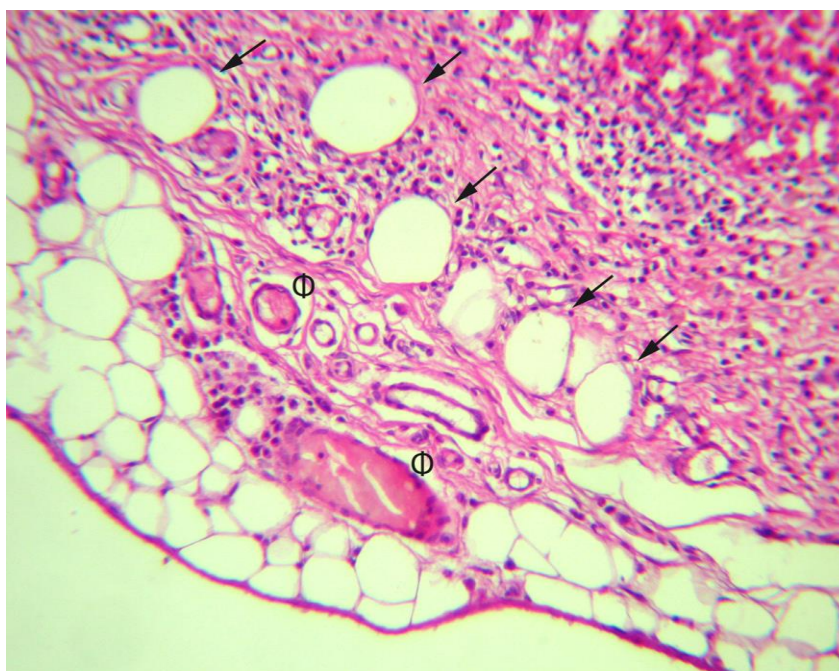


Рис. 3.60. Ксенографт криоконсервированной ЩЖ на 30 сутки после трансплантации. Ф – фолликулы, стрелки – остатки фолликулярных структур. Окраска гематоксилином и эозином. Ок. 10, об. 20.

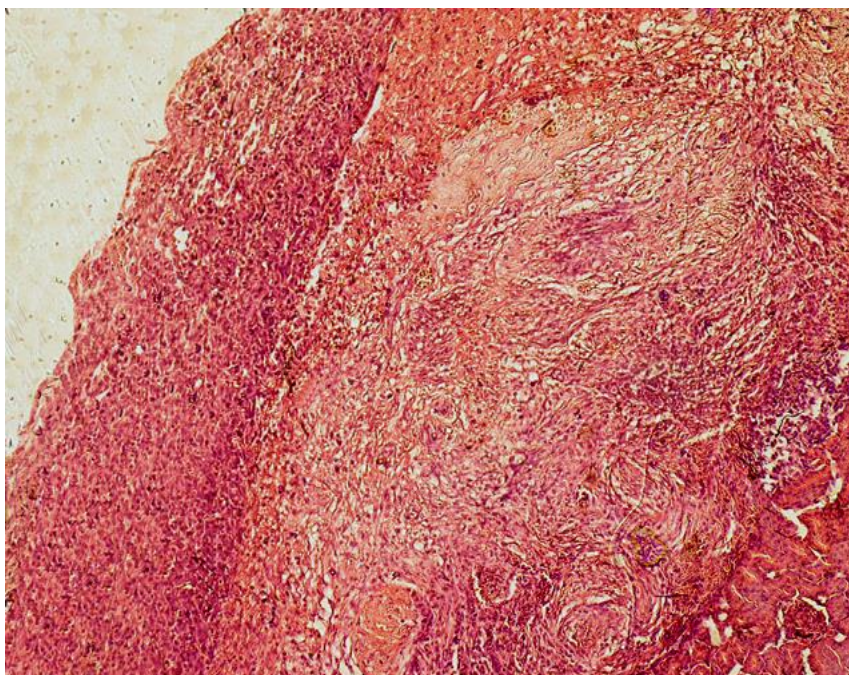


Рис. 3.61. Ксенографт криоконсервированных НЖ на 30 сутки после трансплантации. Окраска гематоксилином и эозином. Ок. 10, об. 10.

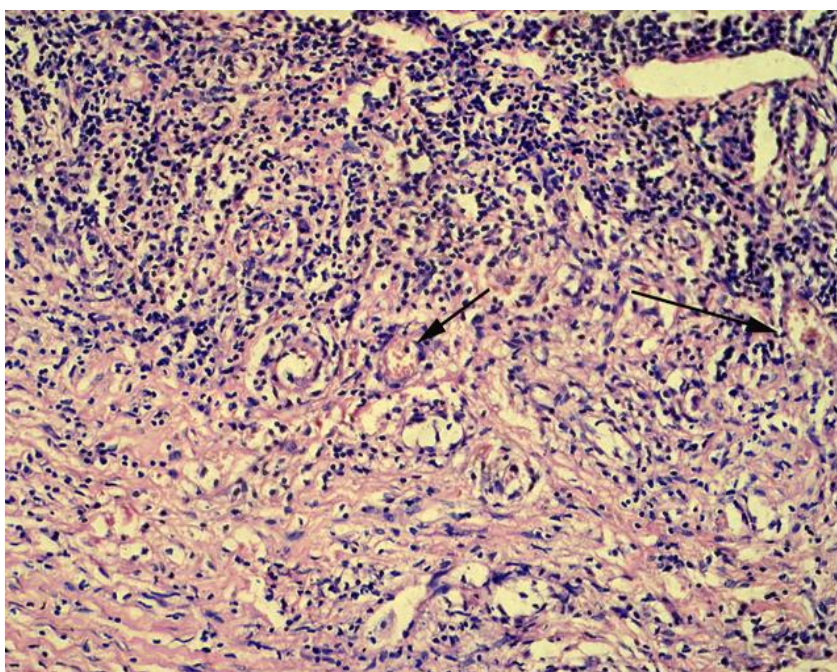


Рис. 3.62. Ксенографт криоконсервированных семенников на 30 сутки после трансплантации. Окраска гематоксилином и эозином. Ок. 10, об. 40.

Результаты количественного анализа морфометрических признаков выживаемости криоконсервированных алло- и ксенографтов представлены в таблицах 3.7 и 3.8.

Таблица 3.7.

Морфометрические индексы выживаемости трансплантатов криоконсервированных фрагментов эндокринных желез на 30 сутки.

Вид ткани	Аллотрансплантация			Ксенотрансплантация		
	S1	S2	S3	S1	S2	S3
ЩЖ	65,6±8,8	3,1±1,5	31,3±10,6	37,2±12,2	4,2±2,6	58,6±7,4
НЖ	62,1±11,8	9,5±6,2*#	28,4±7,4	53,7±14,5	25,8±10,4*#	20,5±5,6
Семенник	67,5±9,1	1,2±1,8	31,3±7,8	89,6±6,8	0	10,4±8,3

Примечание: * – отличия S2 достоверны по сравнению с показателем для ЩЖ; # - отличия S2 достоверны по сравнению с показателем для семенников, $P<0,05$.

Таблица 3.8.

Морфометрические индексы выживаемости трансплантатов криоконсервированных и культивированных после отогрева фрагментов эндокринных желез на 30 сутки.

Вид ткани	Аллотрансплантация			Ксенотрансплантация		
	S1	S2	S3	S1	S2	S3
ЩЖ	69,8±14,6	2,7±1,5	27,5±8,5	64,6±12,4	1,6±1,1	34,4±9,9
НЖ	42,1±7,8	42,5±12,5*#	15,4±7,7	72,0±15,7	21,1±12,2*#	6,9±6,5
Семенник	72,8±11,5	1,9±0,9	25,3±9,4	78,9±8,3	0	21,1±9,6

Примечание: * – отличия S2 достоверны по сравнению с показателем для ЩЖ; # - отличия S2 достоверны по сравнению с показателем для семенников, $P<0,05$.

Из сравнительного анализа данных следует, что выживаемость алло- и ксенографтов ткани ЩЖ и семенников незначительно отличается в зависимости от обработки (криоконсервирование и культивирование после отогрева). Аллогraftы НЖ демонстрируют лучшую выживаемость при культивировании после отогрева, для ксенографтов такой зависимости не прослеживается.

Суммируя данные, полученные при изучении видовых особенностей выживаемости ткани эндокринных желез, как свежесыведенных, так и после обработки, можно заключить следующее. Выживаемость аллогraftов ЩЖ не зависела от вида обработки ткани (рис. 3.63). Незначительное увеличение выживаемости ксенографтов ЩЖ наблюдается после ОК и криоконсервирования (рис. 3.64).

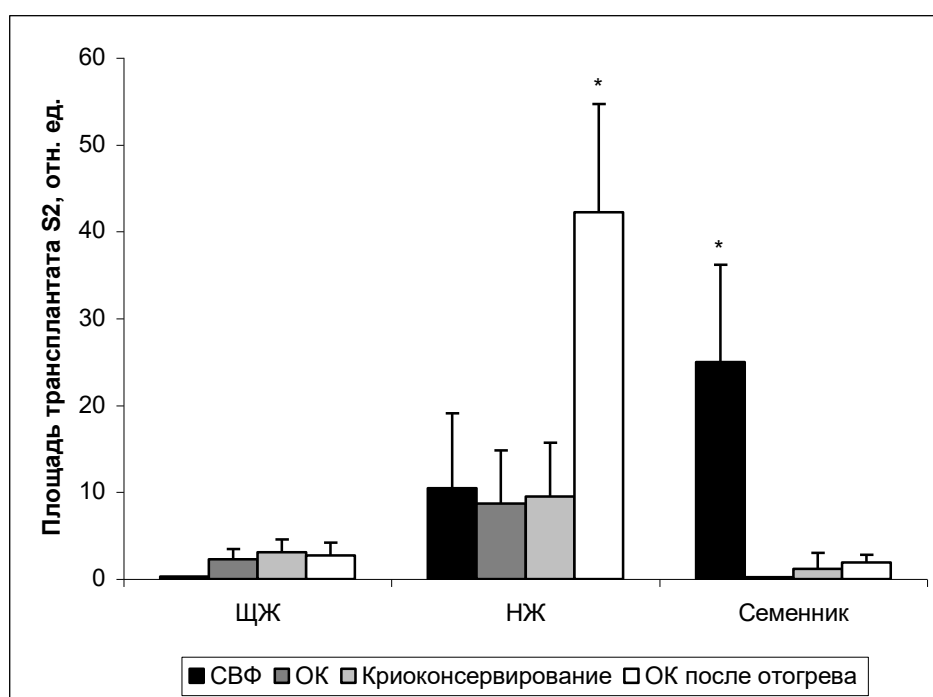


Рис. 3.63. Морфометрический показатель выживаемости аллотрансплантатов эндокринных желез на 30 суток. * – отличия достоверны по сравнению с остальными образцами соответствующей ткани, $P < 0,05$.

Для алло- и ксенографтов НЖ характерной особенностью является сравнительно высокий уровень выживаемости на исследуемый срок после трансплантации. Выживаемость аллогraftов НЖ после криоконсервирования и

культивирования после отогрева возрастала в среднем в 4 раза (рис. 3.63). Для ксенографтов подобной динамики не наблюдалось, в среднем выживаемость ткани при этом находилась в пределах 20-25% (рис. 3.64).

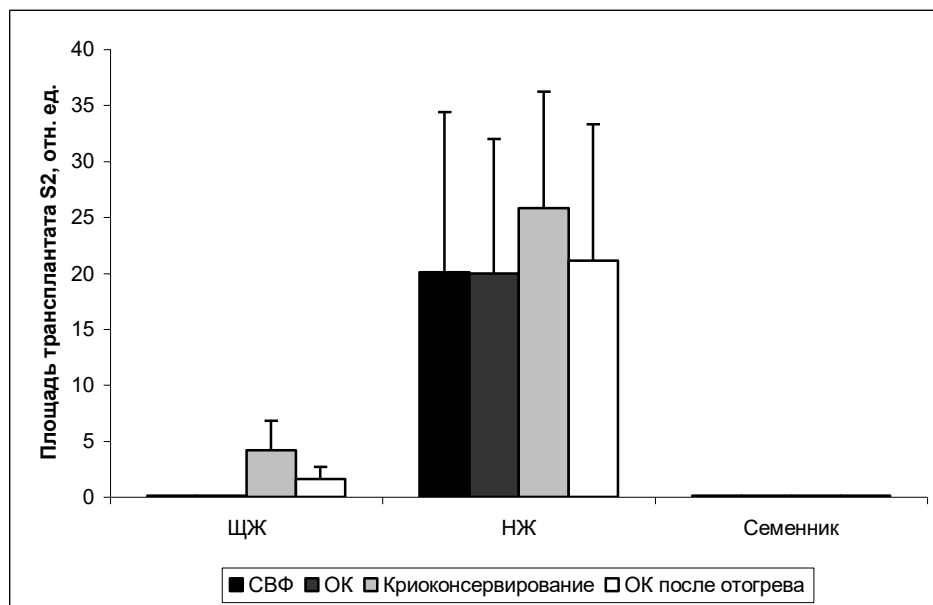


Рис. 3.64. Морфометрический показатель выживаемости ксенотрансплантатов эндокринных желез на 30 сутки. * – отличия достоверны по сравнению со свежевыделенными фрагментами, $P < 0,05$.

Ткань семенников характеризовалась низким уровнем выживаемости во всех исследованных случаях, кроме аллотрансплантации СВФ. Хотя в случае аллотрансплантации при гистологическом исследовании ткани определяется не жизнеспособная ткань, а канальцеподобные структуры, заполненные некротическими массами распада.

Выводы по разделу:

Таким образом, на основе анализа результатов, представленных в данном разделе, можно сделать следующие выводы:

1. Криоконсервирование с высокой скоростью охлаждения ($>100^{\circ}\text{C}/\text{мин}$) в комплексе с культивированием после отогрева способствует выживаемости

аллогенных трансплантатов ткани надпочечников, но не остальных желез (щитовидной железы, семенников).

2. Площадь ткани с неповрежденной структурой на 30 сутки после трансплантации криоконсервированной ткани надпочечников составила 42,2%, что в 4 раза превышало значения данного показателя, установленного при трансплантации незамороженных фрагментов ткани.

3. При использовании криоконсервированной ткани щитовидной железы и семенников для алло- и ксенотрансплантации не установлено достоверных различий в выживаемости по сравнению с незамороженным контролем. Площадь ткани с неповрежденной структурой для алло- и ксенотрансплантатов на 30 сутки после трансплантации составляет соответственно: 2,7 и 1,6 % для криоконсервированной ткани щитовидной железы; 1,9 и 0,1% для криоконсервированной ткани семенников.

Результаты, изложенные в данной главе, опубликованы в следующих работах:

1. Бондаренко Т.П. Сравнительное изучение жизнеспособности криоконсервированных культур эндокринных тканей новорожденных поросят/ Т.П. Бондаренко, Г.А. Божок, Н.Г. Кадникова, Н.М. Алабедадькарим, О.А. Супрун, О.В. Кофанова// Проблемы криобиологии. – 2000. – №4. – С 59-61.
2. Бондаренко Т.П. Оптимізація умов екстрагування та визначення ІІ-ОКС в біологічних рідинах флюорометричним методом / Т.П. Бондаренко, А.В. Геращенко, Г.А. Божок, Н.М. Алабедадькарім // Лабораторна діагностика. – 2001. – №3. – С. 36 – 39.
3. Бондаренко Т.П. Колориметрическое определение жизнеспособности органной культуры клеток семенников, надпочечников и щитовидной железы/ Т.П. Бондаренко, Н.А. Волкова, И.И. Самченко, Н.М. Алабедадькарим, Г.А. Божок // Лабораторна діагностика. – 2001. – №4. – С. 44-46.

4. Бондаренко Т.П. Гормонсекретирующая способность криоконсервированной органной культуры надпочечников новорожденных поросят *in vivo* и *in vitro*/ Т.П. Бондаренко, И.И. Самченко, Г.А. Божок, Н.М. Алабедадькарим // Проблемы медичної науки та освіти. – 2002. – №3. – С.35-37.
5. Бондаренко Т.П. Вплив диметилсульфоксиду та кріоконсервування на функціональні характеристики органної культури сім'яників / Т.П. Бондаренко, Н.М. Алабедадькарим, Г.А. Божок, Салех Абу-Жаяб // Проблемы эндокринной патологии. – 2003. – №2. – С.57-62.
6. Бондаренко Т.П. Ксенотрансплантация кріоконсервованого эндокринного матеріалу як метод корекції гіпофункції залоз в експерименті / Т.П. Бондаренко, Г.А. Божок, Є.І. Легач, Н.М. Алабедадькарим, Н.О. Волкова, С.В. Луговий, І.І. Самченко // Трансплантологія. – 2003. – Т.4, №1. – С. 60-63.
7. Волкова Н.А. Влияние ксенотрансплантации криоконсервированной органной культуры щитовидной железы на физиологические параметры экспериментальных животных / Н.А. Волкова, Г.А. Божок, Н.М. Алабедадькарим, Е.И. Легач, Т.П. Бондаренко // Проблемы криобиологии. – 2003. – №1. – С. 16-19.
8. Волкова Н.А. Влияние криоконсервирования на функциональные характеристики органной культуры щитовидной железы кроликов и новорожденных поросят / Н.А. Волкова, Т.П. Бондаренко, Н.М. Алабедадькарим, Г.А. Божок // Проблемы криобиологии. – 2003. – №2. – С. 109-113.
9. Пахомов А.В. Гормонопродуцирующая способность клеток интерстиция семенников и органотипической культуры семенников новорожденных поросят после криоконсервирования / А.В. Пахомов, Г.А. Божок, Е.И. Легач, Т.П. Бондаренко // Проблемы криобиологии. – 2007. – Т. 17, № 2. – С. 179-185.

10. Пахомов А.В. Использование флюоресцентной микроскопии для характеристики клеток стероидогенных тканей / А.В. Пахомов, Г.А. Божок, И.А. Боровой, Н.Л. Погребняк, Е.И. Легач // Проблемы эндокринной патологии. – 2007. – №4. – С. 78-83.
11. Божок Г.А. Использование метода комбинированного культивирования двух видов эндокринных тканей с целью улучшения морфофункциональных характеристик алло– и ксенографтов / Г.А. Божок, С.Б. Билявская, Е.И. Легач, Т.П. Бондаренко // Трансплантология. – 2007. – Т.9, №1. – С. 19–21.
12. Билявская С.Б. Выделение и культивирование клеток щитовидной железы новорожденных поросят с целью их дальнейшей трансплантации / С.Б. Билявская, Г.А. Божок, Е.И. Легач, Т.П. Бондаренко // Трансплантология. – 2008. – Т.10, №1. – С. 143-145.
13. Пахомов А.В. Клеточное и органотипическое культивирование тканей семенников / А.В. Пахомов, Г.А. Божок, Е.И. Легач, Т.П. Бондаренко // Проблемы криобиологии. – 2008. – Т. 18, № 1. – С. 62-65.
14. Пахомов А.В. Исследование стероидогенного потенциала биологического материала тестисов половозрелых крыс после криоконсервирования / А.В. Пахомов, Т.М. Гурина, Г.А. Божок // Проблемы криобиологии. – 2009. – Т. 19, № 1. – С. 63–71.
15. Сидоренко О.С. Изучение возможности получения и криоконсервирования первичной культуры клеток надпочечников новорожденных поросят / О.С. Сидоренко, Г.А. Божок, Е.И. Легач, Т.М. Гурина // Проблемы криобиологии. – 2011. – Т. 21, №1. – С. 58-67.
16. Gurina T.M. Development of a cryopreservation protocol for testicular interstitial cells with the account of temperature intervals for controlled cooling below -60°C / T.M. Gurina, A.V. Pakhomov, A.L. Kyryliuk, G.A. Bozhok // Cryobiology. – 2011. – Vol.62, № 2. – P. 107-114.
17. Пат. № 4845 Україна, МПК⁷ A12N 5/08, A61K 35/55. Спосіб підготовки кріоконсервованої органотипової культури надниркової залози для

- трансплантації / Алабедацькарім Н.М., Божок Г.А., Легач Є.І., Бондаренко Т.П.; заявл. 29.04.2004; опубл. 15.02.2005, Бюл. №2.
18. Пат. № 9367 Україна, МПК⁷ A01N 1/02. Спосіб кріоконсервування органної культури щитовидної залози новонароджених поросят / Бондаренко Т.П., Божок Г.А., Алабедацькарім Н.М., Легач Є.І.; заявл. 28.03.2005; опубл. 15.09.2005, Бюл. №9.
 19. Пат. № 80497 Україна, МПК⁷ A01N 1/02. Спосіб кріоконсервування органотипової культури сім'яників новонароджених поросят / Божок Г.А., Легач Є.І., Гуріна Т.М., Губіна Н.Ф., Бондаренко Т.П.; заявл. 20.04.2006; опубл. 25.09.2007, Бюл. №15.
 20. Пат. № 46440 Україна, МПК⁷ 12N 5/00. Спосіб підвищення гормональної активності органотипових культур щитовидних залоз новонароджених поросят з метою їх подальшої трансплантації / Білявська С.Б., Божок Г.А., Легач Є.І., Бондаренко Т.П. – заявл. 9.06.2009; опубл. 25.12.2009, Бюл. №24.
 21. Пат. № 91787 Україна, МПК⁵¹, A01N 1/02. Спосіб кріоконсервування суспензії клітин сім'яників ссавців / Гуріна Т.М., Пахомов О.В., Божок Г.А., Бондаренко Т.П.; заявл. 13.04.2009; опубл. 25.08.2010, Бюл. №16.
 22. Бондаренко Т.П. Влияние димексида на базальную секрецию тиреоидных гормонов органотипической культурой щитовидной железы новорожденных поросят / Т.П. Бондаренко, С.В. Луговой, Н.М. Алабедацькарим, Г.А. Божок, Е.И. Легач, А.В. Геращенко // I Всеукраїнська конференція студентів і молодих вчених з питань трансплантології "Трансплантологі сьогодні". – Донецьк, 2000. – С. 23-24.
 23. Бондаренко Т.П. Трансплантація кріоконсервованої культури клітин адренкортикальної тканини новонароджених поросят / Т.П. Бондаренко, Г.А. Божок, Н.М. Алабедацькарім, Є.І. Легач, С.В. Луговий, Г.В. Геращенко // Трансплантологія. – 2000. – Т.1, №1. – С.177-178.
 24. Бондаренко Т.П. Исследование стероидогенной активности кріоконсервированной органной культуры надпочечников при

- ксенотрансплантации / Т.П. Бондаренко, Г.А. Божок, Н.М. Алабедадькарим, А.В. Геращенко, И.И. Самченко, Е.И. Легач // Проблемы криобиологии. – 2001. - №3. – С.36.
25. Волкова Н.А. Изучение функционирования криоконсервированной органной культуры щитовидной железы при трансплантации / Н.А. Волкова, Т.П. Бондаренко, С.В. Луговой, Н.М. Алабедадькарим, Г.А. Божок // Матеріали науково-практичної конференції, присвяченій 150-річчю з дня народження академіка В.Я.Данилевського. – Харків, 2002. – С.25-26.
26. Абу-Жаяб Салех. Вплив кріоконсервування на функціональний стан органної культури сім'яників новонароджених поросят / Салех Абу-Жаяб, Г.А. Божок, Н.М. Алабедадькарим // Укр.біохім.журнал. – 2002. – Т.74, № 4. – С. 148-149.
27. Божок Г.А. Взаимная регуляция гормонопродукции нативных и криоконсервированных органных культур надпочечных и щитовидных желез / Г.А. Божок, Н.М. Алабедадькарим, Н.Ф. Губина // Матеріали науково-практичної конференції "Сучасні напрямки розвитку ендокринології". – Харків, 2004 – С. 12-13.
28. Пахомов А.В. Жизнеспособность различных фракций суспензии клеток семенников при инкубации в растворах ДМСО: Тези доповідей конференції "Холод в биологии и медицине" / А.В. Пахомов, Г.А. Божок // Проблемы криобиологии. – 2005. – Т.15, №4. – С.739-740.
29. Пахомов О.В. Особливості базальної та стимульованої гормонопродукції нативних та кріоконсервованих органотипових культур сім'яників новонароджених поросят: Матеріали конференції "Актуальні проблеми біохімії та біотехнології" / О.В. Пахомов, Г.А. Божок, Є.І. Легач, Б.І. Марков // Укр.біохім.журнал. – 2005. – Т.77, №5. – С.153.
30. Пахомов А.В. Морфофункциональные характеристики криоконсервированной органотипической культуры семенников новорожденных поросят после ксенотрансплантации: Матеріали конференції «Актуальні

проблеми і досягнення кріобіології і кріомедицини» / А.В. Пахомов, Г.А. Божок, Е.И. Легач, Н.Ф. Губина, Б.И. Марков, Т.П. Бондаренко // Проблемы криобиологии. – 2005. – Т.15, №3. – С.433-434.

31. Legach I. Cryopreserved organ culture of endocrine glands for hormonal insufficiency treatment / E.I. Legach, G.A. Bozhok, T.P. Bondarenko // 12th European Congress of Endocrinology. – Prague, 2010. – P. 190.
32. Бондаренко Т.П. Перспективы применения трансплантации криоконсервированной ткани эндокринных желез для коррекции гормональной недостаточности / Т.П. Бондаренко, Г.А. Божок, Е.И. Легач // Проблемы криобиологии. – 2012. – Т. 22, №. 3. – С.258.

3.4. Влияние донор-специфической трансфузии спленоцитов на выживаемость трансплантатов ткани эндокринных желез

Анализируя результаты, полученные на предыдущих этапах работы, был сделан вывод о незначительной эффективности подхода, который состоял в иммуномодуляции ткани трансплантата с помощью криоконсервирования и культивирования. Максимальный достигнутый результат был получен при трансплантации ткани НЖ и состоял в том, что выживаемость аллогraftа НЖ была увеличена в среднем на 30% при использовании криоконсервирования и культивирования после отогрева. Применение данного подхода к трансплантации ткани ЩЖ и семенников вообще оказалось нерезультативным. Это свидетельствовало о том, что решающим фактором выживаемости трансплантата эндокринных желез все же является не их антигенный и иммуногенный статус, а реакции иммунной системы реципиента. В связи с этим, на следующем этапе работы мы использовали подход к изменению реактивности иммунной системы реципиента и исследовали его влияние на выживаемость тканевых трансплантатов эндокринных желез.

Некоторые клинические и экспериментальные данные свидетельствуют о том, что для улучшения выживаемости трансплантата с успехом могут быть задействованы методы коррекции иммунного ответа реципиента, одним из которых является индукция донор-специфической толерантности (ДСТ) к трансплантату. Один из основоположников трансплантологии П.Медавар в 60-х годах прошлого века установил, что при трансплантации кожи животным, которым внутриутробно была сделана инъекция донорских спленоцитов, не наблюдается реакции острого отторжения [74]. Позднее было установлено, что ДСТ может быть вызвана во взрослом организме предтрансплантационным введением донорских клеток (моноклеаров периферической крови, клеток лимфоузлов, селезенки, костного мозга) в портальную вену [241, 332, 376, 395], при этом трансплантацию органа или ткани от того же донора необходимо выполнять не ранее, чем через 7-14 дней [374]. Данный подход был изучен как

при аллогенной, так и ксеногенной трансплантации, причем, было показано, что при ксеногенной трансплантации выживаемость ткани возможна лишь в присутствии иммуносупрессии [223]. Принимая во внимание этот факт и учитывая, что использование иммуносупрессии при трансплантации эндокринной ткани нежелательно [346], в мы проводили дальнейшую экспериментальную работу только в аллогенной системе донор-реципиент.

В качестве объекта трансплантации нами были выбраны эндокринные железы, изначально обладающие иммуномодулирующими свойствами и способные таким образом влиять на иммунокомпетентные клетки реципиента. К ним относятся НЖ (судя из наших предыдущих исследований) и яичники [165, 409]. Кроме того, также были использованы ткани ЩЖ и семенников, как не показавшие в наших предыдущих исследованиях повышенной выживаемости при трансплантации. Учитывая, что предтрансплантационная обработка ткани железы на этапах криоконсервирования и культивирования приводит к ухудшению структурно-функционального состояния гормонопродуцирующих клеток, нами в дальнейших экспериментах использовались только свежевыделенные фрагменты желез.

Во всех случаях эксперименты проводили на половозрелых животных (крысах или мышах) двух линий, одного пола. Схема эксперимента включала интрапортальное введение спленоцитов донорской линии за 7 суток до трансплантации в дозе 1×10^7 кл/животное; моделирование гормональной недостаточности путем удаления эндокринной железы у реципиента; трансплантацию СВФ ткани соответствующей железы донора под капсулу почки (рис. 3. 65).

ИП введение
спленоцитов

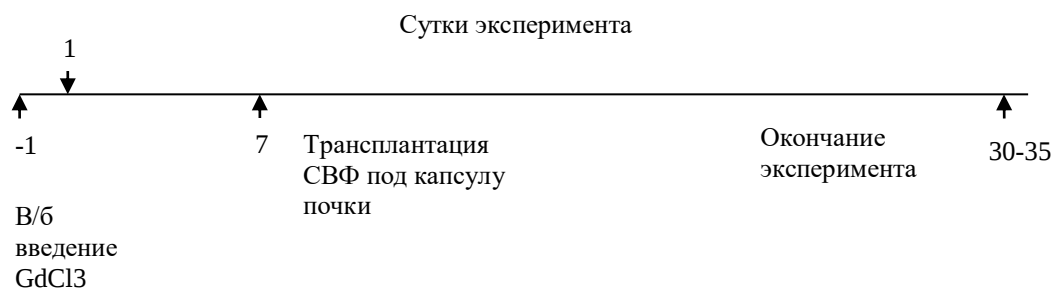


Рис. 3. 65. Схема эксперимента по индукции ДСТ и аллотрансплантации ткани эндокринных желез.

3.4.1. Влияние донор-специфической трансфузии спленоцитов на выживаемость трансплантатов овариальной ткани

Исследование влияния донор-специфической трансфузии (ДСТф) спленоцитов на выживаемость трансплантатов овариальной ткани проводили на 3-4 месячных крысах самках линий Вистар и Август. Реципиентами служили крысы линии Август.

В эксперименте были использованы следующие группы животных: группа 1 – интактный контроль (n=10), группа 2 – овариэктомированные крысы (n=8), группа 3 – овариэктомированные крысы с сингенной трансплантацией (n=6), группа 4 – овариэктомированные крысы с аллотрансплантацией (n=8), группа 5 – овариэктомированные крысы с ДСТф спленоцитов и аллотрансплантацией (n=8).

Установлено, что на 30 день после овариэктомии у крыс в сыворотке крови наблюдается уменьшение уровня эстрадиола на 78% и прогестерона на 88% по сравнению с контрольными животными (рис. 3. 66).

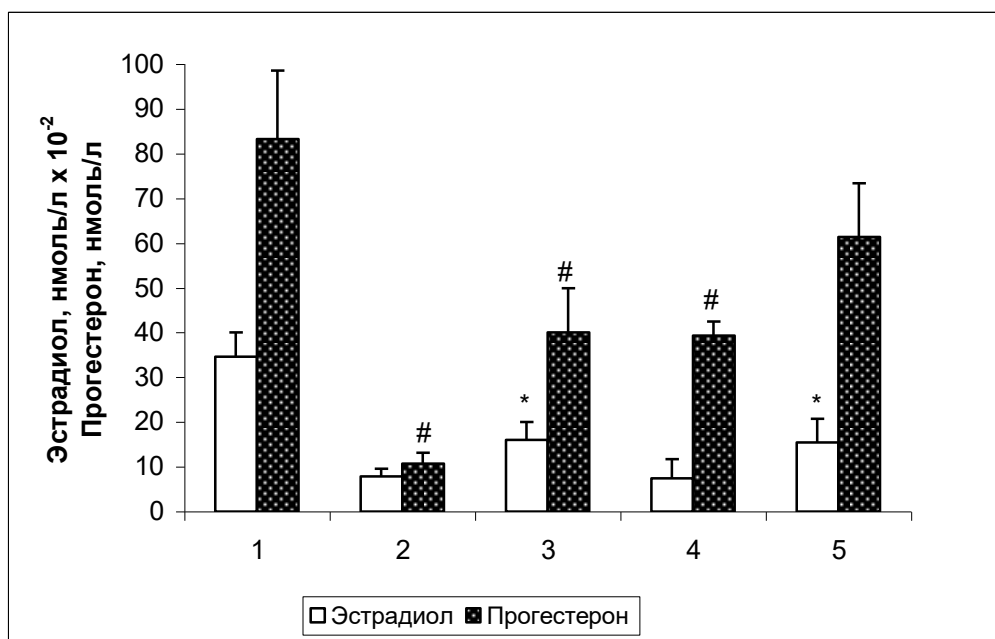


Рис.3.66. Концентрация эстрадиола и прогестерона в сыворотке крови экспериментальных животных: 1 – интактный контроль; 2– оvariэктомизированные; 3 – оvariэктомизированные с сингенной трансплантацией; 4– оvariэктомизированные с аллотрансплантацией; 5 – оvariэктомизированные с ДСТф спленоцитов и аллотрансплантацией.

*, # – уровень эстрадиола и прогестерона достоверно отличается от контроля ($p < 0,05$).

У оvariэктомизированных животных со всеми тремя видами трансплантаций (группы 3, 4, 5) уровень прогестерона был в 4-6 раз выше, чем у крыс без трансплантации ($40,0 \pm 10,0$; $39,4 \pm 3,1$; $61,4 \pm 11,9$ против $10,7 \pm 2,4$ нмоль/л). По сравнению с контрольными значениями полной компенсации уровня прогестерона у животных с трансплантациями не наблюдалось. Уровень прогестерона в 3 и 4 группах животных составлял 48% и 47%, а в 5 группе – 74% от контроля.

Увеличение уровня эстрадиола было отмечено в 3 и 5 группах животных в среднем в 2 раза по сравнению с оvariэктомизированными крысами ($0,16 \pm 0,04$; $0,15 \pm 0,054$ против $0,08 \pm 0,02$ нмоль/л). По сравнению с группой интактного контроля значения уровня эстрадиола в 3 и 5 группах составляли 46% и 44%. В

4 группе животных не наблюдалось повышения уровня эстрадиола по сравнению с овариэктомизированными крысами.

У животных после аллотрансплантации сДСТф спленоцитов (группа 5) уровень половых гормонов был выше, чем у животных без ДСТф (группа 4).

Гистологический анализ выявил достаточно хорошо сохранившуюся структуру ткани сингенных трансплантатов на 30-е сутки после трансплантации (рис. 3.67). В них наблюдается морфологическая структура яичников, характерная для половозрелых животных. Выявлены различные стадии фолликулогенеза, вплоть до антральной, а также желтые тела. Образование фиброзных участков и инфильтрата не обнаружено. Ткань трансплантата активно васкуляризована.

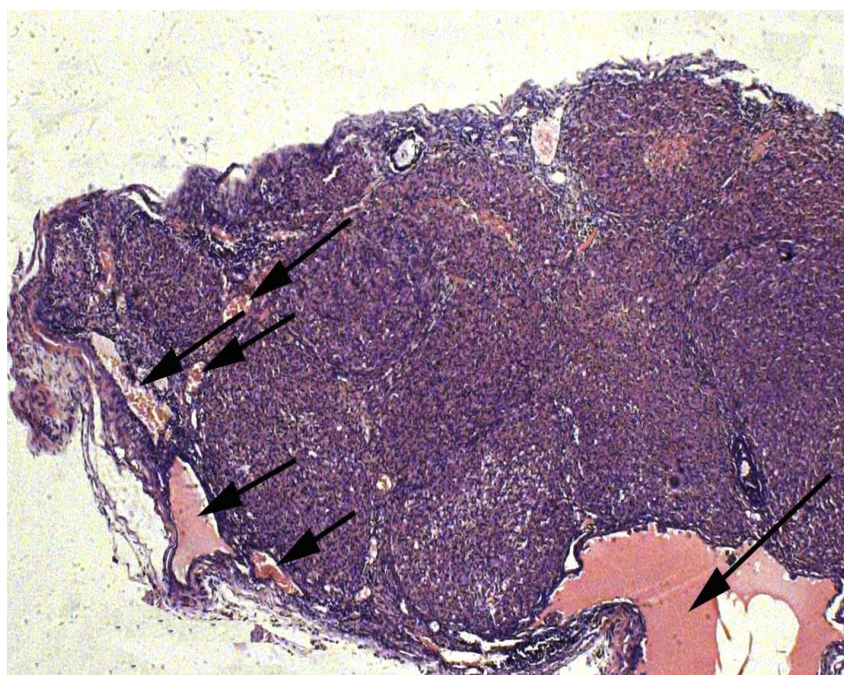


Рис. 3.67. Сингенный трансплантат СВФ овариальной ткани на 30-е сутки после трансплантации. Стрелками отмечены кровеносные сосуды. Окраска гематоксилином и эозином. Ок. 10, об. 5.

Качественно иная картина наблюдается в образцах аллогraftов (рис. 3.68). Структуры, характерные для овариальной ткани, в трансплантатах на 30-е сутки отсутствуют. В основном ткань представлена обширными участками

грубой фиброзной ткани. Наблюдается лейкоцитарная инфильтрация, особенно выраженная на границе трансплантата и почки.

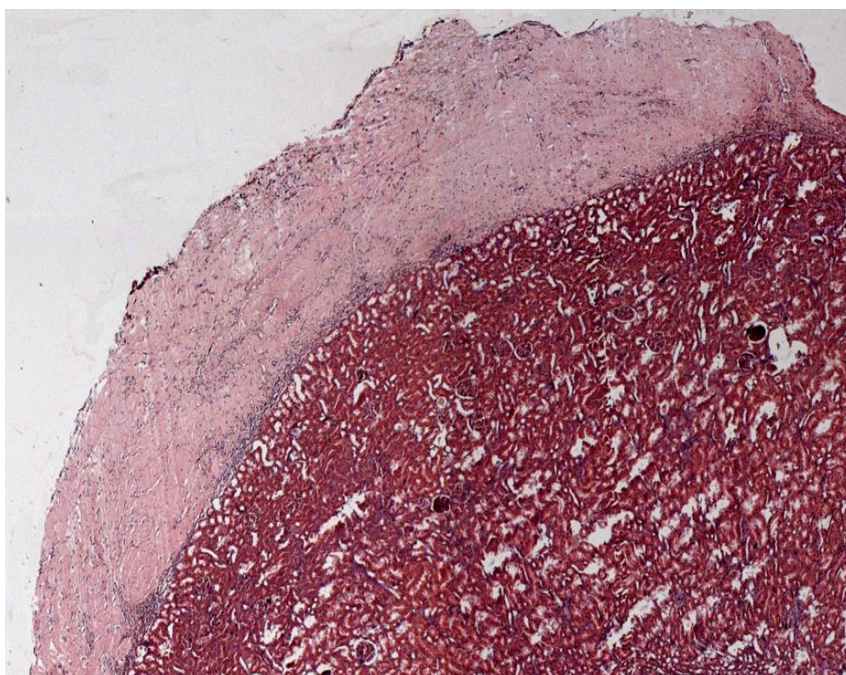


Рис. 3.68. Аллогенный трансплантат СВФ овариальной ткани на 30-е сутки после трансплантации. Окраска гематоксилином и эозином. Ок. 10, об. 5.

При аллотрансплантации овариальной ткани с ДСТф спленоцитов морфологическая картина отличалась от аллогraftов без ДСТф. При макроскопическом исследовании трансплантатов было установлено, что они в несколько раз превышают изначальный объем пересаженного биоматериала. При микроскопическом исследовании выявлено присутствие хорошо сформированной васкуляризированной ткани характерного для яичников строения (рис. 3.69). Активного формирования фиброзной ткани и присутствия лейкоцитарного инфильтрата не выявлено. В ткани трансплантата отмечены фолликулы различной степени зрелости (примордиальные, преантральные и антральные), а также желтые тела (рис. 3.70, 3.71). Встречаются антральные фолликулы с яйцеклеткой на стадии формирования граафового пузырька.

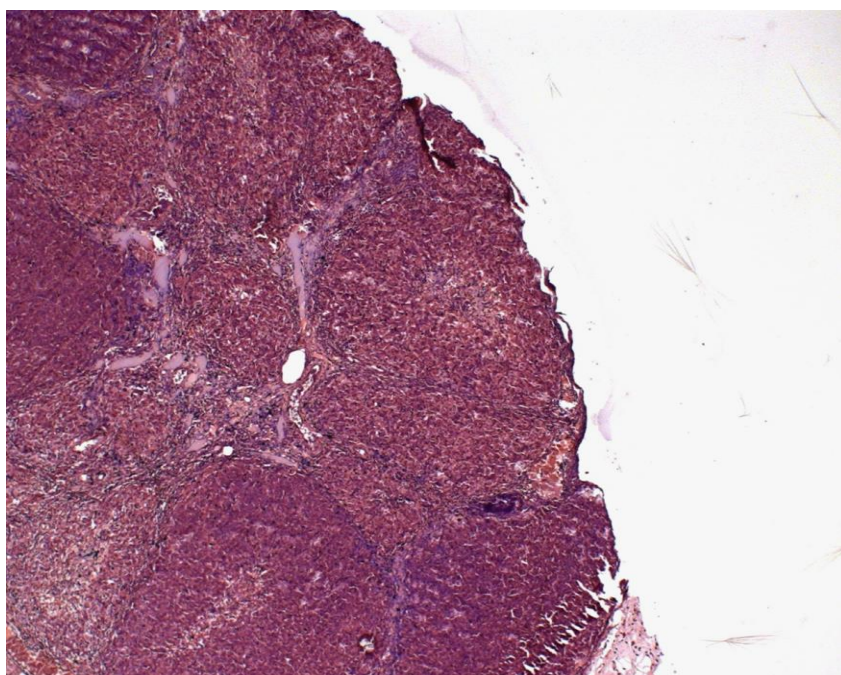


Рис. 3.69. Аллогенный трансплантат СВФ овариальной ткани с ДСТф спленоцитов донорской линии на 30-е сутки после трансплантации. Окраска гематоксилином и эозином. Ок. 10, об. 5.

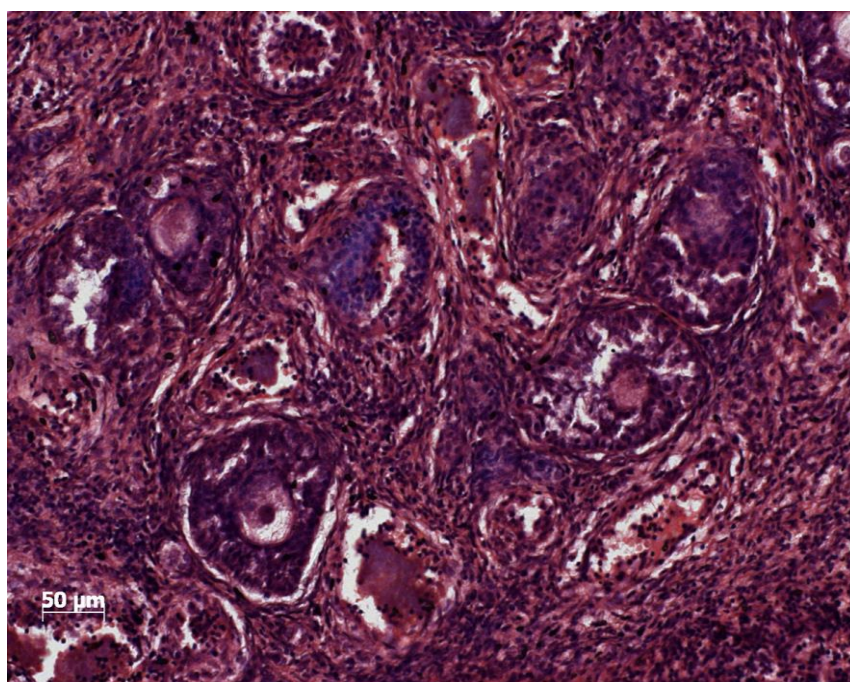


Рис. 3.70. Фолликулы различной степени зрелости в аллогенном трансплантате СВФ овариальной ткани с ДСТф спленоцитов донорской линии на 30-е сутки после трансплантации. Окраска гематоксилином и эозином. Ок. 10, об. 40.

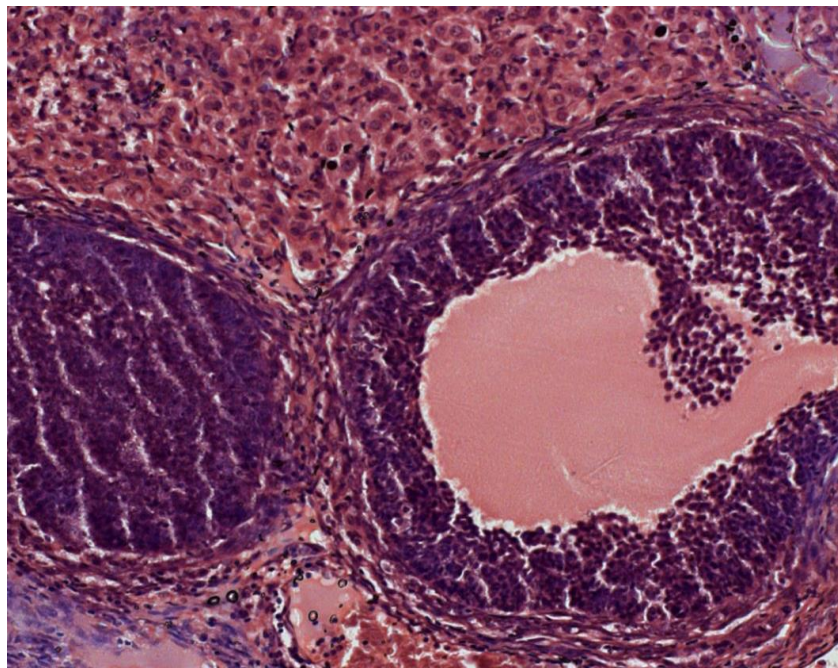


Рис. 3.71. Антральный фолликул с яйцеклеткой на стадии формирования граафического пузырька в аллогенном трансплантате СВФ овариальной ткани с ДСТф спленоцитов донорской линии на 30-е сутки после трансплантации. Окраска гематоксилином и эозином. Ок. 10, об. 40.

Таким образом, полученные данные свидетельствовали, что при аллотрансплантации овариальной ткани без применения иммуносупрессии развивался иммунный ответ, который приводил к деструкции пересаженной ткани на 30 сутки после трансплантации. Предтрансплантационное введение донорских спленоцитов в портальную вену позволило добиться того, что на 30 сутки аллогraft овариальной ткани сохранял способность к выработке половых гормонов и морфологическую структуру, подобную нативной.

Предполагается, что механизм толеризации организма реципиента после интрапортальной ДСТф связан с особенностями процесса презентации антигена в печени, в частности макрофагами печени – клетками Купфера [341]. При введении хлорида гадолиния, химического агента, который избирательно ингибирует функцию макрофагов, индукции толерантности к аллогraftу не наблюдается [142, 238, 324].

В связи с этим, для доказательства того, что в условиях нашего эксперимента действительно реализуется механизм индукции толерантности к трансплантату посредством представления антигенов в печени, одной из групп реципиентов за день до ДСТф вводили раствор $GdCl_3$.

В результате эксперимента было обнаружено, что уровень эстрадиола и прогестерона в крови у животных с обработкой $GdCl_3$ составил $0,07 \pm 0,02$ и $26,9 \pm 12,2$ нмоль/л, соответственно. Данные показатели уровня гормонов были на 53% для эстрадиола и 56% для прогестерона ниже, чем при трансплантации с ДСТф и без введения $GdCl_3$. Гистологический анализ показал, что в ткани аллогraftов реципиентов, обработанных $GdCl_3$ перед ДСТф, не сохраняются структуры, характерные для овариальной ткани, ткань трансплантата была полностью замещена соединительной тканью. Отмечалась диффузная лейкоцитарная инфильтрация. В целом наблюдалась картина, сходная с той, что присутствовала в аллогraftах без ДСТф.

Таким образом, введение хлорида гадолиния отменяло эффект индукции ДСТ, что подтверждало факт иммуномодуляции иммунной системы реципиента путем интрапортального введения спленоцитов донорской линии.

3.4.2. Влияние донор-специфической трансфузии спленоцитов на выживаемость трансплантатов ткани семенников

Исследование было проведено на 5-6 месячных мышах самцах линий C57/Bl и СВН. Мыши линии C57/Bl являлись реципиентами, мыши линии СВН и крысы линии Август – донорами. Недостаточность половых гормонов моделировали посредством двусторонней орхиэктомии. Трансплантацию фрагментов ткани семенников (ФТС) проводили под капсулу левой почки непосредственно после орхиэктомии. ДСТ моделировали так же, как описано для эксперимента по трансплантации овариальной ткани.

На 30 сутки после орхиэктомии у мышей наблюдался уровень тестостерона $6,7 \pm 5,3$ нмоль/л (рис. 3.72), что составляло 9% от уровня интактного контроля ($74,3 \pm 6,3$ нмоль/л).

Сингенная трансплантация ФТС характеризовалась наибольшим повышением уровня тестостерона ($27,1 \pm 7,6$ нмоль/л), который составлял 36% от контрольных значений.

При трансплантации аллогенных ФТС установлены значения уровня тестостерона $9,1 \pm 4,8$ нмоль/л, что составило 12% от контроля. В случае трансплантации биоматериала с предтрансплантационной ДСТф спленоцитов наблюдалось увеличение уровня гормона до $18,6 \pm 5,0$ нмоль/л (25% от контроля), что достоверно в 2 раза выше, чем в образцах аллогraftов без индукции ДСТ.

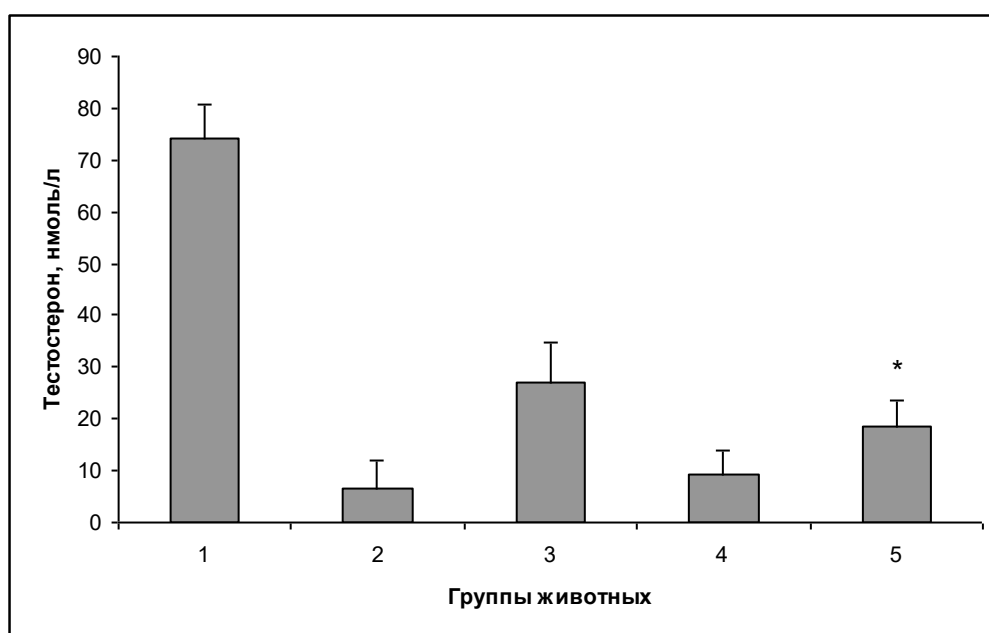


Рис. 3.72. Уровень тестостерона в сыворотке крови мышей: 1 – интактных, 2 – орхиэктомированных; 3 – с трансплантацией сингенных ФТС; 4 – с трансплантацией аллогенных ФТС; 5 – с трансплантацией аллогенных ФТС и ДСТр. * - различия достоверны по сравнению с соответствующей группой без ДСТр ($P < 0.05$)

При гистологическом исследовании сингенных трансплантатов ФТС, полученных на 30 сутки после операции наблюдалось присутствие многочисленных канальцевых структур с разреженной выстилкой из клеток Сертоли (рис. 3.73). В некоторых канальцах отмечалось присутствие сперматогенного эпителия, часто десквамированного в полость канальцев.

Сперматогенеза не обнаруживалось. В межканальцевом пространстве определялись значительные зоны рыхлой соединительной ткани, содержащей клетки Лейдига со сферическими или овальными базофильными ядрами и обширной вакуолизированной эозинофильной цитоплазмой.

В образцах аллогенных трансплантатов ФТС наблюдались редкие канальце-подобные структуры, окруженные инфильтрирующими клетками и фиброзной тканью (рис. 3.74). Спермо-эпителиальный пласт клеток не определялся. Полость канальцев часто заполнена лимфоидными клетками, гистиоцитами и массами распада.

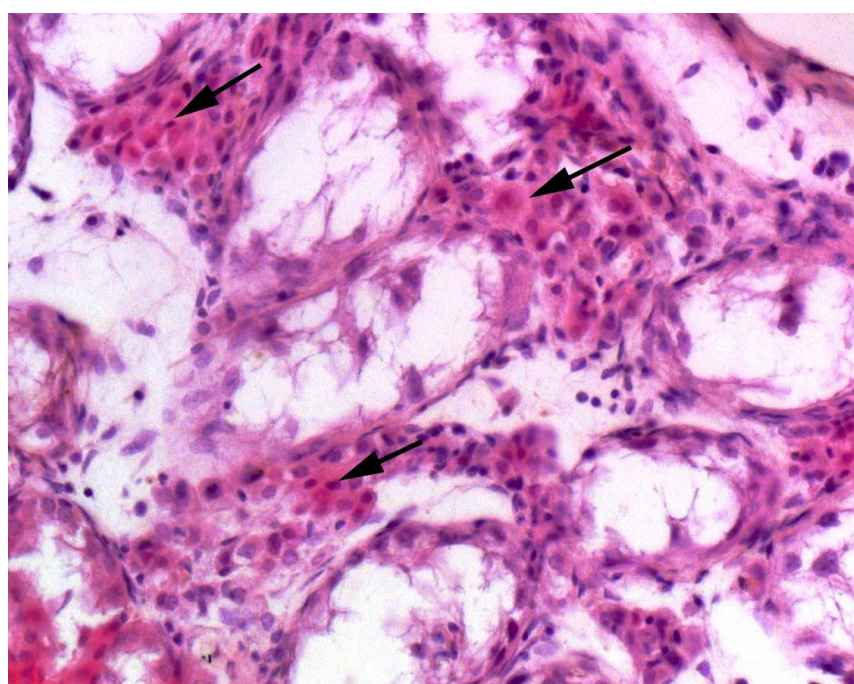


Рис. 3.73. Сингенный трансплантат ФТС на 30-е сутки после трансплантации. Стрелками обозначены скопления клеток Лейдига. Окраска гематоксилином и эозином. Ок. 10, об. 40.

В трансплантатах аллогенных ФТС с ДСТф, в отличие от предыдущих, определялись канальцевые структуры, что свидетельствовало о лучшей выживаемости (рис. 3.75). В канальцах сохранялась выстилка клеток Сертоли и в некоторых наблюдалось присутствие сперматогоний. Сперматогенез отсутствует. Интерстициальная ткань визуальнo занимает меньшую площадь трансплантата, чем в образцах сингенных трансплантатов.

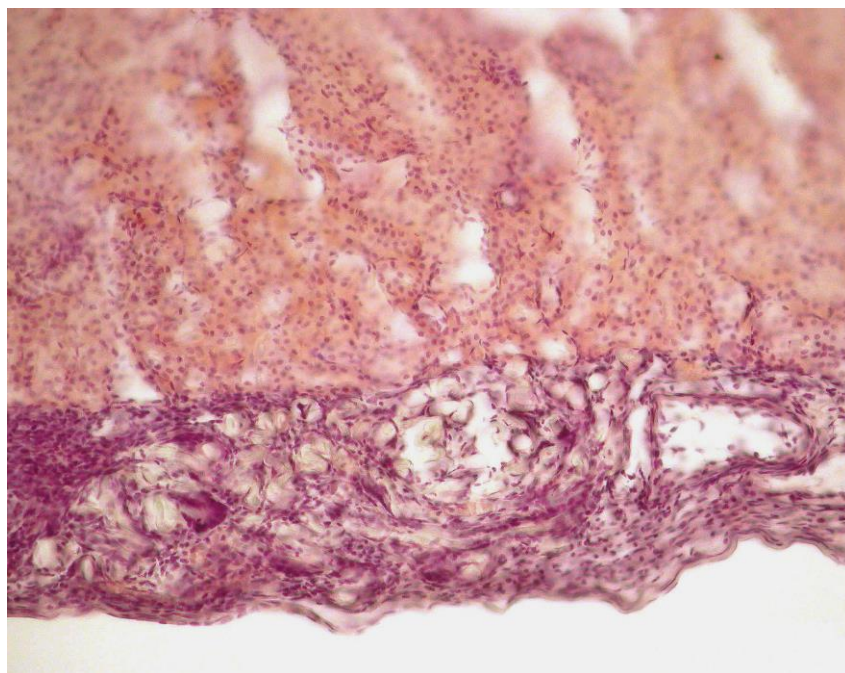


Рис. 3.74. Аллогенный трансплантат ФТС на 30-е сутки после трансплантации. Окраска гематоксилином и эозином. Ок. 10, об. 10.

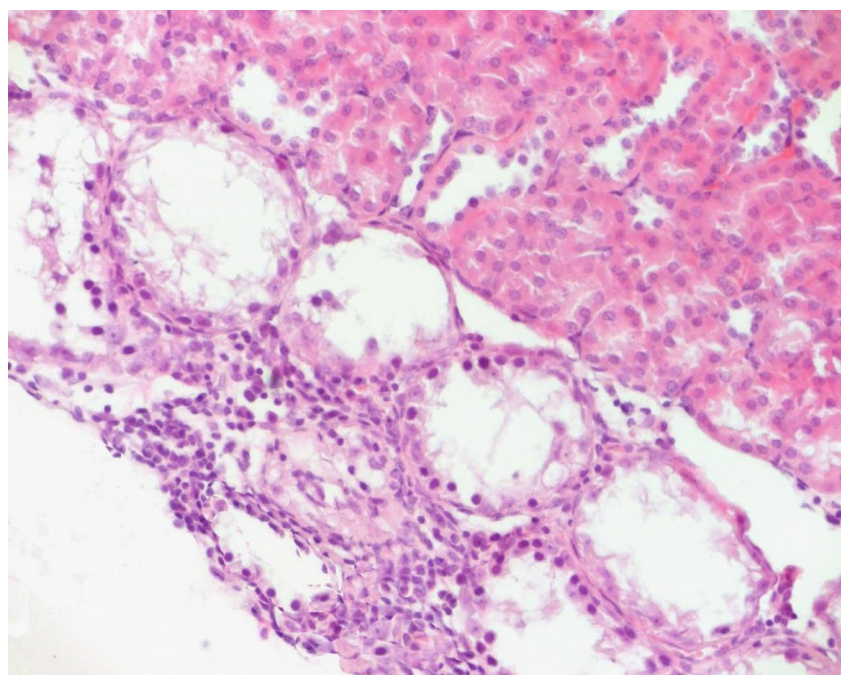


Рис. 3.75. Аллогенный трансплантат ФТС с ДСТр на 30-е сутки после трансплантации. Окраска гематоксилином и эозином. Ок. 10, об. 40.

Таким образом, результаты измерения тестостерона и гистологический анализ аллогraftов ФТС показал улучшение их выживаемости после ДСТф на 30 сутки после трансплантации. Отсутствие сперматогенеза как в сингенных, так и в аллогенных трансплантатах, связано, вероятно, с гетеротопической трансплантацией под капсулу почки. В этом случае температура внутрибрюшинного пространства может быть негативным фактором, ингибирующим созревание сперматозоидов [37].

Определение таких показателей, как количество перитонеальных макрофагов и розеткообразующих клеток, находит широкое применение при диагностике аутоиммунных заболеваний, инфекционных патологий и в том числе при тестировании посттрансплантационного состояния реципиентов [125, 413]. Особое значение приобретают эти тесты при изучении развития реакций трансплантационного иммунитета в условиях предварительного введения донорских клеток. Известно, что в основе реакции розеткообразования лежит реакция адгезии эритроцитов барана с CD-2 рецепторами Т-лимфоцитов. Повышение плотности экспрессии CD-2 рецепторов выражается в увеличении количества розеток с большим количеством эритроцитов - "морул".

На рисунке 3.76 представлены данные спонтанного розеткообразования у животных с аллотрансплантатами ФТС. Тест розеткообразования показал увеличение количества Е-роzetкообразующих клеток (Е-РОК) у животных с аллогraftами по сравнению с интактным контролем или сингенными graftами. Такое повышение показателя Т-клеточного звена трансплантационного иммунитета свидетельствовало об активации процесса отторжения аллогенной ткани. Интересно, что ДСТф не приводила к увеличению количества Е-РОК. Это может быть следствием того, что ДСТф сдвигает баланс Th1/Th2 в сторону активации клеток Th2-типа [178], что рассматривается как ключевой фактор поддержания толерантности к трансплантату [331, 436].

Адгезирующая способность макрофагов коррелирует с экспрессией на их поверхности антигена Mac-1 [343]. Перитонеальный смыв, полученный от

интактных животных, содержит небольшое количество резидентных макрофагов, тогда как при воспалении в брюшной полости количество их резко возрастает. В представленном эксперименте трансплантацию осуществляли под капсулу почки, поэтому при активации процесса отторжения можно было предполагать увеличение количества перитонеальных макрофагов (ПМ).

Проведенное исследование позволило выявить достоверное повышение количества ПМ у животных с аллотрансплантатами без ДСТф, тогда как у реципиентов с индукцией ДСТ процент ПМ не отличался от интактного контроля (рис. 3.76).

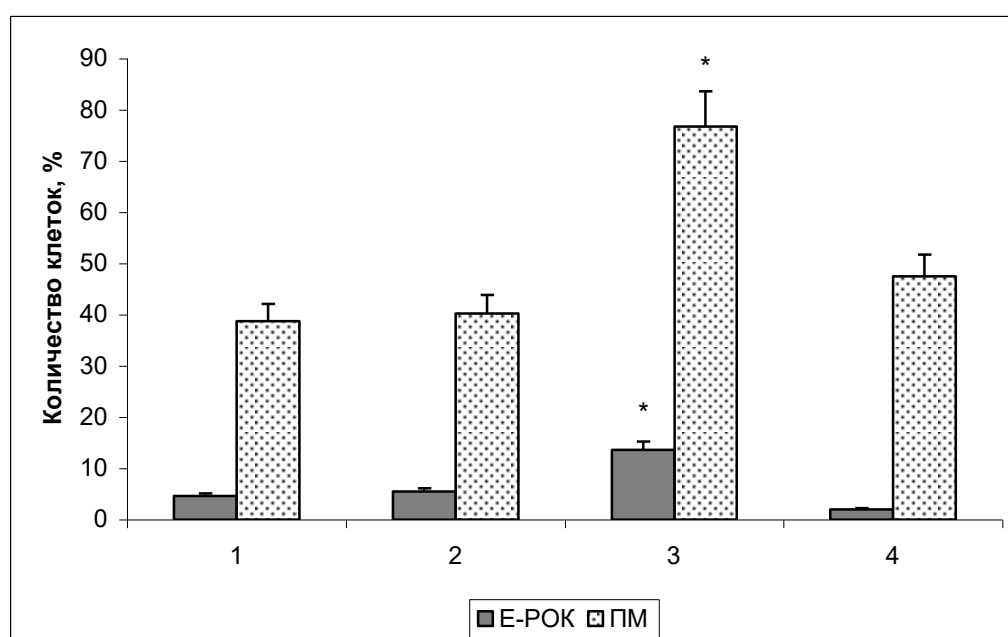


Рис. 3.76. Количество Э-РОК и ПМ у животных: 1 – интактный контроль; 2 – сингенная трансплантация; 3 – аллотрансплантация ФТС; 4 – аллотрансплантация ФТС и ДСТф.

* - различия достоверны по сравнению с интактным контролем ($P < 0,05$).

Известно, что индукция толерантности к трансплантату развивается с большей вероятностью при ДСТф в портальную вену, чем при введении в общий кровоток [332]. Однако при таком способе введения клеток необходимо контролировать сохранность функции печени, так как могут наблюдаться сопутствующие осложнения в виде тромбоза, печеночной гипертензии и, как следствие, обширного повреждения клеток [97].

Нами было проведено изучение влияния интрапортальной трансфузии спленоцитов на состояние печени у животных-реципиентов. Группой сравнения в качестве отрицательного контроля была использована группа животных, которым сделали однократную инъекцию CCl_4 в тот же день, когда остальным производили введение спленоцитов.

Определение активности трансаминаз АЛТ и АСТ в сыворотке крови широко используется для выявления патологии печени [27]. В норме содержание АЛТ в крови невелико, тогда как при поражении гепатоцитов оно возрастает в несколько раз. Нами был исследован уровень АЛТ у реципиентов ФТС на 35 сутки после интрапортальной трансфузии спленоцитов (рис. 3.77). Из данных, представленных на рисунке видно, что достоверных отличий уровня АЛТ в сыворотке крови и гомогенате печени между интактным контролем и группами животных с трансплантациями, в том числе и с предтрансплантационной ДСТф спленоцитов, не наблюдается.

Наибольшие отличия характерны для группы животных с CCl_4 -индуцированным поражением печени. Уменьшение активности АЛТ в гомогенате печени связано с повреждением гепатоцитов, выходом ферментов в кровь, а на поздних стадиях развития процесса – с перерождением ткани печени [39]. Отсутствие достоверных различий уровня АЛТ в сыворотке крови животных этой группы связано, вероятно, с тем, что на достаточно длительных сроках после однократной инъекции CCl_4 наблюдается адаптивное восстановление баланса метаболитов белкового обмена.

Хотя АСТ преобладает в миокарде, тяжелое поражение печени также может характеризоваться повышением уровня этого фермента [19]. В связи с этим нами был исследован коэффициент де Ритиса (КдР), представляющий собой отношение АСТ/АЛТ. Нужно отметить, что достоверных отличий этого показателя между интактным контролем и другими экспериментальными группами на исследуемом сроке после и/п трансфузии спленоцитов не наблюдается.

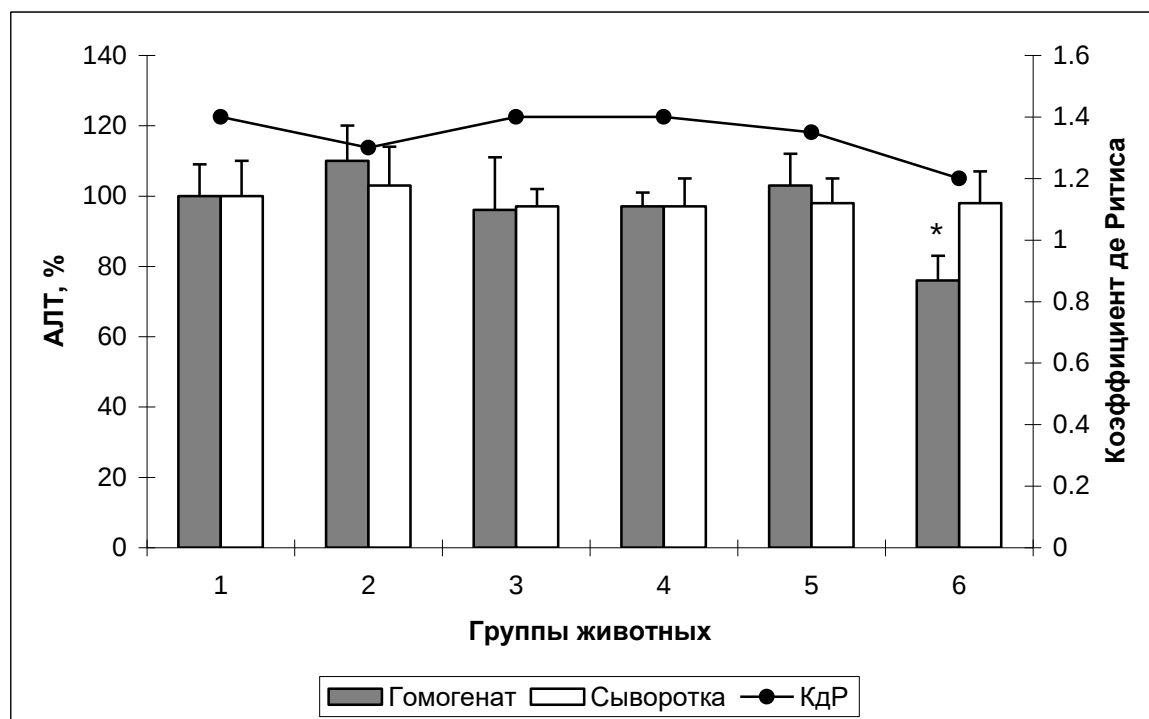


Рис. 3.77. Коэффициент де Ритиса в сыворотке крови и уровень активности АЛТ в сыворотке крови и гомогенате печени мышей: 1 – intactных, 2 – орхиэктомированных; 3 – с трансплантацией сингенных ФТС; 4 – с трансплантацией аллогенных ФТС; 5 – с трансплантацией аллогенных ФТС и ДСТр; 6 – с CCl₄-индуцированным поражением печени.

* - различия достоверны по сравнению с intactным контролем ($P < 0.05$)

В целом, результаты изучения активности аминотрансфераз свидетельствуют об отсутствии метаболических нарушений в печени у реципиентов на 35 сутки после интрапортальной трансфузии спленоцитов.

Таким образом, проведенные эксперименты показали, что предварительная трансфузия спленоцитов донорского происхождения улучшает выживаемость аллогraftов семенников, при этом негативного влияния интрапортальной трансфузии на целостность клеток печени на исследуемом сроке не обнаружено.

3.4.3. Влияние донор-специфической трансфузии спленоцитов на выживаемость трансплантатов ткани надпочечников

Фрагменты НЖ трансплантировали по капсулу почки сингенным и аллогенным крысам непосредственно после адреналэктомии. Донорами являлись крысы Вистар, реципиентами – крысы линии Август. ДСТф спленоцитов производили, как описано выше.

Выживаемость животных после адреналэктомии и трансплантации, как было показано ранее, является чувствительным показателем гормональной функции трансплантата [387, 438]. В течение первых 8-10 суток после адреналэктомии без трансплантации наблюдается тотальная гибель крыс (рис. 3.78). При сингенной трансплантации оперированные животные продолжают жить весь период наблюдения.

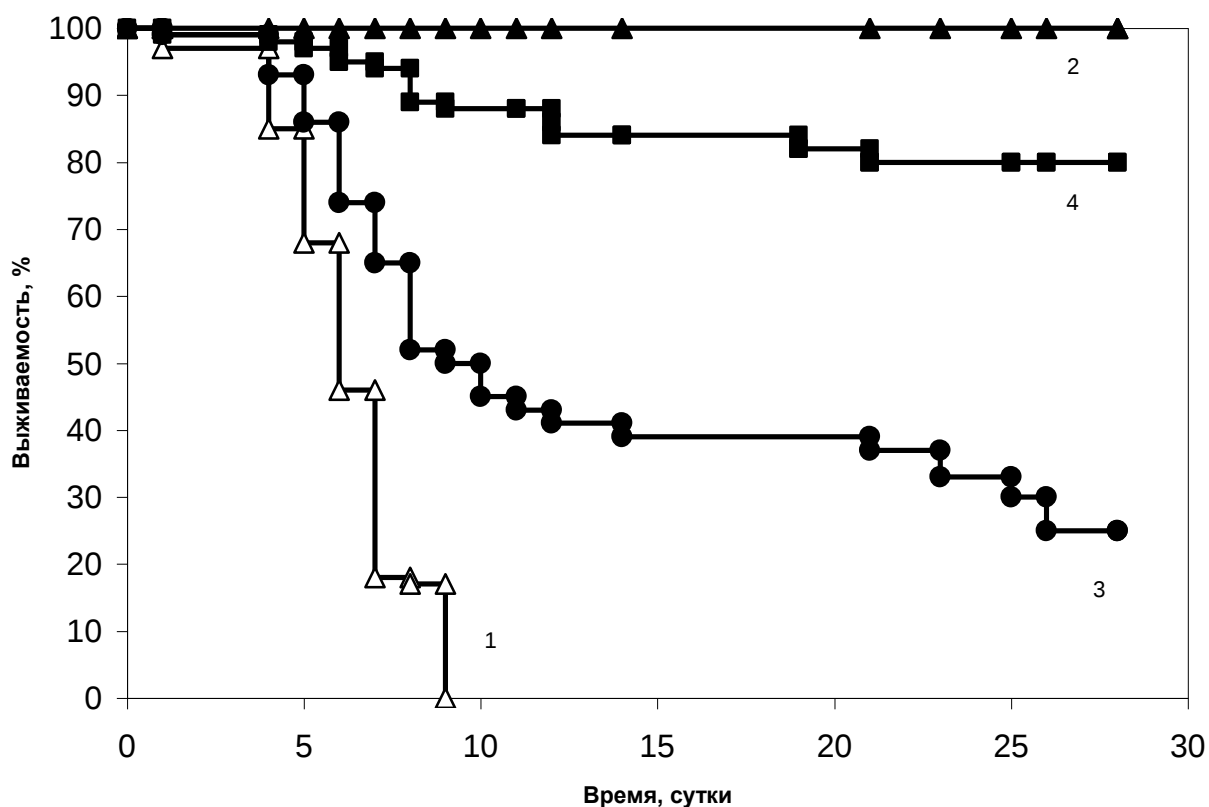


Рис. 3.78. Выживаемость крыс после двусторонней адреналэктомии и трансплантации фрагментов НЖ: 1 – адреналэктомия; 2 – сингенная трансплантация; 3 – аллотрансплантация; 4 – аллотрансплантация с ДСТф.

При аллогенной трансплантации к 28 суткам выживаемость крыс составляла в среднем 25% животных, тогда как при аллогенной трансплантации с ДСТф – 80%. Гистологический анализ сингенных трансплантатов надпочечников показал наличие ткани надпочечников, представленной клубочковой и пучковой зонами коры (рис. 3.79). Определяется значительное количество оптически пустых вакуолей, что свидетельствует об умеренной липидизации ткани. В трансплантате присутствуют клетки с темными и мелкими ядрами, и клетки с крупными светлыми ядрами и вспененной цитоплазмой. Лейкоцитарного инфильтрата и фиброзной ткани не обнаруживается. В аллогенных трансплантатах на 28 сутки определяются остатки ткани, определяемые как клетки коры надпочечников (рис. 3.80). В центре фрагментов наблюдаются некротические участки. Основная часть аллогraftа представлена распространенным фиброзом с очагами лейкоцитарной инфильтрации.

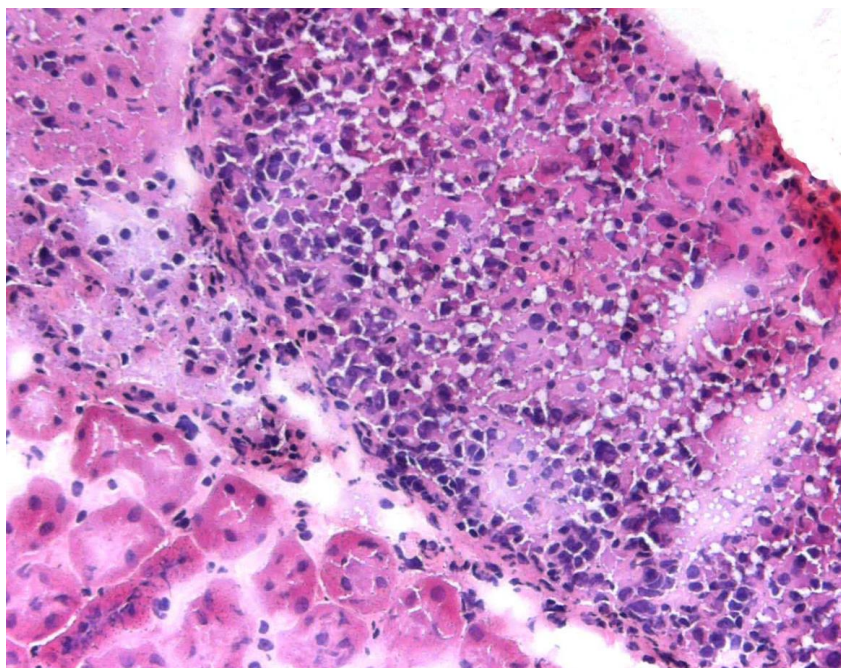


Рис. 3.79. Сингенный трансплантат ткани надпочечников на 28-е сутки после трансплантации. Окраска гематоксилином и эозином. Ок. 10, об. 20.

При исследовании аллогraftов НЖ с ДСТф наблюдается гистологическая картина, сходная с той, что характерна для сингенных трансплантатов (рис. 3.81).

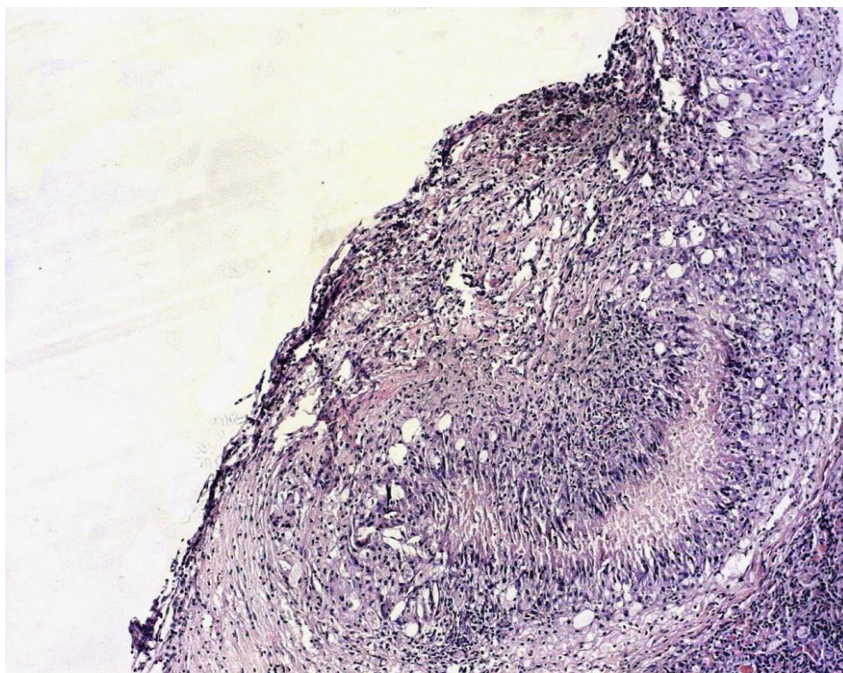


Рис. 3.80. Аллогенный трансплантат ткани надпочечников на 28-е сутки после трансплантации. Окраска гематоксилином и эозином. Ок. 10, об. 20.

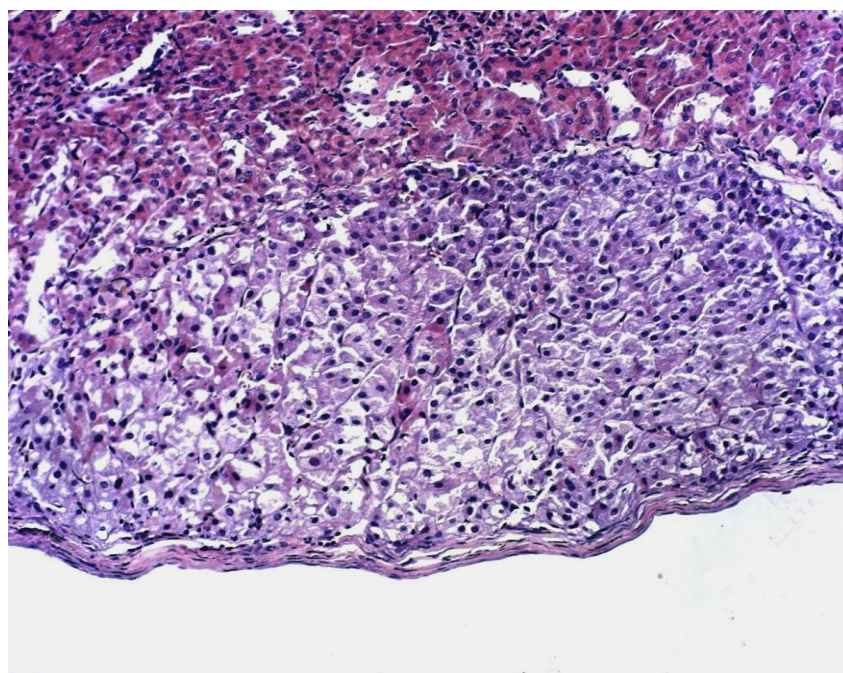


Рис. 3.81. Аллогенный трансплантат ткани надпочечников с ДСТф на 28-е сутки после трансплантации. Окраска гематоксилином и эозином. Ок. 10, об. 20.

Трансплантат представлен кортикальной тканью надпочечников, в основном пучковой зоны. Наблюдаются клетки с крупными светлыми ядрами и с оптически пустыми вакуолями. Липидизация умеренная. Лейкоцитарного инфильтрата и соединительной ткани не обнаруживается. Присутствует хорошо развитая капиллярная сеть и небольшие кровеносные сосуды.

Таким образом, структурно-функциональная сохранность аллогraftов надпочечников после ДСТф была значительно выше, чем при аллотрансплантации без таковой.

3.4.4. Влияние донор-специфической трансфузии спленоцитов на выживаемость трансплантатов ткани щитовидной железы

Исследования проводили на 3-4 месячных крысах Вистар и Август. Реципиентами служили крысы линии Август. Тиреоидэктомию выполняли за 7 суток до трансплантации ткани ЩЖ. ДСТф спленоцитов производили, как описано выше.

Установлено, что на 14 сутки после тиреоидэктомии крыс в сыворотке крови наблюдалось уменьшение уровня общего Т4 в среднем до $27,2 \pm 3,5$ нмоль/л (рис. 3.82) по сравнению с интактным контролем ($73,9 \pm 6,5$ нмоль/л). У животных, которым после тиреоидэктомии на 7 сутки была выполнена сингенная трансплантация ткани ЩЖ, на 14 сутки наблюдалось достоверное повышение уровня Т4 до $57,7 \pm 7,7$ нмоль/л. В последующий период наблюдения уровень Т4 достоверно не изменялся и составлял в среднем 68,3% от интактного контроля.

После аллотрансплантации фрагментов ткани ЩЖ на 14 сутки уровень Т4 составлял $34,1 \pm 6,8$ нмоль/л. К 35 суткам наблюдения достоверной разницы уровня гормона между тиреоидэктомизированными животными и животными с аллотрансплантацией не наблюдалось ($21,5 \pm 4,9$ нмоль/л против $29,8 \pm 6,2$ нмоль/л).

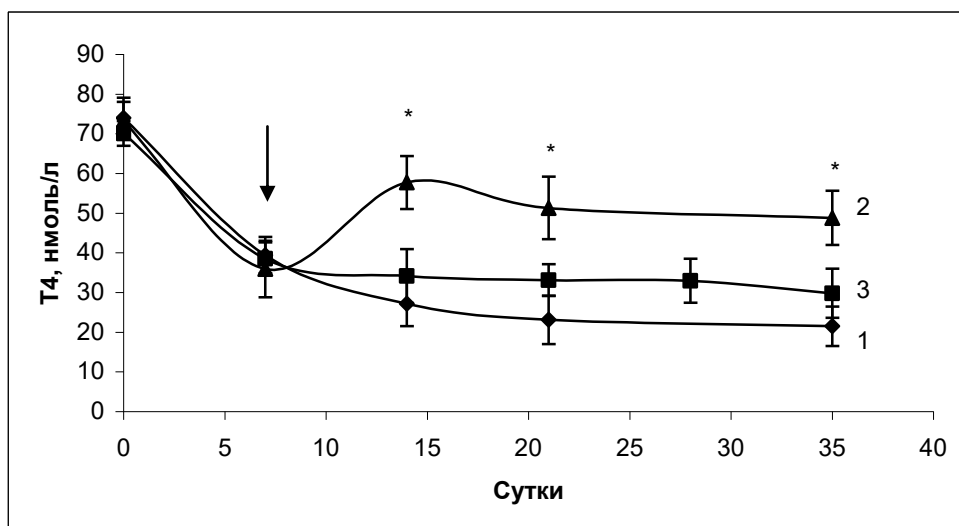


Рис. 3.82. Изменение концентрации Т4 в сыворотке крови животных: 1 – после тиреоидэктомии; 2 – после тиреоидэктомии и сингенной трансплантации ткани ЩЖ; 3 – после тиреоидэктомии и аллогенной трансплантации ткани ЩЖ. Стрелкой указаны сутки, на которые животным была выполнена трансплантация.

* - различия достоверны по сравнению с тиреоидэктомией без трансплантации ($P < 0,05$).

В группе животных с ДСТф спленоцитов наблюдался значительный разброс уровня общего Т4 (рис. 3.83). Приблизительно у половины животных этой группы на 35 сутки в сыворотке крови наблюдался пониженный уровень Т4, находившийся в пределах от 21,9 до 30,4 нмоль/л, что составляло 29-41% от среднего значения гормона в группе интактного контроля. У остальных экспериментальных животных этой группы уровень Т4 находился в пределах 52,5-64,1 нмоль/л, что составляло 71-86% от контрольных значений. В последующий период наблюдения (до 54 суток) уровень гормона несколько снижался у животных всей группы.

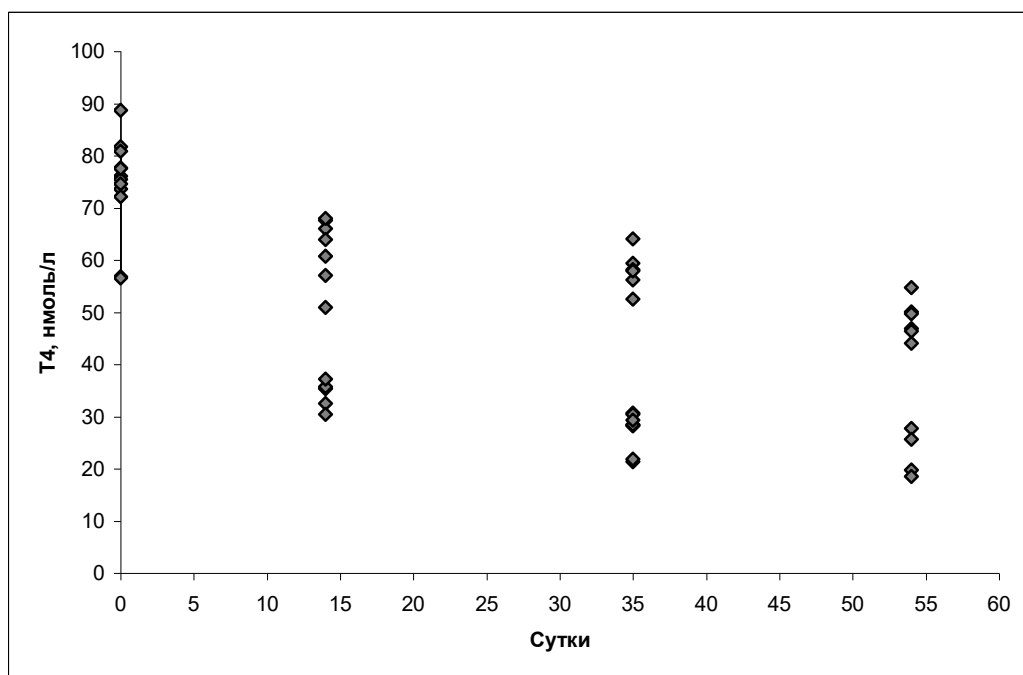


Рис. 3.83. Изменение концентрации Т4 в сыворотке крови животных после тиреоидэктомии и трансплантации ткани ЩЖ с ДСТф. Представлены данные уровня гормона для каждого животного из группы.

Гистологический анализ выявил хорошую сохранность паренхимы ЩЖ в сингенных трансплантатах на 35 сутки (рис. 3.84). В поле зрения всего фрагмента наблюдается упорядоченная фолликулярная структура трансплантата. В паренхиме сингенных графтов наблюдается преобладание микрофолликулярного строения. Фолликулы выстланы высоким кубическим эпителием, заполнены розовым коллоидом. В субкапсулярной зоне трансплантата отмечается присутствие крупных фолликулов с уплощенным эпителием. Степень вакуолизации фолликулов умеренная или слабая. Присутствия инфильтрата не обнаружено.

При микроскопическом исследовании образцов аллогraftов ткани щитовидной железы на 35 сутки были обнаружены явные признаки отторжения (рис. 3.85). Установлено нарушение характерной фолликулярной структуры ткани щитовидной железы. Остатки одиночных фолликулов окружены инфильтриру-

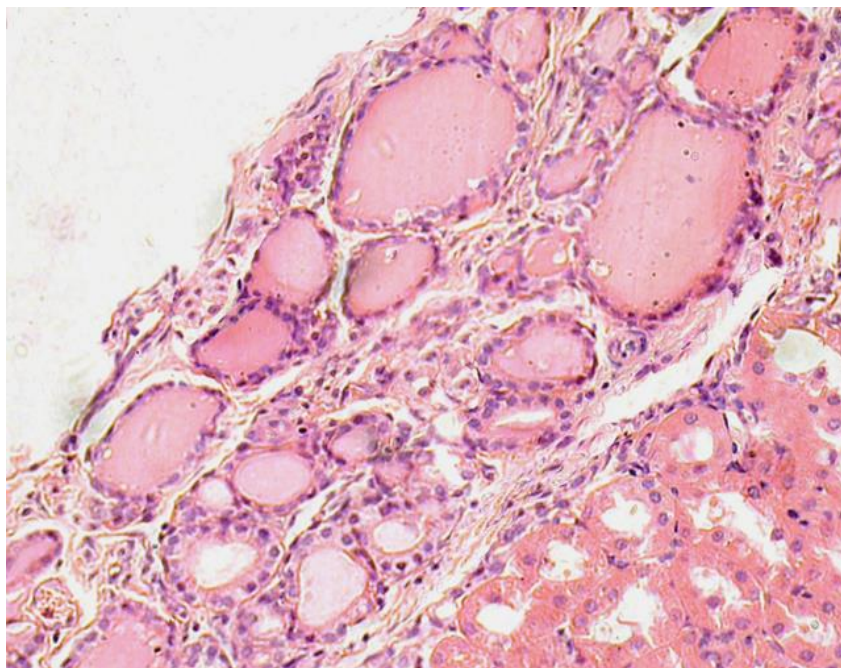


Рис. 3.84. Сингенный трансплантат ткани ЩЖ на 35-е сутки после трансплантации. Окраска гематоксилином и эозином. Ок. 10, об. 20.

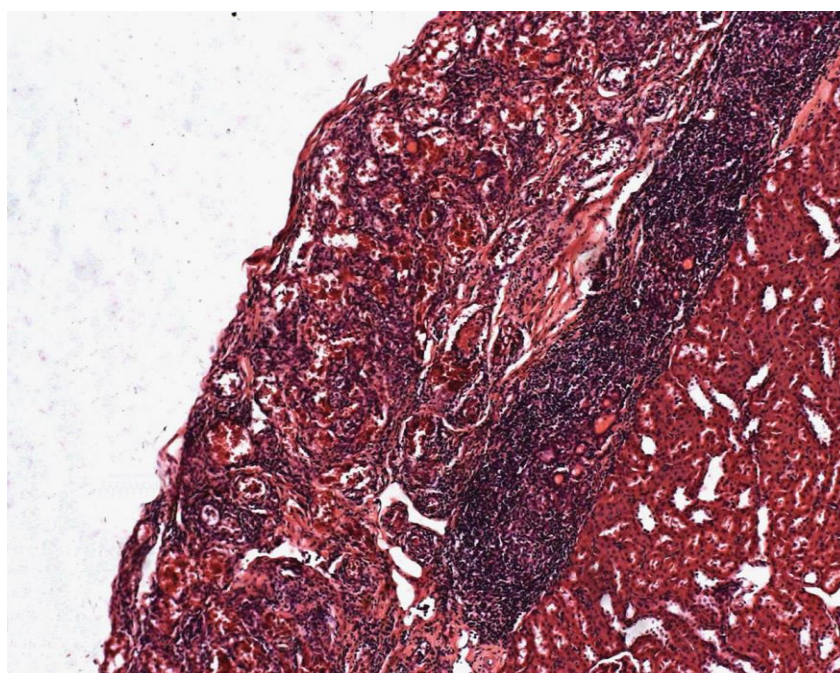


Рис. 3.85. Аллогенный трансплантат ткани ЩЖ на 35-е сутки после трансплантации. Окраска гематоксилином и эозином. Ок. 10, об. 10.

ющими клетками. Лейкоцитарный инфильтрат особенно выражен в паранефральной зоне, наблюдаются очаги формирующейся фиброзной ткани.

Среди образцов трансплантатов животных в аллографтах и ДСТф наблюдались ярко выраженные морфологические отличия. У животных с уровнем Т4 ниже 50% от интактного контроля наблюдались явные признаки отторжения трансплантата (рис. 3.86). Гистологическая картина этих образцов характеризовалась полным отсутствием фолликулов. В основном ткань трансплантата представлена фиброзной тканью, которая к исследуемому сроку замещает трансплантированную ткань. Отмечаются незначительные очаги диффузной лейкоцитарной инфильтрации. Судя по гистологической картине, в этих аллографтах наблюдается акселерация процесса отторжения по сравнению с трансплантатами без ДСТф.

У животных с аллографтами и ДСТф, показавших уровень Т4 выше 50% от интактного контроля, наблюдалась хорошо сохранившаяся ткань щитовидной железы, содержащая фолликулы, выстланные высоким кубическим эпителием (рис. 3.87). Хорошо различались фолликулы, заполненные ярко-розовым коллоидом с вакуолями резорбции. В ткани аллографта наблюдались мелкие сосуды. Присутствия инфильтрата и очагов фиброза не обнаружено.

Суммарный количественный анализ морфометрических показателей выживаемости ткани использованных в эксперименте эндокринных желез после ДСТф представлен в таблице 3.9. Из данных заметно, что основной особенностью аллографтов использованных желез с ДСТф является значительная площадь ткани, сохраняющая нативную структуру S2 (от 50,1 до 82,9%). Кроме того, площадь ткани с лейкоцитарной инфильтрацией S3 в этих аллографтах незначительна (от 0,7 до 5,5%).

Высокая сохранность ткани эндокринных желез после трансплантации без значительной инфильтрации свидетельствует о снижении реактивности иммунной системы реципиента и индукции состояния толерантности к антигенам донора.

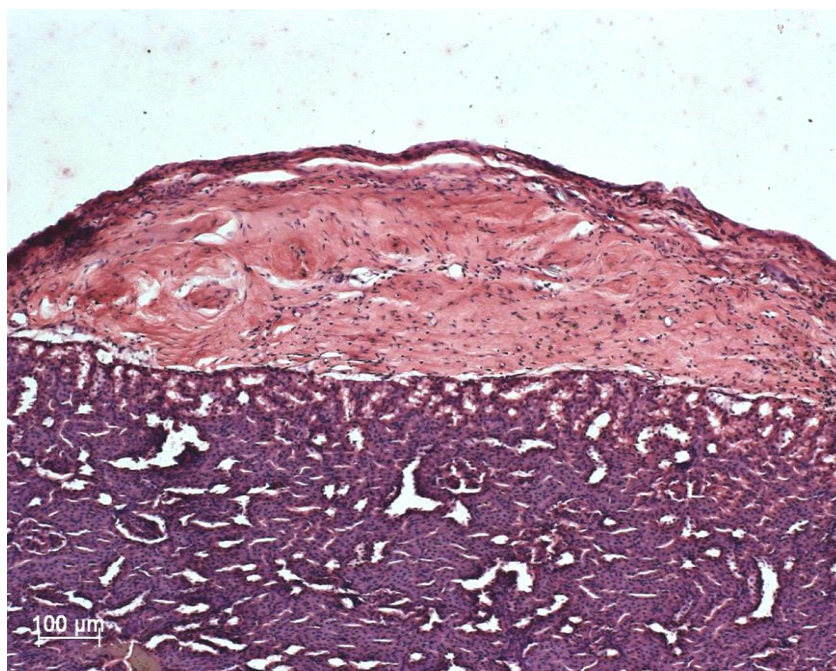


Рис. 3.86. Аллогенный трансплантат ткани ЩЖ с ДСТф на 35-е сутки после трансплантации. У животных наблюдался уровень Т4 ниже 50% от контроля. Окраска гематоксилином и эозином. Ок. 10, об. 10.

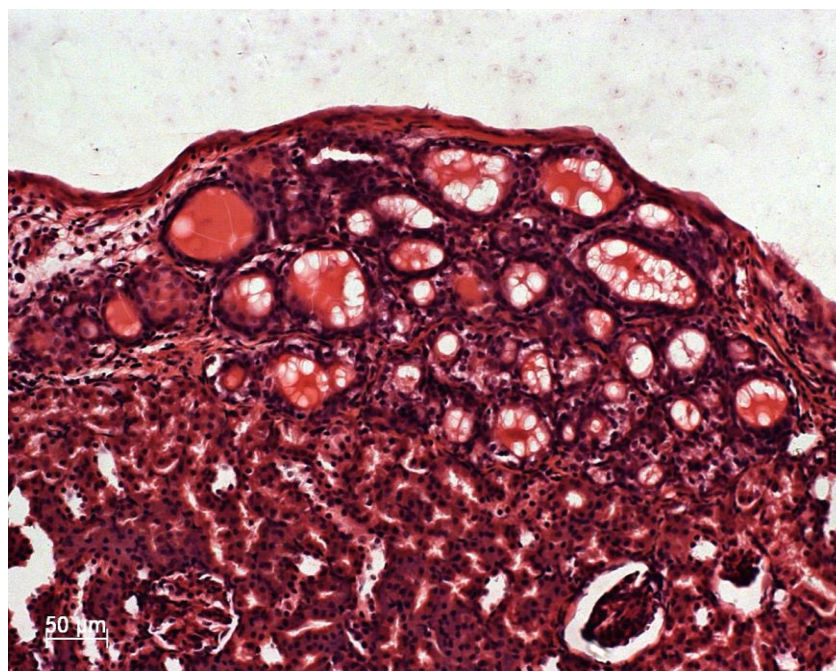


Рис. 3.87. Аллогенный трансплантат ткани ЩЖ с ДСТф на 35-е сутки после трансплантации. У животных наблюдался уровень Т4 выше 50% от контроля. Окраска гематоксилином и эозином. Ок. 10, об. 20.

Наличие некоторого количества соединительной ткани S3 в аллографте (от 16,4 до 44,4%), связано, вероятно, с потерей ткани вследствие ишемического повреждения в течение первых дней после гетеротопической трансплантации, пока ткань еще не имеет сосудистой поддержки.

Таблица 3.9.

Морфометрические индексы выживаемости трансплантатов фрагментов эндокринных желез после ДСТф на 30 сутки.

Вид ткани	Аллотрансплантация+ДСТф		
	S1	S2	S3
Яичник	16,4±9,9	82,9±6,1	0,7±0,9
Семенник	17,4±7,5	81,4±8,3	1,2±0,7
НЖ	20,5±10,2	78,4±4,9	1,1±2,1
ЩЖ	44,4±5,9	50,1±26,3	5,5±3,3

Примечание: S1 – площадь соединительной ткани; S2 – площадь ткани с неповрежденной структурой; S3 – площадь ткани с лейкоцитарной инфильтрацией.

При анализе на 30 сутки установлено достоверное увеличение выживаемости аллогraftов у реципиентов, которым была сделана ДСТф спленоцитов донорской линии, по сравнению с аллогraftами без ДСТф (рис. 3.88). Морфометрический индекс S2 увеличивался в 92 раза для ткани яичников; в 7,5 раз для ткани НЖ; в 3,3 раза для ткани семенников; в 9,1 раз для ткани ЩЖ.

Известно, что наступление состояния толерантности к трансплантату зависит от места введения (периферические сосуды или портальная вена) донорских клеток [332], периода времени от введения клеток до трансплантации [374], повторности предтрансплантационных обработок [376], дозы вводимого антигена [141]. Нами была установлена хорошая выживаемость ткани яичников, НЖ и семенников при индукции ДСТ. То, что в таких же

условиях эффект выживаемости ткани ЩЖ половозрелых животных был достигнут не в 100% случаев после трансплантации, возможно, говорит о влиянии на этот процесс вида пересаживаемой ткани.

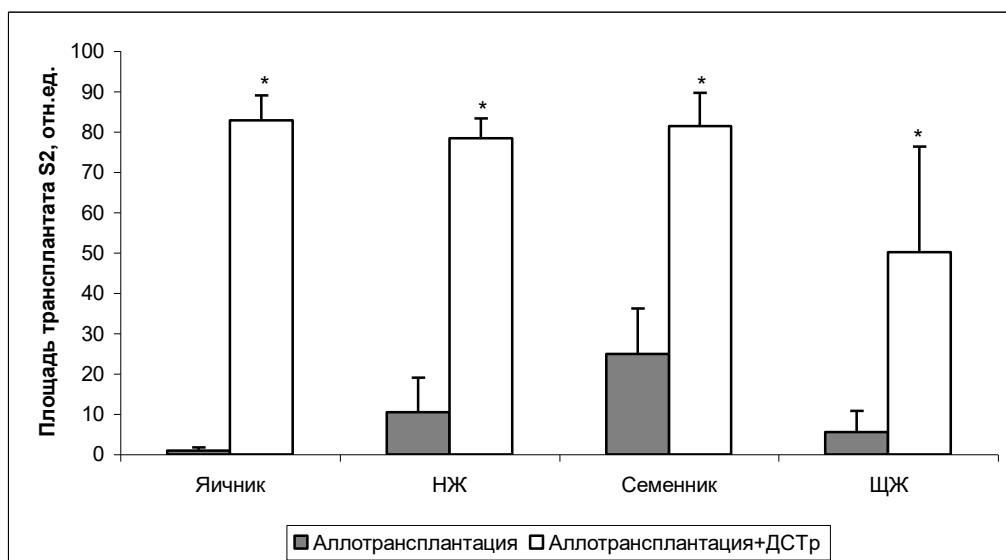


Рис. 3.88. Морфометрический показатель выживаемости ткани эндокринных желез после аллотрансплантации и ДСТф на 30 сутки. * – отличия достоверны по сравнению с аллотрансплантацией без ДСТф, $P < 0,05$.

Тот факт, что состояние специфической ареактивности иммунной системы реципиента к трансплантату наблюдался не у всех животных, ставило вопрос о необходимости дальнейшего изучения механизмов донор-специфической толерантности и выяснения ключевых факторов, ответственных за развитие иммунного ответа в сторону принятия или отторжения трансплантата.

Выводы по разделу:

Таким образом, на основе анализа результатов, представленных в данном разделе, можно сделать следующие выводы:

1. Индукция донор-специфической толерантности путем трансфузии спленоцитов донорского происхождения в портальную вену реципиентов за 7 суток до аллотрансплантации обеспечивает высокую структурно-функциональную сохранность эндокринных тканей.
2. Выживаемость аллогraftов свежесывделенной ткани эндокринных желез при индукции донор-специфической толерантности равняется в среднем для ткани щитовидной железы 50%; ткани семенников 81,4%; ткани надпочечников 78,4%, ткани яичников 82,9%.
3. Индукция донор-специфической толерантности наблюдается не у всех реципиентов. Наименьший показатель структурно-функциональной сохранности аллогraftов (около 50%) был показан при трансплантации ткани ЩЖ.

Результаты, изложенные в данной главе, опубликованы в следующих работах:

1. Божок Г.А. Предтрансплантационное введение донорских лимфоцитов пролонгирует выживаемость аллогенной ткани яичников у овариэктомированных животных реципиентов / Г.А. Божок, В.В. Киروشка, Ю.О. Тищенко, Е.И. Легач // Проблеми ендокринної патології. – 2009. – №4. – С.79-84.
2. Божок Г.А. Влияние интрапортального введения донорских спленоцитов и хлорида гадолиния на выживаемость тканевых аллогraftов эндокринных желез / Г.А. Божок, В.В. Киروشка, Ю.О. Тищенко, Ю.В. Люпина, Я.Д. Карпова, Е.И. Легач // Медицина сьогодні і завтра. – 2011. – №1-2 (50-51). – С. 13-16.
3. Божок Г.А. Влияние предтрансплантационной интрапортальной инфузии спленоцитов на выживаемость тестикулярных трансплантатов и состояние печени у орхиэктомированных мишей / Г.А. Божок // Вісник ХНУ ім. В.Н. Каразіна. Серія: Біологія. – 2011. – Вип. 14. – № 971. – С. 139-145.

4. Божок Г.А. Влияние введения донорских спленоцитов на выживаемость фрагментов ткани щитовидной железы при аллотрансплантации / Г.А. Божок // Проблемы эндокринной патологии . – 2011. – №1. – С. 60-66.
5. Божок Г.А. Влияние интрапортальной донор-специфической трансфузии спленоцитов на выживаемость аллотрансплантатов эндокринных тканей в отсутствии протоколов иммуносупрессии / Г.А. Божок, Е.И. Легач, В.Д. Устиченко, С.Н. Федосова, Т.П. Бондаренко // Вестник неотложной и восстановительной медицины. – 2012. – Т.13, №1. – С. 37-40.
6. Божок Г.А. Вплив донор-специфічної імунізації на виживання трансплантата тканини яєчка / Божок Г.А., Є.І. Легач, Т.П. Бондаренко // Клінічна хірургія. – 2006. – № 4-5. – С. 85-86.
7. Киروشка В.В. Трансплантация овариальной ткани как метод коррекции гипофункции яичников / В.В. Киروشка, Ю.О. Тищенко, Г.А. Божок // Материалы Всероссийской конференции с международным участием «Инновационные технологии в трансплантации органов, тканей и клеток». – Самара, 2008. – С. 52-54.
8. Божок Г.А. Влияние предтрансплантационного введения донорских спленоцитов на выживаемость аллогенной ткани щитовидной железы / Г.А. Божок, Е.И. Легач, Н.Ф. Губина, Ю.В. Люпина, Я.Д. Карпова, Н.П. Шарова, Т.П. Бондаренко // Материалы V Всероссийского съезда трансплантологов. – Москва, 2010. – С. 234.

3.5. Влияние криоконсервирования спленоцитов, предназначенных для донор-специфической трансфузии, на выживаемость аллогraftов эндокринных желез

В предыдущем разделе было установлено несомненное преимущество выживания аллогraftов у реципиентов, которым была сделана предтрансплантационная трансфузия спленоцитов донорской линии. Актуальным при таком подходе к иммуномодуляции выживаемости алогraftов является изучение возможности использования в качестве индуцирующего агента не только нативные, но и криоконсервированные спленоциты. В этом случае криоконсервирование донорского биоматериала позволит выполнять трансплантацию не в экстренном режиме, а планировать сроки операции в зависимости от состояния реципиента. Целью данного этапа работы было изучение влияния интрапортального введения криоконсервированных спленоцитов на выживаемость аллотрансплантатов ткани эндокринных желез.

Исследования проводили на 3-4-месячных крысах Вистар и Август. Спленоциты криоконсервировали как описано в разделе «Материалы и методы». Жизнеспособность спленоцитов, определяемая по окрашиванию трипановым синим, составляла в среднем 90% для нативной и 85% для криоконсервированной суспензий.

Эксперименты были проведены на моделях тиреоидэктомии, адреналэктомии и трансплантации, соответственно, СВФ ЩЖ и НЖ.

Установлено, что на 35-е сутки у тиреоидэктомированных крыс в сыворотке крови наблюдалось уменьшение уровня Т4 (рис. 3.89). Значения уровня гормона у животных в группе колебались от 15,3 до 26,1 нмоль/л (медиана 19,6 нмоль/л). Это составляло в среднем 27% от уровня гормона интактного контроля ($p < 0,05$), в которой значения Т4 были в пределах от 44,5 до 88,6 нмоль/л (медиана 75,1 нмоль/л).

У животных с тиреоидэктомией и трансплантацией СВФ ЩЖ на 35-е сутки уровень Т4 был в пределах от 23,5 до 48,7 нмоль/л (медиана 32,4 нмоль/л). Это составляло в среднем 46% от уровня Т4 у контрольных животных, $p < 0,05$.

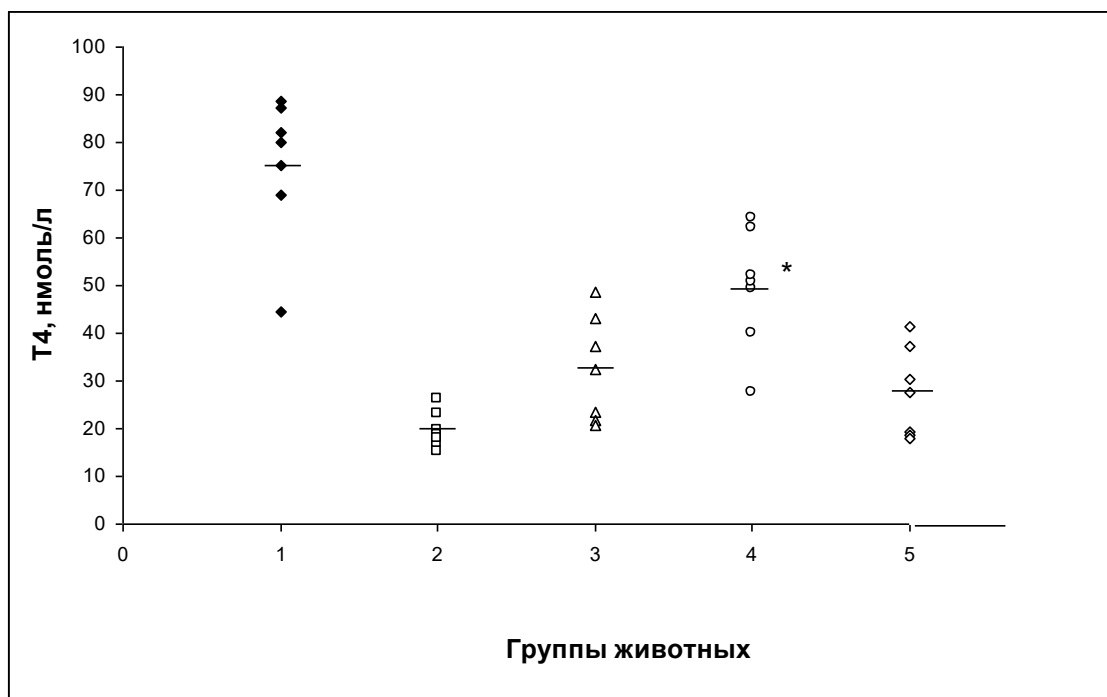


Рис. 3.89. Уровень Т4 в группах животных: 1 – интактный контроль; 2 – тиреоидэктомия; 3 – с аллотрансплантацией СВФ ЩЖ; 4 – с аллотрансплантацией СВФ ЩЖ и ДСТф незамороженных спленоцитов; 5 – с аллотрансплантацией СВФ ЩЖ и ДСТф криоконсервированных спленоцитов. Представлены индивидуальные уровни Т4; линией обозначена медиана уровня гормона. * –отличия достоверны между группами с ДСТр ($p < 0,05$).

В группе животных с трансплантацией СВФ ЩЖ и ДСТф незамороженных спленоцитов наблюдался разброс уровня гормона от 27,7 до 64,1 нмоль/л (медиана 49,4 нмоль/л), что составляло в среднем 66% от значений Т4 у интактного контроля, $p < 0,05$. У животных с трансплантацией СВФ ЩЖ и ДСТф криоконсервированных спленоцитов Т4 находился в пределах от 19,4 до 41,5 нмоль/л (медиана 27,5 нмоль/л), что составляло 41% от контрольных значений.

Таким образом, наибольший уровень Т4 наблюдался в плазме крови крыс, которым за 7 суток до трансплантации были введены нативные спленоциты.

При анализе гистологических образцов почек реципиентов с аллотрансплантацией СВФ ЩЖ, как и в предыдущих подобных экспериментах,

выявлены явные признаки отторжения трансплантата: инфильтрация лимфоцитами, полная деграция фолликулярного строения ткани, замещение ткани трансплантата соединительной тканью.

У животных с аллогraftами ткани ЩЖ с ДСТф нативных спленоцитов, как уже было отмечено ранее, приблизительно в 50% случаев наблюдалась хорошая выживаемость трансплантатов (рис. 3.90). В гистологических образцах данных аллогraftов обнаружена ткань щитовидной железы, содержащая множественные фолликулы, выстланные высоким кубическим эпителием и заполненных ярко-розовым коллоидом средней степени вакуолизации. В трансплантате различается хорошо развитая сосудистая сеть (рис. 3.91).

Гистологический анализ аллогraftов с ДСТф криоконсервированных спленоцитов продемонстрировал отсутствие ткани, определяемой как паренхима щитовидной железы (рис. 3.92). Как и у животных с аллотрансплантацией без ДСТф, в данных образцах наблюдались основные признаки отторжения трансплантата: диффузная лейкоцитарная инфильтрация, особенно выраженная на границе трансплантата и почки и разрастание грубой фиброзной ткани, которая к исследуемому сроку заместила трансплантированную ткань ЩЖ. Таким образом, по уровню Т4 в сыворотке крови и сохранности структуры ткани трансплантата на гистологических образцах хорошая выживаемость аллогraftов ткани ЩЖ была установлена лишь у тех реципиентов, которым были введены перед трансплантацией нативные спленоциты. Криоконсервирование спленоцитов приводило к отмене эффекта пролонгирования выживаемости аллогraftов. Этот результат согласуется с данными работы [212], где авторы также не наблюдали индукции ДСТ после введения криоконсервированных клеток.

Такая же закономерность была установлена и для аллогraftов ткани НЖ. В трансплантатах ткани НЖ с ДСТф нативных спленоцитов наблюдалась хорошая выживаемость аллогraftов, тогда как при трансфузии криоконсервированных спленоцитов сохранившейся ткани НЖ не обнаружено (рис. 3.93 и 3.94).

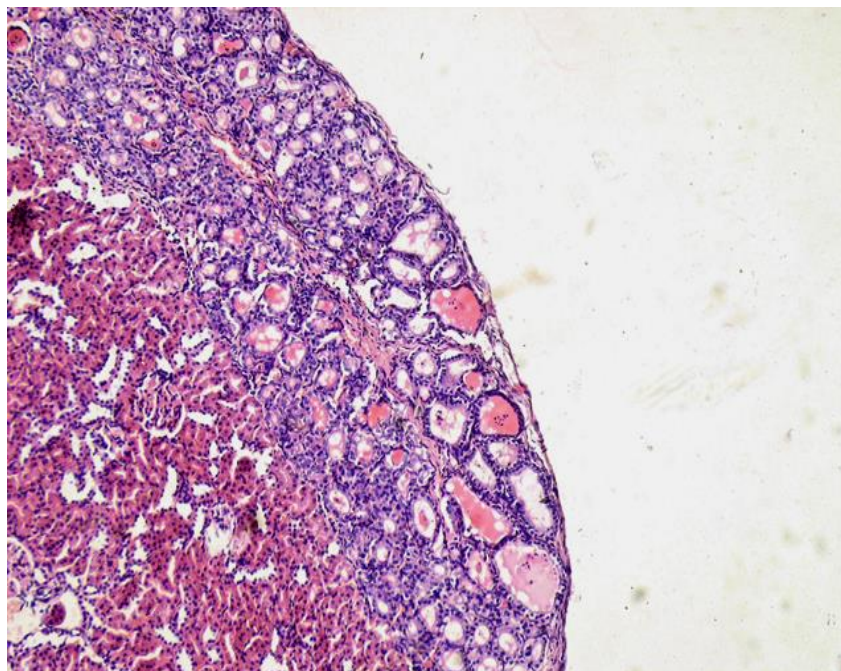


Рис. 3.90. Аллогенный трансплантат ткани ЩЖ с ДСТф нативных спеленоцитов на 35-е сутки после трансплантации. Окраска гематоксилином и эозином. Ок. 10, об. 10.

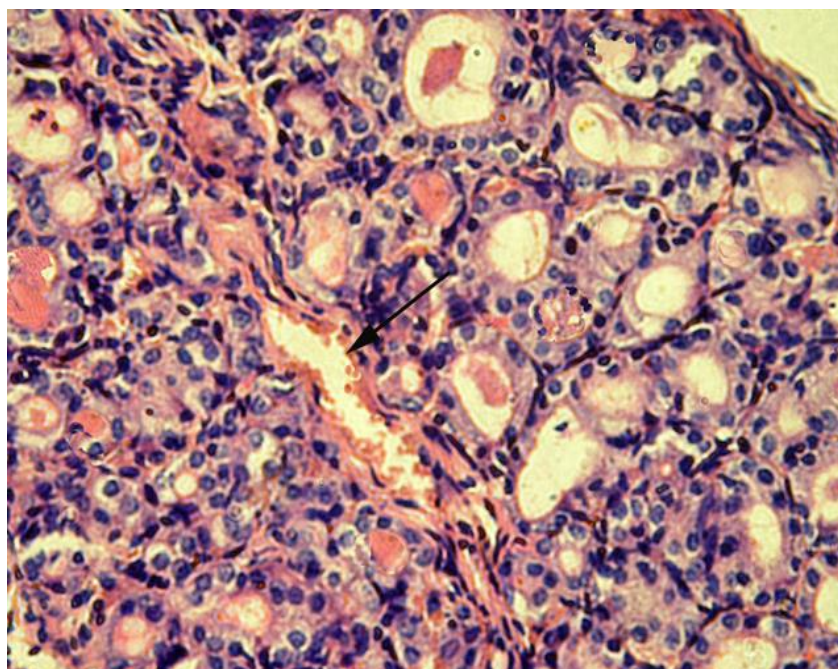


Рис. 3.91. Кровеносный сосуд (стрелка) в аллогенном трансплантате ткани ЩЖ с ДСТф нативных спеленоцитов на 35-е сутки после трансплантации. Окраска гематоксилином и эозином. Ок. 10, об. 40.

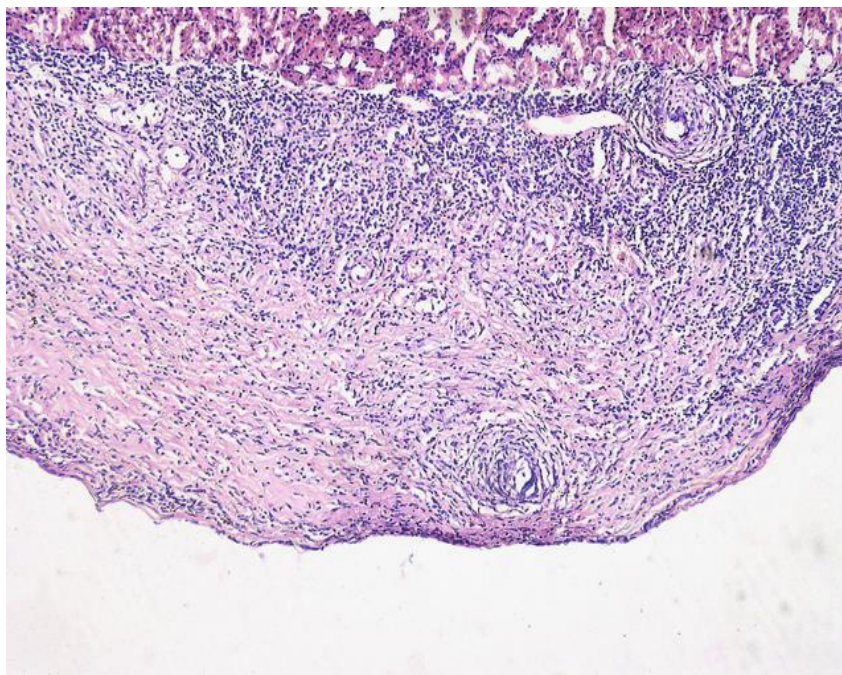


Рис. 3.92. Аллогенный трансплантат ткани ЩЖ с ДСТф криоконсервированных спленоцитов на 35-е сутки после трансплантации. Окраска гематоксилином и эозином. Ок. 10, об. 10.

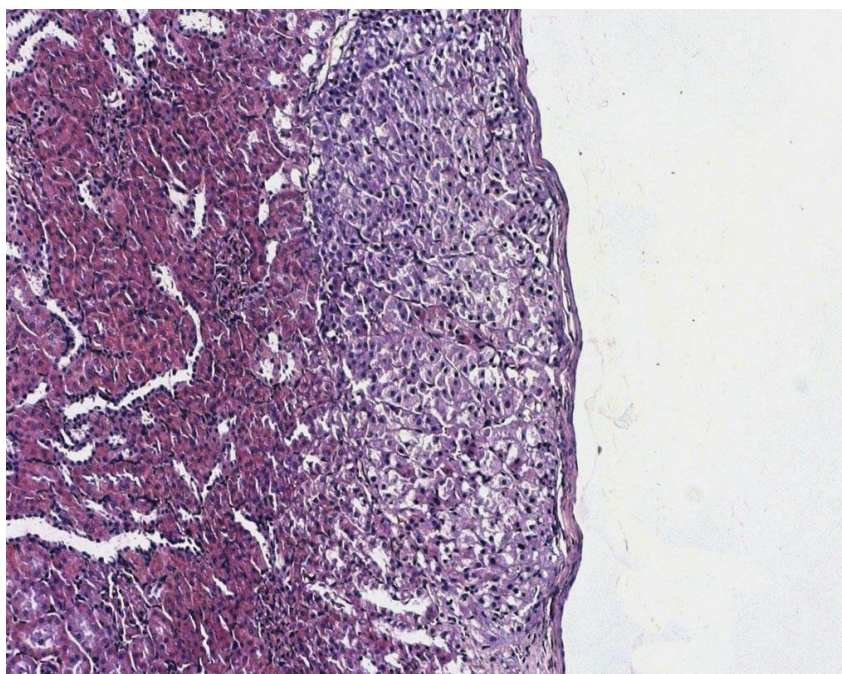


Рис. 3.93. Аллогенный трансплантат ткани НЖ с ДСТф нативных спеленоцитов на 35-е сутки после трансплантации. Окраска гематоксилином и эозином. Ок. 10, об. 10.

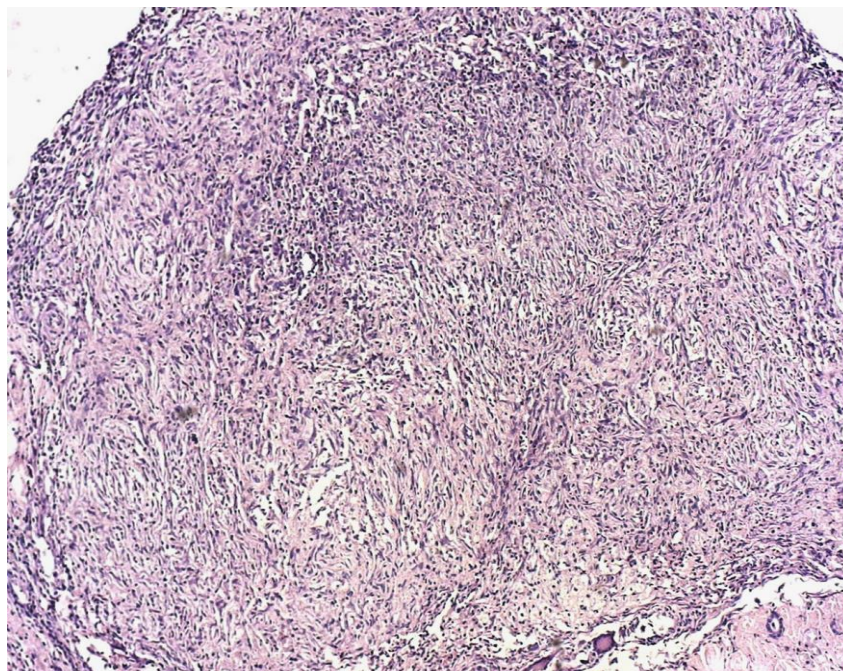


Рис. 3.94. Аллогенный трансплантат ткани НЖ с ДСТф криоконсервированных спленоцитов на 35-е сутки после трансплантации. Окраска гематоксилином и эозином. Ок. 10, об. 10.

Предположительно, причина отмены индукции толерантности к трансплантату после криоконсервирования могла состоять в том, что этот процесс мог изменить субпопуляционный клеточный состав суспензии спленоцитов, предназначенной для донор-специфической трансфузии. Известно, что суспензия клеток, которую получают из селезенки, кроме эритроцитов, содержит В- и Т-лимфоциты, макрофаги, дендритные клетки [36]. Механизм развития и поддержания донор-специфической толерантности в настоящее время недостаточно известен. Возможно, важным для индукции ДСТ является наличие определенной субпопуляции клеток либо иммунологического профиля суспензии в целом.

На следующем этапе работы была проведена оценка влияния криоконсервирования на субпопуляционный состав суспензии спленоцитов. При использовании антител к специфическим рецепторам В- лимфоцитов, CD4⁺ и CD8⁺ Т-лимфоцитов, макрофагов с помощью проточной

цитофлуориметрии был проведен сравнительный анализ нативной и криоконсервированной суспензий клеток.

На гистограммах (рис. 3.95) представлены данные, выражающие степень экспрессии специфических маркеров субпопуляций клеток в нативной и криоконсервированной суспензиях спленоцитов.

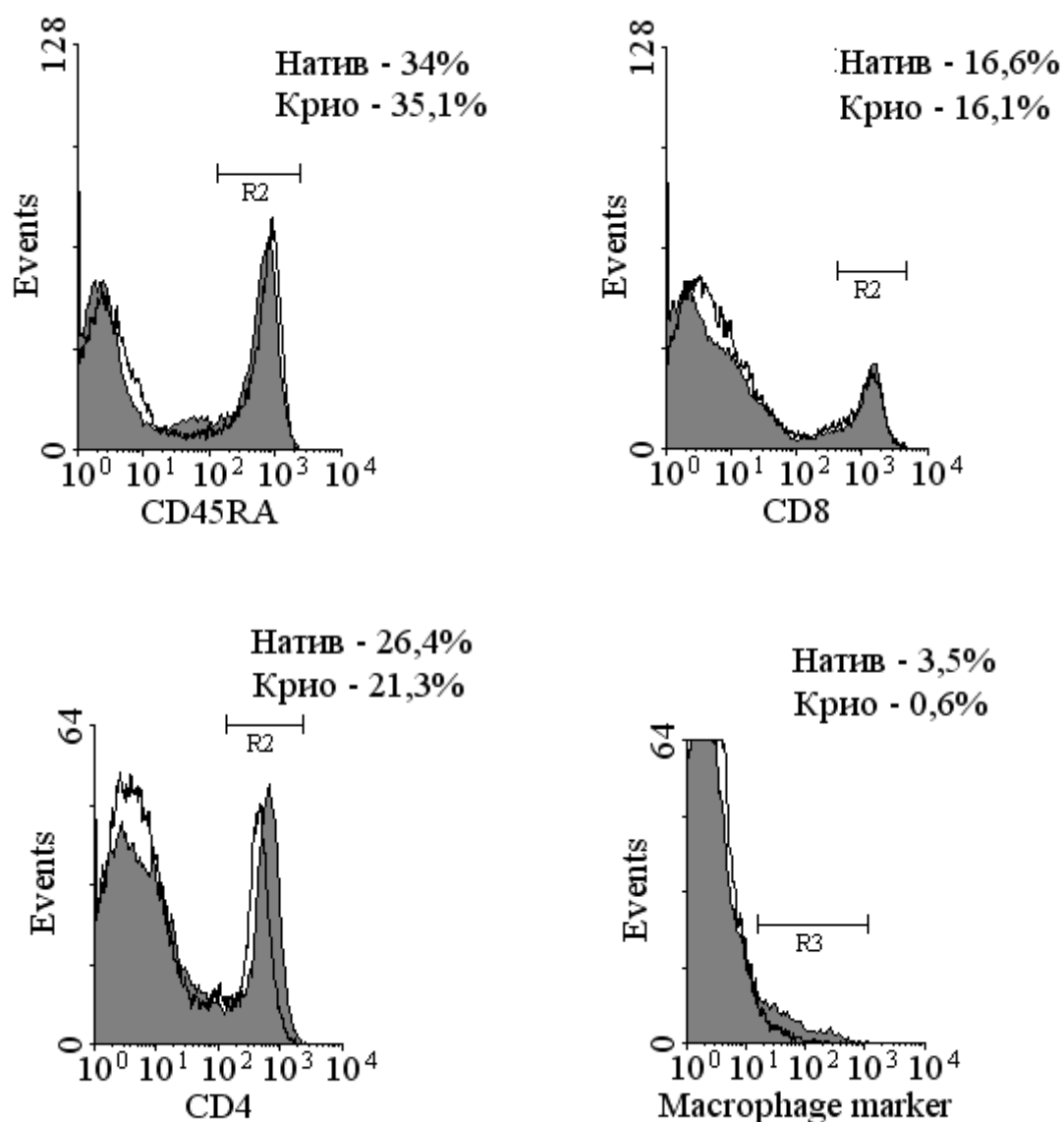


Рис. 3.95. Степень экспрессии специфических маркеров в суспензии клеток, полученной из селезенки. Закрашенные гистограммы – нативные, открытые – криоконсервированные клетки. Цифры на гистограммах обозначают процент клеток, экспрессирующих специфические маркеры, в выделенном регионе.

В нативной суспензии спленоцитов около 34% клеток экспрессируют маркер В-лимфоцитов крыс CD45RA, 16% – маркер цитотоксических Т-лимфоцитов CD8, 26% – маркер Т-хелперов CD4 и 3,5% – макрофагальный маркер. После криоконсервирования наблюдаются некоторые изменения в субпопуляционном составе суспензии спленоцитов. Количество В-лимфоцитов и CD8⁺-Т-лимфоцитов практически не изменяется. Количество CD4⁺-Т-лимфоцитов уменьшается в среднем на 20%, а макрофагов на 83%. Таким образом, основное различие наблюдается в резком уменьшении субпопуляции макрофагов в суспензии спленоцитов после криоконсервирования.

В научной литературе существуют противоположные данные о влиянии замораживания на субпопуляционный состав клеток, получаемых из селезенки. В работах [235, 406, 442] не обнаружены изменения антигенных свойств суспензии спленоцитов после криоконсервирования. В работе [209] установлено, что макрофаги селезенки менее устойчивы к процессу замораживания-оттаивания, чем лимфоциты. По данным [47, 228] после криоконсервирования наблюдается уменьшение сохранности и иммунной реактивности спленоцитов.

Известно, что макрофаги и дендритные клетки имеют высокую чувствительность к скорости охлаждения. Оптимум выживаемости макрофагов и дендритных клеток был установлен в диапазоне скорости охлаждения 0,3-5°C/мин в работах [430, 432]. В наших экспериментах скорость охлаждения составляла 1°C/мин, однако наблюдалось уменьшение количества макрофагов на 82% по сравнению с незамороженной суспензией. Возможно, криочувствительность макрофагов может зависеть от вида ткани, из которой они получены. Как один из возможных механизмов развития ДСТ, обсуждается процесс презентации антигена макрофагами печени – клетками Купфера [341], так как при введении хлорида гадолиния, избирательно блокирующего функцию макрофагов, индукции ДСТ не наблюдается [142]. Результаты наших экспериментов показывают, что элиминация макрофагов из суспензии клеток, используемой для индукции ДСТ, также имеет значение для реализации этого

феномена. По-видимому, для процесса развития ДСТ важным является не только наличие макрофагов реципиента, но и макрофагов донорского происхождения.

Для проверки данного предположения нами был проведен эксперимент, в котором было увеличено количество криоконсервированных спленоцитов для интрапортальной ДСТф. В предыдущем случае количество вводимых интрапортально клеток составляло 1×10^7 клеток/реципиента. В последующем эксперименте доза клеток была увеличена до $5,5 \times 10^7$ клеток/реципиента. В результате такой трансплантации была обнаружена хорошая выживаемость ткани НЖ на 30-е сутки после операции (рис. 3.96). В аллографте определяется пучковая зона адренокортекса, представленная тяжами крупных полигональных клеток с вакуолизированной цитоплазмой. Различается хорошо развитая капиллярно-сосудистая сеть. Лейкоцитарная инфильтрация и фиброзная ткань не обнаруживается.

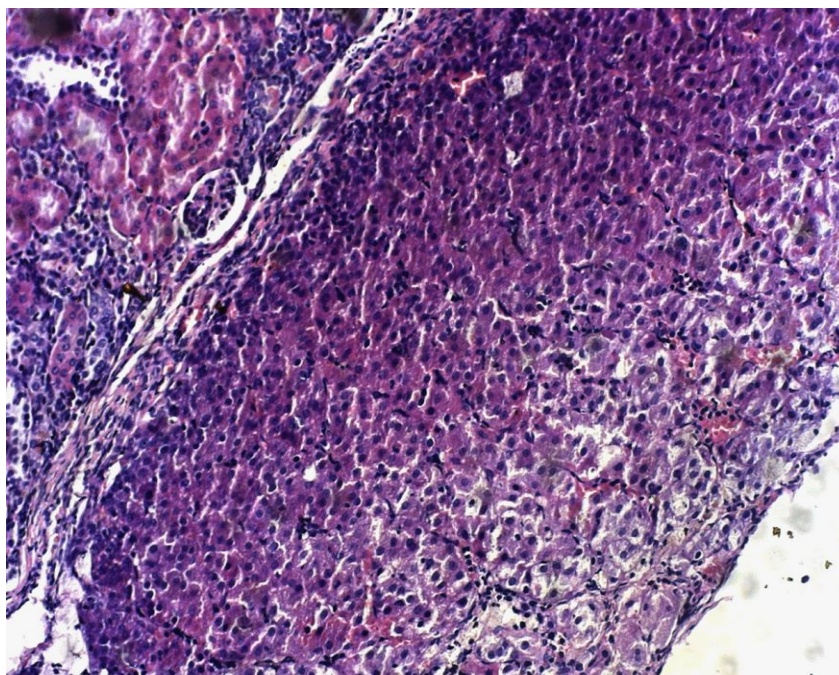


Рис. 3.96. Аллогенный трансплантат ткани НЖ с ДСТф криоконсервированных спленоцитов в дозе $5,5 \times 10^7$ клеток/реципиента на 30-е сутки после трансплантации. Окраска гематоксилином и эозином. Ок. 10, об. 20.

Таким образом, увеличение количества криоконсервированных спленоцитов позволило вновь добиться эффекта индукции ДСТ к трансплантату эндокринной ткани.

Выводы по разделу:

На основе анализа полученных данных можно сделать следующие выводы:

1. Использование криоконсервированных спленоцитов в качестве ДСТ-индуцирующего агента в той же дозе, что и нативных (1×10^7 клеток/реципиента), не приводит к пролонгированию выживаемости ткани эндокринных желез при аллотрансплантации. Для реализации эффекта индукции ДСТ необходимо увеличение дозы криоконсервированных спленоцитов до $5,5 \times 10^7$ клеток/реципиента.
2. Возможная причина отмены эффекта индукции толерантности к трансплантату состоит в уменьшении количества макрофагов в суспензии спленоцитов после криоконсервирования.

Результаты, изложенные в данной главе, опубликованы в работе:

Божок Г.А. Влияние интрапортального введения криоконсервированных спленоцитов на выживаемость аллотрансплантата ткани щитовидной железы / Г.А. Божок // Проблемы криобиологии. – 2011. – Т. 21, № 3. – С. 330-338.

3.6. Исследование экспрессии иммунных протеасом и содержания CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ клеток у реципиентов после индукции донор-специфической толерантности

Возможность индукции толерантности к донорским тканям и органам доказана множеством экспериментальных работ. К сожалению, в клинике экспериментальные способы индукции толерантности часто являются неприменимыми из-за высокого риска для здоровья реципиента. Однако за годы развития клинической трансплантологии накопилось достаточно сведений о реципиентах печени и почек, которым в силу различных обстоятельств был отменен прием иммуносупрессивных препаратов, что не привело к отторжению трансплантата. Эти случаи получили название оперативной толерантности (operational tolerance). Состояние оперативной толерантности встречается в среднем у 3,5% реципиентов почек [95], тогда как для реципиентов печени этот показатель значительно выше, он достигает 20% [86, 284].

Важность изучения подобного феномена для дальнейшего развития трансплантологии подчеркивает тот факт, что в 2007 году были приняты международные программы, охватывающие основные трансплантологические центры Европы и США, целью которых явилось определение «биомаркеров толерантности» у реципиентов со спонтанной операционной толерантностью («Reprogramming the Immune System for Establishment of Tolerance» в Европе и «Immune Tolerance Network» в США). В результате объединения клинических баз было обследовано значительное количество реципиентов почек и печени, которые больше года не принимали никаких иммуносупрессивных препаратов и не испытывали отторжения трансплантатов.

Для определения маркеров толерантности была исследована экспрессия генов у толерантных реципиентов в сравнительном аспекте со здоровыми людьми и реципиентами, страдающими хроническим отторжением. Основными фактами, которые были получены в результате детального исследования экспрессии различных генов, являются следующие:

1) набор генов, экспрессия которых у толерантных реципиентов уменьшена/увеличена по отношению к группам сравнения, у реципиентов почек и печени неодинаков [86, 284, 286];

2) для реципиентов почек характерным признаком толерантности являлась повышенная экспрессия генов, относящихся к В-лимфоцитам [325, 366];

3) для реципиентов печени характерным признаком толерантности являлась повышенная экспрессия генов, относящихся к $\gamma\delta$ T-лимфоцитам и натуральным киллерам [277, 299].

Кроме генов иммунокомпетентных клеток, была установлена разница в экспрессии генов, относящихся к общим реакциям организма на стресс, патогенные и биотические стимулы, а также рецепторов клеток, метаболизму углеводов, обмену железа, клеточному движению, молекулам адгезии, клеточному циклу, факторам транскрипции и пролиферации [79, 96]. Установлено, что экспрессия 13 генов этого набора особенно выражено изменялась у реципиентов с операционной толерантностью [95, 96].

Расаре М. с соавт. в качестве перспективного «биомаркера толерантности» из данных 13 генов был выбран TMTC3/SMILE, одной из функций которого является регуляция экспрессии $\beta 1$, $\beta 1i$ и $\beta 2i$ субъединиц протеасом [352]. Интересно, что Newell К.А. с соавт. также установили разницу в экспрессии данного гена в крови 25 пациентов, имеющих толерантность к почечному трансплантату [325].

Ashton-Chess J. с соавт. обнаружили изменение экспрессии $\beta 2i$ субъединицы протеасом у реципиентов, страдающих хроническим отторжением [64]. Вероятно, в связи с этим, ингибитор протеасом бортезомиб, который вначале использовался в терапии онкологических заболеваний, в последние годы стал применяться в трансплантологии, особенно успешно для лечения хронического отторжения трансплантата [153, 345, 347].

Данные факты говорят о вовлеченности протеасом не только в процесс презентации антигена, но и о возможной их роли в индукции толерантности к трансплантату.

В связи с этим, задачей следующего этапа исследования явилось изучение экспрессии иммунных протеасом как возможного биомаркера толерантности в организме реципиента после трансплантации ткани эндокринных желез в условиях индукции ДСТ.

Для решения задачи в качестве трансплантационного биоматериала были выбраны ткани яичников и щитовидной железы. Как установили наши предыдущие эксперименты, при трансплантации ткани щитовидной железы, даже с индукцией ДСТ, наблюдалась 50%-я выживаемость аллогraftов на 30-35 сутки. При таком уровне выживаемости изучение пула иммунных протеасом могло дать возможность использовать их в качестве показателя принятия либо отторжения аллогraftов. Овариальная ткань имела хорошую выживаемость при трансплантации с индукцией ДСТ (в среднем 82%), что позволяло использовать ее в качестве группы сравнения.

На 30-35 сутки после трансплантации в условиях индукции ДСТ были исследованы аллогraftы овариальной ткани и ткани щитовидной железы с помощью иммуногистохимического мечения антителами к субъединицам иммунных протеасом. Специфическое мечение антителами к субъединицам LMP2 и LMP7 было обнаружено как в аллогraftе овариальной ткани (рис. 3.97), так и ткани щитовидной железы (рис. 3.98).

В интактной ткани яичника и щитовидной железы значительного уровня субъединиц LMP2 и LMP7 не обнаруживалось.

В этих же трансплантатах на срезах, окрашенных гематоксилином и эозином, были установлены признаки отторжения трансплантата (рис. 3.99 и 3.100). Ткань аллогraftов в некоторых местах сохраняла клеточную структуру, характерную, для паренхимы желез, однако в то же время присутствовали области обширной инфильтрации иммунокомпетентными клетками.

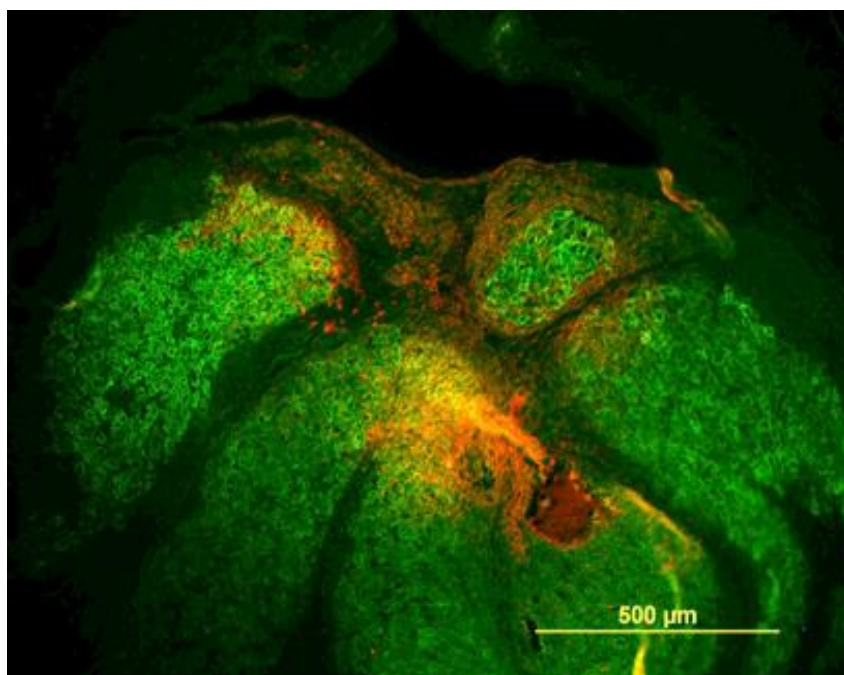


Рис. 3.97. Двойное иммунофлуоресцентное мечение аллографтов овариальной ткани антителами к LMP7, меченными Alexa 488 (зеленая флуоресценция), и антителами к LMP2, меченными Alexa 546 (красная флуоресценция).

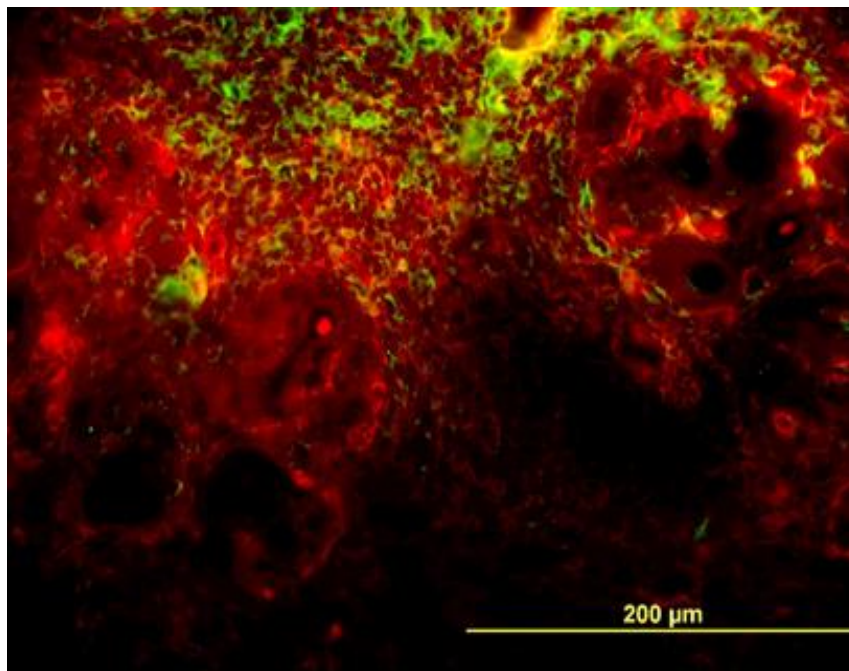


Рис. 3.98. Двойное иммунофлуоресцентное мечение аллографтов ткани ЦЖ антителами к LMP7, меченными Alexa 546 (красная флуоресценция), и антителами к LMP2, меченными Alexa 488 (зеленая флуоресценция).

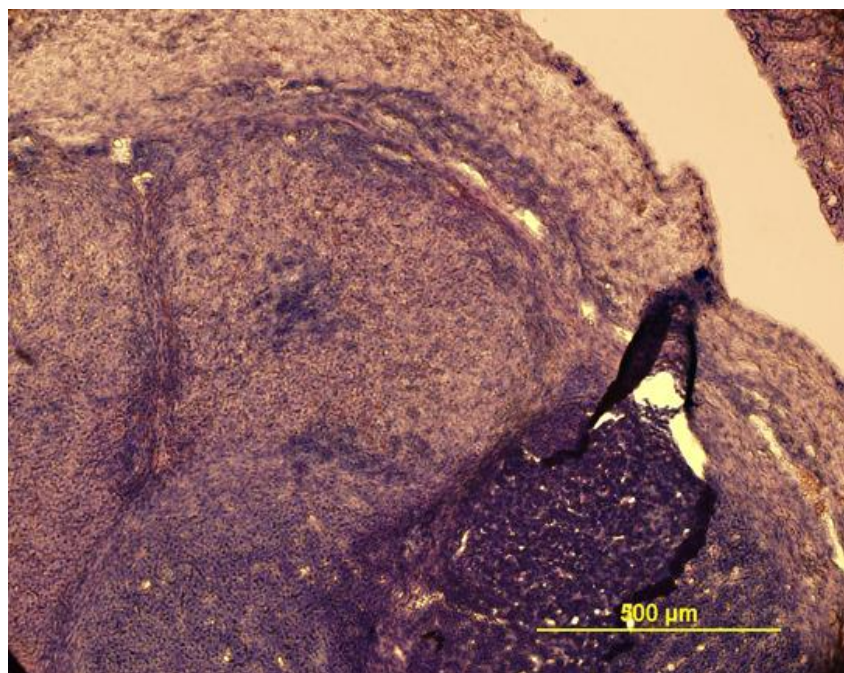


Рис. 3.99. Аллогraft овариальной ткани на 35 сутки после трансплантации, окрашенный гематоксилином и эозином. Этот же образец был использован для мечения антителами к LMP7 и LMP2.

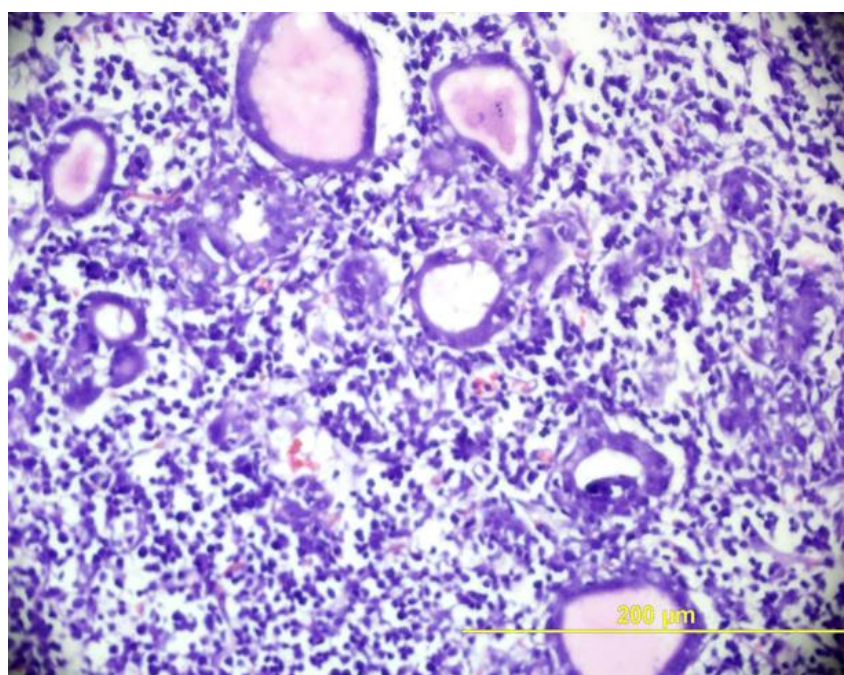


Рис. 3.100. Аллогraft ткани щитовидной железы на 30 сутки после трансплантации, окрашенный гематоксилином и эозином. Этот же образец был использован для мечения антителами к LMP7 и LMP2.

После трансплантации в условиях индукции ДСТ в некоторых аллографтах наблюдалось специфическое мечение, тогда как в остальных оно отсутствовало. Суммарный анализ аллографтов желез, меченных антителами, представлен в таблице 3.10. Из данных, представленных в таблице, заметно, что полное отсутствие LMP2/LMP7-позитивных клеток или их незначительное количество наблюдается в случае, когда трансплантат практически замещен соединительной тканью. В то же время, интенсивное мечение наблюдается в аллографтах, представленных тканью железы с признаками инфильтрации.

Таблица 3.10.

Наличие специфического мечения антителами к LMP7 и LMP2 аллографтов желез щитовидной железы и овариальной ткани.

Условия эксперимента	Яичник			Щитовидная железа		
	№ ж-го	LMP2/LMP7	Гем./эо-зин	№ ж-го	LMP2/LMP7	Гем./эо-зин
Аллотрансплантация	1	+++	ТЖ; И; СТ	1	+++	ТЖ; И
"-	2	-	СТ	2	-	СТ
Аллотрансплантация+ ДСТ	1	+	И; СТ	1	+	И; СТ
"-	2	-	И; СТ	2	+	И; СТ
"-	3	+	И; СТ	3	+	И; СТ
"-	4	-	ТЖ; И	4	+++	ТЖ; И
Аллотрансплантация+ ДСТ+GdCl ₃	1	-	СТ			

Примечание: ТЖ – ткань железы; И – инфильтрат; СТ – соединительная ткань. Специфическое мечение LMP2/LMP7: «-» отсутствие; «+» слабое; «++» умеренное; «+++» интенсивное.

Иммунные протеасомы являются неотъемлемым компонентом иммунокомпетентных клеток. Учитывая, что интактная ткань желез не имела значительного позитивного мечения антителами к LMP2/LMP7, логичным было

предположить, что LMP2/LMP7-позитивные клетки, появляющиеся в аллографте, принадлежат иммунной системе, т.е. означают его инфильтрацию. В том же случае, когда аллографт либо не замечен иммунной системой реципиента в результате индукции ДСТ, либо, когда процесс отторжения в целом завершен, и на месте аллогraftа сформировался соединительно-тканый рубец, специфического мечения данных субъединиц не наблюдается.

В следующем эксперименте нами было проведено тройное иммунофлуоресцентное мечение, при котором кроме антител к LMP2/LMP7, использовался ДНК-краситель Hoechst 33342, позволяющий идентифицировать клеточные ядра. При сравнении образцов аллогraftов, морфологически представленных соединительной тканью и лейкоцитарным инфильтратом, располагающимся основной массой в виде «вала» на границе с паренхимой почки (рис. 3.101), было замечено, что иммунокомпетентные клетки «вала» не окрашиваются антителами к субъединицам протеасом (рис. 3.102). Этот факт говорил о том, что не все иммунокомпетентные клетки, инфильтрующие аллогraft, имеют значительный уровень иммунных протеасом. В наших предыдущих исследованиях по иммуногистохимическому окрашиванию клеток аллогraftа, было показано, что клеточный «вал» на границе между трансплантатом и почкой в основном образуют $CD4^+$ и $CD8^+$ Т-лимфоциты (рис. 3.38 и 3.39). Отсутствие интенсивной экспрессии в них иммунных субъединиц на исследуемом сроке после трансплантации, возможно, объясняется фактом, установленным в работах [108, 491]. В них было показано, что уменьшение экспрессии субъединиц LMP7 и LMP10 в Т-лимфоцитах определяется на фоне их экспансии, которая является необходимой для эффективного ответа на трансплантат. Иммунные протеасомы генерируют большинство антигенных пептидов, которые связываются с переносчиком ТАР и презентуются в составе молекулы ГКГ I класса [403]. Иммунные протеасомы в нормальных условиях постоянно экспрессируются в дендритных клетках [289], макрофагах [198], В-лимфоцитах [166]. Кроме того, вследствие секреции $IFN-\gamma$, которая происходит при антигенной стимуляции,

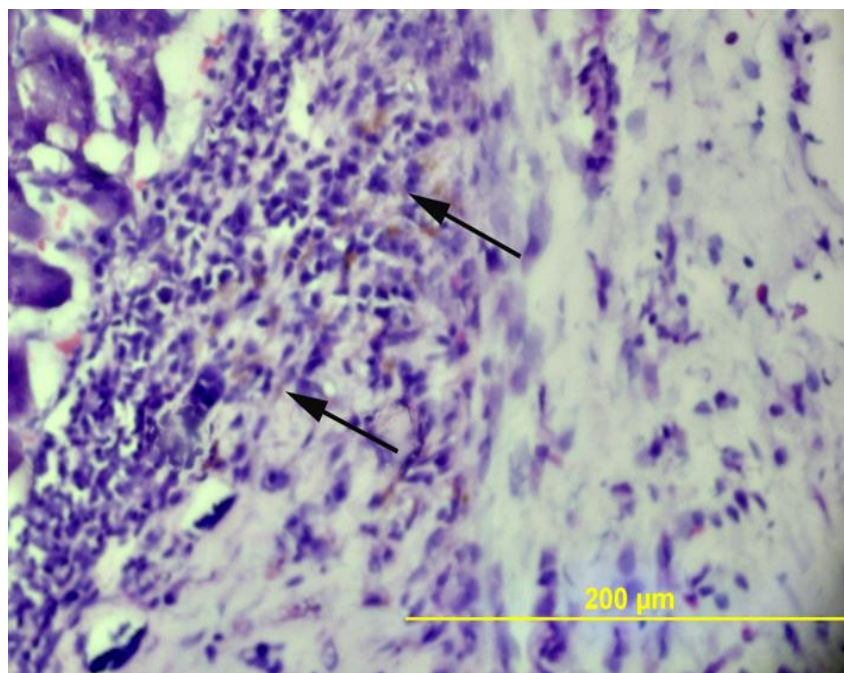


Рис. 3.101. Аллогraft ткани щитовидной железы на 30 сутки после трансплантации, окрашенный гематоксилином и эозином. Стрелкой указан лимфоцитарный инфильтрат, располагающийся в виде «вала» на границе почка-аллогraft.

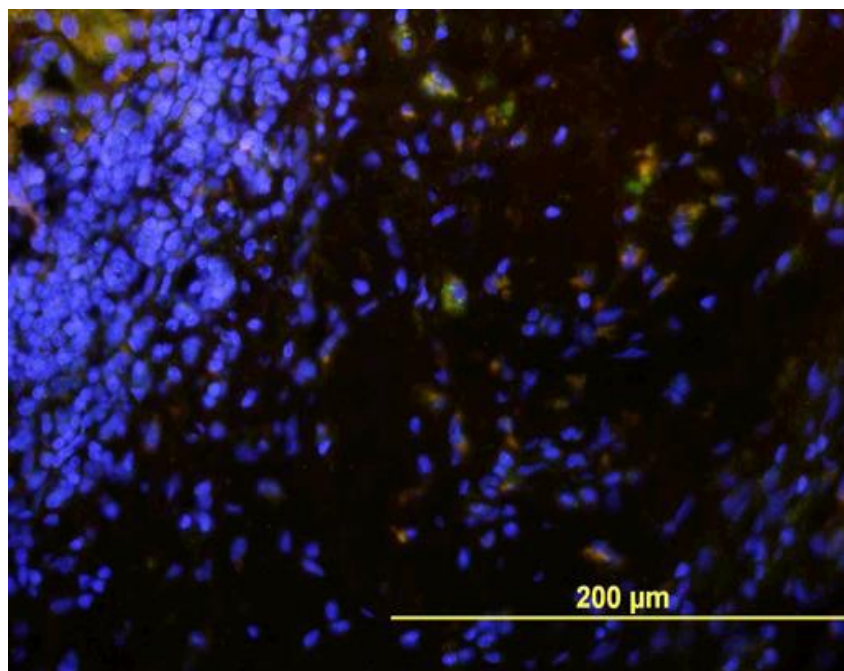


Рис. 3.102. Тройное иммунофлуоресцентное мечение аллогraftа ткани щитовидной железы антителами к LMP7 и LMP2, окрашивание ядер Hoechst 33342.

иммунные субъединицы могут синтезироваться и в паренхиматозных клетках различных органов [146].

Таким образом, обобщая эти и полученные нами данные, мы пришли к выводу о том, что появление в аллографте значительного количества клеток, несущих иммунные протеасомы с набором субъединиц LMP2 и LMP7, вероятнее всего отражает процесс распознавания антигенов трансплантата, их процессинг и презентацию антиген-представляющими клетками. В условиях обычной аллотрансплантации этап распознавания антигена и его презентации протекает в течение первых 3-5 суток, после чего наблюдается появление в сайте трансплантации значительного количества Т-лимфоцитов (рис. 3.8). При индукции ДСТ процесс распознавания антигена, вероятно, замедляется, развиваясь по механизмам, отличным от механизмов острого отторжения, вследствие чего мы можем наблюдать появление обширных зон клеток, позитивно метящимися антителами к субъединицам протеасом LMP2 и LMP7, только на 30-35 сутки. В это время в отторгнутых трансплантатах уже практически не наблюдается АПК, несущих LMP2 и LMP7, но Т-лимфоциты еще могут присутствовать.

В попытке приблизиться к пониманию молекулярных механизмов развития портальной толерантности, нами был изучен уровень протеасомальных субъединиц LMP2 и LMP7 в печени на 1 и 7 сутки после введения донорских спленоцитов. С помощью проточной цитофлуориметрии обнаружено, что на 1 сутки после ДСТф увеличивается количество как субъединицы LMP2, так и субъединицы LMP7 в печени по сравнению с количеством данных субъединиц, обнаруженных у животных, которым вместо спленоцитов был введен физиологический раствор – ложно-оперированного контроля (рис. 3.103). На 7 сутки наблюдается достоверное снижение количества субъединиц по сравнению с 1 сутками. Кроме того, пул данных субъединиц уменьшается и по сравнению с животными без трансфузии спленоцитов. При использовании ингибитора макрофагов печени GdCl₃ за

сутки до введения спленоцитов в целом получена та же динамика изменения количества субъединиц в печени.

Естественно предполагать, что увеличение количества LMP2 и LMP7 в первые сутки после ДСТф происходит за счет притока в печень спленоцитов, содержащих иммунные протеасомы. Этот вывод подтверждает тот факт, что ингибирование иммунокомпетентных клеток печени с помощью гадолиния хлорида достоверно не влияет на увеличение количества LMP2 и LMP7 на 1 сутки после ДСТф.

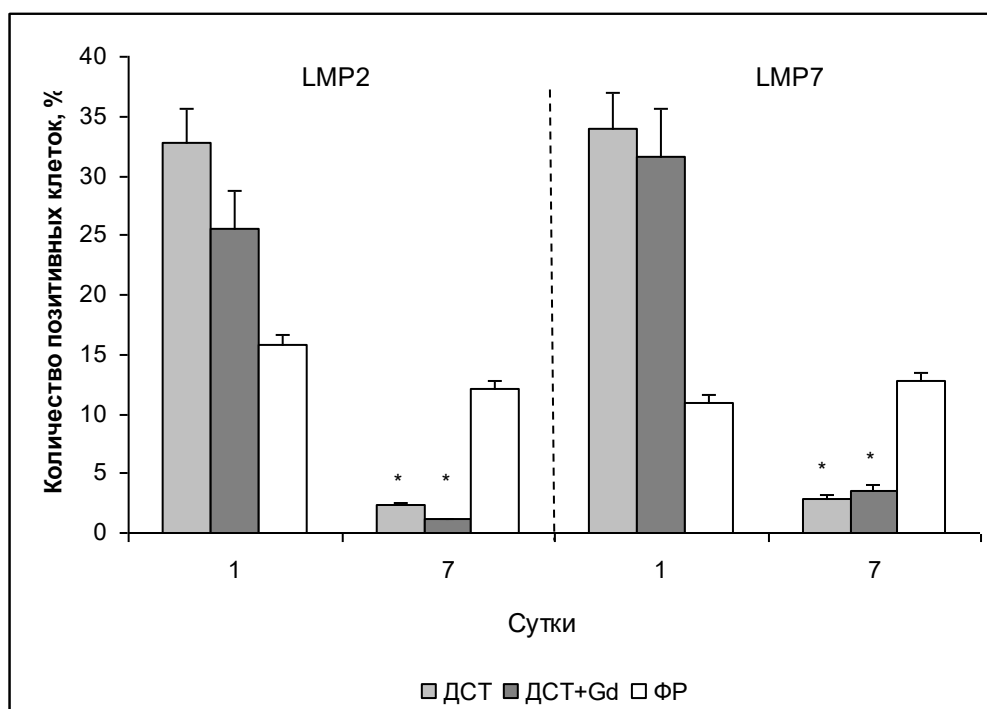


Рис. 3.103. Количество клеток, позитивно меченных антителами к субъединицам протеасом LMP2 и LMP7, в печени животных на 1 и 7 сутки после интрапортальной трансфузии донорских спленоцитов. GdCl₃ был введен за сутки до трансфузии спленоцитов. ФР – физиологический раствор. * – данные 7 суток достоверно отличаются от 1 суток, $P < 0,05$.

Интересен факт уменьшения иммунных протеасом на 7 сутки после ДСТр. Этот факт подтверждается Nakagawa К с соавт. [324], которые наблюдали снижение количества спленоцитов в печени на 7 сутки после интрапортальной

трансфузии. С одной стороны, это может отражать динамику элиминации введенных спленоцитов в печени или их расселение по организму реципиента.

Однако, с другой стороны, уменьшение количества протеасом ниже уровня ложно-оперированного контроля, возможно, свидетельствует об активном процессе, происходящем в печени и отражающем процесс толеризации организма реципиента к донорским клеткам.

Механизмы индукции и поддержания порտальной донор-специфической толерантности до сих пор остаются не до конца выясненными. Один из вопросов состоит в том, является ли печень единственным толерогенным органом, либо в процесс индукции ДСТ вовлекаются другие периферические и центральные иммунные органы. В связи с этим, нами было изучено количество клеток, позитивно меченных антителами к субъединицам протеасом LMP2 и LMP7, в селезенке и тимусе животных на 1 и 7 сутки после интрапортальной трансфузии донорских спленоцитов.

Результаты, представленные на рисунке 3.104, свидетельствуют о том, что достоверных количественных отличий содержания иммунных субъединиц протеасом в селезенке в зависимости от времени, прошедшем после ДСТф, не наблюдалось. Эти данные позволяют говорить о том, что на данном сроке селезенка, вероятно, не является органом иммунной системы, вовлеченным в процесс индукции ДСТ.

При изучении данного показателя в клетках тимуса животных нами было обнаружено достоверное увеличение содержания субъединицы LMP7 в образцах, полученных на 7 сутки после индукции ДСТ (рис. 3.105). Это могло свидетельствовать в пользу того, что тимус как центральный орган иммунной системы реагирует на антигенную стимуляцию после интрапортальной трансфузии спленоцитов.

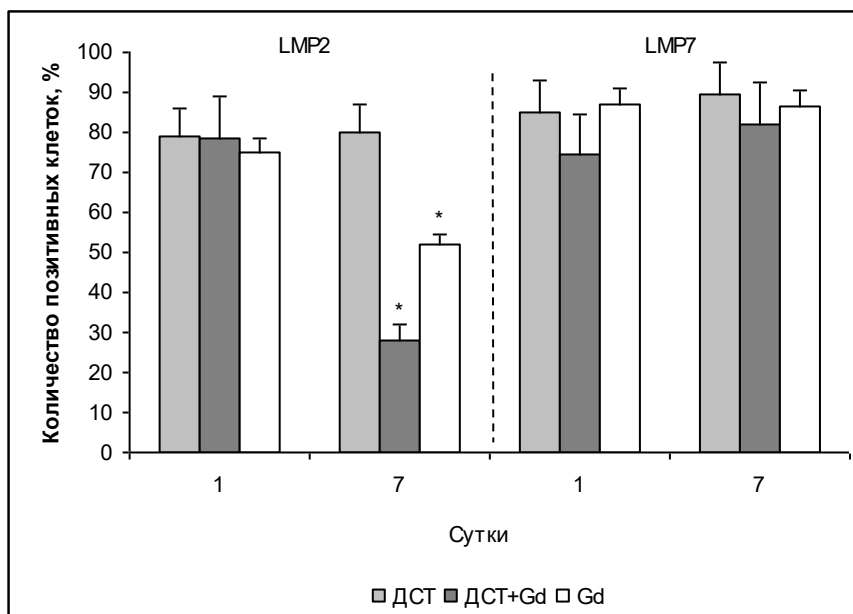


Рис. 3.104. Количество клеток, позитивно меченных антителами к субъединицам протеасом LMP2 и LMP7, в селезенке животных на 1 и 7 сутки после интрапортальной трансфузии донорских спленоцитов. GdCl₃ был введен за сутки до трансфузии спленоцитов * – отличия достоверны по сравнению с группой без введения GdCl₃, P<0,05.

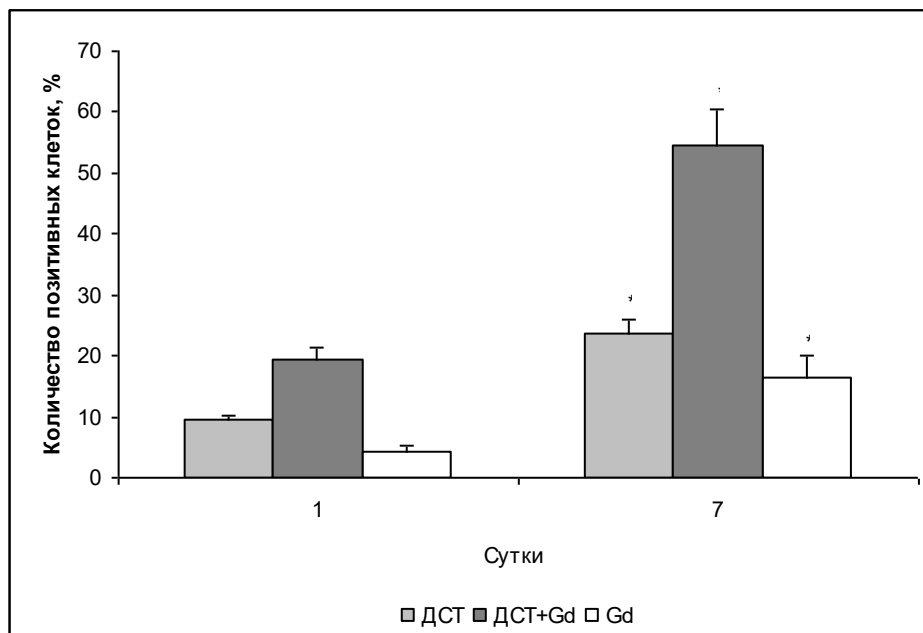


Рис. 3.105. Количество клеток, позитивно меченных антителами к LMP7, в тимусе животных на 1 и 7 сутки после интрапортальной трансфузии донорских спленоцитов. GdCl₃ был введен за сутки до трансфузии спленоцитов. * – отличия достоверны по сравнению с 1 сутками после ДСТф спленоцитов, P<0,05.

Введение специфического ингибитора макрофагов GdCl₃ за сутки до интрапортального введения спленоцитов, как установлено ранее, отменяет феномен индукции ДСТ [142, 324]. Мы изучили влияние гадолиния хлорида на количественный состав иммунных протеасом селезенки и тимуса. Установлено уменьшение количества клеток, экспрессирующих иммунную субъединицу LMP2, в селезенке экспериментальных животных на 7 сутки (рис. 3.104), в то время как количество клеток с LMP7 не изменялось.

В тимусе, наблюдалось увеличение содержания LMP7 на 7 сутки, так же, как и в образцах без введения GdCl₃ (рис. 3.105). Однако, интересен тот факт, что и на 1, и на 7 сутки количество субъединицы LMP7 в тимусе возрастает после применения гадолиния хлорида совместно с ДСТ по сравнению с группой, где индукция ДСТ производилась без ингибитора. Такое повышение экспрессии иммунных протеасом в тимусе может свидетельствовать об активации иммунных реакций, направленных на чужеродный антиген, что может объяснять явление «срыва толерантности» после применения GdCl₃ вовлечением не только периферических, но и центральных механизмов иммунитета.

Исследование пула иммунных протеасом в печени, селезенке и тимусе было также проведено после аллотрансплантации с ДСТф спленоцитов и без таковой. На рисунке 3.106 представлены результаты измерения количества клеток, позитивно меченных антителами к субъединицам протеасом LMP2 и LMP7, в селезенке, печени и тимусе животных на 35 сутки после аллотрансплантации овариальной ткани. Установлено достоверное увеличение содержания субъединицы LMP2 в селезенке и тимусе животных с аллотрансплантацией без индукции ДСТ, что может свидетельствовать о реакции иммунной системы реципиента на чужеродный трансплантационный материал и отражать процесс острого отторжения аллогraftа.

Содержание субъединицы LMP7 достоверно не отличалось от интактного контроля во всех исследованных органах и экспериментальных группах животных, кроме животных группы с ДСТ, у которых на исследуемом сроке

была обнаружена хорошая сохранность аллогraftа (на рисунке 3.106 обозначена как ДСТ 2). В печени данных животных наблюдалось уменьшение на 80% ($p < 0,05$) содержания субъединицы LMP7.

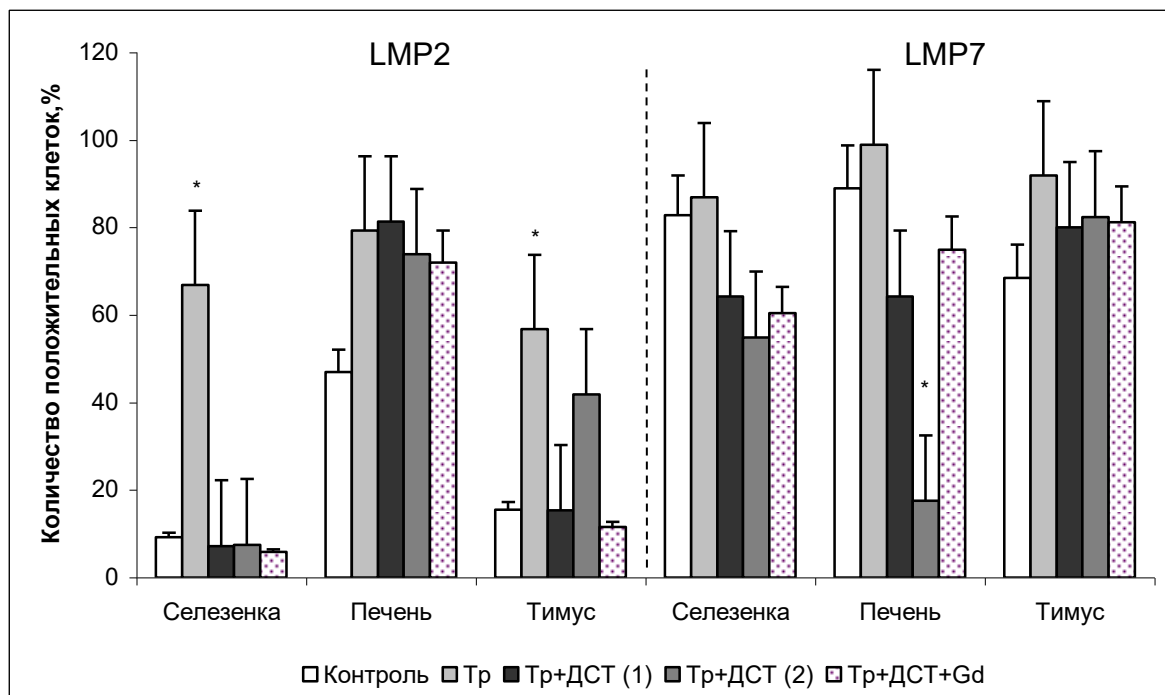


Рис. 3.106. Количество клеток, позитивно меченных антителами к субъединицам протеасом LMP2 и LMP7, в селезенке, печени и тимусе животных на 35 сутки после аллотрансплантации овариальной ткани и ДСТр. GdCl₃ был введен за сутки до трансфузии спленоцитов * – отличия достоверны по сравнению с группой без введения GdCl₃, $P < 0,05$.

При изучении содержания субъединиц LMP2 и LMP7 в трансплантатах методом Вестер-блоттинга было установлено, что во всех аллогraftах наблюдается увеличение количества иммунных протеасом (рис. 3.107). Экспрессия субъединицы LMP2 увеличивается в среднем в 8,8, а LMP7 – в 4,8 раз по сравнению с контролем (интактной тканью яичников). Однако количественное соотношение иммунных субъединиц в отторгнутых (ДСТ 1) и выживших (ДСТ 2) трансплантатах было неодинаковым. В аллогraftах, носящих признаки отторжения (ДСТ 1), увеличивается количество LMP7, в то время как в аллогraftах, демонстрирующих хорошую выживаемость (ДСТ 2),

содержание этой субъединицы достоверно меньше. Количественное распределение субъединицы LMP2 носит противоположный характер: увеличивается в прижившихся и уменьшается в отторгнутых аллографтах.

Эти данные находятся в соответствии с данными протеасомного спектра печени у реципиентов групп ДСТ 1 и ДСТ 2 (рис.3.106), где также было установлено уменьшение субъединицы LMP7 в толеризованных аллографтах.

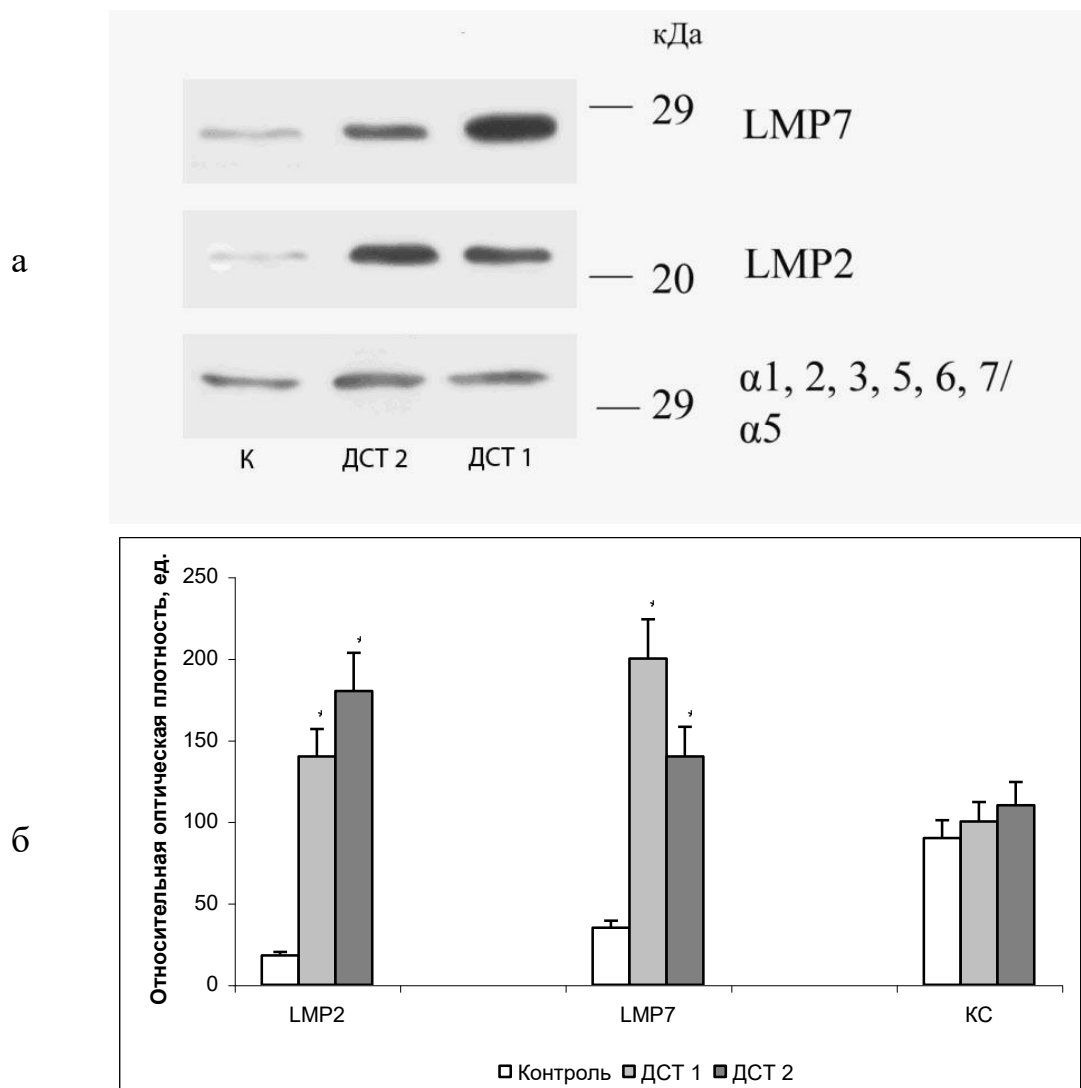


Рис. 3.107. Содержание иммунных субъединиц LMP7, LMP2 и конститутивных субъединиц (КС) $\alpha 1, 2, 3, 5, 6, 7$ протеасом в трансплантатах овариальной ткани. Вестерн-блоты осветленных гомогенатов с использованием антител к субъединицам LMP2, LMP7 и $\alpha 1, 2, 3, 5, 6, 7/5$ (а) и относительное количество LMP7, LMP2 и конститутивных α субъединиц (б). * – отличия достоверны по сравнению с контролем, $P < 0,05$.

Анализ соотношения субъединиц LMP2/LMP7 в трансплантатах показал достоверную разницу между образцами с индукцией ДСТ и контролем (рис. 108).

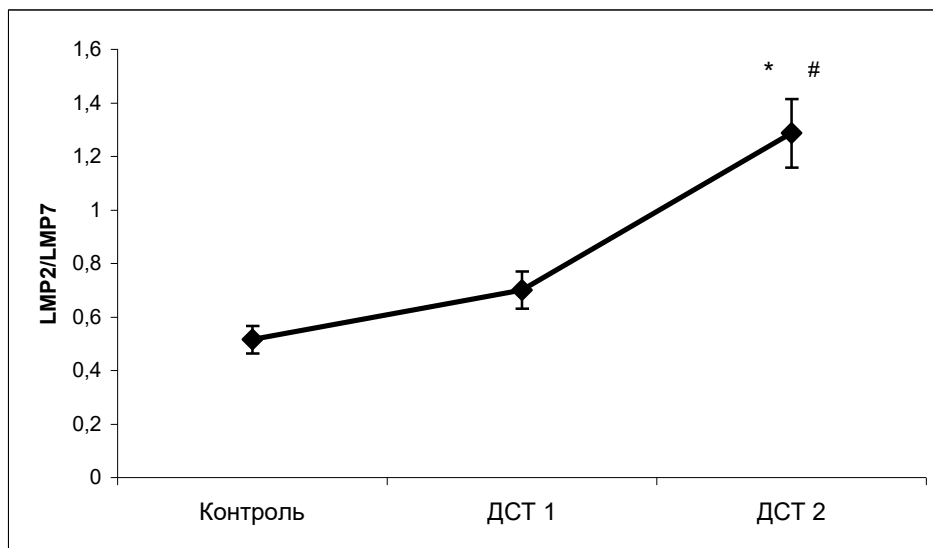


Рис. 108. Соотношение субъединиц LMP2/LMP7 в контрольной и экспериментальной группах. * – отличия достоверны по сравнению с контролем, $P < 0,05$; # – отличия достоверны между ДСТ 1 и ДСТ 2, $P < 0,05$.

Известно, что субъединица LMP7 играет важную роль в презентации антигена в составе ГКГ I класса цитотоксическим Т-лимфоцитам. Нокаутные мыши с отсутствием LMP7 имеют низкий уровень экспрессии ГКГ I класса и не способны эффективно представлять антиген [154], имеют слабую сопротивляемость инфекции и уменьшенное количество функциональных CD8⁺ Т-лимфоцитов [449]. Логично предполагать, что при распознавании трансплантата изменение содержания субъединицы этого типа также играет ведущую роль, таким образом, что экспрессия LMP7 является повышенной как трансплантате, так и в печени нетолеризованного реципиента.

LMP2 также участвует в создании антигенных пептидов, однако отсутствие экспрессии данной субъединицы у нокаутных мышей приводит к менее значительным последствиям для презентации антигена. В наших исследованиях при индукции толерантности наблюдается сдвиг баланса LMP2

и LMP7, экспрессируемых приблизительно в равных количествах в контроле, в сторону увеличения LMP2 и уменьшения LMP7 в толеризованных реципиентах.

Репертуар экспрессируемых иммунных субъединиц может определять иерархию представляемых антигенных эпитопов. Так, в работах Basler M. с соавт. и Chen W. с соавт. [69, 115] было установлено, что субъединицы LMP2 и LMP7 играют важную роль в создании иерархии иммунного ответа $CD8^+$ Т-клеток в ответ на стимуляцию разными антигенами вирусов гриппа или хориоменингита. Это выражалось в том, что при изменении баланса субъединиц иммунный ответ на доминирующие антигенные детерминанты стремительно уменьшался, тогда как на субдоминантные антигены – значительно возрастал. Возможно, данный механизм может играть важную роль при индукции ДСТ к аллотрансплантату и определять вектор иммунного ответа организма реципиента в сторону его принятия либо отторжения.

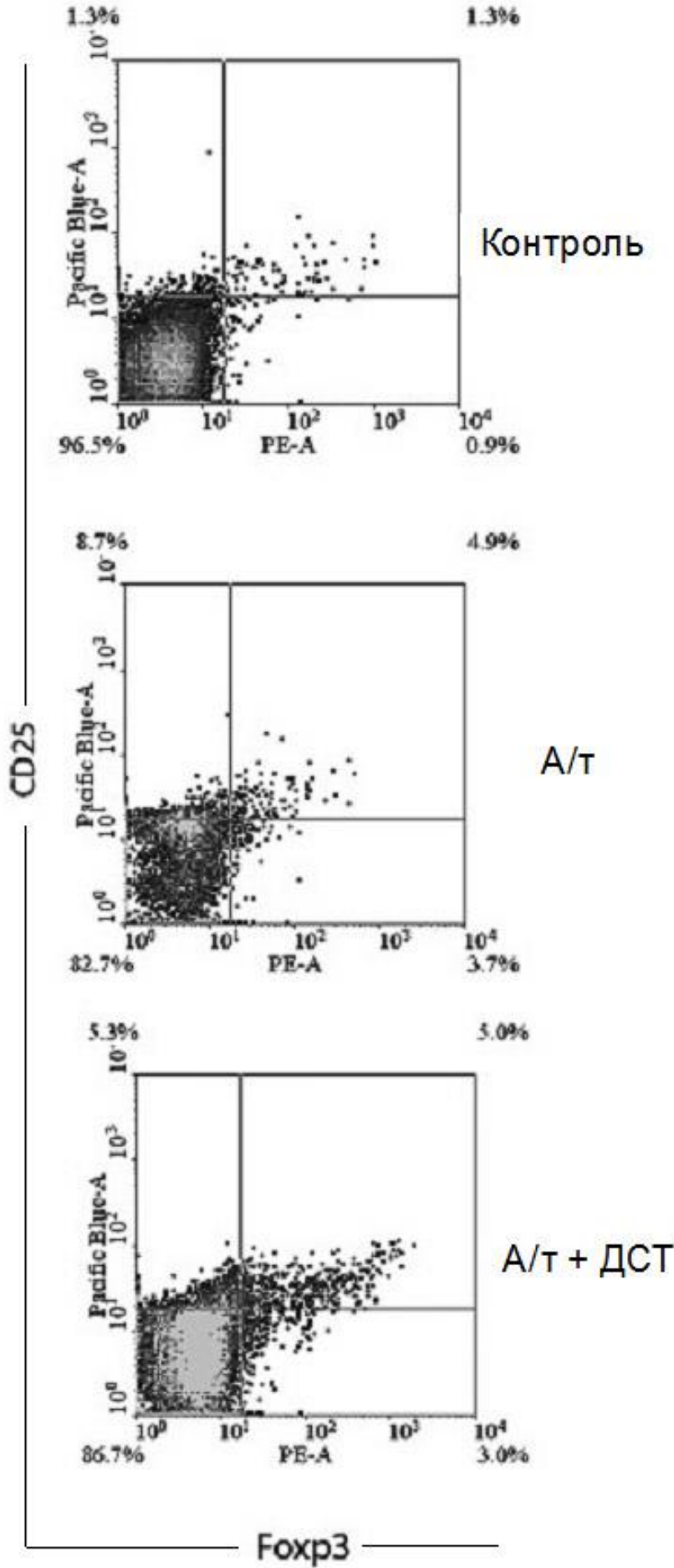
Таким образом, показатель соотношения иммунных протеасом в печени реципиента и в трансплантате может быть использован в качестве биомаркера толерантности при трансплантации ткани эндокринных желез.

Одним из широко известных фактов является наблюдение о том, что у реципиентов с толерантностью к органному или тканевому аллогraftу повышается содержание регуляторных Т-лимфоцитов $CD4^+CD25^+Foxp3^+$ (Treg) [53, 168, 175, 311]. Более того, перенос этих клеток от толеризованного реципиента к наивному также приводит к индукции аллоспецифичной толерантности [251, 492]. В некоторых клинических исследованиях уровень Treg в периферической крови реципиентов используется как диагностический показатель выживаемости трансплантата [373].

Мы в своей работе также изучили показатель содержания Treg в крови крыс с аллогraftами щитовидной железы на 30 сутки после трансплантации. На рисунке 109 представлены репрезентативные диаграммы цитофлуориметрического анализа клеток периферической крови интактного

контроля и реципиентов аллогraftов ткани ЦЖ, меченные антителами к CD4, CD25 и Foxp3.

а



б

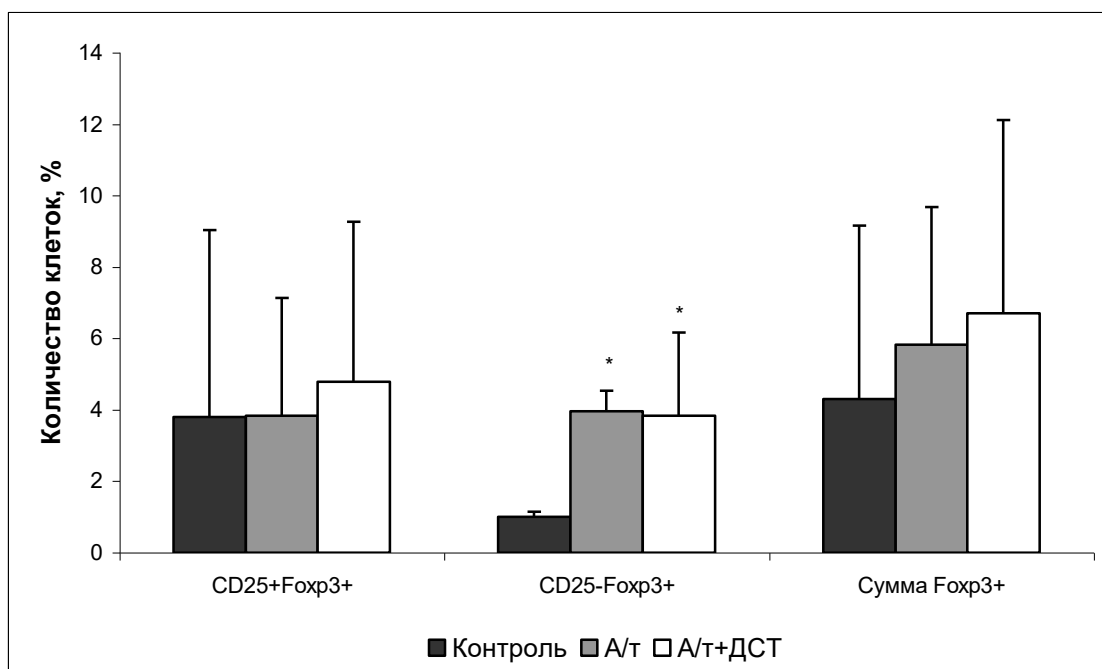


Рис. 109. Репрезентативные диаграммы цитофлуориметрического анализа клеток (а) и содержание Foxp3⁺ клеток в субпопуляции CD4⁺ Т-лимфоцитов (б) в периферической крови интактного контроля и реципиентов аллотрансплантата ткани щитовидной железы на 30 сутки после трансплантации. А – точечные диаграммы, отражающие содержание CD25⁺Foxp3⁺ и CD25⁻Foxp3⁺ клеток в субпопуляции CD4⁺ Т-лимфоцитов. CD25⁺Foxp3⁺ клетки расположены в верхних правых квадрантах, CD25⁻Foxp3⁺ клетки находятся в нижних правых квадрантах. А/т – аллотрансплантация; * – отличия достоверны по сравнению с контролем, P<0,05.

Обобщая данные животных разных групп, не установлено достоверных различий между количеством CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ клеток в интактном контроле и двух экспериментальных группах (аллотрансплантация с индукцией ДСТ и без таковой), хотя наблюдалась тенденция к повышению содержания данных клеток на 3-4% в экспериментальных группах по сравнению с контролем (рис. 109, б).

Наши данные совпадают с результатами работы Abe Y. с соавт. [53], где также на 30 сутки после трансплантации печени при индукции ДСТ

наблюдалось количественное увеличение субпопуляции Treg клеток на 3%, хотя отличия были достоверны. В этой же работе было установлено, что процент клеток с фенотипом $CD4^+CD25^-Foxp3^+$, предположительно являющихся предшественниками регуляторных Т-лимфоцитов, не несущими регуляторной активности [167], изменяется таким же образом, как и Treg.

Нами также был сделан пересчет содержания клеток субпопуляции предшественников Treg, и обнаружено достоверное увеличение количества клеток в обеих группах с аллотрансплантацией по сравнению с контролем (рис. 109, б).

При анализе показателей состояния толерантности иммунной системы к трансплантату необходимо учитывать индивидуальные различия реципиентов. Нами было установлено, что индукция ДСТ происходит не у всех использованных животных. При этом усреднение показателей по группе может скрыть отличия в уровне субпопуляции Treg у толерантных реципиентов. В связи с этим, мы отобрали для последующего анализа содержания Treg образцы только тех животных, у которых было установлено наличие выжившей ткани эндокринной железы на исследуемом сроке после трансплантации.

Кроме того, при гистологическом анализе образцов аллогraftов ткани ЩЖ без индукции ДСТ было обнаружено одно животное, у которого наблюдалось хорошая выживаемость ткани на 30 сутки.

При цитофлуориметрическом анализе крови этих экспериментальных животных было установлено увеличение субпопуляции $CD4^+CD25^+Foxp3^+$, однако отличия все же были недостоверны по сравнению с интактным контролем. Субпопуляция клеток с фенотипом $CD4^+CD25^-Foxp3^+$ и суммарное количество Foxp3-позитивных клеток увеличивались в 6 и 3 раза, соответственно, по сравнению с контролем ($P < 0,05$, рис. 110).

Полученные нами данные указывали на то, что содержание $CD4^+CD25^+Foxp3^+$ клеток в периферической крови не всегда может отражать состояние толерантности реципиента к трансплантату. К такому же выводу пришли авторы работ [85, 282, 314], которые обнаружили различия уровня Treg

в крови у реципиентов почек с оперативной толерантностью по сравнению с пациентами, страдающими хроническим отторжением аллографта, но не контрольной группой. В связи с этим, существует необходимость дополнительной оценки состояния аллографта, дающую более полную характеристику вектора иммунного ответа и характеризующую статус трансплантата как отторгающийся либо прижившийся. Таким дополнительным биомаркером может быть соотношение иммунных субъединиц протеасом LMP2/LMP7.

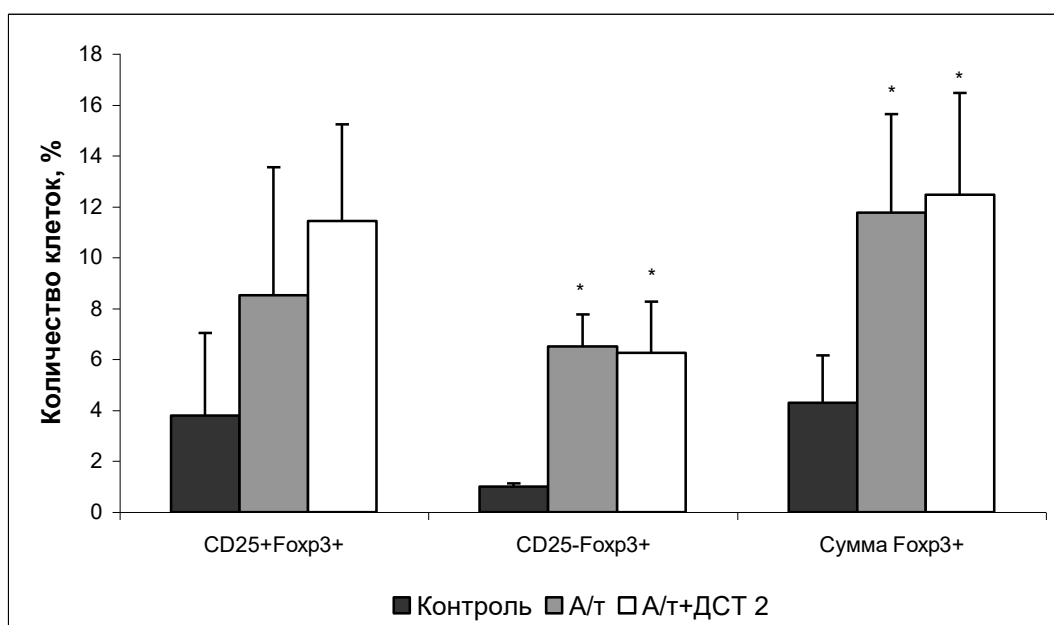


Рис. 110. Содержание Foxp3⁺ клеток в субпопуляции CD4⁺ Т-лимфоцитов в периферической крови интактного контроля и реципиентов с хорошей выживаемостью аллографтов ткани щитовидной железы на 30 сутки после трансплантации. * – отличия достоверны по сравнению с контролем, P<0,05.

Выводы по разделу:

Таким образом, на основе анализа полученных данных можно сделать следующие выводы:

5. 1. Содержание субъединиц протеасом LMP2 и LMP7 в печени отражает динамику перераспределения донорских спленоцитов в течение первых 7 суток после индукции ДСТ: количество иммунных субъединиц LMP2 и LMP7 увеличивается на 1 сутки после введения клеток и уменьшается на 7 сутки.

6. В печени животных-реципиентов, имевших высокую структурно-функциональную сохранность трансплантата на 30 сутки после трансплантации в условиях индукции ДСТ, наблюдается уменьшение экспрессии иммунной субъединицы протеасом LMP7 на 80%.

7. В аллографтах с признаками отторжения на 30 сутки после трансплантации в условиях индукции ДСТ наблюдается увеличение содержания субъединицы LMP7, в то время как в аллографтах с высокой структурно-функциональной сохранностью трансплантата увеличивается содержание субъединицы LMP2. На основе полученной закономерности соотношение субъединиц протеасом LMP2/LMP7 может быть рекомендовано в качестве биомаркера толерантности иммунной системы реципиента к трансплантату.

8. Показатель содержания регуляторных Т-лимфоцитов с фенотипом $CD4^+CD25^+Foxp3^+$ в периферической крови реципиентов на 30 сутки после аллотрансплантации в условиях индукции ДСТ не отражает состояния толерантности к трансплантату эндокринной ткани. Количество регуляторных Т-лимфоцитов достоверно не отличалось между показателями интактного контроля и экспериментальных животных, имевших высокую структурно-функциональную сохранность трансплантата после индукции ДСТ.

Результаты, изложенные в данной главе, опубликованы в следующих работах:

1. Божок Г.А. Возможная роль протеасом печени в реализации механизмов трансплантационной толерантности / Г.А. Божок, Я.Д. Карпова, Ю.В. Люпина, Е.И. Легач, Ю.В. Богомягкова, Т.П. Бондаренко, Н.П. Шарова // Вестник трансплантологии и искусственных органов. – 2011. – Т.13, №3. – С. 73-81.
2. Karpova I.D., Bozhok G.A., Liupina I.V., Legach E.I., Astakhova T.M., Stepanova A.A., Bondarenko T.P., Sharova N.P. Changes in the proteasome function after induction of donor-specific tolerance in rats with ovarian

- allograft / I.D. Karpova, G.A. Bozhok, I.V. Lyupina, E.I. Legach, T.M. Astakhova, A.A. Stepanova, T.P. Bondarenko, N.P. Sharova // *Biology Bulletin*. – 2012. – Vol.39, №3. – С. 244-249.
3. Божок Г.А. Использование флуоресцентных полиметиновых красителей в клеточной трансплантации / Г.А. Божок, Н.М. Алабедалякарим, Г.В. Дудецкая, Н.В. Колот, Н.Л. Погребняк, Е.И. Легач // *Материалы тезисов III Всероссийского симпозиума «Актуальные вопросы тканевой и клеточной трансплантологии»*. – Москва, 2007. – С.56.
 4. Карпова Я.Д. Протеасомные механизмы в развитии донор-специфической толерантности у крыс при трансплантации / Я.Д. Карпова, Г.А. Божок, Ю.В. Люпина, Т.М. Астахова, Е.И. Легач, Т.П. Бондаренко, Н.П. Шарова // *Материалы V Всероссийского съезда трансплантологов*. – Москва, 2010. – С. 287.
 5. Karpova Y.D. Immune proteasomes during the development of portal vein tolerance in rat liver / Y.D. Karpova, G.A. Bozhok, Y.V. Lyupina, T.M. Astakhova, E.I. Legach, N.P. Sharova // *36th Congress Biochemistry for Tomorrow Medicine*. –Torino, Italy, 2011. – P. 298-299.
 6. Степанова А.А. Протеасомные механизмы при трансплантации щитовидной железы в условиях толерантности у крыс / А.А. Степанова, Я.Д. Карпова, Г.А. Божок, Ю.В. Люпина, Е.И. Легач, Т.П. Бондаренко, Н.П. Шарова // *Материалы VI Всероссийского съезда трансплантологов*. – Москва, 2012. – С. 301.
 7. Божок Г.А. Выживаемость аллогенной ткани эндокринных желез и количество CD4+CD25+FOXP3+ клеток после индукции донор-специфической толерантности / Г.А. Божок, Я.Д. Карпова, Е.И. Легач, Ю.В. Люпина, С.Б. Билявская, В.Д. Устиченко, Г.В. Дудецкая, Н.П. Шарова, Т.П. Бондаренко // *Вестник трансплантологии и искусственных органов*. – 2012. – Т.15, №3. – С. 282.

ОБОБЩЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Количественные показатели эндокринных патологий не уменьшаются в современном обществе, а имеют тенденцию к росту. Воздействие неблагоприятных факторов окружающей среды, загрязненность химическими веществами почвы, воды, пищевые добавки и консерванты – это ряд причин, перечисленных в заявлении ВОЗ «Состояние научных данных о химических веществах, разрушающих эндокринную систему» от 2013 года, которые, по мнению специалистов, приводят к увеличению числа случаев расстройств эндокринной системы.

Распространенность состояний гормональной недостаточности, временная утрата трудоспособности и возможная инвалидизация пациентов, пожизненное течение болезни, необходимость постоянного приема гормональных препаратов, пребывание под перманентным врачебным контролем наносят значительный социально-экономический ущерб. Все это указывает на необходимость поиска новых методов лечения, одним из которых может стать трансплантация эндокринной ткани в комплексном лечении наряду с традиционной заместительной гормональной терапией.

Трансплантация эндокринной ткани позволяет создать в организме реципиента постоянно действующее «депо» гормона, способное адекватно отвечать на физиологические запросы организма. Возможность свободной пересадки эндокринной ткани, сравнительно небольшая инвазивность метода трансплантации (обычно, в виде укола в подкожно-жировую клетчатку), быстрая реваскуляризация трансплантата – являются явными преимуществами и открывают перспективы для создания методов лечения гормональной недостаточности на основе применения трансплантации эндокринной ткани. Однако для достижения существенных успехов в данном направлении необходимо решить ряд задач, в том числе, изучить сроки реализации гормонозаместительного эффекта трансплантации, его угасания в связи с отторжением трансплантата, эффективность применения криоконсервирования

при заборе ткани и возможность пролонгирования ее посттрансплантационной выживаемости без применения иммуносупрессии.

Исходя из вышеприведенных предпосылок, целью диссертационной работы явилось изучение влияния криоконсервирования и индукции донор-специфической толерантности на структурно-функциональную сохранность трансплантатов тканей эндокринных желез, а также определение биологических маркеров трансплантационной толерантности у реципиентов. Структурно-функциональная сохранность эндокринной ткани оценивалась в работе по двум основным показателям: содержанию гормонов в сыворотке крови реципиентов и выживаемостью ткани, верифицируемой при проведении гистологических и морфо-метрических исследований.

Согласно цели и задачам диссертационной работы исследование включало несколько взаимосвязанных этапов.

В качестве отправного этапа был проведен комплекс экспериментов по определению сроков выживаемости свежесыводенной ткани эндокринных желез (СВФ щитовидной железы, семенников, надпочечников) при разных видах трансплантации (ауто-, алло- и ксенотрансплантации) животным с моделями гормональной недостаточности соответствующей железы (тиреоид-, орхи- и адреналэктомией). Проведенный анализ данных позволил заключить, что алло- и ксенотрансплантаты ткани щитовидной железы, семенников, надпочечников, пересаженные гетеротопически под капсулу почки без применения иммуносупрессии, подвергаются острому отторжению. Процесс отторжения пересаженной ткани включает в себя лейкоцитарную инфильтрацию, развивающуюся с первых дней и достигающую максимума на 7-14 сутки, прогрессирующее уменьшение площади ткани трансплантата и замещение ее соединительной тканью к 35 суткам. Скорость отторжения трансплантатов ткани эндокринных желез зависит от вида железы, причем выживаемость ткани НЖ достоверно выше, чем ткани ЩЖ и семенников.

Таким образом, было установлено, что средний срок существования необработанного (СВФ ткани) алло- или ксенотрансплантата в организме

реципиента недостаточен для осуществления заместительного гормонального эффекта вследствие активации процесса отторжения в организме реципиента. Это подтверждали данные измерения уровней гормонов (Т4, 11-ОКС, кортизола, тестостерона) в сыворотке крови реципиентов, которые не продемонстрировали достижения уровня гормона в крови, близкого к контрольным значениям, ни в одном из случаев.

Процесс отторжения трансплантата является кооперативным, в котором принимают участие, с одной стороны, антигены и антигенпредставляющие клетки донорской ткани и, с другой стороны, звенья клеточного и гуморального иммунитета реципиента. В соответствии с этими представлениями, поиск и разработка подходов пролонгирования выживаемости трансплантата должен был быть направлен как на иммуномодуляцию пересаживаемой ткани, так и на изменение реактивности иммунной системы реципиента. В связи с этим, дальнейшие исследования, представленные в диссертационной работе, были проведены в двух направлениях: уменьшение иммуногенности трансплантата и индукция донор-специфической толерантности у реципиента к трансплантату.

Теоретическая основа изменения иммуногенности ткани путем криоконсервирования была заложена работами Taylor M.J. с соавторами [430-432], в которых было показано, что АПК ткани (макрофаги и дендритные клетки) имеют высокую чувствительность к скорости охлаждения. Наблюдения последующих авторов подтвердили адекватность данного подхода для снижения иммуногенности аллогraftов сосудов, ткани яичников, кардиомиоцитов [407, 468, 489].

Эти факты явились предпосылками для выполнения нами этапа исследований, при реализации которого было изучено влияние факторов криоконсервирования на количественный и фенотипический состав антигенпредставляющих клеток эндокринных желез (на примере надпочечников). Для изучения влияния криоконсервирования были использованы несколько режимов. Их основное различие заключалось в использовании различных температурных режимов охлаждения: режима

медленного двухэтапного охлаждения и режима быстрого одноэтапного охлаждения. Более щадящий режим медленного охлаждения включал использование скорости охлаждения $1^{\circ}\text{C}/\text{мин}$ до -70°C на первом этапе, после чего образцы помещали в жидкий азот. Более повреждающий режим быстрого охлаждения реализовался прямым погружением образца в жидкий азот в течение 1,5 минут, при этом реализовалась скорость охлаждения $>100^{\circ}\text{C}/\text{мин}$. Два указанных режима были выбраны из тех соображений, что они должны были обеспечить разную степень сохранности АПК при замораживании. В качестве промежуточных режимов охлаждения были выбраны режимы 10 и $40^{\circ}\text{C}/\text{мин}$. В результате проведенных исследований было установлено, что количество макрофагов и дендритных клеток в эндокринной ткани после криоконсервирования уменьшается с увеличением скорости охлаждения. Аллогенные трансплантаты ткани эндокринных желез, которые были обеднены АПК в процессе криоконсервирования, вызывали менее выраженный иммунный ответ по сравнению со свежевыделенной тканью.

Учитывая показанную при выполнении предыдущего этапа возможность уменьшения иммуногенности эндокринной ткани путем криоконсервирования, целью третьего этапа становилось получение криоконсервированной ткани всех, использованных в работе, эндокринных желез и оценка результативности данного подхода иммуномодуляции при алло- и ксенотрансплантации. В связи с тем, что культивирование приводит к уменьшению количества клеток, экспрессирующих антигены главного комплекса гистосовместимости II класса [365, 416] и снижению иммуногенности ткани [216], эта технология была использована в наших экспериментах в комплексе с криоконсервированием ткани.

В работе был проведен сравнительный анализ морфо-функционального состояния ткани эндокринных желез после криоконсервирования при использовании замораживания с медленными ($1-5^{\circ}\text{C}/\text{мин}$) и высокими ($>100^{\circ}\text{C}/\text{мин}$) скоростями охлаждения. На основании полученных данных для дальнейшего использования при трансплантации были выбраны режимы

охлаждения ткани, максимально способствующие сохранению жизнеспособности и гормональной активности клеток эндокринных желез. При трансплантации животным с моделями экспериментальной гормональной недостаточностью не было показано преимущества выживаемости криоконсервированной ткани щитовидной железы и семенников при алло- и ксенотрансплантации по сравнению с СВФ ткани. Для алло- и ксенографтов НЖ характерной особенностью являлся сравнительно высокий уровень выживаемости на исследуемый срок после трансплантации. Выживаемость аллогraftов НЖ после криоконсервирования и культивирования после отогрева возрастала в среднем в 4 раза. Для ксенографтов подобной динамики не наблюдалось, в среднем выживаемость ткани при этом находилась в пределах 20-25%.

Выживаемость фрагментов, которые были культивированы до или после отогрева не превышала выживаемости тех, которые были подвергнуты лишь криоконсервированию.

Таким образом, результаты проведенных исследований свидетельствовали, с одной стороны, о возможности уменьшения иммуногенности ткани с помощью криоконсервирования. Однако, с другой стороны, повреждение гормоно-продуцирующих клеток при криоконсервировании негативно сказывалось на выживаемости ткани при дальнейшей трансплантации.

Решение проблемы пролонгирования выживаемости трансплантата эндокринной ткани требовало иного подхода. С этой целью были проведены эксперименты по изучению влияния индукции донор-специфической толерантности у реципиентов на сохранность структуры и функции трансплантатов эндокринной ткани.

В предыдущих работах было показано, что ДСТ может быть индуцирована во взрослом организме предтрансплантационным введением донорских клеток (моноклеаров периферической крови, клеток лимфоузлов, селезенки, костного мозга) в портальную вену [241, 332, 376, 395], при этом

трансплантацию органа или ткани от того же донора необходимо выполнять не ранее, чем через 7-14 дней [374]. Данный подход был изучен как при аллогенной, так и ксеногенной трансплантации, причем, было показано, что при ксеногенной трансплантации выживаемость ткани возможна лишь в присутствии иммуносупрессии [223]. Принимая во внимание этот факт и учитывая, что использование иммуносупрессии при трансплантации эндокринной ткани нежелательно [346], дальнейшую экспериментальную работу мы проводили в аллогенной системе донор-реципиент.

В качестве объекта трансплантации были выбраны эндокринные железы, изначально обладающие иммуномодулирующими свойствами и способные таким образом влиять на иммунокомпетентные клетки реципиента. К ним относятся НЖ (судя из предыдущих исследований) и яичники [165, 409]. Также были использованы ткани ЩЖ и семенников, как не показавшие в наших предыдущих исследованиях повышенной выживаемости при трансплантации. Учитывая, что предтрансплантационная обработка ткани на этапах криоконсервирования и культивирования приводит к ухудшению структурно-функционального состояния гормоно-продуцирующих клеток, нами в дальнейших экспериментах использовались только свежевыделенные фрагменты желез. Эксперименты проводили на половозрелых животных (крысах или мышах) двух линий, одного пола. Схема эксперимента включала интрапортальное введение спленоцитов донорской линии в дозе $1-2 \times 10^7$ кл/животное за 7 суток до трансплантации СВФ под капсулу почки.

В результате проведенных экспериментов установлено, что введение спленоцитов донорского происхождения в портальную вену печени реципиентов за 7 суток до трансплантации фрагментов яичников, семенников, надпочечников и щитовидной железы под капсулу почки может привести к пролонгированию выживаемости аллогraftов без применения иммуносупрессии. Выживаемость аллогraftов свежевыделенной ткани эндокринных желез при индукции донор-специфической толерантности на исследуемом сроке наблюдения равнялась в среднем для ткани щитовидной

железы 50%; ткани семенников 81,4%; ткани надпочечников 78,4%, ткани яичников 82,9%. Несмотря на то, что по сравнению с контрольными значениями полной компенсации уровней гормонов у животных с трансплантациями не наблюдалось, все же уровни всех исследуемых гормонов были выше у реципиентов с индукцией ДСТ, чем у животных без ДСТ.

При гистологическом анализе аллогraftов яичников, семенников, НЖ установлено наличие васкуляризированной ткани с характерным для пересаженных желез строением при аллотрансплантации в условиях индукции ДСТ. В гистологических образцах аллогraftов без индукции ДСТ наблюдались признаки отторжения икании: обширная лейкоцитарная инфильтрация, очаги формирования фиброзной ткани и постепенное замещение ею ткани трансплантата.

Успешность пересадки эндокринной ткани при индукции ДСТ наблюдалась в наших экспериментах не во всех случаях. Характерным примером этого служит аллотрансплантация ткани ЩЖ, для которой выживаемость трансплантатов в условиях индукции ДСТ составила около 50%. При этом среди образцов ЩЖ, трансплантированных в условиях индукции ДСТ, наблюдались ярко выраженные морфологические отличия. У части животных в группе уровень Т4 был значительно ниже уровня гормона интактного контроля и, судя по гистологической картине, наблюдались явные признаки отторжения трансплантата. У остальных реципиентов уровень Т4 был в пределах 71-86% от контрольных значений. У них сохранялся трансплантат, в котором наблюдалась хорошо васкуляризированная ткань щитовидной железы, содержащая фолликулы, заполненные ярко-розовым коллоидом с вакуолями резорбции. Присутствия инфильтрата и очагов фиброза не обнаружено.

Учитывая, что при введении клеток в портальный кровоток при индукции ДСТ могут наблюдаться осложнения в виде тромбоза, печеночной гипертензии и повреждении гепатоцитов, нами дополнительно было проведено изучение влияния интрапортальной трансфузии спленоцитов на состояние печени у реципиентов на 35 сутки после трансплантации. Группой сравнения в качестве

отрицательного контроля была использована группа, которой сделали однократную инъекцию CCl₄ в тот же день, когда остальным производили введение спленоцитов. Для выявления патологии печени использовали определение активности трансаминаз АЛТ и АСТ в сыворотке крови и гомогенатах печени реципиентов. В результате проведенных исследований не было установлено достоверных отличий уровней трансаминаз между интактным контролем и группами животных с трансплантациями, что косвенно свидетельствовало об отсутствии негативного влияния интрапортальной трансфузии спленоцитов на целостность клеток печени на исследуемом сроке после операции.

При индукции ДСТ путем передтрансплантационной трансфузии спленоцитов актуальным является изучение возможности использования в качестве индуцирующего агента криоконсервированных клеток. В этом случае криоконсервирование донорского биоматериала позволит выполнять трансплантацию не в экстренном режиме, а планировать сроки операции в зависимости от состояния реципиента. В связи с этим, целью следующего этапа работы было тестирование возможности индукции ДСТ посредством трансфузии криоконсервированных спленоцитов.

Проведенные эксперименты продемонстрировали, что использование криоконсервированных спленоцитов в качестве ДСТ-индуцирующего агента в той же дозе, что и нативных, не приводит к пролонгированию выживаемости ткани эндокринных желез при аллотрансплантации. При анализе гистологических образцов аллогraftов, пересаженных при индукции ДСТ криоконсервированными спленоцитами, выявлены явные признаки отторжения трансплантата: инфильтрация лимфоцитами, полная деградация железистого строения ткани, замещение ткани трансплантата соединительной тканью.

Причина отмены индукции толерантности к трансплантату после криоконсервирования могла состоять в изменении субпопуляционного состава суспензии спленоцитов вследствие неодинаковой чувствительности клеток к охлаждению. Для выяснения данного вопроса были проведены дополнительные

эксперименты по изучению фенотипического состава свежевыделенной и криоконсервированной суспензий спленоцитов. При цитофлуориметрическом анализе субпопуляционного состава суспензии спленоцитов с использованием антител к Т, В-лимфоцитам и макрофагам было установлено достоверное уменьшение содержания макрофагов после замораживания. Это приводило к мысли о том, что для процесса развития ДСТ важным является наличие макрофагов донорского происхождения. Таким образом, для реализации эффекта индукции ДСТ было решено увеличить дозу криоконсервированных спленоцитов. Действительно, при увеличении количества клеток с 1×10^7 (как для свежевыделенных) до $5,5 \times 10^7$ клеток/реципиента была обнаружена хорошая выживаемость эндокринной ткани.

При оценке результатов аллотрансплантации в условиях индукции ДСТ была установлена достаточно высокая выживаемость эндокринной ткани. Однако данный эффект имел индивидуальные особенности, т.е. в группах животных с ДСТ наблюдалось некоторое количество реципиентов, у которых не происходила толеризация иммунной системы к трансплантату. Особенно характерно это было для реципиентов ткани ЩЖ, где выживаемость аллогraftов составляла около 50%. Данное обстоятельство стимулировало проведение серии экспериментов, посвященных изучению молекулярно-клеточных основ индукции толерантности к трансплантату.

Одним из широко известных фактов является наблюдение о том, что у реципиентов с толерантностью к аллогraftу повышается содержание регуляторных Т-лимфоцитов $CD4^+CD25^+Foxp3^+$ (Treg) [53, 168, 175, 311]. Кроме того, анализ литературных данных о случаях «операционной толерантности» к трансплантатам почек и печени, привел к обоснованию возможности вовлеченности иммунных протеасом в процесс индукции толерантности к трансплантату [64, 325, 352]. В связи с данными предпосылками, серия экспериментов следующего этапа диссертационной работы включала изучение субпопуляции регуляторных Т-лимфоцитов

CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ и экспрессии иммунных субъединиц протеасом как возможных биомаркеров толерантности у реципиентов эндокринной ткани.

Как установили наши предыдущие эксперименты, при трансплантации ткани щитовидной железы, даже с индукцией ДСТ, наблюдалась 50%-я выживаемость аллографтов на 30-35 сутки. При таком уровне выживаемости изучение пула иммунных протеасом могло дать возможность использовать их в качестве показателя принятия либо отторжения аллографтов. Овариальная ткань имела хорошую выживаемость при трансплантации с индукцией ДСТ (в среднем 82%), что позволяло использовать ее в качестве группы сравнения.

Иммуногистохимическое мечение с антителами к иммунным субъединицам протеасом LMP2 и LMP7 показало, что появление в аллографтах иммунных протеасом связано с его инфильтрацией и отражает процесс распознавания антигенов трансплантата, их процессинг и презентацию антиген-представляющими клетками.

Для изучения процессов, отражающих индукцию толерантности в организме реципиента, была определена экспрессия иммунных протеасом в печени (как сайте, куда изначально попадают спленоциты после трансфузии), селезенке (как периферическом органе иммунной системы) и тимусе (как центральном органе иммунной системы).

С помощью проточной цитофлуориметрии было изучено содержание клеток, несущих субъединицы LMP2 и LMP7, в печени на 1 и 7 сутки после интрапортальной трансфузии донорских спленоцитов. Обнаружено, что на 1 сутки после трансфузии увеличивается количество обеих субъединиц по сравнению с печенью животных, которым был введен физиологический раствор без спленоцитов (ложно-оперированный контроль). Увеличение количества LMP2 и LMP7 на 1 сутки после трансфузии происходит за счет притока в печень спленоцитов, содержащих иммунные протеасомы, а не активации иммунитета печени, так как ингибирование иммунокомпетентных клеток печени с помощью гадолиния хлорида достоверно не влияло на содержание LMP2 и LMP7. На 7 сутки после трансфузии происходило

уменьшение LMP2 и LMP7, что могло отражать элиминацию введенных спленоцитов в печени или их расселение по организму реципиента.

У животных с аллотрансплантацией без индукции ДСТ на 30 сутки установлено достоверное увеличение содержания субъединицы LMP2 в селезенке и тимусе, что может свидетельствовать о реакции иммунной системы реципиента на чужеродный трансплантационный материал и отражать процесс острого отторжения аллографта. Содержание субъединицы LMP7 достоверно не отличалось от интактного контроля во всех исследованных органах и экспериментальных группах животных, кроме животных с индукцией ДСТ, у которых в печени наблюдалось уменьшение содержания этой субъединицы на 80%.

При изучении LMP2 и LMP7 в трансплантатах на 30 сутки после операции методом вестер-блоттинга было установлено, что во всех аллографтах наблюдается увеличение количества иммунных протеасом, однако их распределение в отторгнутых и выживших трансплантатах носило неодинаковый характер: в отторгнутых аллографтах достоверно увеличивалось количество LMP7, а в выживших – LMP2.

При изучении содержания регуляторных Т-лимфоцитов с фенотипом $CD4^+CD25^+Foxp3^+$ в крови крыс на 30 сутки после аллотрансплантации не установлено достоверных различий между количеством регуляторных Т-клеток в интактном контроле и двух экспериментальных группах (аллотрансплантация с индукцией ДСТ и без таковой), хотя наблюдалась тенденция к повышению содержания данных клеток на 3-4% в экспериментальных группах по сравнению с контролем. Эти данные совпадали с результатами предыдущих работ [85, 282, 314], в которых не были обнаружены различия уровня регуляторных Т-клеток в крови у реципиентов почек с оперативной толерантностью по сравнению с контрольной группой.

На основе проведенных исследований уровень экспрессии иммунных протеасом LMP2 и LMP7 в трансплантате реципиента был оценен нами, как дающий более полную характеристику вектора иммунного ответа и

характеризующий статус трансплантата. Соотношение иммунных протеасом LMP2/LMP7 может использоваться в качестве биомаркера толерантности при трансплантации ткани эндокринных желез.

Таким образом, на основе изучения структурно-функциональной сохранности трансплантатов эндокринных тканей у реципиентов с моделями гормональной недостаточности выявлена наиболее эффективная стратегия трансплантации, которая включает в себя максимальный срок выживаемости и уровень гормональной активности трансплантата. Это дает возможность в дальнейшем использовать метод трансплантации с высокой прогнозируемостью результатов, а также определить терапевтическую ценность препаратов эндокринных тканей для использования в эндокринологии, трансплантологии, регенеративно-восстановительной и профилактической медицине. При этом, соотношение иммунных субъединиц протеасом LMP2 и LMP7 может использоваться как показатель принятия или отторжения трансплантата, на основе чего может быть создана соответствующая диагностическая тест-система.

Полученные в диссертационной работе результаты имеют практическое значение для разработки клинических подходов к оптимизации лечения гормонодефицитного состояния путем трансплантации эндокринной ткани без использования иммуносупрессантов при мониторинге биомаркеров толерантности в крови реципиента.

ВЫВОДЫ

Диссертационная работа содержит теоретическое обоснование и экспериментальное решение проблемы обеспечения структурно-функциональной сохранности эндокринных тканей при трансплантации без использования иммуносупрессантов, которое состоит в использовании криоконсервирования для снижения иммуногенности пересаживаемых тканей и индукции донор-специфической толерантности путем предтрансплантационной трансфузии свежевыделенных или криоконсервированных спленоцитов. Это позволило повысить гормональную продукцию трансплантатов ткани щитовидной железы, семенников, надпочечников, яичников, продлить срок выживаемости трансплантата в организме реципиента по сравнению с исходными показателями, а также выявить биологические маркеры трансплантационной толерантности у реципиентов.

1. Установлены морфо-функциональные изменения ткани эндокринных желез (щитовидной железы, семенников, надпочечников) после гетеротопической трансплантации под капсулу почки без применения иммуносупрессии, а также определены сроки ее выживаемости. Алло- и ксенотрансплантаты подвергаются острому отторжению, которое включает в себя лейкоцитарную инфильтрацию, развивающуюся с первых дней и достигающую максимума на 7-14 сутки, прогрессирующее уменьшение площади ткани трансплантата и замещение ее соединительной тканью к 35 суткам.

2. Морфометрические исследования позволили установить индивидуальные особенности выживаемости аллогенных и ксеногенных трансплантатов свежевыделенной ткани эндокринных желез. Площадь ткани с неповрежденной вследствие отторжения структурой на 30 сутки после трансплантации для алло- и ксенотрансплантатов составляет соответственно: 0,1 и 0,3 % для ткани щитовидной железы, 25 и 0,1% для ткани семенников и 10,5 и 20% для ткани надпочечников.

3. Криоконсервирование фрагментов надпочечников с использованием скоростей охлаждения в интервале $10 \rightarrow 100^\circ\text{C}/\text{мин}$ приводит к уменьшению количества антигенпредставляющих клеток в ткани. Показатели экспрессии CD11c как маркера дендритных клеток и CD11b как маркера моноцитарно-макрофагальных клеток уменьшаются после криоконсервирования: на 78,3 и 60% при замораживании со скоростью охлаждения $10^\circ\text{C}/\text{мин}$; на 94,1 и 93,4% при замораживании со скоростью охлаждения $>100^\circ\text{C}/\text{мин}$, соответственно.

4. Криоконсервирование с высокой скоростью охлаждения ($>100^\circ\text{C}/\text{мин}$) в комплексе с культивированием после отогрева способствует выживаемости аллогенных трансплантатов ткани надпочечников. Площадь ткани с неповрежденной структурой на 30 сутки после трансплантации криоконсервированной ткани надпочечников составила 42,2%, что в 4 раза превышало значения данного показателя, установленного при трансплантации незамороженных фрагментов ткани.

5. При использовании криоконсервированной ткани щитовидной железы и семенников для алло- и ксенотрансплантации не установлено достоверных различий в выживаемости по сравнению с незамороженным контролем. Площадь ткани с неповрежденной структурой для алло- и ксенотрансплантатов на 30 сутки после трансплантации составляет соответственно: 2,7 и 1,6 % для криоконсервированной ткани щитовидной железы; 1,9 и 0,1% для криоконсервированной ткани семенников.

6. Индукция донор-специфической толерантности путем трансфузии спленоцитов донорского происхождения в портальную вену реципиентов за 7 суток до аллотрансплантации обеспечивает высокую структурно-функциональную сохранность эндокринных тканей. Площадь ткани с неповрежденной структурой после трансплантации в условиях индукции ДСТ составляет: 82,9% для ткани яичников; 81,4% для ткани семенников; 78,4% для ткани надпочечников; 50% для ткани щитовидной железы.

7. Использование криоконсервированных спленоцитов в качестве индуцирующего толерантность агента в дозе 1×10^7 клеток/реципиента, которая была установлена для незамороженных спленоцитов, не приводит к индукции донор-специфической толерантности. Для реализации эффекта индукции ДСТ необходимо увеличение дозы криоконсервированных спленоцитов до $5,5 \times 10^7$ клеток/реципиента.

8. Показатель содержания регуляторных Т-лимфоцитов с фенотипом $CD4^+CD25^+Foxp3^+$ в периферической крови реципиентов на 30 сутки после аллотрансплантации в условиях индукции ДСТ не отражает состояния толерантности к трансплантату эндокринной ткани. Количество регуляторных Т-лимфоцитов достоверно не отличалось между показателями интактного контроля и экспериментальных животных, имевших высокую структурно-функциональную сохранность трансплантата после индукции ДСТ.

9. Экспрессия иммунных субъединиц протеасом в печени как месте введения донорских спленоцитов отражает процессы, происходящие в иммунной системе реципиентов при индукции донор-специфической толерантности. В печени животных-реципиентов, имевших высокую структурно-функциональную сохранность трансплантата на 30 сутки после трансплантации в условиях индукции ДСТ, наблюдается уменьшение экспрессии иммунной субъединицы протеасом LMP7 на 80%.

10. Сравнительная оценка содержания иммунных субъединиц протеасом в аллогraftах на 30 сутки после трансплантации в условиях индукции ДСТ позволила установить достоверную разницу в экспрессии субъединиц LMP2 и LMP7 между отторгнутыми и прижившимися трансплантатами эндокринной ткани. В аллогraftах, носивших признаки отторжения, наблюдалось увеличение содержания субъединицы LMP7, в то время как в аллогraftах, имевших высокую структурно-функциональную сохранность трансплантата, увеличивалось содержание субъединицы LMP2. На основе полученной закономерности соотношение субъединиц протеасом

LMP2/LMP7 может быть рекомендовано в качестве биомаркера толерантности иммунной системы реципиента к трансплантату.

11. Экспериментально установлено потенциальную возможность разработки клинических подходов для оптимизации лечения гормонодефицитных состояний с помощью трансплантации ткани эндокринной железы без использования иммуносупрессантов. Наиболее эффективным из изученных подходов, при котором наблюдается высокая структурно-функциональная сохранность ткани эндокринной железы и отсутствие признаков отторжения на исследуемом сроке наблюдения 30-35 суток, является трансплантация ткани в условиях индукции донор-специфической толерантности.

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ

1. Адамс Р. Методы культуры клеток для биохимиков / Р. Адамс. – М.: Мир, 1983. – 263 с.
2. Алабедадькарим Н.М. Спосіб підготовки кріоконсервованої органотипової культури надниркової залози для трансплантації / Н.М. Алабедадькарим, Г.А. Божок, Е.И. Легач, Т.П. Бондаренко // Патент 4845 А Україна, МПК⁷ A12N5/08, A61K35/55; заявл. 29.04.2004; опубл. 15.02.05, Бюл. № 2.
3. Алабедадькарим Н. М. Влияние димексида и кріоконсервирования на эффективность ксенотрансплантации надпочечников / Н. М. Алабедадькарим, В. Д. Устиченко, Г. В. Дудецкая [и др.] // Проблемы криобиологии. – 2005. – Т. 15, №3. – С. 427-428.
4. Бондаренко Т. П. Спосіб кріоконсервування культури клітин адренокортикальної тканини / Т. П. Бондаренко, Є. І. Легач. // Патент 34848 А Україна, МПК⁵ C12N5/02; заявл. 13.07.99; опубл. 15.03.01, Бюл. № 2, II ч.
5. Бондаренко Т. П. Уровень тиреоидных гормонов в плазме крови кроликов при ксенотрансплантации кріоконсервированной органной культуры щитовидной железы неонатальных поросят / Т. П. Бондаренко, Н. А. Волкова, С. В. Луговой // Проблемы криобиологии. – 2001. – №3. – С. 41-42.
6. Бондаренко Т. П. Влияние димексида на секретизирующую способность тироцитов новорожденных поросят / Т. П. Бондаренко, С. В. Луговой // Проблемы криобиологии. – 2001. – №1. – С. 48-51.
7. Волкова Н. А. Функционирование кріоконсервированной органной культуры щитовидной железы при экспериментальной аллотрансплантации / Н. А. Волкова, Т. П. Бондаренко // Проблеми медичної науки та освіти. – 2002. – №4. – С. 38-47.
8. Гаврилюк Б.К. Органотипическое культивирование тканей / Б.К. Гаврилюк, В.П. Сафронов. – М.: Наука, 1983. – 128 с.
9. Гехман Б. С. О лечении импотенции пересадкой яичка на сосудистой ножке / Б. С. Гехман // Урология и нефрология. – 1964. – №1. – С. 59-60.

10. Грищенко В. И. Новые криобиологические технологии получения клеточных и тканевых фетоплацентарных трансплантатов и их использование в медицине / В. И. Грищенко, Т. Н. Юрченко, О. С. Прокопюк // Трансплантологія. – 2004. – Т. 7, № 3. – С. 123-129.
11. Грищенко В. И. Криоконсервация тканей и клеток эндокринных органов / В. И. Грищенко, В. А. Чуйко, Н. С. Пушкаръ. – К.: Наукова думка, 1993. – 241 с.
12. Даценко Б. М. Функция щитовидной железы, подвергнутой глубокому охлаждению (-196°C) / Б. М. Даценко, В. А. Чуйко, А. А. Алюшина [и др.] // Проблемы эндокринологии. – 1975. – Т. 21, № 2. – С. 86-90.
13. Денисов В.К. Трансплантология. Учебное пособие / В.К. Денисов. – Киев: Наукова думка, 1998. – 248 с.
14. Исмаилов С. И. Криоконсервирование щитовидной железы с целью лечения гипотиреоза (экспериментально-клиническое исследование) / С. И. Исмаилов // Автореф. дис. докт. мед. наук. – Харьков, 1988. – 44 с.
15. Исмаилов С. И. Влияние криоконсервирования и факторов трансплантации на морфофункциональное состояние щитовидной железы у собак / С. И. Исмаилов, И. Х. Туракулов, Т. П. Ташходжаева [и др.] // Бюлл. эксп. биол. мед. – 1989. – Т. 108, № 12. – С. 727-730.
16. Кабак Я.М. Практикум по эндокринологии / Я.М. Кабак. – М.: Сов. наука, 1968. – С. 61-64.
17. Караченцев Ю. И. Эффективность и перспективы применения трансплантации криоконсервированной щитовидной железы как метод лечения различных форм первичного гипотиреоза, в том числе послерадиационного / Ю. И. Караченцев, И. А. Лях, В. В. Хазиев // Международный журнал радиационной медицины. – 1999. – №3-4. – С. 104-108.
18. Караченцев Ю. И. Влияние аллотрансплантации криоконсервированной ткани щитовидной железы на гормональный и иммунный статус больных постоперационным гипотиреозом / Ю. И. Караченцев, И. А. Лях, В. А. Македонская // Проблемы криобиологии. – 2001. – № 1. – С. 65-69.

19. Карпищенко А. И. Медицинская лабораторная диагностика (программы и алгоритмы). Справочник / А. И. Карпищенко. – СПб.: Интермедика, 2001. – 44 с.
20. Керос В.А. Криоконсервирование тестикулярной ткани плодов человека и создание низкотемпературного банка для использования в клинической трансплантологии / В.А. Керос // Пробл. криобиологии. – 1999. – №3. – С.54-59.
21. Клаус Д. Лимфоциты: Методы / Д. Клаус. – М.: Мир, 1990. – 395 с.
22. Легач Е. І. Комбінована трансплантація кріоконсервованих органотипових культур ендокринних залоз (експериментальне дослідження) / Легач Е. І. // Автореф. дис. докт. мед. наук. – Київ. – 2008. – 36 с.
23. Легач Е. И. Ретроградный способ тиреоидэктомии крыс как адекватная модель гипотиреоза / Е. И. Легач // Трансплантология. – 2005. – Т.8, №2. – С.92-94.
24. Легач Е. И. Трансплантация надпочечных желез / Е. И. Легач, Т. П. Бондаренко // Трансплантология. – 2005. – Т. 8, №1. – С. 21-27.
25. Легач Е. І. Ксенотрансплантація органної культури надниркових залоз. Досвід клінічного застосування при ревматоїдному артриті та бронхіальній астмі / Е. І. Легач, В. В. Сирота // Трансплантология. – 2004. – Т. 6, №2. – С. 39–41.
26. Луговой С. В. Влияние режимов замораживания на морфологические характеристики органной культуры щитовидной железы новорожденных поросят / С. В. Луговой, Т. П. Бондаренко, Т. М. Гурина [и др.] // Проблемы эндокринной патологии. – 2003. – №3. – С. 82-87.
27. Меньшиков В.В. Лабораторные методы исследования в клинике: Справочник / В.В. Меньшиков, Л.Н. Делекторская, Р.П. Золотницкая [и др.] // М.: Медицина, 1987. – 368 с.
28. Мироненко О. Н. Хирургическая профилактика послеоперационных гормональных расстройств у больных тиреоидной патологией / О. Н. Мироненко, Д. Н. Афонин, В. В. Потий // Український медичний альманах. – 2008. – Т. 11, №5. – С. 105-108.
29. Потемкин В.В. Эндокринология: Учебник / В.В. Потемкин. – М.: Медицина, 1999. – 640 с.

30. Потиха О.П. Цитологическая и гормональная характеристика клеточных культур из семенников новорожденных поросят / О.П. Потиха, И.С. Турчин, Н.Д. Тронько // Физиологический журнал. – 1990. – Т.36, №4. – С. 80-84.
31. Пушкарь Н.С. Способ консервирования щитовидной железы человека / Н. С. Пушкарь, А. М. Утевский, В. А. Чуйко [и др.] // А.с. 935050 СССР. Открытия. Изобретения. – 1982. №22. - С. 26.
32. Пушкарь Н.С. Криоконсервирование и трансплантация щитовидной железы человека / Н.С. Пушкарь, А.М. Утевский, В.А. Чуйко [и др.] // Криобиология и криомедицина. – 1983. – №11. – С.64-74.
33. Пушкарь Н. С. Аутоимплантация криоконсервированной (-196°С) тиреоидной паренхимы как метод лечения послеоперационного гипотиреоза / Н. С. Пушкарь, В. А.Македонская, А. М. Утевский [и др.] // Проблемы эндокринологии. – 1984. – Т. 30, №5. – С. 42- 46.
34. Рашитов М. М., Аллотрансплантация криоконсервированной ткани надпочечных желез у больных с хронической недостаточностью коры надпочечников / М. М. Рашитов, А. А. Норбоев // Вестник врача общей практики. – 2001. - №2. – С. 12-18.
35. Резников А.Г. Методы определения гормонов. Справочное пособие / А.Г. Резников. – К.: Наук. думка, 1980. – 400 с.
36. Ройт А. Иммунология / А. Ройт, Д. Бростофф, Д. М. Мейл. – М.: Мир, 2000. – 592 с.
37. Рузен Ранге Э. Сперматогенз у животных / Э. Рузен Ранге. – М.; Мир, 1980. – 255 с.
38. Смит О. Биологическое действие замораживания и переохлаждения / О. Смит. – М.: Изд-во иностр. лит., 1963. – 505 с.
39. Степанова Е.В. Влияние ионов кадмия на активность аминотрансфераз у потомства самок белых крыс / Е.В. Степанова, В.В. Игнатов // Известия Саратовского университета. – 2007. – Т. 7, №1. – С. 57-59.
40. Теппермен Д., Теппермен Х. Физиология обмена веществ и эндокринной системы / Д. Теппермен, Х. Теппермен. – М.:Мир, 1989. – 653 с.

41. Тронько Н.Д. Ультраструктурная характеристика органных культур надпочечников новорожденных поросят / Н.Д. Тронько, Т.И. Богданова, И.С. Турчин // Эндокринология. – 1988. – Т.34, №5. – С.65-69.
42. Турчин І.С. Трансплантація культур клітин і тканин при гіпотиреозі / І.С. Турчин, І.В. Комісаренко, Н.Д Тронько [та ін.] // Метод. рекомендації. – Київ, 1997. – 16 с.
43. Урманчеева А.Ф. Онкологические вопросы эстрогенной заместительной терапии: Пособие для врачей / А.Ф. Урманчеева, Л.М. Берштейн, М.М. Бурнина. – Москва, 2001. – 21 с.
44. Устиченко В. Д. Иммуномодулирующее влияние димексида и криоконсервирования при ксенотрансплантации надпочечников / В. Д. Устиченко, Н. М. Алабедадькарим, Т. П. Бондаренко // Трансплантологія. – 2007. – Т. 9, №1. – С. 296-298.
45. Устиченко В.Д. Гипотермическое культивирование как метод обеспечения сохранности гормонопродуцирующей активности *in vitro* нативных и криоконсервированных надпочечников новорожденных поросят / В.Д. Устиченко, Н.М. Алабедадькарим, Т.П. Бондаренко // Проблемы криобиологии. – 2008. – Т.18, №2. – С. 124-126.
46. Хаитов Р.М. Иммунология / Р.М. Хаитов. – М.: ГЭОТАР-Медиа, 2006. – 320 с.
47. Цуцаева А.А. Криоконсервирование клеточных суспензий / А.А. Цуцаева, В.А. Аграненко, Л.И. Федорова [и др.] // К.: Наук. думка, 1983. – 240 с.
48. Чуйко В. А. Биохимия криоконсервированной щитовидной железы / В. А. Чуйко, А. М. Утевский. – К.: Наукова думка, 1985. – 216 с.
49. Чуйко В. А. Функциональная активность трансплантата криоконсервированной при -196°C щитовидной железы / В. А. Чуйко // Проблемы криобиологии. – 1992. – № 3. – С. 3-14.
50. Шумаков В.И. Трансплантология (руководство для врачей) / В.И. Шумаков. – М.: Медицина, 1995. – 575 с.

51. Юрченко Т. Н. Клеточная и тканевая трансплантация. Биопрепараты / Т. Н. Юрченко, О. С. Прокопюк, В. В. Ломако. – Харьков: ИПКиК НАНУ, МНЦ криобиологии и криомедицины НАН, АМН и МЗ Украины, 2003. – 67 с.
52. Ярилин А.А. Основы иммунологии / Ярилин А.А. – М.: Медицина, 1999 – 223 с.
53. Abe Y. Induction of Foxp3-expressing regulatory T-cells by donor blood transfusion is required for tolerance to rat liver allografts / Y. Abe, H. Urakami, D. Ostanin [et al.] // PLoS One. – 2009. – Vol. 4, №11. – e7840.
54. Abrishami M. Cryopreservation of immature porcine testis tissue to maintain its developmental potential after xenografting into recipient mice / M. Abrishami, M. Anzar, Y. Yang [et al.] // Theriogenology. – 2010. – Vol. 73. – P. 86-96.
55. Alegre M. L. Toll-like receptors (TLRs) in transplantation / M. L. Alegre, A. Chong // Front. Biosci. (Elite Ed). – 2009. – Vol. 1, №1. – P. 36-43.
56. Alejandro R. Effect of anti-Ia antibodies, culture, and cyclosporin on prolongation of canine islet allograft survival / R. Alejandro, Z. Latif, J. Noel [et al.] // Diabetes. – 1987. – Vol. 36, № 3. – P. 269-273.
57. Alexander J. W. Evaluation of pre- and post-transplant donor-specific transfusion/cyclosporine A in non-HLA identical living donor kidney transplant recipients / J. W. Alexander, J. A. Light, L. A. Donaldson [et al.] // Transplantation. – 1999. – Vol. – 68. – P. 1117-1124.
58. Almeida H. Macrophages of the adrenal cortex: a morphological – of the effects of aging and dexamethasone administration / H. Almeida, J. Ferreira, D. Neves // Ann. N. Y. Acad. Sci. – 2004. – Vol. 1019. – P. 135-140.
59. Anderson C. B. Beneficial effects of donor-specific transfusions on long-term renal allograft function / C. B. Anderson, D. Brennan, C. Keller [et al.] // Transplant Proc. – 1995. – Vol. 27. – P. 991-994.
60. Andre F. Exosomes as potent cell-free peptide-based vaccine. I. Dendritic cell-derived exosomes transfer functional MHC class I/peptide complexes

to dendritic cells / F. Andre, N. Chaput, N. E. Scharz [et al.] // J. Immunol. – 2004. – Vol. 172, №4. – P. 2126.

61. Ansari M. J. Clinical transplantation tolerance: the promise and challenges / M. J. Ansari, M. H. Sayegh // Kidney Int. – 2004. – Vol. 65, № 5. – P. 1560-1563.

62. Ar'Rajab A. Immune privilege of the testis for islet xenotransplantation (rat to mouse) / A. Ar'Rajab, I.J. Dawidson, R.B. Harris [et al.] // Cell Transplant. – 1994. – Vol. 3. – P. 493-498.

63. Arrigo A.P. Identity of the 19S 'prosome' particle with the large multifunctional protease complex of mammalian cells (the proteasome) / A.P. Arrigo, K. Tanaka, A.L. Goldberg [et al.] // Nature. – 1988. – Vol. 331. – P. 192-194.

64. Ashton-Chess J. Immunoproteasome beta subunit 10 is increased in chronic antibody-mediated rejection / J. Ashton-Chess, H.L. Mai, V. Jovanovic [et al.] // Kidney Int. – 2010. – Vol. 77, №10. – P. 880-890.

65. Aspinwall C. A. Insulin-stimulated insulin secretion in single pancreatic beta cells / C. A. Aspinwall, J. R. Lakey, R. T. Kennedy // J. Biol. Chem. – 1999. – Vol. 274, №10. – P. 6360-6365.

66. Auchincloss H. Xenogeneic transplantation / H. Auchincloss // Transplantation. – 1988. – Vol. 46. – P. 1-20.

67. Auchincloss H. The role of "indirect" recognition in initiating rejection of skin grafts from major histocompatibility complex class II-deficient mice / H. Auchincloss, Jr, R. Lee, S. Shea [et al.] // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. – 1993. – Vol. 90. – P. 3373-3377.

68. Baird D. T. Long-term ovarian function in sheep after ovariectomy and transplantation of autografts stored at -196 C / D. T. Baird, R. Webb, R. Campbell [et al.] // Endocrinology. – 1999. - Vol. 140. – P. 462-471.

69. Basler M. Immunoproteasomes down-regulate presentation of a subdominant T cell epitope from lymphocytic choriomeningitis virus / M. Basler, N. Youhnovski, M. Van Den Broek [et al.] // J. Immunol. – 2004. – Vol. 173, №6. – P. 3925-3934.

70. Basu S. CD91 is a common receptor for heat shock proteins gp96, hsp90, hsp70, and calreticulin / S. Basu, R.J. Binder, T. Ramalingam [et al.] // *Immunity*. – 2001. – Vol.14. – P. 303-313.
71. Battaglioli T. Hormone therapy and thromboembolic disease / T. Battaglioli, I. Martinelli // *Curr. Opin. Hematol.* – 2007. – Vol.14, №5. – P. 488-493.
72. Benhamou P. Y. Immunomodulation of pancreatic islets by culture / P. Y. Benhamou, Y. Mullen, Lanza R. P. [et al.] // *Pancreatic Islet Transplantation*. – 1994. – Vol. II. – P. 99-109.
73. Benseler V. The liver: a special case in transplantation tolerance / V. Benseler, G. W. McCaughan, H. J. Schlitt [et al.] // *Semin Liver Dis.* – 2007. – Vol. 27. – P.194–213.
74. Billingham R.E. Actively acquired tolerance of foreign cells / R.E. Billingham, L. Brent., P.B. Medawar // *Nature*. – 1953. – V. 172, № 4379. – P. 603-606.
75. Bishop G. A. Spontaneous acceptance of liver transplants in rodents: Evidence that liver leucocytes induce recipient T-cell death by neglect / G. A. Bishop, C. Wang, A. F. Sharland [et al.] // *Immunol. Cell Biol.* – 2002. – Vol. 80. – P. 93-100.
76. Blanco B. Bortezomib induces selective depletion of alloreactive T lymphocytes and decreases the production of Th1 cytokines / B. Blanco, J.A. Pérez-Simón, L.I. Sánchez-Abarca [et al.] // *Blood*. – 2006. – Vol. 107, № 9. – P. 3575-3583.
77. Blanco B. Treatment with bortezomib of human CD4⁺ T cells preserves natural regulatory T cells and allows the emergence of a distinct suppressor T-cell population / B. Blanco, J.A. Pérez-Simón, L.I. Sánchez-Abarca [et al.] // *Haematologica*. – 2009. – Vol. 94, № 7. – P. 975-983.
78. Blander J.M. Regulation of phagosome maturation by signals from toll-like receptors / J.M. Blander, R. Medzhitov // *Science*. – 2004. Vol. 304. – P. 1014-1018.

79. Bohne F. Intra-graft expression of genes involved in iron homeostasis predicts the development of operational tolerance in human liver transplantation / F. Bohne, M. Martínez-Llordella, J.J. Lozano [et al.] // *J. Clin. Invest.* – 2012. – Vol.122, № 1. – P. 368-382.
80. Bornstein S.R. Basic and clinical aspects of intraadrenal regulation of steroidogenesis / S.R. Bornstein, M. Ehrhart-Bornstein // *Z. Rheumatol.* – 2000. – Vol. 59, Suppl 2:II. – P.12-17.
81. Borot S. Results of cryopreserved parathyroid autografts: a retrospective multicenter study / S. Borot, V. Lapierre, B. Carnaille [et al.] // *Surgery.* – 2010. – Vol. 147, №4. – P. 529–535.
82. Bowen K. M. Successful allotransplantation of mouse pancreatic islets to nonimmunosuppressed recipients / K. M. Bowen, L. Andrus, K. J. Lafferty // *Diabetes.* – 1980. – Vol. 29. - P. 98.
83. Braud C. Immunosuppressive drug-free operational immune tolerance in human kidney transplant recipients: Part I. Blood gene expression statistical analysis / C. Braud, D. Baeten, M. Giral [et al.] // *J. Cell Biochem.* – 2008. –Vol.103, № 6. – P. 1681-1692.
84. Braudeau C. Contrasted blood and intragraft toll-like receptor 4 mRNA profiles in operational tolerance versus chronic rejection in kidney transplant recipients / C. Braudeau, J. Ashton-Chess, M. Giral [et al.] // *Transplantation.* – 2008. – Vol. 86, № 1. – P.130-136.
85. Braudeau C. Variation in numbers of CD4+CD25^{high}FOXP3⁺ T cells with normal immuno-regulatory properties in long-term graft outcome / C. Braudeau, M. Racape, M. Giral [et al.] // *Transpl. Int.* – 2007. – Vol. 20, № 10. – P. 845-855.
86. Braza F. Gene expression signature in transplantation tolerance / F. Braza, J.P. Soulillou, S. Brouard // *Clin. Chim. Acta.* – 2012. – Vol. 413, № 17-18. – P. 1414-1418.
87. Breinholt 3rd J. P. A prospective analysis of the immunogenicity of cryopreserved nonvalved allografts used in pediatric heart surgery / J. P. Breinholt

3rd, J. A. Hawkins, L. M. Lambert [et al.] // *Circulation*. – 2000. – Vol. 102. – P. 179-182.

88. Brennan D.C. Long-term (> 30 months) follow-up of a single successful kidney-islet transplant recipient / D.C. Brennan, K.S. Flavin, D.W. Scharp [et al.] // *Transplant Proc.* – 1997. – Vol. 29, №4. – P. 2231-2233.

89. Brennan D. C. Donor-specific transfusion and donor bone marrow infusion in renal transplantation tolerance: A review of efficacy and mechanisms / D. C. Brennan, M. W. Flye // *Am. J. Kidney Dis.* – 1995. – Vol. – 26. – P. 701.

90. Brennan M. F. Human parathyroid cryopreservation: in vitro testing of function by parathyroid hormone release / M. F. Brennan, E. M. Brown, H. F. Sears [et al.] // *Annals of Surgery*. – 1978. – Vol. 187, №1. – P. 87–90.

91. Bretzel R.G. Rat pancreatic islet pretreatment with anti-MHC class II monoclonal antibodies and culture: in vitro MLIC test response does not predict islet allograft survival / R.G. Bretzel, B.K. Flesch, G. Brennenstuhl [et al.] // *Acta Diabetol.* – 1993. – Vol.30, №1. – P. 49-56.

92. Bretzel R. G. Impact of culture and cryopreservation on MHC class II antigen expression in canine and porcine islets / R. G. Bretzel, B. K. Flesch, B. J. Hering [et al.] // *Horm. Metab. Res.* – 1990. – Vol. 25. – P. 128-132.

93. Brevig T. Neural xenotransplantation: pretreatment of porcine embryonic nigral tissue with anti-Gal antibodies and complement is not toxic for the dopaminergic neurons / T. Brevig, M. Meyer, T. Kristensen [et al.] // *Cell Transplant.* – 2001. – Vol. 10, № 1. – P.25-30.

94. Brevig T. Xenotransplantation for brain repair: reduction of porcine donor tissue immunogenicity by treatment with anti-Gal antibodies and complement / T. Brevig, M. Meyer, T. Kristensen [et al.] // *Transplantation*. – 2001. – Vol. 72, № 2. – P. 190-196.

95. Brouard S. Identification of a gene expression profile associated with operational tolerance among a selected group of stable kidney transplant patients / S. Brouard, A. Le Bars, A. Dufay [et al.] // *Transpl. Int.* – 2011. – Vol. 24, №6. – P. 536-547.

96. Brouard S. Identification of a peripheral blood transcriptional biomarker panel associated with operational renal allograft tolerance / S. Brouard, E. Mansfield, C. Braud [et al.] // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – 2007. – Vol.104, №39. – P.15448-15453.
97. Bucher P. Morbidity associated with intraportal islet transplantation / P. Bucher, Z. Mathe, D. Bosco [et al.] // *Transplant. Proceed.* – 2004. – Vol.36, №4. – P. 1119-1120.
98. Caccitolo J. A. The current role of parathyroid cryopreservation and autotransplantation in parathyroid surgery: an institutional experience // J. A. Caccitolo, D. R. Farley, J. A. van Heerden [et al.] // *Surgery.* – 1997. – Vol. 122, №6. – P. 1062-1067.
99. Cagiannos C. Effect of major histocompatibility complex on murine intestinal graft survival / C. Cagiannos, R. Zhong, Z. Zang [et al.] // *Transplantation.* – 1998. – Vol.66. – P. 1369-1374.
100. Callery M. P. Kupffer cell blockade inhibits induction of tolerance by the portal venous route / M. P. Callery, T. Kamei, M. W. Flye // *Transplantation.* 1989. – Vol. 47. – P. 1092–1094.
101. Callery M. P. The effect of portocaval shunt on delayed hypersensitivity responses following antigen feeding / M. P. Callery, T. Kamei, M. W. Flye // *J. Surg. Res.* – 1989. – Vol. 46. – P. 391–394.
102. Calne R. Y. Induction of immunological tolerance by porcine liver allografts / R. Y. Calne, R. A. Sells, R. J. Pena [et al.] // *Nature.* – 1969. – Vol. 223. – P. 472–476.
103. Calne R. Y. Mechanisms in the acceptance of organ grafts // *Br. Med. Bull.* – 1976. – Vol. 32. – P. 107-112.
104. Candy C. J. Restoration of a normal reproductive lifespan after grafting of cryopreserved mouse ovaries / C. J. Candy, M. J. Wood, D. G. Whittingham // *Hum. Reprod.* – 2000. – Vol. 15. – P. 1300-1304.

105. Carmellini M. Transplantation of bovine pancreatic islet into thymus of nonimmunosuppressed pigs / M. Carmellini, R. Giannarelli, S. Del Guerra [et al.] // *Transplant.Proc.* – 1997. – Vol. 29. – P. 903-904.
106. Carroll J. Transplantation of frozen±thawed mouse primordial follicles / J. Carroll, R. G. Gosden // *Hum. Reprod.* – 1993. – Vol. 8. – P. 1163-1167.
107. Casiraghi F. Pretransplant infusion of mesenchymal stem cells prolongs the survival of a semiallogeneic heart transplant through the generation of regulatory T cells / F. Casiraghi, N. Azzollini, P. Cassis [et al.] // *J. Immunol.* – 2008. – Vol. 181, № 6. – P. 3933-3946.
108. Caudill C.M. T cells lacking immunoproteasome subunits MECL-1 and LMP7 hyperproliferate in response to polyclonal mitogens / C.M. Caudill, K. Jayarapu, L. Elenich [et al.] // *J. Immunol.* – 2006. – Vol. 176, №7. – P. 4075-4082.
109. Chalermkulrat W. Combined donor specific transfusion and anti-CD154 therapy achieves airway allograft tolerance / W. Chalermkulrat, K. P. McKinnon, W. J. Brickey [et al.] // *Thorax.* – 2006. – Vol. 61, № 1. – P. 61-67.
110. Chatterjee R. Patterns of Leydig cell insufficiency in adult males following bone marrow transplantation for haematological malignancies / R. Chatterjee, P. D. Kottaridis, H. H. McGarrigle [et al.] // *Bone Marrow Transplant.* – 2001. – Vol. 28. – P. 497-502.
111. Chatterjee R. Management of erectile dysfunction by combination therapy with testosterone and sildenafil in recipients of high-dose therapy for haematological malignancies / R. Chatterjee, P. D. Kottaridis, H. H. McGarrigle [et al.] // *Bone Marrow Transplant.* – 2002. – Vol. 29. – P. 607-610.
112. Chen C. H. In vivo immune modulatory activity of hepatic stellate cells in mice / C. H. Chen, L. M. Kuo, Y. Chang [et al.] // *Hepatology.* – 2006. – Vol. 44. – P. 1171-1181.
113. Chen M. Hepatocytes express abundant surface class I MHC and efficiently use transporter associated with antigen processing, tapasin, and low molecular weight polypeptide proteasome subunit components of antigen processing

and presentation pathway / M. Chen, P. Tabaczewski, S.M. Truscott [et al.] // *J. Immunol.* – 2005. – Vol.175, №32. – P.1047-1055.

114. Chen N. Prevention of Th1 responses is critical for tolerance / N. Chen, Q. Gao, E.H. Field [et al.] // *Transplantation.* – 1996. – Vol. 61, №7. – P. 1076-1083.

115. Chen W. Immunoproteasomes shape immunodominance hierarchies of antiviral CD8(+) T cells at the levels of T cell repertoire and presentation of viral antigens / W. Chen, C.C. Norbury, Y. Cho [et al.] // *J. Exp. Med.* – 2001. – Vol.193, №11. – P.1319-1326.

116. Cheng X. Interaction of programmed death-1 and programmed death-1 ligand-1 contributes to testicular immune privilege / X. Cheng, H. Dai, N. Wan [et al.] // *Transplantation.* – 2009. – Vol.87, №12. – P. 1778-1786.

117. Chryssikopoulos A. The relationship between the immune and endocrine systems / A. Chryssikopoulos // *Ann. N. Y. Acad. Sci.* – 1997. – Vol. 816. – P. 83-93.

118. Coates P. T. Dendritic cells, tolerance induction and transplant outcome / P. T. Coates, A. W. Thomson // *Am. J. Transplant.* – 2002. – Vol. 2, № 4. – P. 299-307.

119. Coffey L. C. Immune cell populations in nonhuman primate islets / L. C. Coffey, D. M. Berman, M. A. Willman [et al.] // *Cell Transplant.* – 2009. – Vol. 18. – P. 1213-1222.

120. Cohen M. S. Long-term functionality of cryopreserved parathyroid autografts: a 13-year prospective analysis / M. S. Cohen, W. G. Dilley, S. A. Wells [et al.] // *Surgery.* – 2005. – Vol. 138, №6. – P. 1033-1041.

121. Coico R. Immunology: a short course / R. Coico, G. Sunshine, E. Benjamini. – John Wiley&Sons, Inc., Hoboken, New Jersey, 2003. – 434 p.

122. Colpi G. M. Testicular function following chemo-radiotherapy / G. M. Colpi, G. F. Contalbi, F. Nerva [et al.] // *Eur. J. Obstet. Gynecol. Reprod. Biol.* – 2004. – Vol. 113, №5. – P. S2-S6.

123. Colson Y. L. Mixed allogeneic chimerism in the rat. Donor-specific transplantation tolerance without chronic rejection for primarily vascularized cardiac

allografts / Y. L. Colson, K. Zadach, M. Nalesnik [et al.] // Transplantation. – 1995. – Vol. 60, № 9. – P. 971-980.

124. Cong Y. Generation of antigen-specific, Foxp3-expressing CD4⁺ regulatory T cells by inhibition of APC proteasome function / Y. Cong, A. Konrad, N. Iqbal [et al.] // J. Immunol. – 2005. – Vol. 174, № 5. – P. 2787-2795.

125. Conrad C. Potency testing of anti-lymphocyte globulins: In vitro alternatives for the monkey skin-graft assay / C. Conrad, D. Kabelitz, G. Schaffner // ALTEX. – 1998. – Vol.15, № 5. – P. 27-30.

126. Cooper D. K. C. Xenotransplantation - state of the art // Frontiers in Bioscience. – 1996. - № 1. – P. 248-265.

127. Cooper D.K.C. Clinical xenotransplantation-how close are we? // Lancet. – 2003. – V.362. – P.557-559.

128. Coulombe M. Tolerance to antigen-presenting cell-depleted islet allografts is CD4 T cell dependent / M. Coulombe, H. Yang, L.A. Wolf [et al.] // Immunol. – 1999. – Vol.162. – P. 2503-2510.

129. Coux O. Structure and functions of the 20S and 26S proteasomes / O. Coux, K. Tanaka, A. L. Goldberg // Annu. Rev. Biochem. – 1996. – Vol. 65. – P. 801-847.

130. Crispe I. N. Cellular and molecular mechanisms of liver tolerance / I. N. Crispe, G. Matthew, K. Ingo [et al.] // Immunol. Reviews. – 2006. – Vol. 213. – P. 101-118.

131. Currie K.P. Evidence for paracrine signaling between macrophages and bovine adrenal chromaffin cell Ca(2⁺) channels / K.P. Currie, Z. Zhou, A.P. Fox // J. Neurophysiol. – 2000. – Vol.83. – P. 280-287.

132. Dahlmann B. Proteasomes / B. Dahlmann // Essays Biochem. – 2005. – Vol. 41. – P. 31-48.

133. Dahlmann B. Different proteasome subtypes in a single tissue exhibit different enzymatic properties / B. Dahlmann, T. Ruppert, L. Kuehn [et al.] // J. Mol. Biol. – 2000. – Vol.303, № 5. – P. 643-653.

134. Dai Z. Impaired recall of CD8 memory T cells in immunologically privileged tissue / Z. Dai, I.W. Nasr, M. Reel [et al.] // J. Immunol. – 2005. – Vol.174, №3. – P.1165-1170.
135. Davies C. B. Efficacy of a single pretransplant donor-specific transfusion and cyclosporin A administered 24 to 48 hours before one-haplotype-mismatched living related donor kidney transplant / C. B. Davies, J. W. Alexander, B. R. Cofer [et al.] // Ann. Surg. – 1992. – Vol. 215. – P. 618-625.
136. Deneys V. Immunologic tolerance of fetal allograft / V. Deneys, M. Van Lierde, M. De Bruyere // Presse Med. – 1995. – Vol. 24. – P. 1651-1657.
137. Denkers E. Y. Neutrophils as a source of immunoregulatory cytokines during microbial infection / E. Y. Denkers, A. J. Marshall // The Immunologist. – 1998. – Vol. 6. – P. 116-120.
138. Der Zwan A. V. Specific tolerance induction and transplantation: A single-day protocol / A. V. Der Zwan, A. C. Besseling, L. P. de Waal [et al.] // Blood. – 1997. – Vol. 89. – P. 2596.
139. Dettino A. L. A. Induction of oral tolerance and the effect of interleukin-4 on murine skin allograft rejection / A. L. A. Dettino, A. J. S. Duarte, M. N. Sato // Braz. J. Med. Biol. Res. – 2004. – Vol. 37, № 3. – P. 435-440.
140. Devitt J.J. Friesen, Early innate immune events induced by prolonged cold ischemia exacerbate allograft vasculopathy / J.J. Devitt, C.L. King, T.D.G. Lee [et al.] // J. Cardiothorac. Surg. – 2011. – Vol.6. – P. 2-8.
141. Dhanireddy K. K. Portal venous donor-specific transfusion in conjunction with sirolimus prolongs renal allograft survival in nonhuman primates / K. K. Dhanireddy, D. A. Bruno, T. A. Weaver [et al.] // Am. J. Transplant. – 2009. – Vol. 9, № 1. – P. 124-131.
142. Diaz-Peromingo J. A. Influence of gadolinium-induced kupffer cell blockade on portal venous tolerance in rat skin allograft transplantation / J. A. Diaz-Peromingo, A. Gonzalez-Quintela // Eur. Surg. Res. – 2005. – Vol. 37. – P. 45-49.

143. Donnez J. Children born after autotransplantation of cryopreserved ovarian tissue. A review of 13 live births / J. Donnez, S. Silber, C. Y. Andersen [et al.] // *Annals of Medicine*. – 2011. – Vol. 43, №6. – P. 437-450.
144. Dragun D. Novelties in diagnostics and therapy of antibody mediated rejection / D. Dragun, B. Rudolph // *Nephrol. Dial. Transplant*. – 2007. – Vol. 22, №8. – P. 50-53.
145. Dunn J. C. Y. Adrenal cortical cell transplantation / J. C. Y. Dunn, Y. Chu, M. M. Lam [et al.] // *J. Pediatr. Surg*. – 2004. – Vol. 39. – P. 1856-1858.
146. Ebstein F. Emerging roles of immunoproteasomes beyond MHC class I antigen processing / F. Ebstein, P.M. Kloetzel, E. Krüger [et al.] // *Cell Mol. Life Sci*. – 2012. – Vol.69, № 15. – P. 2543-2558.
147. Efstathiou E. Review of late complications of treatment and late relapse in testicular cancer / E. Efstathiou, C. J. Logothetis // *J. Natl. Compr. Canc. Netw*. 2006. – Vol. 4. – P. 1059-1070.
148. Eid A. Induction of transplantation tolerance by intraportal injection of allogeneic bone marrow cells. Possible implications for intrauterine bone marrow transplantation across major histocompatibility barriers / A. Eid, S. Morecki, S. Slavin // *Transpl. Int*. – 1988. – Vol. 1, № 2. – P. 109-112.
149. Ellerkamp V. A murine model of allogeneic adrenocortical cell transplantation: Perspectives for the treatment of Addison's disease in humans / V. Ellerkamp, T. J. Musholt, S. H. G. Klebs [et al.] // *Surgery*. – 2000. – Vol. 128. – P. 999-1006.
150. Emerich D.F. The testicular-derived Sertoli cell: cellular immunoscience to enable transplantation / D.F. Emerich, R. Hemendinger, C.R. Halberstadt // *Cell Transplantation*. – 2003. – Vol.12. – P.335-349.
151. Erhardt A. IL-10, regulatory T cells, and Kupffer cells mediate tolerance in concanavalin A-induced liver injury in mice / A. Erhardt, M. Biburger, T. Papadopoulos [et al.] // *Hepatology*. – 2007. – Vol. 45. – P. 475–485.
152. Ernst J.D. Phagocytosis of Bacteria and Bacterial Pathogenicity / J.D. Ernst, O. Stendahl. – Cambridge University Press, 2006. – 296 p.

153. Everly M.J. The state of therapy for removal of alloantibody producing plasma cells in transplantation / M.J. Everly, P.I. Terasaki // *Semin Immunol.* – 2012. – Vol.24, № 2. – P. 143-147.
154. Fehling H.J. MHC class I expression in mice lacking the proteasome subunit LMP-7 / H.J. Fehling, W. Swat, C. Laplace [et al.] // *Science.* – 1994. – Vol. 265, № 5176. – P. 1234-1237.
155. Ferguson J. Isolation and long-term preservation of pancreatic islets from mouse, rat and guinea pig / J. Ferguson, R. H. Allsopp, R. M. Taylor [et al.] // *Diabetologia.* – 1976. – Vol. 12, №2. – P. 115-121.
156. Flechner S. M. Allotransplantation of cryopreserved parathyroid tissue for severe hypocalcemia in a renal transplant recipient / S. M. Flechner, E. Berber, M. Askar [et al.] // *Am. J. Transplant.* – 2010. – Vol. 10, №9. – P. 2061-2065.
157. Flesch B. K. Pretreatment of rat pancreatic islets with MHC I-A monoclonal antibody: in-vitro and in-vivo effects on islet antigenicity / B. K. Flesch, R. G. Bretzel, D. A. Otto [et al.] // *Horm. Metab. Res.* – 1991. – Vol. 23, № 8. – P. 357-361.
158. Flesch B.K. Islet transplantation in experimental diabetes of the rat. XIII. Cryopreservation reduces MHC class II but not class I antigens of rat pancreatic islets / B.K. Flesch, H. Entenmann, K. Milde [et al.] // *Horm. Metab. Res.* – 1991. – Vol.23, № 1. – P. 1-6.
159. Flye M. W. Donor-specific transfusions have long-term beneficial effects for human renal allografts / M. W. Flye, K. Burton, T. Mohanakumar [et al.] // *Transplantation.* – 1995. – Vol. 60. – P. 1395-1401.
160. Foglia R.P. Can fetal and newborn allografts survive in an immunocompetent host? / R.P. Foglia, M. LaQuaglia, J. DiPreta [et al.] // *J. Pediatr. Surg.* – 1986. – Vol. 21. – P. 608-612.
161. Fox A. Evidence that macrophages are required for T-cell infiltration and rejection of fetal pig pancreas xenografts in nonobese diabetic mice / A. Fox, M. Koulmanda, T. E. Mandel [et al.] // *Transplantation.* – 1998. – Vol. 66. – P. 1407-1416.

162. Fox A. Innate and adaptive immune responses to non-vascular xenografts: evidence that macrophages are direct effectors of xenograft rejection / A. Fox, J. Mountford, A. Braakhuis [et al.] // *J. Immunol.* – 2001. – Vol. 166. – P. 2133-2140.
163. Fox-Marsh A. Emerging evidence that molecules expressed by mammalian tissue grafts are recognized by the innate immune system / A. Fox-Marsh, L.C. Harrison [et al.] // *J. Leukoc. Biol.* – 2002. – Vol. 71. – P. 401-409.
164. Fraser I. P. The serum mannosebinding protein and the macrophage mannose receptor are pattern recognition molecules that link innate and adaptive immunity / I. P. Fraser, H. Koziel, R. A. B. Ezekowitz [et al.] // *Semin. Immunol.* – 1998. – Vol. 10. – P. 363-372.
165. Freitas R.A. Nanomedicine, Vol. IIA: Biocompatibility / R.A. Freitas Jr. – Landes Bioscience, 2003. – 357 p.
166. Frisan T. Variations in proteasome subunit composition and enzymatic activity in B-lymphoma lines and normal B cells / T. Frisan, V. Levitsky, M.G. Masucci [et al.] // *Int. J. Cancer.* – 2000. – Vol.88, № 6. – P. 881-888.
167. Fu S. TGF-beta induces Foxp3 + T-regulatory cells from CD4 + CD25 – precursors / S. Fu, N. Zhang, A.C. Yopp [et al.] // *Am. J. Transplant.* – 2004. – Vol. 4, № 10. – P. 1614-1627.
168. Fucs R. Frequency of natural regulatory CD4+CD25+ T lymphocytes determines the outcome of tolerance across fully mismatched MHC barrier through linked recognition of self and allogeneic stimuli / R. Fucs, J.T. Jesus, P.H. Souza [et al.] // *J. Immunol.* – 2006. – Vol. 176, №4. – P. 2324-2322.
169. Gal I. Autotransplantation of cryopreserved thyroid tissue in dogs / I. Gal, I. Miko, I. Furka [et al.] // *Magy Seb.* – 2005. – Vol. 58. – P. 93-99.
170. Galili U. A unique natural human IgG antibody with anti-alpha-galactosyl specificity / U. Galili, E. A. Rachmilewitz, A. Peleg [et al.] // *J. Exp. Med.* – 1984. – Vol. 160, №5. – P. 1519-1531.
171. Genden E. M. Induction of donor-specific tolerance to rat nerve allografts with portal venous donor alloantigen and anti-ICAM-1/LFA-1 monoclonal

antibodies / E. M. Genden, S. E. Mackinnon, S. Yu [et al.] // *Surgery*. – 1998. – Vol. 124, № 2. – P. 448-456.

172. Genden E. M. Portal venous ultraviolet B-irradiated donor alloantigen prevents rejection in circumferential rat tracheal allografts / E. M. Genden, S. E. Mackinnon, S. Yu [et al.] // *Otolaryngol. Head. Neck. Surg.* – 2001. – Vol. 124, № 5. – P. 481-488.

173. Genden E. M. Pretreatment with portal venous ultraviolet B-irradiated donor alloantigen promotes donor-specific tolerance to rat nerve allografts / E. M. Genden, S. E. Mackinnon, S. Yu [et al.] // *Laryngoscope*. – 2001. – Vol. 111, №3. – P. 439-447.

174. Gerl A. The impact of chemotherapy on Leydig cell function in long term survivors of germ cell tumors / A. Gerl, D. Mühlbayer, G. Hansmann [et al.] // *Cancer*. – 2001. – Vol. 91. – P. 1297-1303.

175. Golshayan D. In vitro-expanded donor alloantigen-specific CD4+CD25+ regulatory T cells promote experimental transplantation tolerance / D. Golshayan, S. Jiang, J. Tsang [et al.] // *Blood*. – 2007. – Vol. 109, №2. – P. 827-835.

176. González-Hernández J.A. Macrophages within the human adrenal gland / J.A. González-Hernández, S.R. Bornstein, M. Ehrhart-Bornstein [et al.] // *Cell Tissue. Res.* – 1994. – Vol. 278. – P. 201-205.

177. Gorczynski R. M. A role for persisting antigen, antigen presentation, and ICAM-1 in increased renal graft survival after oral or portal vein donor-specific immunization / R. M. Gorczynski, Z. Chen, H. Zeng [et al.] // *Transplantation*. – 1998. – Vol. 66, № 3. – P. 339-349.

178. Gorczynski R.M. Manipulation of xenogeneic skin and/or renal graft survival in the rat-mouse concordant combination by portal pretransplant transfusion vein. / R.M. Gorczynski, X.-M. Fu, S. Chung [et al.] // *Transplant Immunology*. – 1995. – Vol. 3, № 4. – P. 321-329.

179. Gordon S. The role of the macrophage in immune regulation // *Res. Immunol.* – 1998. – Vol. 149. – P. 685-688.

180. Gores P. F. Depletion of donor Ia⁺ cells before transplantation does not prolong islet allograft survival / P. F. Gores, D. E. Sutherland, J. L. Platt [et al.] / *J. Immunol.* – 1986. – Vol. 137, № 1. – P. 1482-1485.
181. Gosden R. G. Restoration of fertility to oophorectomized sheep by ovarian autografts stored at -196 degrees C / R. G. Gosden, D. T. Baird, J. C. Wade [et al.] // *Hum. Reprod.* – 1994. – Vol. 9. – P. 597-603.
182. Gough I. R. Rat parathyroid transplantation. Allograft pretreatment with organ culture and antilymphocyte serum / I. R. Gough, M. Finnimore // *Transplantation.* – 1980. – Vol. 29, № 2. – P. 149-152.
183. Grady D. HERS Research Group. Cardiovascular disease outcomes during 6.8 years of hormone therapy: Heart and Estrogen/progestin Replacement Study follow-up (HERS II) / D. Grady, D. Herrington, V. Bittner [et al.] // *JAMA.* – 2002. – Vol. 288, №1. – P. 49-57.
184. Grau V. Dynamics of monocytes/macrophages and T lymphocytes in acutely rejecting rat renal allografts / V. Grau, B. Herbst, B. Steiniger // *Cell Tissue Res.* – 1998. – Vol. 291. – P. 117-126.
185. Green C. J. Pregnancy after autografting and allografting vascularised ovaries and en bloc vascularised ovaries with adnexa in rabbits / C. J. Green, S. Simpkin, G. Grimaldi. // *Br. J. Obstet. Gynaecol.* – 1982. – Vol. 89. – P. 645-651.
186. Green D.R. The role of Fas ligand in immune privilege / D.R. Green, T.A. Ferguson // *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.* – 2001. – Vol. 2. – P. 917-924.
187. Griffin T.A. Immunoproteasome assembly: cooperative incorporation of interferon gamma (IFN-gamma)-inducible subunits / T.A. Griffin, D. Nandi, M. Cruz [et al.] // *J. Exp. Med.* – 1998. – Vol. 187. – P. 97-104.
188. Grodstein E. A case of human intramuscular adrenal gland transplantation as a cure for chronic adrenal insufficiency / E. Grodstein, M. A. Hardy, M. J. Goldstein // *Am. J. Transplant.* – 2010. – Vol. 10. – P. 431-433.
189. Groscurth P. Cryopreservation of human fetal organs / P. Groscurth, M. Erni, M. Balzer [et al.] // *Anat. Embryol. (Berl).* – 1986. – Vol. 174, №1. – P. 105-113.

190. Gruessner R.W. Donor-specific portal blood transfusion in intestinal transplantation: a prospective, preclinical large animal study / R.W. Gruessner, R. E. Nakhleh, J. V. Harmon [et al.] // *Transplantation*. – 1998. – Vol. 66, № 2. – P. 164-169.
191. Guerrero M. A. Viability of cryopreserved parathyroid tissue: when is continued storage versus disposal indicated? / M. A. Guerrero, D. B. Evans, J. E. Lee. // *World Journal of Surgery*. – 2008. – Vol. 32, №5. – P. 836-839.
192. Guerrero M. A. Cryopreservation of parathyroid glands / M. A. Guerrero // *International Journal of Endocrinology*. – 2010. – Vol. 1. – P. 1-5.
193. Guild W.R. Successful homotransplantation of the kidney in an identical twin / W.R. Guild, J.H. Harrison, J.P. Merrill [et al.] // *Trans. Am. Clin. Climatol. Assoc.* – 1955-1956. – Vol. 67. – P. 167-173.
194. Guillaume B. Two abundant proteasome subtypes that uniquely process some antigens presented by HLA class I molecules / B. Guillaume, J. Chapiro, V. Stroobant [et al.] // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. – 2010. – Vol. 107, № 43. – P.18599-18604.
195. Gunasena K. T. Allogeneic and xenogeneic transplantation of cryopreserved ovarian tissue to athymic mice / K. T. Gunasena, J. R. T. Lakey, P. M. Villines [et al.] // *Biol. Reproduction*. – 1997. – Vol. 57. – P. 226-231.
196. Hall A. Rho GTPases: Molecular switches that control the organization and dynamics of the actin cytoskeleton / A. Hall, C.D. Nobes // *Phil. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* – 2000. – Vol. 355. – P. 965-970.
197. Hancock W. W. Composition of interstitial cellular infiltrate identified by monoclonal antibodies in renal biopsies of rejecting human renal allografts / W. W. Hancock, N. M. Thomson, R. C. Atkins // *Transplantation*. – 1983. – Vol. 35. – P. 458-463.
198. Haorah J. Alcohol and HIV decrease proteasome and immunoproteasome function in macrophages: implications for impaired immune function during disease / J. Haorah, D. Heilman, C. Diekmann [et al.] // *Cell Immunol.* – 2004. – Vol. 229, №2. – P. 139-148.

199. Hare G. M. Effect of cold preservation on lymphocyte migration into peripheral nerve allografts in sheep / G. M. Hare, P. J. Evans, S. E. Mackinnon [et al.] // *Transplantation*. – 1993. – Vol. 56. – P. 154-162.
200. Harp R. Cryopreservation of murine ovarian tissue / J. Leibach, J. Black, C. Keldahl [et al.] // *Cryobiology*. – 1994. – Vol. 31. – P. 336-343.
201. Hartman F.A. Substance which prolongs life of adrenalectomized cats / F.A. Hartman, C.J. MacArthur, W.E. Hartman // *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* – 1927. – V. 25. – P. 69-70.
202. Hartmann F. The use of cortin in Addison's disease / F. Hartmann, A. Aaron, A. Gulp // *Endocrinology*. – 1930. – V.14. – P. 438-442.
203. Hawley T. S. *Methods in Molecular Biology: Flow Cytometry Protocols*, 2nd ed. / T. S. Hawley, R. G. Hawley. – Humana Press Inc., 2004. – 567 p.
204. He F. Increased CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ regulatory T cells in tolerance induced by portal venous injection / F. He, Z. Chen, S. Xu [et al.] // *Surgery*. – 2009. – Vol. 145, № 6. – P. 663-674.
205. He H. Analysis of robust innate immune response after transplantation in the absence of adaptive immunity / H. He, J. R. Stone, D. L. Perkins // *Transplantation*. – 2002. – Vol. 73. – P. 853–861.
206. He H. Analysis of differential immune responses induced by innate and adaptive immunity following transplantation / H. He, J. R. Stone, D. L. Perkins // *Immunology*. – 2003. – Vol. 109. – P. 185–196.
207. He Y. G. Depletion of donor-derived Langerhans cells promotes corneal allograft survival / Y. G. He, J. Y. Niederkorn // *Cornea*. – 1996. – Vol. 15, № 1. – P. 82-89.
208. Hedger M.P. Testicular leukocytes: what are they doing? / M.P. Hedger // *Rev. Reprod.* – 1997. – Vol.2. – P.38-47.
209. Hem E. Freezing of rat lymphocytes. I. The effects of dimethyl sulfoxide and freezing on the phytohemagglutinin- and pokeweed mitogen-responding lymphocyte subpopulations / E. Hem // *Cryobiology*. – 1976. – Vol.13, № 2. – P. 134-141.

210. Hering B. J. Clinical islet transplantation — registry report, accomplishments in the past and future research needs / B. J. Hering, C. C. Browatzki, A. Schultz [et al.] // *Cell Transplant.* — 1993. — Vol. 2, №4. — P. 269-282.
211. Herrera M. Parathyroid autotransplantation / M. Herrera, C. Grant, J. A. Van Heerden [et al.] // *Archives of Surgery.* — 1992. — Vol. 127, №7. — P. 825-830.
212. Hollander A.A. No tolerance induction with cryopreserved bone marrow cells after allogeneic kidney transplantation and antilymphocyte globulin in rhesus monkeys / A.A. Hollander, M.J. de Waal L.P. van Bockel [et al.] // *Transplant International.* — 1997. — Vol. 10, № 3. — P. 249-250.
213. Hori J. Epithelium-deficient corneal allografts display immune privilege beneath the kidney capsule / J. Hori, N. Joyce, J. W. Streilein // *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* — 2000. — Vol. 41. — P. 443-452.
214. Hovatta O., Cryopreservation of testicular tissue in young cancer patients // *Hum. Reprod. Update.* — 2001. — №7. — P. 378-383.
215. Howell S. Gonadal damage from chemotherapy and radiotherapy / S. Howell, S. Shalet // *Endocrinol. Metab. Clin. North Am.* — 1998. — Vol. 27. — P. 927-943.
216. Hullett D. A. Enhancement of thyroid allograft survival following organ culture. Alteration of tissue immunogenicity / D.A. Hullett, A. S. Landry, D. K. Leonard [et al.] // *Transplantation.* — 1989. — Vol. 47. — P. 24-27.
217. Hullett D. A. Enhancement of thyroid allograft survival following organ culture: II. Induction of recipient peripheral tolerance / D. A. Hullett, H. W. Sollinger // *Hum. Immunol.* — 1997. — Vol. 52. — P. 127-137.
218. Hutson J. C. Changes in the concentration and size of testicular macrophages during development // *Biol. Reprod.* — 1990. — Vol. 43. — P. 885-890.
219. Ichinari H. Effects of portal venous inoculation with donor splenocytes on lung allograft survival in dogs / H. Ichinari, T. Shimizu, M. Yoshioka [et al.] // *J. Thorac. Cardiovasc. Surg.* — 1996. — Vol. 112, № 2. — P. 300-305.

220. Ingham E. The effects of variation of cryopreservation protocols on the immunogenicity of allogeneic skin grafts / E. Ingham, J. B. Matthews, J. N. Kearney [et al.] // *Cryobiology*. – 1993. – Vol. 30. – P. 443-458.
221. Iwai H. Acceptance of murine thyroid allografts by pretreatment of anti-Ia antibody or anti-dendritic cell antibody in vitro / H. Iwai, S. Kuma, M.M. Inaba [et al.] // *Transplantation*. – 1989. – Vol.47. – P. 45-49.
222. Iwakoshi N. N. Treatment of allograft recipients with donor-specific transfusion and anti-CD154 antibody leads to deletion of alloreactive CD8₊ T cells and prolonged graft survival in a CTLA4-dependent manner / N. N. Iwakoshi, J. P. Mordes, T. G. Markes [et al.] // *J. Immunol.* – 2000. – Vol. 164. – P. 512-521.
223. Iwata H. Prolongation of xenograft survival by combining donor-specific intravenous presensitization with FK 506 / H. Iwata, Y. Umeda, Y. Matsuno [et al.] // *Transplant. Proc.* – 2002. – Vol. 34. – P. 2745-2748.
224. Jackson R. Class II MHC expression in normal adrenal cortex and cortical cells in autoimmune Addison's disease / R. Jackson, A.M. McNicol, M. Farquharson [et al.] // *J. Pathol.* – 1988. – Vol.155. – P. 113-120.
225. Jahnukainen K. Effect of cold storage and cryopreservation of immature non-human primate testicular tissue on spermatogonial stem cell potential in xenografts / K. Jahnukainen, J. Ehmcke, S. D. Hergenrother [et al.] // *Hum. Reprod.* – 2007. – Vol. 22. – P. 1060-1067.
226. Janeway C. A. Innate immune recognition / C. A. Janeway, C. A., Jr. Medzhitov, R. Medzhitov // *Annu. Rev.Immunol.* – 2002. – Vol. 20. – P. 197-216.
227. Janse F. Limited value of ovarian function markers following orthotopic transplantation of ovarian tissue after gonadotoxic treatment / F. Janse, J. Donnez, E. Anckaert [et al.] // *J. Clin. Endocrinol. Metab.* – 2011. – Vol. 96, №4. – P. 1136-1144.
228. Jennings J.J. Immune reactivity of frozen-thawed murine spleen cells / J.J. Jennings, S.S. Yanari, R. Reid // *Cryobiology*. – 1978. – Vol. 15, № 3. – P. 272-278.

229. Jezek D. Effects of various cryopreservation media and freezing-thawing on the morphology of rat testicular biopsies / D. Jezek, W. Schulze, S. Kalanj-Bognar [et al.] // *Andrologia*. – 2001. – Vol. 33. – P. 368-378.
230. Jiang S. New spectrum of allorecognition pathways: implications for graft rejection and transplantation tolerance / S. Jiang, O. Herrera, R. I. Lechler // *Curr. Opin. Immunol.* – 2004. – Vol. 16, №5. – P. 550.
231. Jin Y. Simultaneous administration of a low-dose mixture of donor bone marrow cells and splenocytes plus adenovirus containing the CTLA4Ig gene result in stable mixed chimerism and long-term survival of cardiac allograft in rats / Y. Jin, Q. Zhang, J. Hao [et al.] // *Immunology*. – 2003. – Vol. 110, № 2. – P. 275-286.
232. Jose M. D. Macrophages act as effectors of tissue damage in acute renal allograft rejection / M. D Jose, Y. Ikezumi, N. van Rooijen [et al.] // *Transplantation*. – 2003. – Vol. 76. – P. 1015-1022.
233. Jung T. Oxidized proteins: intracellular distribution and recognition by the proteasome / T. Jung, N. Bader, T. Grune // *Arch. Biochem. Biophys.* – 2007. – Vol. 462, № 2. – P. 231-237.
234. Jurgens M. Activation of human epidermal Langerhans cells by engagement of the high affinity receptor for IgE, Fc epsilon RI / M. Jurgens, A.Wollenberg, D. Hanau [et al.] // *J. Immunol.* – 1995. – Vol. 155. – P. 5184–5189.
235. Kaluzhina N.N. Expression of class II HLA antigens on cryopreserved isolated mononuclear splenic cells / N.N. Kaluzhina, V.Iu Abramov // *Gematol. Transfuziol.* – 1991. – Vol. 36, № 3. – P. 5-7.
236. Kamath A.T. The development, maturation, and turnover rate of mouse spleen dendritic cell populations / A.T. Kamath, J. Pooley, M.A. O'keeffe [et al.] // *J. Immunol.* – 2000. – Vol.165. – P. 6762-6770.
237. Kamei T. Pretransplant portal venous administration of donor antigen and portal venous allograft drainage synergistically prolong rat cardiac allograft survival / T. Kamei, M. P. Callery, M. W. Flye // *Surgery*. – 1990. – Vol. 108. – P. 415-422.

238. Kamei T. Kupffer cell blockade prevents induction of portal venous tolerance in rat cardiac allograft transplantation / T. Kamei, M. P. Callery, M. W. Flye // J. Surg. Res. – 1990. – Vol. 48. – P. 393-396.
239. Karpenko L. G. The effects of freezing and cryoprotectant exposure on adenylate cyclase activity in cell membranes of bovine thyroid gland and adrenal cortex / L. G. Karpenko, N. F. Gubina, V. A. Schirova [et al.] // CryoLetters. – 2001. – Vol. 22, №4. – P. 229-234.
240. Kaufmann D. E. PD-1 and CTLA-4 inhibitory cosignaling pathways in HIV infection and the potential for therapeutic intervention / D. E. Kaufmann, B. D. Walker // J. Immunol. – 2009. – Vol. 182, № 10. – P. 5891-5897.
241. Kenick S. Prolonged cardiac allograft survival following portal venous inoculation of allogeneic cells: What is “hepatic tolerance?” / S. Kenick, R. P. Lowry, R. D. S. Forbes [et al.] // Transplant. Proc. – 1987. – Vol. 19. – P. 478-479.
242. Kenmochi T. Cryopreservation of human pancreatic islets from non-heart-beating donors using hydroxyethyl starch and dimethyl sulfoxide as cryoprotectants / T. Kenmochi, T. Asano, M. Maruyama [et al.] // Cell Transplant. – 2008. – Vol. 17, №1-2. – P. 61-67.
243. Keros V. Methods of cryopreservation of testicular tissue with viable spermatogonia in pre-pubertal boys undergoing gonadotoxic cancer treatment / V. Keros, K. Hultenby, B. Borgström [et al.] // Hum. Reprod. – 2007. – Vol. 22. – P. 1384-1395.
244. Keros V. Optimizing cryopreservation of human testicular tissue: comparison of protocols with glycerol, propanediol and dimethylsulphoxide as cryoprotectants / V. Keros, B. Rosenlund, K. Hultenby [et al.] // Hum. Reprod. – 2005. – Vol. 20. – P. 1676-1687.
245. Ketheesan N. The effect of cryopreservation on the immunogenicity of allogeneic cardiac valves / N. Ketheesan, J. N. Kearney, E. Ingham // Cryobiology. – 1996. – Vol. 33. – P. 41-53.

246. Ketheesan N. Effect of cryopreservation on the immunogenicity of umbilical cord blood cells / N. Ketheesan, C. Whiteman, A. B. Malczewski [et al.] // *Transfus. Apher. Sci.* – 2004. – Vol. 30, № 1. – P. 47-54.
247. Khoury E.L. HLA-DR expression by adrenocortical cells of the zona reticularis: structural and allotypic characterization / E.L. Khoury, J.W. Berline // *Tissue Antigens.* – 1988. – Vol. 31. – P.191-203.
248. Kiristioglu I. Long-term outcome of the fetal adrenal gland transplantation in rats / I. Kiristioglu, H. Dogruyol, I. Cavusoglu // *Eur. J. Pediatr. Surg.* – 1999. – Vol. 9. – P. 400-405.
249. Kirklin J. K. Longterm function of cryopreserved aortic homografts / J.K. Kirklin, D. Smith, W. Novick [et al.] // *J. Thorac. Cardiovasc. Surg.* – 1993. – Vol. – 106. – P. 154-166.
250. Kishimoto K. Mechanism of action of donor-specific transfusion in inducing tolerance: role of donor MHC molecules, donor co-stimulatory molecules, and indirect antigen presentation / X. Yuan, H. Jr. Auchincloss, A. H. Sharpe [et al.] // *J. Am. Soc. Nephrol.* – 2004. – Vol. – 15, № 9. – P. 2423-2428.
251. Kitade H. Early presence of regulatory cells in transplanted rats rendered tolerant by donor-specific blood transfusion / H. Kitade, M. Kawai, O. Rutgeerts [et al.] // *J. Immunol.* – 2005. – Vol. 175. – P. 4963-4970.
252. Kitamura Y. Cryopreservation of thyroid pieces-optimal freezing condition and recovery / Y. Kitamura, K. Shimizu, M. Nagahama [et al.] // *Nippon Geka Gakkai Zasshi.* – 1994. – Vol. 95. – P. 14-20.
253. Klein J.R. Characterization of a novel set of resident intrathyroidal bone marrow-derived hematopoietic cells: potential for immune-endocrine interactions in thyroid homeostasis / J.R. Klein, H.C. Wang // *J. Exp. Biol.* –2004. – Vol. 207. – P. 55-65.
254. Knechtle S. J. Development of tolerogenic strategies in the clinic // *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* – 2005. – Vol. 360. – P. 1739-1746.
255. Knolle P. A. Local control of the immune response in the liver / P. A. Knolle, G. Gerken // *Immunological Reviews.* – 2000. – Vol. 174. – P. 21-34.

256. Knolle P. A. Endotoxin downregulates T cell activation by antigen-presenting liver sinusoidal endothelial cells / P. A. Knolle, T. Germann, U. Treichel [et al.] // *J. Immunol.* – 1999. – Vol. 162. – P. 1401-1407.
257. Kobayashi E. Migration of donor cells into the thymus is not essential for induction and maintenance of systemic tolerance after liver transplantation in the rat / E. Kobayashi, N. Kamada, L. Delriviere [et al.] // *Immunology.* – 1995. – Vol. 84, № 2. – P. 333-336.
258. Kono H. How dying cells alert the immune system to danger / H. Kono, K.L. Rock // *Nat. Rev. Immunol.* – 2008. – Vol.8. – P. 279-289.
259. Korbitt G.S. Cotransplantation of allogeneic islets with allogeneic testicular cell aggregates allows long-term graft survival without systemic immunosuppression / G.S. Korbitt, J.F. Elliott, R.V. Rajotte // *Diabetes.* – 1997. – Vol. 46. – P. 317-322.
260. Korbitt G. S. Cryopreservation of rat pancreatic islets: effect of ethylene glycol on islet function and cellular composition / G. S. Korbitt, G. R. Rayat, J. Ezekowitz [et al.] // *Transplantation.* – 1997. – Vol. 64, №7. – P. 1065-1070.
261. Kukreja S.C. Allotransplantation of rat parathyroid glands: effects of organ culture and transplantation into the adrenal gland / S.C. Kukreja, P.A. Johnson, G. Ayala [et al.] // *Experientia.* – 1979. – Vol. 35. – P. 559-560.
262. Kvist K. Cryopreservation of intact testicular tissue from boys with cryptorchidism / K. Kvist, J. Thorup, A. G. Byskov [et al.] // *Hum. Reprod.* – 2006. – Vol. 21. – P. 484-491.
263. Lacy P. Prolongation of islet allograft survival following in vitro culture (24°C) and a single injection of ALS / P. Lacy, J. Davie, E. Finke // *Science.* – 1979. – Vol. 204. – P. 312-313.
264. Lakey J. R. T. Cryopreservation of human pancreatic islets / J. R. T. Lakey, P. W. Burridge, R. V. Rajotte // *Graft.* – 2002. – Vol. 5. – P. 266-276.
265. Lafferty K. J. Thyroid allograft immunogenicity is reduced after a period in organ culture / K. J. Lafferty, M.A. Cooley, J. Woolnough [et al.] // *Science.* – 1975. – Vol. 188. – P. 259-261.

266. Lafferty K. Effect of organ culture on the survival of thyroid allograft in mice / K. Lafferty, A. Bootes, G. Dart [et al.] // *Transplantation*. – 1976. – Vol. 22. – P. 138-149.
267. La Rosa F. The abrogation of thyroid allograft rejection by culture in acid medium / F. La Rosa, D. Talmage // *Transplantation*. – 1987. – Vol. 44. – P. 592.
268. La Rosa F.G. Major histocompatibility complex antigen expression of parenchymal cells of thyroid allografts is not by itself sufficient to induce rejection / F. G. La Rosa, D.W. // *Transplantation*. – 1990. – Vol. 49, № 3. – P. 605-609.
269. La Rosa F. G. The failure of a major histocompatibility antigen to stimulate a thyroid allograft reaction after culture in oxygen / F. G. La Rosa, D. W. Talmage // *J. Exp. Med.* – 1983. – Vol. 157. – P. 898-906.
270. LaRosa D. F. The innate immune system in allograft rejection and tolerance / D. F. LaRosa, A. H. Rahman, L. A. Turka // *J. Immunol.* – 2007. – Vol. 178. – P. 7503-7509.
271. Lechler R. I. Restoration of immunogenicity to passenger cell-depleted kidney allografts by the addition of donor strain dendritic cells / R. I. Lechler, J. R. Batchelor // *J. Exp. Med.* – 1982. – Vol. 155. – P. 31.
272. Lechler R. Dendritic cells in transplantation -friend or foe? / R. Lechler, Wan Fai Ng, R. M. Steinman // *Immunity*. – 2001. – Vol. 14. – P. 357–368.
273. Lees J. R. Myeloid derived suppressor cells in transplantation / J. R. Lees, A. M. Azimzadeh, J. S. Bromberg // *Current Opinion in Immunology*. – 2011. – Vol. 23, № 5. – P. 692-697.
274. Leone M. R. A comparison of 2 protocols for living-related renal transplantation in children: donor-specific transfusions versus cyclosporine / M. R. Leone, S. R. Alexander, T. Melvin [et al.] // *J. Urol.* – 1990. – Vol. 144. – P. 721-723.
275. Lezaic V. Donor-specific transfusion and renal allograft outcome / V. Lezaic, S. Jovicic, S. Simic [et al.] // *Nephron*. – 2002. – Vol. 92. – P. 246–247.
276. Li L. Macrophages, dendritic cells and kidney ischemia-reperfusion injury / L. Li, M.D. Okusa // *Semin. Nephrol.* – 2010. – Vol.30. – P. 268-277.

277. Li L. A common peripheral blood gene set for diagnosis of operational tolerance in pediatric and adult liver transplantation / L. Li, L.J. Wozniak, S. Rodder [et al.] // *Am. J. Transplant.* – 2012. – Vol.12, №5. – P. 1218-1228.
278. Li W. Costimulation blockade promotes the apoptotic death of graft-infiltrating T cells and prolongs survival of hepatic allografts from FLT3L-treated donors / W. Li, L. Lu, Z. Wang [et al.] // *Transplantation.* – 2001. – Vol. 72. – P. 1423-1432.
279. Liang J. Posttransplant infusion of donor-specific blood induces immunological unresponsiveness in rat hepatic allografts / J. Liang, Y. Yamaguchi, T. Matsuda [et al.] // *Transplantation.* – 2000. – Vol. 70. – P. 1363-1371.
280. Lipscomb M. F. Dendritic cells: immune regulators in health and disease / M. F. Lipscomb, B. J. Masten // *Physiol. Rev.* – 2002. – Vol. 82, №1. – P. 97-130.
281. Lloyd D. M. Pancreas-graft immunogenicity and pretreatment with anti-class II monoclonal antibodies / D. M. Lloyd, S. J. Cotler, A. G. Letai [et al.] // *Diabetes.* – 1989. – Vol. 38. – P. 104-108.
282. Louis S. Contrasting CD25hiCD4+T cells/FOXP3 patterns in chronic rejection and operational drug-free tolerance / S. Louis, C. Braudeau, M. Giral [et al.] // *Transplantation.* – 2006. – Vol.81, № 3. – P. 398-407.
283. London N. J. M. Clinical studies of human islet transplantation / N. J. M. London // *Ann. R. Coll. Surg. Engl.* – 1995. – Vol. 77. – P. 263-269.
284. Londoño M.C. A need for biomarkers of operational tolerance in liver and kidney transplantation / M.C. Londoño, R. Danger, M. Giral [et al.] // *Am. J. Transplant.* – 2012. – Vol.12, № 6. – P. 1370-1377.
285. Louis S. Contrasting CD25hiCD4+T cells/FOXP3 patterns in chronic rejection and operational drug-free tolerance / S. Louis, C. Braudeau, M. Giral [et al.] // *Transplantation.* – 2006. – Vol. 81, №3. – P. 398-407.
286. Lozano J.J. Comparison of transcriptional and blood cell-phenotypic markers between operationally tolerant liver and kidney recipients / J.J. Lozano, A. Pallier, M. Martinez-Llordella [et al.] // *Am. J. Transplant.* – 2011. – Vol. 11, № 9. – P. 1916-1926.

287. Lu C. Y. Xenotransplantation / C. Y. Lu, T. Khair-El-Din, I. A. Dawidson [et al.] // *FASEB J.* – 1994. – Vol. 8. – P. 1122-1130.
288. Lukyanenko Y.O. Production of 25-hydroxycholesterol by testicular macrophages and its effects on Leydig cells / Y.O. Lukyanenko, J.J. Chen, J.C. Hutson // *Biol. Reprod.* – 2001. – Vol. 64. – P. 790-796.
289. Macagno A. Dendritic cells up-regulate immunoproteasomes and the proteasome regulator PA28 during maturation / A Macagno, M Gilliet, F Sallusto [et al.] // *Eur. J. Immunol.* – 1999. – Vol. 29, №12. – P. 4037-4042.
290. MacKenzie D.A. Decreased immunogenicity of human fetal pancreas allografts following hyperbaric oxygen culture / D.A. MacKenzie, H.W. Sollinger, D.A. Hullett // *Transplant.Proc.* – 2003. – Vol. 35. – P. 1499-1502.
291. Mackie F. Donor-specific transfusions / *Nephrology.* – 2010. – Vol. 15. – P. 101-105.
292. Mandel T. E. A Comparison of organ cultured fetal pancreas allo-, iso-, and xenografts (pig) in non-immunosuppressed non-obese diabetic mice / T. E Mandel, J. Kovarik, M. Koulmanda // *Am. J. Pathology.* – 1995. – Vol. 147, № 3. – P. 834-844.
293. Mannon R.B. Chronic rejection of mouse kidney allografts / R.B. Mannon, J.B. Kopp, P. Ruiz [et al.] // *Kidney Int.* – 1999. – Vol. 55. – P. 1935-1944.
294. Margenthaler J. A. Mechanism of portal venous tolerant long-term MHC class I Ld-specific skin graft survival in transgenic 2CF1 mice / J. A. Margenthaler, K. Landeros, M. Kataoka [et al.] // *Transplant Immunol.* – 2003. – Vol. 11. – P. 23-29.
295. Markees T. G. Prolonged survival of mouse skin allografts in recipients treated with donor splenocytes and antibody to CD40 ligand / T. G. Markees, N. E. Phillips, R. J. Noelle [et al.] // *Transplantation.* – 1997. – Vol. 64. – P. 329-335.
296. Marks R. M. Rapid induction of neutrophil-endothelial adhesion by endothelial complement fixation / R. M. Marks, R. F. Todd III, P. A. Ward // *Nature.* – 1989. – Vol. 339. – P. 314-317.

297. Marti H. P. Effect of donor-specific transfusions on the outcome of renal allografts in the cyclosporine era / H.P. Marti, J. Henschkowski, G. Laux [et al.] // *Transpl. Int.* – 2006. – Vol. 19. – P. 19-26.
298. Martin P. Concept of lymphoid versus myeloid dendritic cell lineages revisited: both CD8alpha(2) and CD8alpha(1) dendritic cells are generated from CD4(low) lymphoid-committed precursors / P. Martin, G.M. Del Hoyo, F. Anjuere [et al.] // *Blood.* – 2000. – Vol. 96. – P. 2511-2519.
299. Martínez-Llordella M. Using transcriptional profiling to develop a diagnostic test of operational tolerance in liver transplant recipients / M. Martínez-Llordella, J.J. Lozano, I. Puig-Pey [et al.] // *J. Clin. Invest.* – 2008. – Vol. 118, №8. – P. 2845-2857.
300. Maruyama M. Simplified method for cryopreservation of islets using hydroxyethyl starch and dimethyl sulfoxide as cryoprotectants / M. Maruyama, T. Kenmochi, K. Sakamoto [et al.] // *Transplant Proc.* – 2004. – Vol. 36, №4. – P. 1133-1134.
301. Marx C. Relevance of major histocompatibility complex class II expression as a hallmark for the cellular differentiation in the human adrenal cortex / C. Marx, S.R. Bornstein, G.W. Wolkersdorfer [et al.] // *J. Clin. Endocrinol. Metab.* – 1997. – Vol. 82. – P. 3136-3140.
302. Mazur P. Freezing of living cells: mechanisms and implications / P. Mazur // *Am. J. Physiol.* – 1984. – Vol. 247. – P. 125-142.
303. Mazzone A. Leukocyte CD11/CD18 integrins: biological and clinical relevance / A. Mazzone, G. Ricevuti // *Haematologica.* – 1995. – Vol. 80, № 2. – P. 161-175.
304. McHenry C. R. The effect of cryopreservation on parathyroid cell viability and function / C. R. McHenry, D. B. Stenger, N. K. Calandro // *American Journal of Surgery.* – 1997. – Vol. 174, №5. – P. 481-484.
305. Medzhitov R. Innate immunity / R. Medzhitov, C. Janeway Jr. // *N. Engl. J. Med.* – 2000. – Vol. 343. – P. 338-344.

306. Meirow D. Pregnancy after Transplantation of Cryopreserved Ovarian Tissue in a Patient with Ovarian Failure after Chemotherapy / D. Meirow, J. Levron, I. Hardan [et al.] // The New England Journal of Medicine. – 2005. – Vol. 353, №3. – P. 318-321.
307. Metzger R. Organ-specific distribution of major histocompatibility antigens in rats [et al.] / R. Metzger, T. Mempel, I. Joppich // *Pediatr. Surg. Int.* – 2000. – Vol. 16. – P. 285-292.
308. Middleton D. Transfusion of one HLA-DR antigen-matched blood to potential recipients of a renal allograft / D. Middleton, J. Martin, J. Douglas [et al.] // *Transplantation.* – 1994. – Vol. 58. – P. 845.
309. Milazzo J. P. Comparison of conditions for cryopreservation of testicular tissue from immature mice / J. P. Milazzo, L. Vaudreuil, B. Cauliez [et al.] // *Human reproduction.* – 2008. – Vol. 23. – P. 17-28.
310. Mitchell R. T. Male fertility and strategies for fertility preservation following childhood cancer treatment / R. T. Mitchell, P. T. Saunders, R. M. Sharpe [et al.] // *Endocr. Dev.* – 2009. – Vol. 15. – P. 101-134.
311. Miyanari N. Persistent infiltration of CD / N. Miyanari, Y. Yamaguchi, K. Matsuno [et al.] // *Hepatology.* – 1997. – Vol. 25. – P. 1008-1013.
312. Miyauchi T. Effect of donor-specific splenocytes via portal vein and FK506 in rat small bowel transplantation / T. Miyauchi, M. Ishikawa, S. Tashiro [et al.] // *Transplantation.* – 1998. – Vol. 65, № 1. – P. 27-32.
313. Moffett J. M. Parathyroid autotransplantation / J. M. Moffett, J. Suliburk // *Endocr. Pract.* – 2011. – Vol. 17, №1. – P. 83-89.
314. Moraes-Vieira P.M. Differential monocyte STAT6 activation and CD4(+)CD25(+)Foxp3(+) T cells in kidney operational tolerance transplanted individuals / P.M. Moraes-Vieira, H.M. Silva, M.C. Takenaka [et al.] // *Hum. Immunol.* – 2010. – Vol. 71, № 5. – P. 442-450.
315. Moreland A. F. Enhancement of murine thyroid allograft survival after 16 to 20 hours' organ culture / A. F. Moreland, A. Müllbacher // *Transplantation.* – 1987. – Vol. 43, № 3. – P. 417-421.

316. Morita H. Acceptance of skin allografts in pigs by portal venous injection of donor bone marrow cells / H. Morita, N. Nakamura, K. Sugiura [et al.] // *Annals Surgery*. – 1999. – Vol. 230, № 1. – P. 114-119.
317. Morita H. A strategy for organ allografts without using immunosuppressants or irradiation / H. Morita, K. Sugiura, M. Inaba [et al.] // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. – 1998. – Vol. 95. – P. 6947-6952.
318. Moses R. D. Evidence that multiple defects in cell-surface molecule interactions across species differences are responsible for diminished xenogeneic T cell responses / R. D. Moses, H. J. Winn, I. I. Auchincloss // *Transplantation*. – 1992. – Vol. 33. – P. 203-209.
319. Mowat A. M. The regulation of immune responses to dietary protein antigens // *Immunology Today*. – 1987. – Vol. 8. – P. 93-98.
320. Muller Y. D. Transplantation tolerance: Clinical potential of regulatory T cells / Y. D. Muller, J. D. Seebach, L. H. Bühler [et al.] // *Self Nonself*. – 2011. – Vol. 2, № 1. – P. 26-34.
321. Musholt T. J. Transplantation of adrenal tissue fragments in a murine model: functional capacities of syngeneic and allogeneic grafts / T. J. Musholt, S. H. Klebs, P. B. Musholt [et al.] // *World J. Surg.* – 2002. – Vol. 26. – P. 950-957.
322. Nagasaka S. In vivo study of the effects of cryopreservation on heart valve xenotransplantation / S. Nagasaka, S. Taniguchi, Y. Nakayama [et al.] // *Cardiovasc. Pathol.* – 2005. – Vol. 14, № 2. – P. 70-79.
323. Naji A. The influence of histocompatibility and transplant site on parathyroid allograft survival / A. Naji, C.F. Barker // *J.Surg.Res.* – 1976. – Vol. 20. – P. 261-267.
324. Nakagawa K. Donor dendritic cells and recipient Kupffer cells in the induction of donor-specific immune hyporesponsiveness / K. Nakagawa, T. Matsuno, H. Iwagaki [et al.] // *J. Int. Med. Res.* – 2001. – Vol. 29. – P. 119-130.
325. Newell K.A. Immune Tolerance Network ST507 Study Group. Identification of a B cell signature associated with renal transplant tolerance in

humans / K.A. Newell, A. Asare, A.D. Kirk [et al.] // J. Clin. Invest. – 2010. – Vol. 120, № 6. – P. 1836-1847.

326. Ng T. F. Allogeneic neonatal neuronal retina grafts display partial immune privilege in the subcapsular space of the kidney / T. F. Ng, H. Osawa, J. Hori [et al.] // J. Immunol. – 2002. – Vol.169. – P. 5601-5606.

327. Nicolls M.R. The basis of immunogenicity of endocrine allografts / M.R. Nicolls, M. Coulombe, R.G. Gill // Crit. Rev. Immunol. – 2001. – Vol. 21. – P. 87-101.

328. Norman D.J. Expected clinical outcomes of kidney transplantation and risk factors / D.J. Norman, W.N. Suki // ASTP, Primer on Transplantation. – Thorofare, NJ: Slack Inc., 1997. – P. 245-250.

329. Nugent D. Transplantation in reproductive medicine: previous experience, present knowledge and future prospects / D. Nugent, D. Meirow, P. F. Brook [et al.] // Human Reproduction Update. – 1997. – Vol. 3, №3. – P. 267-280.

330. Nussdorfer G. G. Immune-endocrine interactions in the mammalian adrenal gland: facts and hypotheses / G. G. Nussdorfer, G. Mazzocchi // Int. Rev. Cytol. – 1998. – Vol.183. – P. 143-184.

331. O'Connell P. J. Donor dendritic cell persistence in organ allograft recipients in the absence of immunosuppression / P. J. O'Connell, W. J. Burlingham // J. Leukoc. Biol. – 1999. – Vol. 66, № 2. – P. 301-305.

332. Oko A. Prolongation of rat kidney graft survival after inoculation of allogeneic spleen cells: the effect of various routes of cell transfer / A. Oko, I. Idasiak-Piechocka, K. Pawlaczyk [et al.] // Ann. Transplant. – 2002. – Vol. 7, № 2. – P. 51-53.

333. Oktay K. Ovarian function after transplantation of frozen, banked autologous ovarian tissue / K. Oktay, G. N. Karlikaya // Engl. J. Med. – 2000. – Vol. 342. – P. 1919.

334. Oktay K. Endocrine function and oocyte retrieval after autologous transplantation of ovarian cortical strips to the forearm / K. Oktay, K. Economos, M. Kan [et al.] // J. Am. Med. Assoc. – 2001. - Vol. 286. – P. 1490-1493.

335. Onji M. Dendritic cells in clinics / M. Onji, S. M. F. Akbar. – Springer, 2004. – 168 p.
336. Onoe T. Liver sinusoidal endothelial cells tolerize T cells across MHC barriers in mice / T. Onoe, H. Ohdan, D. Tokita [et al.] // J. Immunol. – 2005. – Vol. 175. – P.139-146.
337. Otsuka M. Long term results of donorspecific blood transfusion with cyclosporine in living related transplantation / M. Otsuka, K. Yuzawa, Y. Takada [et al.] // Nephron. – 2001. – Vol. 88. – P. 144-148.
338. Oya H. Impact of intraportal donor-specific leukocyte transfusion for adult ABO-incompatible liver transplantation / H. Oya, Y. Sato, S. Yamamoto [et al.] // Transplant Proc. – 2009. – Vol. 41, № 1. – P. 222-225.
339. Ozinsky A. The repertoire for pattern recognition of pathogens by the innate immune system is defined by cooperation between toll-like receptors / A. Ozinsky, D. M. Underhill, J. D. Fontenot [et al.] // Proc. Nat. Acad. Sci. USA. – 2000. – Vol. 97. – P. 13766-13771.
340. Parker D. C. Survival of mouse pancreatic islet allografts in recipients treated with allogeneic small lymphocytes and antibody to CD40 ligand / D. C. Parker, D. L. Greiner, N. E. Phillips [et al.] // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. – 1995. – Vol. 92, № 21. – P. 9560-9564.
341. Parker G. A. Liver immunobiology / G. A. Parker, C. A. Picut // Toxicol. Pathol. – 2005. – Vol. 33, № 1. – P. 52-62.
342. Parr E. Cellular changes in cultured mouse thyroid glands and islets of Langerhans / E. Parr, K. Bowen, K. Lafferty // Transplantation. – 1980. – Vol. 30. – P. 135-139.
343. Patarroyo M. Leukocyte-cell adhesion: a molecular process fundamental in leukocyte physiology / M. Patarroyo, J. Prieto, J. Rincon [et al.] // Immunol. Rev. – 1990. – Vol. 114. – P. 67-108.
344. Patel R. D. Ahmedabad tolerance induction protocol and chronic renal allograft dysfunction: pathologic observations and clinical implications / R. D. Patel, A. V. Vanikar, F. A. Aziz [et al.] // Diagn. Pathol. – 2009. – Vol. 4. – P. 4-9.

345. Paterno F. Bortezomib for acute antibody-mediated rejection in liver transplantation / F. Paterno, M. Shiller, G. Tillery [et al] // *Am. J. Transplant.* – 2012. – Vol. 12, № 9. – P. 2526-2531.
346. Penfornis A. Immunosuppressive drug-induced diabetes / A. Penfornis, S. Kury-Paulin // *Diabetes Metab.* – 2006. – Vol. 32, № 5. – P. 539-546.
347. Perry D. K. Proteasome inhibition causes apoptosis of normal human plasma cells preventing alloantibody production / D. K. Perry, J. M. Burns, H. S. Pollinger [et al.] // *Am. J. Transplant.* – 2009. – Vol. 9, № 1. – P. 201-209.
348. Pierre P. Developmental regulation of invariant chain proteolysis controls MHC class II trafficking in mouse dendritic cells / P. Pierre, I. Mellman // *Cell.* – 1998. – Vol. 93. – P. 1135-1145.
349. Pujol-Borrell I. Differential expression and regulation of MHC products in the endocrine and exocrine cells of the human pancreas / Pujol-Borrell, I. Todd, M. Doshi [et al.] // *Clin. Exp. Immunol.* – 1986. – Vol. 65. – P. 128-139.
350. Qian J. H. Studies on the induction of tolerance to alloantigens. 1. The abrogation of potentials for delayed-type hypersensitivity responses to alloantigens by portal venous inoculation with allogeneic cells / J. H. Qian, T. Hashimoto, H. Fujiwara [et al.] // *J. Immunol.* – 1985. – Vol. 134. – P. 3656-3662.
351. Quigley R. L. Transfusion induces blood donor-specific suppressor cells / R. L. Quigley, K. J. Wood, P. J. Morris // *J. Immunol.* – 1989. – Vol. 142. – P. 463-470.
352. Racapé M. The involvement of SMILE/TMTC3 in endoplasmic reticulum stress response / M. Racapé, J. P. Duong Van Huyen, R. Danger [et al.] // *PLoS One.* – 2011. – Vol. 6, № 5. – P. 193-21.
353. Racusen L. C. Antibody-mediated rejection in renal allografts: lessons from pathology / L. C. Racusen, M. Haas // *Clin. J. Am. Soc. Nephrol.* – 2006. – Vol. 1. – P. 415-420.
354. Radford J. A. Orthotopic reimplantation of cryopreserved ovarian cortical strips after high-dose chemotherapy for Hodgkin's lymphoma / J. A. Radford, B. Lieberman, D. Brison [et al.] // *Lancet.* – 2001. – Vol. 357. – P. 1172-1175.

355. Rajotte R. V. Viability studies on frozen-thawed rat islets of Langerhans / R. V. Rajotte, H. L. Stewart, W. A. Voss [et al.] // *Cryobiology*. – 1977. – Vol. 14, №1. – P. 116-120.
356. Rajotte R. V. Optimizing cryopreservation of isolated islets / R. V. Rajotte, G. L. Warnock, N. M. Kneteman [et al.] // *Transplant Proc.* – 1989. – Vol. 21, №1. – Pt 3. – P. 2638-2640.
357. Rayat G. R. The degree of phylogenetic disparity of islet grafts dictates the reliance on indirect CD4 T-cell antigen recognition for rejection / G. R. Rayat, Z. A. Johnson, J. N. Beilke [et al.] // *Diabetes*. – 2003. – Vol. 52, № 6. – P. 1433-1440.
358. Reichle F. A. Fate of experimental allogeneically transplanted fetal adrenal glands in nonimmunosuppressed adrenalectomized adult rats / F. A. Reichle, M. A. Obando, R. M. Reichle [et al.] // *Transplant. Proc.* – 1977. – Vol. 9. – P. 347-350.
359. Rich S. J. Cryopreservation of rat islets of Langerhans: a comparison of two techniques / S. J. Rich, S. Swift, S. M. Thirdborough [et al.] // *Cryobiology*. – 1993. – Vol. 30, №4. – P. 407-412.
360. Ricordi C. Transplantation of cryopreserved human pancreatic islets into diabetic nude mice / C. Ricordi, N. M. Kneteman, D. W. Scharp [et al.] // *World J. Surg.* – 1988. – Vol. 12, № 6. – P. 861-864.
361. Regnault A. Fcγ receptor-mediated induction of dendritic cell maturation and major histocompatibility complex class I-restricted antigen presentation after immune complex internalization / A. Regnault, D. Lankar, V. Lacabanne [et al.] // *J. Exp. Med.* – 1999. – Vol. 189. – P. 371-380.
362. Rock K. L. Degradation of cell proteins and the generation of MHC class I-presented peptides / K. L. Rock, A. L. Goldberg // *Annu. Rev. Immunol.* – 1999. – Vol. 17. – P. 739-779.
363. Rossini A. A. Induction of immunologic tolerance for transplantation / A. A. Rossini, D. L. Greiner, J. P. Mordes // *Physiol. Rev.* – 1999. – Vol. 79, №1. – P. 99-141.

364. Rossini A. A. Induction of islet transplantation tolerance using donor specific transfusion and anti-CD154 monoclonal antibody / A. A. Rossini, J. P. Mordes, T. G. Markees [et al.] // *Transplant Proc.* – 1999. – Vol. 31. – P. 629-632.
365. Rutzky L. P. Microgravity culture conditions reduces immunogenicity and improves function of pancreatic islets / L. P. Rutzky, S. Bilinski, M. Kloc [et al.] // *Transplantation.* – 2002. – Vol. 74, № 1. – P. 13-21.
366. Sagoo P. Development of a cross-platform biomarker signature to detect renal transplant tolerance in humans / P. Sagoo, E. Perucha, B. Sawitzki [et al.] // *J. Clin. Invest.* – 2010. – Vol. 120, № 6. – P. 1848-1861.
367. Sakonju I. Cryopreservation of isolated rat islets of Langerhans in the presence of ethylene glycol or dimethyl sulfoxide: evaluation of toxicity and the dynamic pattern of subsequent insulin release in vitro / I. Sakonju, Y. Taura, Y. Inayoshi [et al.] // *Cryobiology.* – 1996. – Vol. 33, №3. – P. 354-362.
368. Salvatierra O. Jr. Deliberate donorspecific blood transfusions prior to living related renal transplantation. A new approach / O. Jr. Salvatierra, F. Vincenti, W. Amend [et al.] // *Ann. Surg.* – 1980. – Vol. 192. – P. 534-552.
369. Sanberg P. R. Testis-derived Sertoli cells survive and provide localized immunoprotection for xenografts in rat brain / P. R. Sanberg, C. V. Borlongan, S. Saporta [et al.] // *Nat. Biotechnol.* – 1996. – Vol. 14 – P. 1692-1695.
370. Sandler S. Cryopreservation of mouse pancreatic islets. Effects of fast cooling on islet B cell function and on the outcome of islet transplantation // S. Sandler, Y. Kojima, A. Andersson // *Transplantation.* – 1986. – Vol. 42, №6. – P. 588-593.
371. Santos R. R. Osmotic tolerance and freezability of isolated caprine early-staged follicles / R. R. Santos, T. van Haften, B. A. J. Roelen [et al.] // *Cell Tissue Res.* – 2008. – Vol. 333. – P. 323-331.
372. Sato T. Class II MHC-expressing cells in the rat adrenal gland defined by monoclonal antibodies / T. Sato // *Histochem. Cell. Biol.* – 1998. – Vol. 109. – P. 359-367.

373. Sato Y. Regulatory T-cell activation among patients who displayed operational tolerance following intra-portal administration of donor-specific antigens in living donor liver transplantation / Y. Sato, T. Chikako, H. Oya [et al.] // *Transplant Proc.* – 2012. – Vol. 44, № 2. – P. 560-564.

374. Sato Y. Impact of 70% partial hepatectomy on administration of donor leukocytes in cardiac transplantation in rats / Y. Sato, O. Farges, D. Buffello [et al.] // *Transplant. Proc.* – 1998. – Vol. 30. – P. 3873-3875.

375. Sato Y. Macrochimerism of donor type CD56+CD3+T cells in donor specific transfusion via portal vein following living related donor liver transplantation / Y. Sato, T. Ichida, H. Watanabe [et al.] // *Hepatogastroenterology.* – 2003. – Vol. 50. – P. 21-61.

376. Sato Y. Repeating intraportal donor-specific transfusion may induce tolerance following adult living-related donor liver transplantation / Y. Sato, T. Ichida, H. Watanabe [et al.] // *Hepatogastroenterology.* – 2003. – Vol. 50. – P. 601-606.

377. Sato Y. Dendritic cells in the rat pituitary gland evaluated by the use of monoclonal antibodies and electron microscopy / Y. Sato, K. Inoue // *Arch. Histol. Cytol.* – 2000. – Vol. 63. – P. 291-303.

378. Sato Y. Role of recipient CD56+CD3+ cells in the graft in living-related partial liver transplantation / Y. Sato, H. Watanabe, S. Yamamoto [et al.] // *Transplant Proc.* – 2000. – Vol. 32. – P. 2131.

379. Satoh S. Long-term graft survival with or without donor-specific transfusion in cyclosporine era in one haplo-identical living related renal transplant recipients beyond the first year: a 19 year experience / S. Satoh, J. Sugimura, S. Omori [et al.] // *Tohoku J. Exp. Med.* – 2002. – Vol. 197. – P. 201-207.

380. Saxe A. W. Deferred parathyroid autografts with cryopreserved tissue after reoperative parathyroid surgery / A. W. Saxe, A. M. Spiegel, S. J. Marx [et al.] // *Archives of Surgery.* – 1982. - Vol. 117, №5. – P. 538-543.

381. Saxe A. W. In vitro assessment of parathyroid immunogenicity: the effect of cryopreservation / A. W. Saxe, G. Gibson, E. Elfont // *Surgery*. – 1990. – Vol. 108. – P. 56-62.
382. Sayegh M. H. Role of indirect allorecognition in allograft rejection / M. H. Sayegh, C. B. Carpenter // *Int. Rev. Immunol.* – 1996. – Vol. 13. – P. 221-229.
383. Schlatt S. Spermatogenesis and steroidogenesis in mouse, hamster and monkey testicular tissue after cryopreservation and heterotopic grafting to castrated hosts / S. Schlatt, S. S. Kim, R. Gosden // *Reproduction*. – 2002. – Vol. 124. – P. 339-346.
384. Schnorr J. Functional studies of subcutaneous ovarian transplants in non-human primates: steroidogenesis, endometrial development, ovulation, menstrual patterns and gamete morphology / J. Schnorr, S. Oehninger, J. Toner [et al.] // *Hum. Reprod.* – 2002. – Vol. 17. – P. 612-619.
385. Schober A. Distinct populations of macrophages in the adult rat adrenal gland: a subpopulation with neurotrophin-4-like immunoreactivity / A. Schober, K. Huber, J. Fey [et al.] // *Cell Tissue Res.* – 1998. – Vol. 291. – P. 365-373.
386. Schuurman H. J. Pathology of xenograft rejection: a commentary / H. J. Schuurman, J. Cheng, T. Lam // *Xenotransplantation*. – 2003. – Vol. 10, №4. – P. 293-299.
387. Seeliger H. Transplantation of H-2Kb-transgenic adrenocortical cells in the mouse having undergone an adrenalectomy: functional and morphological aspects / H. Seeliger, M. W. Hoffmann, M. Behrend [et al.] // *Transplantation*. – 2000. – Vol. 69. – P. 1561-1566.
388. Seetharam A. Alloimmunity and autoimmunity in chronic rejection / A. Seetharam, V. Tiriveedhi, T. Mohanakumar // *Curr. Opin. Organ Transplant.* – 2010. – Vol. 15, №4. – P. 531-536.
389. Selawry H. P. Islet transplantation to immunoprivileged sites / H. P. Selawry, R. P. Lanza, W. L. Chick [et al.] // *Pancreatic islet transplantation*. – 1994. – Vol. II. – P. 75-86.

390. Selawry H. P. Extended allograft survival of islets after intra-abdominally placed testis / H. P. Selawry, K. Whittington // *Diabetes*. – 1984. – Vol. 33. – P. 405-406.
391. Shapiro A. M. International trial of the Edmonton protocol for islet transplantation / A. M. Shapiro, C. Ricordi, B. J. Hering [et al.] // *N. Engl. J. Med.* – 2006. – Vol. 355, №13. – P. 1318-1330.
392. Sharabi Y. Mixed chimerism and permanent specific transplantation tolerance induced by a nonlethal preparative regimen / Y. Sharabi, D. H. Sachs // *J. Exp. Med.* – 1989. – Vol. 169. – P. 493.
393. Sharma R. K. Role of preoperative donorspecific transfusion and cyclosporine in haplo-identical living related renal transplantation recipients / R. K. Sharma, P. K. Rai, A. Kumar [et al.] // *Nephron*. – 1997. – Vol. 75. – P. 20-24.
394. Sharova N. P. New approach to study of T cellular immunity development: Parallel investigation of lymphoid organ formation and changes in immune proteasome amount in rat early ontogenesis / N. P. Sharova, L. A. Zakharova, T. M. Astakhova [et al.] // *Cell. Immunol.* – 2009. – Vol. 256. – P. 47-55.
395. Sheng Sun D. Prolonged survival of donor-specific rat intestinal allograft by administration of bone-marrow-derived immature dendritic cells / D. Sheng Sun, H. Iwagaki, M. Ozaki [et al.] // *Transplant Immunology*. – 2005. – Vol. 14. – P.17-20.
396. Sheng Sun D. Combined effect of donor-specific bone marrow transplantation via portal vein and FK506 on small bowel transplantation in the rat / D. Sheng Sun, A. Nakao, T. Yagi [et al.] // *Transplant Proc.* – 2000. – Vol. 32, № 7. – P. 2011-2012.
397. Sheng Sun D. Intraportal donor bone marrow transplantation improves intestinal allograft survival in rats under FK506-based immunosuppression / D. Sheng Sun, T. Yagi, T. Oyama [et al.] // *J. Int. Med. Res.* – 2003. – Vol. 31. – P. 281-289.

398. Shilling R. A. Immunobiology of chronic lung allograft dysfunction: new insights from the bench and beyond / R. A. Shilling, D. S. Wilkes // *Am. J. Transplant.* – 2009. – Vol. 9. – P. 1714-1718.
399. Shiloh H. The influence of cryopreservation on the ultrastructural morphology of human thyroid cells / H. Shiloh, T. C. Iancu, M. Sheinfeld [et al.] // *Cryobiology.* – 1987. – Vol. 24. – P. 303-310.
400. Shimizu K. Trial of autotransplantation of cryopreserved thyroid tissue for postoperative hypothyroidism in patients with Graves' disease / K. Shimizu, S. Kumita, Y. Kitamura [et al.] // *J. Am. Coll. Surg.* – 2002. – Vol. 194. – P. 14-22.
401. Shorter R. G. Effects of freezing and storage on survival of thyroid autografts / R. G. Shorter, J. L. Titus, F. W. L. Kerr [et al.] // *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* – 1963. – Vol. 113. – P. 77-75.
402. Shortman K. Burnet oration: dendritic cells: multiple subtypes, multiple origins, multiple functions / K. Shortman // *Immunol. Cell Biol.* – 2000. – Vol. 78. – P. 161-165.
403. Sijts E. J. The role of the proteasome in the generation of MHC class I ligands and immune responses / E. J. Sijts, P. M. Kloetzel. - *Cell Mol. Life Sci.* – 2011. – Vol. 68, № 9. – P. 1491-1502.
404. Singh-Jasuja H. The heat shock protein gp96 induces maturation of dendritic cells and down-regulation of its receptor / H. Singh-Jasuja, H. U. Scherer, N. Hilf [et al.] // *Eur. J. Immunol.* – 2000. – Vol. 30. – P. 2211-2215.
405. Snell G.D. The homograft reaction // *Annu. Rev. Microbiol.* – 1957. – Vol. 11. – P. 439-458.
406. Sogut I. Cryopreservation of spleen and lymph nodes as a source of mononuclear cells to be used for the development of monoclonal antibody producing hybridoma cells / I. Sogut, I. Hatipoglu, M. Serhatli [et al.] // *Cryo Letters.* – 2011. – Vol. 32, № 3. – P. 266-274.
407. Solanes N. Cryopreservation alters antigenicity of allografts in a porcine model of transplant vasculopathy / N. Solanes, M. Rigol, M. Castellà [et al.] // *Transplant Proc.* – 2004. – Vol. 36. – P. 3288-3294.

408. Sonoda T. Donor-specific transfusion: a report of the Japanese Renal Transplant Registry / T. Sonoda, M. Ishibashi // Clin. Transpl. – 1987. – P. 257-260.
409. Spanel-Borowski K. Footmarks of innate immunity in the ovary and cytokeratin-positive cells as potential dendritic cells / K. Spanel-Borowski K. // Adv. Anat. Embryol. Cell Biol., Springer, 2011. – 110 p.
410. Stahl P. D. The mannose receptor and other macrophage lectins // Curr. Opin. Immunol. – 1992. – Vol. 4. – P. 49-52.
411. Starzl T. E. Tolerogenic immunosuppression for organ transplantation / T. E. Starzl, N. Murase, K. Abu-Elmagd [et al.] // Lancet. – 2003. – Vol. 361. – P. 1502-1510.
412. Stastny P. Role of immunoglobulin (Ig)-G and IgM antibodies against donor human leukocyte antigens in organ transplant recipients / P. Stastny, S. Ring, C. Lu [et al.] // Hum. Immunol. – 2009. – Vol. 70. – P. 600-604.
413. Steel C. M. The sheep-cell rosette: test on human peripheral blood lymphocytes: an analysis of some analysis of some variable factors in the technique / C. M. Steel, J. Evans, M. A. Smith // Br. J. Haematol. – 1974. – Vol.28, № 2. – P. 245-251.
414. Steinman R. M. Identification of a novel cell type in peripheral lymphoid organs of mice. I. Morphology, quantitation, tissue distribution / R. M. Steinman, Z. A. Cohn // J. Exp. Med. – 1973. – Vol. 137. – P. 1142-1162.
415. Steinman R. M. Identification of a novel cell type in peripheral lymphoid organs of mice. II. Functional properties in vitro / R. M. Steinman, Z. A. Cohn // J. Exp. Med. – 1974. – Vol. 139. – P. 380-397.
416. Stepkowski S. M. Immature syngeneic dendritic cells potentiate tolerance to pancreatic islet allografts depleted of donor dendritic cells in microgravity culture condition / S. M. Stepkowski, T. Phan, H. Zhang [et al.] // Transplantation. – 2006. – Vol. 82. – P. 1756-1763.
417. Stewart G. N. The influence of extracts of adrenal cortex on the survival period of adrenalectomized dogs and cats / G. N. Stewart, J. M. Rogoff // Am. J. Physiol. – 1929. – Vol. 91. – P. 254-264.

418. Stock P. G. Modulation of MHC class I antigen decreases pancreatic islet immunogenicity / P. G. Stock, N. L. Ascher, S. Chen [et al.] // J. Surg. Res. – 1989. – Vol. 46, № 4. – P. 317-321.
419. Strehl B. Interferon-gamma, the functional plasticity of the ubiquitin-proteasome system, and MHC class I antigen processing / B. Strehl, U. Seifert, E. Kruger [et al.] // Immunol. Rev. – 2005. – Vol. 207. – C. 19-30.
420. Streilein J. W. Ocular immune privilege: therapeutic opportunities from an experiment of nature // Nat. Rev. Immunol. – 2003. – Vol. 3, № 11. – P. 879-889.
421. Suss G. A subclass of dendritic cells kills CD4 T cells via Fas/Fas-ligand-induced apoptosis / G. Suss, K. Shortman // J. Exp. Med. – 1996. – Vol. 183. – P. 1789-1796.
422. Suthanthiran M. Transplantation tolerance: Fooling mother nature / Proc. Natl. Acad. Sci. – 1996. – Vol. 93. – P. 12072-12075.
423. Takeuchi T. Heart allografts in murine systems. The differential activation of Th2-like effector cells in peripheral tolerance / T. Takeuchi, R. P. Lowry, B. Konieczny // Transplantation. – 1992. – Vol. 53. – P. 1281-1294.
424. Takeuchi H. Implantation of xenografts into the parkinsonian rat brain after portal venous administration of xenogeneic donor spleen cells / H. Takeuchi, M. Yoshikawa, S. Kanda [et al.] // J. Neurosurg. – 2001. – Vol. 94, № 5. – P. 775-781.
425. Talmage D. W. Activation of transplant immunity: effect of donor leukocytes on thyroid allograft rejection / D. W. Talmage, G. Dart, J. Radovich [et al.] // Science. – 1976. – Vol. 191. – P. 385.
426. Talmage D. W. Effect of oxygen pressure during culture on survival of mouse thyroid allografts / D. W. Talmage, G. A. Dart // Science. – 1978. – Vol. 200. – P. 1066.
427. Taniguchi A. Expression of vascular endothelial growth factor and its receptors flk-1 andflt-1 during the regeneration of autotransplanted adrenal cortex in the adrenalectomized rat / A. Taniguchi, T. Tajima, K. Nonomura [et al.] // J. Urol. – 2004. – Vol. 171. – P. 2445-2449.

428. Taniguchi H. Presence of hematopoietic stem cells in the adult liver / H. Taniguchi, T. Toyoshima, K. Fukao [et al.] // – Nature Med. – 1996. – Vol. 2. – P. 198-203.
429. Tanoue M. The role of complement-derived chemotactic factors in lung injury induced by preformed immune complexes / M. Tanoue, Y. Yoshizawa, T. Sato [et al.] // Int. Arch. Allergy Immunol. – 1993. – Vol. 101. – P. 47-51.
430. Taylor M. J. Selective destruction of leucocytes by freezing as a potential means of modulating tissue immunogenicity: membrane integrity of lymphocytes and macrophages / M. J. Taylor, H. L. Bank, M. J. Benton // Cryobiology. – 1987. – Vol. 24. – P. 91-102.
431. Taylor M. J. Function of lymphocytes and macrophages after cryopreservation by procedures for pancreatic islets: potential for reducing tissue immunogenicity / M. J. Taylor, H. L. Bank // Cryobiology. – 1988. – Vol. 25. – P. 1-17.
432. Taylor M. J. The cryobiology of rat and human dendritic cells: preservation and destruction of membrane integrity by freezing / M. J. Taylor, N. J. London, S. M. Thirdborough [et al.] // Cryobiology. – 1990. – Vol. 27. – P. 269-278.
433. Tewari M. K. A cytosolic pathway for MHC class II-restricted antigen processing that is proteasome and TAP dependent /M. K. Tewari, G. Sinnathamby, D. Rajagopal [et al.] // Nat. Immunol. – 2005. – Vol. 6. – P. 287-294.
434. Thery C. Indirect activation of naive CD4⁺ T cells by dendritic cell-derived exosomes / C. Thery, L. Duban, E. Segura [et al.] // Nat. Immunol. – 2002. – Vol. 3, №12. – P. 1156.
435. Thusoo T. K. Autotransplantation of cryopreserved thyroid tissue / T. K. Thusoo, D. Das // J. Am.Coll. Surg. – 2003. – Vol. 196. – P. 663-664.
436. Tian C. Persistence of antigen is required to maintain transplantation tolerance induced by genetic modification of bone marrow stem cells / C. Tian, J.Bagley, J. Iacomini // Am. J. Transplant. – 2006. – Vol. 9. – P. 2202-2207.
437. Tiegs G. Immune tolerance: what is unique about the liver / G. Tiegs, A. W. Lohse // J. Autoimmun. – 2010. – Vol. 34, № 1. – P. 1-6.

438. Till H. Fetal adrenal transplants respond to ACTH and prevent addisonian crisis in adrenalectomized rats / H. Till, S. Kellnar, C. J. Strassburger [et al.] // *Pediatr. Surg. Int.* – 1998. – Vol. 13. – P. 271-273.
439. Till H. Cryopreservation and transplantation of fetal adrenal glands in adrenalectomized rats / H. Till, D. Stachel, J. Muller-Hocker J. [et al.] // *Eur. J. Pediatr. Surg.* – 1998. – Vol. 8. – P. 240-243.
440. Till H. Proliferation, zonal maturation, and steroid production of fetal adrenal transplants in adrenalectomized rats / H. Till, R. Metzger, T. Mempel [et al.] // *Pediatr. Surg. Int.* – 2000. – Vol. 16. – P. 293-296.
441. Tokita D. Liver sinusoidal endothelial cells that endocytose allogeneic cells suppress T cells with indirect allospecificity / D. Tokita, M. Shishida, H. Ohdan [et al.] // *J. Immunol.* – 2006. – Vol. 177. – P. 3615-3624.
442. Tomita Yu. Immune and non-immune factors in cryopreserved tissues/ Yu. Tomita, M. Yoshikawa, Q. W. Zhang [et al.] // *J. Heart Lung Transplant.* – 2003. – Vol. 22. – P. 560-567.
443. Tournaye H. Preserving the reproductive potential of men and boys with cancer: current concepts and future prospects / H. Tournaye, E. Goossens, G. Verheyen [et al.] // *Human Reproduction Update.* – 2004. – Vol. 10, №6. – P. 525-532.
444. Trammer A. Transplantation of fetal adrenal glands in syngeneic rat strains / A. Trammer, S. Kellnar, U. Welsch [et al.] // *Eur. J. Pediatr. Surg.* – 1994. – Vol. 4. – P. 249-252.
445. Trivedi H. L. High-dose peripheral blood stem cell infusion: A strategy to induce donor-specific hyporesponsiveness to allografts in pediatric renal transplant recipients / H. L. Trivedi, V. R. Shah, A. V. Vanikar [et al.] // *Pediatr. Transplant.* – 2002. – Vol. 6. – P. 63-68.
446. Trivedi H. L. Allogeneic hematopoietic stem-cell transplantation, mixed chimerism, and tolerance in living related donor renal allograft recipients / H. L. Trivedi, A. V. Vanikar, P. R. Modi [et al.] // *Transplant Proc.* – 2005. – Vol. 37. – P. 737-742.

447. Trombetta E. S. Cell biology of antigen processing in vitro and in vivo / E. S. Trombetta, I. Mellman // *Annual Review of Immunology*. – 2005. – Vol. 23. – P. 975-1028.
448. Tryde Schmidt K. L. Orthotopic autotransplantation of cryopreserved ovarian tissue to a woman cured of cancer - follicular growth, steroid production and oocyte retrieval / K. L. Tryde Schmidt, C. Yding Andersen, J. Starup [et al.] // *Reprod. Biomed. Online*. – 2004. – Vol. 8, № 4. – P. 448-453.
449. Tu L. Critical role for the immunoproteasome subunit LMP7 in the resistance of mice to *Toxoplasma gondii* infection / L. Tu, C. Moriya, T. Imai [et al.] // *Eur. J. Immunol.* – 2009. – Vol. 39, № 12. – P. 3385-3394.
450. Tung T. H. Survival of long nerve allografts following donor antigen pretreatment: a pilot study / T. H. Tung, V. B. Doolabh, S. B. Mackinnon [et al.] // *J. Reconstr. Microsurg.* – 2006. – Vol. 22, № 6. – P. 443-449.
451. Ustichenko V. D. Cryopreserved adrenal xenografts: Immune and hormonal aspects / V. D. Ustichenko, N. M. Alabedalkarim // *Eur. J. Med. Res.* – 2007. – Vol. 12. – Suppl. IV. – P. 46-47.
452. Van Gulik T. M. Prolonged survival of murine thyroid allografts after 7 days of hyperbaric organ culture in the UW preservation solution at hypothermia / T. M. Van Gulik, D. A. Hullett, K. Boudjema [et al.] // *Transplantation*. – 1990. – Vol. 49, № 5. – P. 971-975.
453. Van Rood J. J. The influence of allogeneic cells on the human T and B cell repertoire / J.J. Van Rood, F. H. J. Class // *Science*. – 1990. – Vol. 248. – P. 1388.
454. Van Waes C. Nuclear factor-kappaB in development, prevention, and therapy of cancer // *Clin. Cancer Res.* – 2007. – Vol. 13, № 4. – P. 1076-1082.
455. Venkataraman M. Effects of cryopreservation on immune responses. VIII. Enhanced secretion of interferon-gamma by frozen human peripheral blood mononuclear cells // *Cryobiology*. – 1995. – Vol. 32, № 6. – P. 528-534.

456. Venkataraman M. Effects of cryopreservation of immune responses. XI. Heightened secretion of tumor necrosis factor-alpha by frozen human peripheral blood mononuclear cells / *Cryobiology*. – 1997. – Vol. 34, № 3. – P. 276-283.
457. Vercellotti G. M. Neutrophil adhesion to xenogeneic endothelium via iC3b / G. M. Vercellotti, J. L. Platt, F. H. Bach [et al.] // *J. Immunol.* – 1991. – Vol. 146. – P. 730-734.
458. Vignes C. Anti-TCR-specific DNA vaccination demonstrates a role for a CD8 T cell clone in the induction of allograft tolerance by donor-specific blood transfusion / C. Vignes, E. Chiffolleau, P. Douillard [et al.] // *J. Immunol.* – 2000. – Vol. 165. – P. 96-101.
459. Visekruna A. Comparative expression analysis and characterization of 20S proteasomes in human intestinal tissues: The proteasome pattern as diagnostic tool for IBD patients / A. Visekruna, T. Joeris, N. Schmidt [et al.] // *Inflamm. Bowel Dis.* – 2009. – Vol. 15, № 4. – P. 526-533.
460. Voges D. The 26S proteasome: a molecular machine designed for controlled proteolysis / D. Voges, P. Zwickl P., Baumeister W. // *Annu. Rev. Biochem.* – 1999. – Vol. 68. – P. 1015-1068.
461. Von Mach M. A. Size of pancreatic islets of Langerhans: a key parameter for viability after cryopreservation / M. A. Von Mach, J. Schlosser, M. Weiland [et al.] // *Acta Diabetol.* – 2003. – Vol. 40, № 3. – P. 123-129.
462. Vremec D. CD4 and CD8 expression by dendritic cell subtypes in mouse thymus and spleen / D. Vremec, J. Pooley, H. Hochrein [et al.] // *J. Immunol.* – 2000. – Vol. 164. – P. 2978-2986.
463. Walgenbach S. Modified cryopreservation and xenotransplantation of human parathyroid tissue / S. Walgenbach, R. Rosnatiowski, F. Bittinger [et al.] // *Langenbecks Arch. Surg.* – 1999. – Vol. 384, №3. – P. 277-283.
464. Walsh R. C. Proteasome inhibitor-based primary therapy for antibody-mediated renal allograft rejection / R. C. Walsh, J. J. Everly, P. Brailey [et al.] // *Transplantation.* – 2010. – Vol. 89, № 3. – P. 277-284.

465. Walz J. 26S proteasome structure revealed by three-dimensional electron microscopy / J. Walz, A. Erdmann, M. Kania [et al.] // *J. Struct. Biol.* – 1998. – Vol. 121. – P. 19-29.
466. Wang C. A short course of methylprednisolone immunosuppression inhibits both rejection and spontaneous acceptance of rat liver allografts / C. Wang, J. Sun, A. G. R. Sheil [et al.] // *Transplantation.* – 2001. – Vol. 72. – P. 44-51.
467. Wang F. S. Recipient blood pretransplant transfusion prolongs hepatic allograft survival in rats / F. S. Wang, Y. Yamaguchi, T. Furuhashi [et al.] // *J. Surg. Res.* – 2006. – Vol. 135. – P. 52-60.
468. Wang Y. Endocrine function and lymphocyte infiltration of newborn rat ovaries after ultrarapid freezing and allotransplantation / Y. Wang, P. Wang, X. Shen [et al.] // *Fertil. Steril.* – 2007. – Vol. 87. – P. 1438-1443.
469. Warnock G. L. The natural history of transplantation of insulin-producing pancreatic islets into type I diabetic patients / G. L. Warnock, E. A. Ryan, N. M. Kneteman [et al.] // *The Transplant Proc.* – 1992. – Vol. 24, № 6. – P. 3058.
470. Warren H. S. Rejection of cultured thyroid allografts by the transfer of sensitized LYT 2+ T cells / H. S. Warren, R. G. Pembrey // *Transplantation.* - 1986. – Vol. 41, № 4. – P. 421-426.
471. Watanabe T. Molecular mechanisms of portal vein tolerance / T. Watanabe, M. Kudo, T. Chiba [et al.] // *Hepatology Research.* – 2008. – Vol. 38. – P. 441-449.
472. Weiner H. L. Oral tolerance: immune mechanisms and treatment of autoimmune diseases / *Immunol. Today.* – 1997. – Vol. 18. – P. 335-343.
473. Willing A. E. Sertoli cells enhance the survival of co-transplanted dopamine neurons / A. E. Willing, A. I. Othberg, S. Saporta [et al.] // *Brain. Res.* – 1999. – Vol. 822. – P. 246-250.
474. Wingenfeld C. Cryopreservation promotes angiogenesis and immune tolerance in mice / C. Wingenfeld, R. J. Egli, A. Hempfing [et al.] // *J. Bone Joint Surg. Am.* – 2002. – Vol. 84. – P. 1420-1429.

475. White D. J. The ontogeny of immune responses / D. J. White, W. Gilks // J. Heart Lung Transplant. – 1993. – Vol. 12. – P. 301-308.
476. White M. L. Central lymph node dissection in differentiated thyroid cancer / M. L. White, P. G. Gauger, G. M. Doherty // World Journal of Surgery. – 2007. – Vol. 31, №5. – P. 895-904.
477. Witkowski P. Infectious tolerance mediated by CD8⁺ T-suppressor cells after UV-B-irradiated donor-specific transfusion and rat heart transplantation / P. Witkowski, J. W. Liu, M. X. Jin [et al.] // Transplant Proc. – 2005. – Vol. 37, № 1. – P. 43-45.
478. Wolf L. A. Donor antigen-presenting cell-independent rejection of islet xenografts / L. A. Wolf, M. Coulombe, R. G. Gill // Transplantation. – 1995. – Vol. 60. – P. 1164-1170.
479. Womer K. L. Donor antigen and transplant tolerance strategies: it takes two to tango! / K. L. Womer, M. H. Sayegh // J. Am. Soc. Nephrol. – 2004. – Vol. 15, № 4. – P. 1101-1103.
480. Womer K. L. Transplantation Tolerance / J. Kidney. Dis. Transpl. – 2005. – Vol. 16. – P. 498-505.
481. Wong W. Pretransplant administration of a single donor class I major histocompatibility complex molecule is sufficient for the indefinite survival of fully allogeneic cardiac allografts: evidence for linked epitope suppression / W. Wong, P. J. Morris, K. J. Wood // Transplantation. – 1997. – Vol. 63. – P. 1490-1494.
482. Wright J. R. Induction of class II MHC antigens on human and rodent islet parenchymal cells in vitro // Diabetologia. – 1987. – Vol. 30. – P. 441.
483. Wu G. Pig islet xenograft rejection is markedly delayed in macrophage depleted mice: a study in streptozotocin diabetic animals / G. Wu, O. Korsgren, J. Zhang [et al.] // Xenotransplantation. – 2000. – Vol. 7. – P. 214-220.
484. Wyburn K. R. The role of macrophages in allograft rejection / K. R. Wyburn, M. D. Jose, H. Wu [et al.] // Transplantation. – 2005. – Vol. 80. – P. 1641-1647.

485. Yang L. Mechanisms of long-term donor-specific allograft survival induced by pretransplant infusion of lymphocytes / L. Yang, B. Du Temple, Q. Khan [et al.] // *Blood*. – 1998. – Vol. – 91. – P. 324-330.
486. Yard B. A. Modulation of IFN-gamma-induced immunogenicity by phosphatidylethanolamine-linked hyaluronic acid / B. A. Yard, S. Yedgar, M. Scheele [et al.] *Transplantation*. – 2002. – Vol. 73, № 6. – P. 984-992.
487. Yewdell J. To DRiP or not to DRiP: generating peptide ligands for MHC class I molecules from biosynthesized proteins // *Mol. Immunol.* – 2002. – Vol. 39, № 3-4. – P. 139-146.
488. Yin H. Transplantation of intact rat gonads using vascular anastomosis: effects of cryopreservation, ischaemia and genotype / H. Yin, X. Wang, S. S. Kim [et al.] // *Human Reproduction*. – 2003. – Vol. 18, №6. – P. 1165-1172.
489. Yokomuro H. Effect of cryopreservation on cell proliferation and immunogenicity of transplanted human heart cells / H. Yokomuro, N. Shiono, T. Ozawa [et al.] // *Ann. Thorac. Cardiovasc. Surg.* – 2010. – Vol. 16. – P. 105-112.
490. You Q. Mechanism of T cell tolerance induction by murine hepatic Kupffer cells / Q. You, L. Cheng, R. M. Kedl [et al.] // *Hepatology*. – 2008. – Vol. 48. – P. 978-990.
491. Zaiss D. M. The proteasome immunosubunit multicatalytic endopeptidase complex-like 1 is a T-cell-intrinsic factor influencing homeostatic expansion / D. M. Zaiss, N. de Graaf, A. J. Sijts / *Infect. Immun.* – 2008. – Vol. 76, № 3. – P. 1207-1213.
492. Zheng S. G. Transfer of regulatory T cells generated ex vivo modifies graft rejection through induction of tolerogenic CD4⁺CD25⁺ cells in the recipient / S. G. Zheng, L. Meng, J. H. Wang [et al.] // *Int. Immunol.* – 2006. – Vol. 18, № 2. – P. 279-289.
493. Zieger M. A. Osmotic tolerance limits of canine pancreatic islets / M. A. Zieger, E. J. Woods, J. R. Lakey [et al.] // *Cell Transplant.* – 1999. – Vol. 8, №3. – P. 277-284.