

**НАЦІОНАЛЬНА АКАДЕМІЯ НАУК УКРАЇНИ
ІНСТИТУТ ПРОБЛЕМ КРІОБІОЛОГІЇ І КРІОМЕДИЦИНИ**

БОЖОК ГАЛИНА АНАТОЛІЇВНА

УДК 57.043:616.43/44-089.843

**КРІОКОНСЕРВУВАННЯ ТА ІНДУКЦІЯ ТОЛЕРАНТНОСТІ ЯК ФАКТОРИ
ВПЛИВУ НА СТРУКТУРНО-ФУНКЦІОНАЛЬНУ ЗБЕРЕЖЕНІСТЬ
ЕНДОКРИННИХ ТКАНИН ЗА УМОВ ТРАНСПЛАНТАЦІЇ**

03.00.19 – кріобіологія

АВТОРЕФЕРАТ
дисертації на здобуття наукового ступеня
доктора біологічних наук

Харків – 2013

Дисертацією є рукопис.

Робота виконана в Інституті проблем кріобіології і кріомедицини НАН України.

Науковий консультант: доктор біологічних наук, професор
БОНДАРЕНКО Тетяна Петрівна,
Інститут проблем кріобіології і кріомедицини НАН України,
завідувач відділу кріобіохімії і фармакології нейро-
гуморальних систем, м. Харків.

Офіційні опоненти: доктор біологічних наук, професор
ЖЕГУНОВ Геннадій Федорович,
Харківська державна зооветеринарна академія
МАП України,
завідувач кафедри хімії та біохімії, м. Харків

доктор біологічних наук, професор
БАБЕНКО Наталія Олексіївна,
Харківський національний університет
імені В. Н. Каразіна МОН України,
завідувач відділу фізіології онтогенезу
Науково-дослідного інституту біології, м. Харків

доктор біологічних наук, старший науковий співробітник
КОЛИБО Денис Володимирович,
Інститут біохімії імені О.В. Палладіна НАН України,
заступник директора з наукової роботи,
завідувач лабораторії імунобіології, м. Київ.

Захист відбудеться «28» травня 2013 р. о 13.30 годині на засіданні спеціалізованої вченої ради Д 64.242.01 при Інституті проблем кріобіології і кріомедицини НАН України за адресою: 61015, м. Харків, вул. Переяславська, 23.

З дисертацією можна ознайомитись у бібліотеці Інституту проблем кріобіології і кріомедицини НАН України за адресою: 61015, м. Харків, вул. Переяславська, 23.

Автореферат розісланий «19» квітня 2013 р.

Вчений секретар
спеціалізованої вченої ради,
член-кореспондент НАН України,
доктор біологічних наук, професор



Гордієнко Є.О.

ЗАГАЛЬНА ХАРАКТЕРИСТИКА РОБОТИ

Актуальність теми.

Ендокринна система є життєво важливою частиною організму, яка інтегрує всі метаболічні, фізіологічні та поведінкові процеси. Порушення будь-якої ланки ендокринної системи неминуче приводить до порушення функцій органів і виникнення виснажливих або небезпечних для життя хвороб. Стурбованість у зв'язку із збільшенням числа випадків ендокринних захворювань та розладів, що спостерігається в сучасному суспільстві, виразилася в заяві Всесвітньої організації охорони здоров'я «Стан наукових даних про хімічні речовини, що руйнують ендокринну систему» (Женева, 2013).

Трансплантація ендокринних залоз, їх тканин або клітин є перспективним методом лікування ендокринної недостатності, особливо в умовах збільшення випадків онкологічних, серцево-судинних та інших ускладнень замісної гормональної терапії (ЗГТ) (Урманчєєва А.Ф. и др., 2001; Grady D. et al., 2002; Battaglioli T. et al., 2007). Такий метод має переваги в порівнянні з ЗГТ, серед яких головними є: вбудованість трансплантата в нейрогуморальну систему; ауто- і паракринна регуляція; здатність підтримувати добові та циркадні ритми, реагувати на стрес та інші фізіологічні запити організму; наявність резерву стовбурових/прогеніторних клітин. Таким чином, трансплантація може використовуватися в комплексі регенеративно-відновлювальних заходів при лікуванні ендокринопатій та як допоміжний метод при використанні ЗГТ, оскільки дозволяє знижувати дозу екзогенного гормону.

Однією з основних задач кріобіології є розробка довгострокових зберігаючих технологій для трансплантації органів і тканин. На даний час розроблено способи низькотемпературного кріоконсервування клітин і тканин щитовидної залози, наднирників, сім'яників (Пушкарь Н.С. и др., 1983; Грищенко В.И. и др., 1993; Керос В.А., 1999) і показана можливість їх застосування при трансплантації хворим із гормональною недостатністю (Караченцев Ю.И. и др., 1999, 2001; Рашитов М.М. и др., 2001; Легач Е.И. и др., 2004). Однак роль факторів кріоконсервування в збереженні морфофункціональних особливостей ендокринної тканини після трансплантації детально не вивчалася.

Ендокринні залози – це упорядковані «ансамблі», в яких клітини взаємодіють таким чином, щоб підтримувати оптимальний гормональний вихід. Збереження тканинної архітектури та регуляторних взаємовідносин між клітинами важливе для повноцінного гормонопоезу, тому існує необхідність кріоконсервування саме тканини ендокринних залоз, а не їх поодиноких клітин. Незважаючи на те, що тканини і клітини ендокринних залоз були одними з перших об'єктів, на яких були відпрацьовані технології заморожування, порівняльний аналіз їх стійкості до факторів кріоконсервування досі відсутній.

Загальноприйнято, що основними причинами пошкодження клітин при заморожуванні є утворення внутрішньоклітинного льоду та підвищення концентрації солей внаслідок виморожування води – так званий «ефект розчину» (Mazur P., 1984). При цьому внесок того чи іншого фактора в кріопошкодження залежить від швидкості охолодження. Даний постулат справедливий як для

суспензій поодиноких клітин, так і для їх конгломератів (агрегатів, фрагментів і зрізів тканини). Однак при заморожуванні тканини, що являє собою тривимірну організацію декількох типів клітин, потрібно враховувати й інші фактори, а саме: різну кріостійкість клітин тканини; неоднакову швидкість насичення клітин кріопротектором; існування температурного градієнту між внутрішніми та зовнішніми шарами тканини на етапах охолодження та відігріву; полегшення внутрішньоклітинної кристалізації внаслідок існування міжклітинних контактів (Белоус А.М. и др., 1994; Karlsson J., 1996; Acker J. et al., 2001). У зв'язку з цим актуальним є порівняльне вивчення впливу різних режимів охолодження на структурно-функціональну збереженість тканин ендокринних залоз.

Для отримання трансплантата, як правило, використовують технології забору, підготовки та зберігання тканини ендокринної залози, які у подальшому можуть впливати на імунобіологічні властивості трансплантата. Некоректне проведення підготовчих етапів може ініціювати некротичні процеси в тканині ендокринних залоз і призвести до втрати її гормональної функції. Крім того, пересадку фрагментів тканини здійснюють, як правило, без відновлення судинних зв'язків та в різні сайти організму (Selawry H., 1994; Турчін І.С. зі співавт., 1997), що впливає на швидкість та ступінь реваскуляризації трансплантата, а значить, і на параметри його трофічної підтримки. Наслідком цього є складність дозування і прогнозування тривалості функції трансплантата. Тому актуальним є визначення строків виживання та гормональної активності кріоконсервованої тканини ендокринних залоз при гетеротопічній трансплантації.

На теперішній час основним методом підтримання трансплантата в організмі реципієнта є позиттєве застосування імуносупресантів. Можливість застосування імуносупресивних препаратів при трансплантації тканини ендокринних залоз обмежена внаслідок їх негативного впливу на гормонопоез (Penfornis A. et al., 2006), а ризик розвитку летальних ускладнень у реципієнтів великий (Шумаков В.И., 1995). Ці обставини диктують необхідність пошуку та розробки методів індукції толерантності до трансплантата.

Експериментально показано, що трансфузія крові або імунокомпетентних клітин (спленоцитів, моноклеарів крові, дендритних клітин або клітин кісткового мозку) від донора, яка була проведена за кілька днів до алотрансплантації органа або тканини від того ж донора, зменшує частоту і тяжкість кризів відторгнення, а в деяких випадках призводить до перманентного виживання трансплантата без застосування імуносупресії (Oktay K. et al., 2000; Sato Y. et al., 2003; Sheng Sun D. et al., 2000, 2005). Це явище отримало назву індукції донор-специфічної толерантності (ДСТ). Однак даний підхід досі не вивчався на тканинах ендокринних залоз, особливості яких можуть впливати на активність імунної відповіді реципієнта та виживаність тканини після трансплантації завдяки тому, що паренхіма залоз внутрішньої секреції містить значну кількість антиген-презентуючих клітин (Hedger M. et al., 1997; Metzger R. et al., 2000).

Незважаючи на те, що індукція ДСТ використовується в практиці трансплантології протягом останнього десятиріччя, досі не було зроблено спроби застосувати кріоконсервовані клітини в якості індукуючого агента.

Кріоконсервування донорського трансфузійного матеріалу дозволить виконувати трансплантацію не в екстреному режимі, а планувати її в залежності від стану реципієнта. Таким чином, вивчення впливу кріоконсервування клітин, обраних для передтрансплантаційної трансфузії, на виживання трансплантатів тканин ендокринних залоз в умовах індукції ДСТ важливе не тільки для з'ясування можливих ефектів, але є підґрунтям для створення банків кріоконсервованого біоматеріалу.

На даний момент не існує універсальної панелі біомаркерів для виявлення толерантності імунної системи реципієнта до трансплантата. У зв'язку з цим важлива розробка тестових систем для їх визначення, які дозволять безпечно мінімізувати або скасувати імуносупресію, ґрунтуючись на показниках індивідуального імунологічного профілю реципієнта. Одним з імовірних кандидатів на роль біомаркерів при трансплантації є кількість регуляторних Т-лімфоцитів з фенотипом $CD4^+CD25^+Foxp3^+$ (Treg). Однак недостатність та суперечливість даних щодо пулу цих клітин у здорових людей, реципієнтів з толерантністю до трансплантата або його хронічним відторгненням (Braudeau C. et al., 2007, 2008; Abe Y. et al. 2009; Moraes-Vieira P. et al., 2010) вимагає пошуку нових показників, які з більшою вірогідністю могли б визначити вектор імунної відповіді: відторгнення або прийняття трансплантата.

Молекулярні основи презентації антигена включають каскад реакцій, серед яких система спрямованого протеолізу білків протеасомами визначає ієрархію антигенних епітопів клітин (Rock K. et al., 1999; Sijts E. et al., 2011). Тому актуальним є вивчення ролі імунних протеасом при трансплантації. Однак, незважаючи на те, що в останні роки інгібітор протеасом бортезоміб активно використовується в якості імуносупресанта (Perry D. et al., 2009; Everly M. et al., 2012, Paterno F. et al., 2012), практично не існує даних щодо експресії імунних субодиниць протеасом у реципієнтів алогографтів різних органів або тканин. У зв'язку з вищевикладеним порівняльний аналіз змін субпопуляції Т-лімфоцитів з фенотипом $CD4^+CD25^+Foxp3^+$ і вмісту імунних протеасом у реципієнтів тканини ендокринних залоз в умовах індукції толерантності є важливим для виявлення механізмів і закономірностей розвитку ДСТ, а також для розробки панелі біомаркерів при трансплантації.

Таким чином, низка вищезазначених актуальних проблем обумовила необхідність виконання даної дисертаційної роботи та визначила її мету та задачі.

Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами. Дисертація виконана у відділі кріобіохімії і фармакології нейро-гуморальних систем Інституту проблем кріобіології і кріомедицини НАН України в рамках наступних науково-дослідних тем, в яких автор була відповідальним виконавцем: «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) та «Структурно-функціональні властивості та проліферативний потенціал ендокринних тканин при культивуванні, кріоконсервуванні та трансплантації» (шифр 2.2.6.64, № 0111U001196).

Мета і задачі дослідження. Мета роботи – вивчити вплив кріоконсервування та індукції донор-специфічної толерантності на структурно-функціональну збереженість трансплантатів тканин ендокринних залоз, а також визначити біологічні маркери трансплантаційної толерантності у реципієнтів.

У відповідності з поставленою метою передбачалося вирішити наступні задачі:

1. Визначити строки виживання та гормональну активність ауто-, ало- і ксенографтів свіжовиділених тканин ендокринних залоз (щитовидної залози, сім'яників, наднирників) при трансплантації під капсулу нирки тваринам з моделями гормональної недостатності (тиреоїд-, орхі- і адреналектомією).

2. Вивчити вплив швидкості охолодження на кількісний і фенотиповий склад антиген-презентуючих клітин ендокринних залоз і виявити умови реалізації ефекту зниження імуногенності тканини при кріоконсервуванні.

3. Провести порівняльний аналіз життєздатності, гормональної секреції та структурної цілісності тканин ендокринних залоз (щитовидної залози, сім'яників, наднирників), кріоконсервованих з різною швидкістю охолодження, на основі якого відібрати режими кріоконсервування і передтрансплантаційної підготовки (культивування), які максимально відповідають умовам зниження імуногенності для подальшого використання при трансплантації.

4. Визначити строки виживання та гормональну активність ало- і ксенографтів культивованих та кріоконсервованих тканин ендокринних залоз (щитовидної залози, сім'яників, наднирників) при трансплантації під капсулу нирки тваринам з моделями гормональної недостатності.

5. Вивчити вплив індукції донор-специфічної толерантності шляхом трансфузії свіжовиділених спленоцитів на виживання і гормональну активність трансплантатів тканин ендокринних залоз (щитовидної залози, наднирників, сім'яників, яєчників) у тварин з моделями гормональної недостатності.

6. Вивчити вплив індукції донор-специфічної толерантності шляхом трансфузії кріоконсервованих спленоцитів на виживання трансплантатів тканин ендокринних залоз.

7. Визначити вміст регуляторних Т-лімфоцитів $CD4^+CD25^+Foxp3^+$ у крові реципієнтів після трансплантації тканин ендокринних залоз в умовах норми та індукції донор-специфічної толерантності.

8. Визначити експресію імунних протеасом у трансплантатах тканин ендокринних залоз, а також у печінці, селезінці та тимусі реципієнтів після трансплантації в умовах норми та індукції донор-специфічної толерантності.

9. Виявити найбільш ефективну стратегію трансплантації, що включає в себе максимальну структурно-функціональну збереженість трансплантата, для розробки підходів до використання методу трансплантації ендокринних тканин в регенеративно-відновлювальній та профілактичній медицині, а також при лікуванні гормональної недостатності.

Об'єкт дослідження – вплив кріоконсервування та індукції донор-специфічної толерантності на структурно-функціональну збереженість фрагментів тканин ендокринних залоз (щитовидної залози, сім'яників, наднирників, яєчників)

при трансплантації експериментальним тваринам, а також на експресію імунних протеасом і вміст регуляторних Т-лімфоцитів $CD4^+CD25^+Foxp3^+$ у реципієнтів.

Предмет дослідження – тканини ендокринних залоз (щитовидної залози, сім'яників, наднирників, яєчників) експериментальних тварин при культивуванні, кріоконсервуванні і трансплантації, а також вміст імунних субодиниць протеасом у трансплантаті, печінці, селезінці, тимусі та регуляторних Т-лімфоцитів $CD4^+CD25^+Foxp3^+$ в крові реципієнтів.

Методи дослідження. В роботі були використані сучасні методи кріобіології, молекулярної та клітинної біології, експериментальної медицини, біохімії гормонів, імунології: культивування, радіоімунологічний метод, проточна цитофлуориметрія, спектрофотометрія, світлова та флуоресцентна мікроскопія, гістологічний аналіз, морфометричний аналіз, імуногістохімічний аналіз, вестерн-блотінг, статистичний аналіз результатів.

Наукова новизна одержаних результатів. В дисертаційній роботі вперше проведені порівняльні дослідження та отримані нові дані щодо чутливості ендокринних тканин (щитовидної залози, сім'яників, наднирників) до кріоконсервування з використанням режимів з низькою ($1^\circ\text{C}/\text{хв}$) та високою ($>100^\circ\text{C}/\text{хв}$) швидкостями охолодження.

Вперше проведено порівняльний аналіз виживання ендокринних тканин при гетеротопічній трансплантації під капсулу нирки та визначення їх індивідуальних особливостей, включаючи імуногенність і стійкість до передтрансплантаційної обробки шляхом кріоконсервування та культивування. За результатами аналізу зроблено висновок, що швидкість відторгнення трансплантатів ендокринних тканин залежить від виду залози, причому виживання тканини наднирників достовірно вище, ніж інших залоз.

У роботі вперше було визначено імунофенотип дендритних клітин наднирників миші, а також проведено кількісний аналіз антиген-презентуючих клітин за умов імуномодуляції тканини наднирників шляхом варіювання швидкостей охолодження при кріоконсервуванні, що дозволяє застосовувати цей підхід для зниження імуногенності тканин інших залоз.

Вперше детально вивчені строки виживання ендокринних тканин у звичайних умовах, а також при імуномодуляції трансплантата (шляхом культивування або кріоконсервування) або реципієнта (при індукції донор-специфічної толерантності).

Вперше експериментально апробовано метод індукції донор-специфічної толерантності шляхом трансфузії нативних і кріоконсервованих спленоцитів при трансплантації ендокринних тканин, що дозволило досягти максимальної виживаності алографтів та їх гормональної функції без використання імуносупресантів. Отримані експериментальні дані дозволяють теоретично обґрунтувати використання біоматеріалу ендокринних залоз для трансплантації у відсутності імуносупресантів в регенеративно-відновлювальній та профілактичній медицині.

Вперше вивчено експресію імунних субодиниць протеасом LMP2 та LMP7 у реципієнтів з індукцією толерантності до трансплантата. Отримані результати щодо кількісної та якісної зміни пулу імунних протеасом мають фундаментальне значення

для розуміння механізмів розвитку толерантності імунної системи реципієнта до трансплантата.

Практичне значення одержаних результатів. Розроблені способи кріоконсервування тканини щитовидної залози (Патент України № 9367), тканини (Патент України № 80497) та клітин сім'яників (Патент України № 91787), а також передтрансплантаційної підготовки тканини наднирників і щитовидної залози (Патент України № 4845 і № 46440) дозволяють забезпечити високу функціональну активність ендокринних залоз після заморожування-відігрівання.

Отримані в роботі дані щодо різної чутливості паренхіматозних та антиген-презентуючих клітин ендокринних залоз до кріопошкодження дозволяють в подальшому розробити стратегію зниження імуногенності або корекції імунологічного профілю ендокринних тканин шляхом варіювання швидкостей охолодження при кріоконсервуванні.

На основі вивчення структурно-функціональної збереженості трансплантатів ендокринних тканин у реципієнтів з моделями гормональної недостатності виявлено найбільш ефективну стратегію трансплантації, яка включає в себе максимальний строк виживаності і рівень гормональної активності трансплантату, що надає можливості в подальшому використовувати метод трансплантації з високою прогнозованістю результатів, а також визначити терапевтичну цінність препаратів ендокринних тканин для використання в ендокринології, трансплантології, регенеративно-відновлювальній та профілактичній медицині.

На основі проведених досліджень пулу імунних протеасом при трансплантації в умовах індукції толерантності науково обґрунтовано застосування показника їх експресії в трансплантаті і печінці реципієнта в якості біомаркерів толерантності. Показано, що співвідношення імунних субодиниць протеасом LMP2 та LMP7 може використовуватися як показник прийняття або відторгнення трансплантата, на основі чого може бути створено відповідну діагностичну тест-систему.

Отримані в дисертаційній роботі результати мають практичне значення для розробки клінічних підходів до оптимізації лікування гормонодефіцитного стану шляхом трансплантації ендокринної тканини без використання імуносупресантів при моніторингу біомаркерів толерантності в крові реципієнта.

Результати проведених досліджень впроваджено в роботу ІПКіК НАН України, Українського науково-практичного центра ендокринної хірургії, трансплантації ендокринних органів і тканин МОЗ України. Матеріали дисертаційної роботи використовуються в навчальному процесі кафедри кріобіології і кріомедицини ЮНЕСКО, кафедр Харківського національного університету ім. В.Н. Каразіна, Харківського національного медичного університету, Харківської медичної академії післядипломної освіти.

Теоретичне і практичне значення обраного наукового напрямку і отриманих результатів демонструє підтримка подальших досліджень в цій галузі міжнародним Українським науково-технологічним центром (проекти УНТЦ № 3919 та 5509) і Російським фондом фундаментальних досліджень (проект РФФД № 12-04-90914-мол_снг).

Особистий внесок здобувача. Вибір теми дисертаційного дослідження, планування мети і завдань, складання методологічної структури роботи належать автору. Винесені на захист результати роботи отримані автором особисто. Дисертантом самостійно проведено патентний та інформаційний пошук, висунута основна концепція роботи, здійснено аналіз отриманих результатів, написані всі розділи дисертації, сформульовані висновки.

Автор висловлює щире подяку колективу відділу кріобіохімії і фармакології нейро-гуморальних систем ІПКіК НАН України, особисто д.м.н. Легачу Є.І., к.б.н. Алабедалькарім Н.М., науковому консультанту д.б.н. Бондаренко Т.П., а також усім співавторам наукових публікацій за допомогу в проведенні експериментів, обговоренні результатів та наукові дискусії, що дозволило якнайкраще спланувати і виконати дисертаційне дослідження. Особливу подяку автор висловлює колективу лабораторії біохімії Інституту біології розвитку ім. Н.К. Кольцова (Москва, Росія), особисто керівнику лабораторії д.б.н. Шаровій Н.П., співробітникам к.б.н. Люпіній Ю.В., к.б.н. Карповій Я.Д. за надану можливість проведення молекулярно-біологічних досліджень, цінні рекомендації та плідну співпрацю.

В опублікованих із співавторами роботах особистий внесок здобувача полягає: у роботах [1-4, 6, 10, 16-18, 24, 26, 30, 42, 48, 58, 62] в проведенні експериментів по визначенню впливу факторів кріоконсервування на життєздатність, структурну та гормональну збереженість ендокринних тканин *in vitro*, аналітичній та статистичній обробці результатів; у роботах [38, 39, 41, 57, 74] у виборі методичних підходів до кріоконсервування, розробці режимів кріоконсервування та визначенні їх ефективності при заморожуванні ендокринних тканин, аналітичній та статистичній обробці результатів, формулюванні висновків; у роботах [5, 7-9, 15, 20, 21, 43, 45-47, 49-51, 56, 59-61, 64, 67, 68, 70] в проведенні експериментальних досліджень з визначення строку виживаності та гормональної активності ендокринних тканин за умов ауто-, ало- та ксенотрансплантації без індукції донор-специфічної толерантності, аналітичній та статистичній обробці результатів; у роботах [14, 19, 22, 23, 37, 40, 44, 53, 55, 65, 69] в проведенні експериментів по дослідженню впливу культивування на життєздатність, структурну та гормональну збереженість ендокринної тканини, аналітичній та статистичній обробці результатів; у роботах [11, 35, 36, 52, 54, 75] в проведенні експериментів по дослідженню впливу кріоконсервування на імуногенність ендокринної тканини, аналітичній та статистичній обробці результатів, формулюванні висновків; у роботах [25, 27, 33, 63, 66, 71] в проведенні експериментальних досліджень з визначення структурно-функціональної збереженості ендокринних тканин після трансплантації в умовах індукції донор-специфічної толерантності, аналітичній та статистичній обробці результатів, формулюванні висновків; у роботах [34, 72, 73, 76, 77] в проведенні експериментальних досліджень з визначення експресії імунних субодиниць протеасом та вмісту регуляторних Т-лімфоцитів після трансплантації ендокринних тканин в умовах індукції донор-специфічної толерантності, аналітичній та статистичній обробці результатів, формулюванні висновків; в оглядових роботах [12, 13, 32] в аналізі даних літератури, теоретичному обґрунтуванні наукових підходів, використаних в дисертаційній роботі, формулюванні висновків.

Апробація результатів дисертації. Основні положення дисертації доповідалися й обговорювалися на: наукових семінарах та засіданнях секцій вченої ради Інституту проблем кріобіології і кріомедицини НАН України, Інституту біології розвитку ім. Н.К. Кольцова (Москва, Росія); Всеукраїнській конференції студентів та молодих вчених «Трансплантология сегодня» (Донецьк, 2000); Всеукраїнській науковій конференції «Успіхи і перспективи розвитку кріобіології і кріомедицини» (Харків, 2001); науковій конференції, присвяченій 100-річчю з дня народження академіка І.Н. Буланкіна (Харків, 2001); 13th й 18th European Students' Conferences for promising biomedical scientists and future doctors (Берлін, Німеччина, 2002, 2007); III Міжнародній науковій конференції «Medicine – Health XXI century» (Донецьк, 2002); конференції молодих вчених «Актуальні проблеми біохімії та біотехнології» (Київ, 2002, 2004, 2005); Установчому з'їзді Українського товариства клітинної біології (Львів, 2004); науково-практичних конференціях «Фундаментальні питання експериментальної та клінічної ендокринології» (Харків, 2002, 2003, 2004, 2005); З'їздах трансплантологів України (Київ, 2000; Донецьк, 2005; Київ, 2006, 2007, 2009; Харків, 2011); IX Українському біохімічному з'їзді (Харків, 2006); науково-практичній конференції «Профілактика, діагностика та лікування – основні складові терапії» (Харків, 2006); Всеросійських симпозиумах з міжнародною участю «Актуальные вопросы тканевой и клеточной трансплантологии» (Москва, 2007; Самара, 2008; Санкт-Петербург, 2010); Всеросійських з'їздах трансплантологів (Москва, 2008, 2010, 2012); IV Всеросійському конгресі «Профессия и здоровье» (Москва, 2008); 12th European Congress of Endocrinology (Прага, Чехія, 2010); 36th Congress Biochemistry for Tomorrow Medicine (Торіно, Італія, 2011); Міжнародній науково-практичній конференції «Біотехнологія в клінічній медицині» (Донецьк, 2012); науковій конференції з міжнародною участю «Актуальні проблеми кріобіології і кріомедицини» (Харків, 2005, 2012).

Публікація матеріалів. Основні положення дисертації викладені в 35 статтях у фахових наукових виданнях та міжнародних журналах з імпакт-фактором, у розділі колективної монографії, а також 36 публікаціях матеріалів конференцій. Отримано 5 деклараційних патентів України.

Об'єм і структура дисертації. Дисертація викладена на 309 сторінках машинописного тексту і містить вступ, огляд літератури, матеріали і методи дослідження, 6 розділів результатів досліджень та їх обговорення, узагальнення результатів, висновки та список використаних джерел на 52 сторінках, який включає 493 джерела (441 з яких закордонних). Робота проілюстрована 14 таблицями, 45 рисунками та 65 мікрофотографіями.

ОСНОВНИЙ ЗМІСТ РОБОТИ

Огляд літератури

В огляді літератури представлено аналіз наукових публікацій, в яких подано результати кріоконсервування та трансплантації тканини і клітин ендокринних залоз; описані сучасні способи зниження імуногенності тканинних трансплантатів; висвітлені основні аспекти трансплантаційного імунітету, а також способи індукції

толерантності до трансплантата; описана роль внутрішньоклітинних молекулярних протеолітичних комплексів – протеасом – в презентації антигена і стимуляції імунної відповіді на трансплантат. На основі проведеного аналізу літературних даних показана можливість пролонгування виживання трансплантата без використання імуносупресії, у тому числі за допомогою кріоконсервування, і доведена актуальність і необхідність досліджень в цьому напрямку для трансплантатів тканин ендокринних залоз.

Матеріали і методи дослідження

Робота була виконана на 5-6-місячних мишах ліній BALB/c (n=120), C57BL/6 (n=120), bm1 (n=20), 4-6-місячних безпорідних білих щурах (n=250), аутбредних щурах Вістар (n=200), інбредних щурах лінії Август (n=200), які утримувались в умовах віварію ІПКіК НАН України, новонароджених поросятах першого покоління порід велика біла і українська м'ясна (n=150), які були привезені з племінного господарства «Агрокомбінат Слобожанський» (Харківська обл.). Всі маніпуляції з тваринами проводились відповідно до положень «Європейської конвенції про захист хребетних тварин, які використовуються для експериментальних та інших наукових цілей» (Страсбург, 1986) і «Загальних етичних принципів експериментів на тваринах», схвалених І Національним конгресом з біоетики (Київ, 2001).

Кріоконсервування свіжовиділених фрагментів (СВФ) ендокринних залоз (щитовидної залози, наднирників, сім'яників) здійснювали з використанням кріозахисного середовища на основі диметилсульфоксиду (ДМСО) за допомогою програмного заморожувача Cryoson (Німеччина). У деяких випадках до або після кріоконсервування проводили органотипове культивування СВФ залоз з використанням живильного середовища 199 або DMEM (Sigma, США; РАА, Австрія), збагаченого 10% фетальної телячої сироватки (ФТС, Sigma, США) та антибіотиками за методом (Турчин І.С. зі співавт., 1997).

Суспензію клітин ендокринних залоз отримували з фрагментів тканини ферментативним методом з використанням розчину, який містив колагеназу V типу (1 мг/мл, Sigma, США) і ДНКазу I типу (0,1 мг/мл, Sigma, США). Після трьохетапної інкубації з ферментним розчином фрагменти роздібнювали на клітини шляхом піпетування.

Спленоцити отримували неферментативним методом (Клаус Д., 1990). Еритроцити видаляли короткостроковою інкубацією в розчині, який містив 154 мМ хлориду амонію, 10 мМ бікарбонату натрію, 0,082 мМ ЕДТА. Кріоконсервування суспензії спленоцитів здійснювали за методом (Нем Е., 1976) з використанням кріозахисного розчину на основі середовища 199, яке містило 10% ДМСО і 25% ФТС (Біолот, Росія). Заморожування проводили на програмному заморожувачі Cryoson зі швидкістю охолодження 1°C/хв до -40°C з наступним зануренням у рідкий азот. Відігрів здійснювали на водяній бані при температурі 37-40°C.

Мононуклеарні клітини печінки отримували після попередньої перфузії органа фосфатно-сольовим буфером (ФСБ), який містив 0,4 мг/мл колагенази V типу, 3,7 мМ CaCl₂, 25 нг/мл ДНКазу I типу, 5 мМ MgCl₂, після чого клітини відмивали і фракціонували в градієнті щільності перколу (Pharmacia, Швеція) за методом (Greter M., 2009).

У всіх випадках після одержання суспензії клітин їх життєздатність визначали за допомогою забарвлення трипановим синім.

Гормональну недостатність у тварин моделювали хірургічним шляхом. Тиреоїдектомію проводили за методом (Легач Є.І., 2005), білатеральну адреналектомію – за методом (Ellerkamp V., 2000), білатеральну орхі- і оваріоектомію – за методом (Кабак Я., 1968). Трансплантацію ендокринного матеріалу здійснювали гетеротопічно під капсулу лівої нирки. Доза трансплантованого матеріалу становила 35-40 мг. У післяопераційному періоді імуносупресанти не використовували.

Індукцію донор-специфічної толерантності (ДСТ) проводили шляхом інтрапортальної трансфузії спленоцитів за 7 діб до трансплантації тканин ендокринних залоз за методом (Око А., 2002). Для цього у портальну вену тварин інсуліновим шприцом вводили 0,5 мл фізіологічного розчину, який містив спленоцити. Для попередження кровотечі використовували гемостатичну губку Tabotamp (Johnson&Johnson, США) або препарат транексамової кислоти Tranex (Lusofarmaco, Італія). Деяким групам тварин за день до введення спленоцитів робили внутрішньочеревно ін'єкцію розчину хлориду гадолінію $GdCl_3$ (Gd) у дозі 1 мг/100 г маси тіла за методом (Diaz-Peromingo J., 2005).

Рівні гормонів у середовищі культивування, а також у сироватці крові тварин визначали радіоімунологічним методом, вміст 11-оксикортикостероїдів (11-ОКС) у плазмі крові щурів – флуориметричним методом (Резніков О.Г., 1980). Кількість гормонів в середовищі культивування нормували на білок, який вимірювали за методом Бредфорд. У роботі використані тест-набори RIA-T4-CT, RIA-T3-CT, RIA-CT-Тестостерон, RIA-кортизол-CT, RIA-естрадіол-CT, RIA-ПРОГЕСТЕРОН-CT (Білорусь), TOTAL T4 RIA KIT, TOTAL T3 RIA KIT (Immunotech, Франція), RIA Corticosterone (Biermann GMBH Diagnostika, Німеччина).

Активність амінотрансфераз вимірювали в сироватці крові та гомогенаті печінки за допомогою тест-наборів АЛТ "ДДС" і АСТ "ДДС" (Діакон, Росія). Здатність перитонеальних макрофагів до адгезії і кількість розеткоутворюючих клітин визначали за методом (Меншиков В., 1987).

Аналіз фенотипу антиген-презентуючих клітин (АПК) в суспензії клітин наднирників мишей проводили за допомогою флуорохром-мічених антитіл до CD45, CD8 α , CD3, CD11c, CD11b, Ly6g/Gr-1, DEC-205 виробництва Abcam (Великобританія) і TER-119/Erythroid cells (Ly-76) виробництва BD Bioscience (США). Для аналізу фенотипу субпопуляцій спленоцитів щурів використовували флуорохром-мічені антитіла до макрофагів Macrophage Marker, Т-лімфоцитів CD4 та CD8 α виробництва eBioscience (США) і В-лімфоцитів CD45RA виробництва Invitrogen (США).

Вміст регуляторних Т-лімфоцитів (Treg) у периферичній крові щурів визначали за допомогою флуорохром-мічених антитіл до CD4, CD25 та Foxp3 виробництва eBioscience.

Для аналізу вмісту імунних субодиниць протеасом у печінці, селезінці і тимусі щурів використовували первинні кролячі антитіла до LMP2 і LMP7 виробництва Biomol (Великобританія) і вторинні антикролячі антитіла, мічені Alexa 488 і Alexa

546, виробництва Invitrogen. Для ідентифікації мертвих клітин використовували 7-AAD (eBioscience) або пропідій йодид (Sigma).

Мічені специфічними антитілами клітини аналізували на проточних цитофлуориметрах BD FACSCalibur (BD Bioscience, США) і Cell Lab Quanta SC (Beckman-Coulter, США) з використанням програмного забезпечення CellQuestPro та Winmdi 2.8.

Гістологічному аналізу піддавали цілі ендокринні залози, їх свіжовиділені, кріоконсервовані і культивовані фрагменти, а також ауто-, ало- та ксенотрансплантати на різних термінах після операції. Матеріал для гістологічного дослідження фіксували в 10% нейтральному формаліні, за стандартною методикою заливали в парафін. Приготовлені на мікротомі зрізи 5-7 мкм фарбували гематоксиліном і еозином, досліджували під світловим мікроскопом з окуляром 10 і об'єктивами 5, 10, 20, 40, 60. Мікрофото зйомку зразків здійснювали за допомогою мікроскопів Olympus IX-71 (Японія), Carl Zeiss Axio Observer Z1 (Німеччина), DM RXA2 Leica (Німеччина). Морфометричний аналіз серійних зрізів виконували за допомогою програми для обробки зображення AxioVision Rel.4.7.

Імуногістохімічний аналіз проводили в зразках трансплантатів, фіксованих в 4%-му розчині параформальдегіду і заморожених до -80°C . Зрізи органів товщиною 5-8 мкм виготовляли на кріомікротомі Cryocut (Німеччина) і монтували на полі-лізінових стеклах (Thermo, Великобританія). Для імуногістохімічного аналізу використовували первинні антитіла до ГКГ II класу, CD8 та CD4 Т-лімфоцитів та вторинні антитіла, кон'юговані з пероксидазою хрому виробництва PharMingen (США).

Методом вестерн-блотінгу досліджували вміст субодиниць протеасом LMP2 і LMP7 у трансплантатах. Для цього освітлені гомогенати трансплантатів отримували з використанням буфера, який містить 50 мМ Tris-HCl (pH 7,5), 100мМ NaCl, 1мМ EDTA, 1мМ дитіотреїтолу, 10мМ $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$, 0,5 мкг/мл лейпептіну, 1мкг/мл пепстатину, 1мкг/мл апротоніну. Отримані гомогенати центрифугували при 15400g при 4°C протягом 30 хв. Вимірювали загальний білок за методом Бредфорд і приводили гомогенати до одного значення білка додаванням буфера. Після електрофорезу в 13% ПААГ з SDS (5-10 мкл освітленого гомогенату на доріжку) поліпептиди переносили з гелю на нітроцелюлозну мембрану Hybond ECL (Amersham, США). Для виявлення імунних субодиниць використовували первинні мишачі антитіла до LMP2 і LMP7 виробництва Biomol і кон'юговані з пероксидазою хрому вторинні антитіла виробництва Amersham Biosciences (Великобританія). Оптичні щільності смуг на рентгенівській плівці аналізували в програмі ImageJ.

Для обробки отриманих результатів застосовували варіаційно-статистичні методи: перевірка нормальності розподілу кількісних значень за допомогою критерію Колмогорова-Смірнова, оцінка статистичної вірогідності результатів за допомогою непарного критерію Стьюдента або однофакторного дисперсійного аналізу. Було використане програмне забезпечення Statistica та Excel. Достовірними вважалися відмінності при $p < 0,01$ і $p < 0,05$. Вживаність розраховували за методом Каплана-Мейера, при якому відмінності між групами визначали за допомогою

логрангового критерію. Дані на рисунках і в таблицях представлені як середнє значення $\pm$ стандартне відхилення.

ОСНОВНІ РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕННЯ

1. Структурно-функціональна збереженість свіжовиділених фрагментів тканин ендокринних залоз при гетеротопічній трансплантації

Структурно-функціональна збереженість СВФ тканин щитовидної залози (ЩЗ), надниркових залоз (НЗ), сім'яників була оцінена за двома основними параметрами: вмістом гормонів у сироватці крові реципієнтів і виживаністю тканини після трансплантації. Виживаність тканини було оцінено візуально в гістологічних зразках як присутність пересадженої тканини та кількісно за допомогою морфометричного аналізу.

Алогенну трансплантацію СВФ під капсулу нирки проводили між щурами Вістар (донори) і Август (реципієнти), ксеногенну трансплантацію – між новонародженими поросятами (донори) і щурами Вістар (реципієнти). Інтактні тварини, тварини з моделями недостатності гормонів відповідної залози, а також тварини з аутологічною трансплантацією складали групи порівняння.

При визначенні рівнів загального Т4, тестостерону та кортикостерону в сироватці крові експериментальних тварин (табл. 1) виявлено достовірне зменшення вмісту досліджуваних гормонів на 30 добу після ало- і ксенотрансплантації СВФ відповідних залоз.

Таблиця 1

Рівень гормонів у сироватці крові щурів-реципієнтів з моделями гормональної недостатності на 30 добу після трансплантації СВФ фрагментів ЩЗ, НЗ, сім'яників

Транс-план-тація СВФ	Вміст гормону	Інтактний контроль	Без трансплан-тації	Ауто-трансплан-тація	Алло-трансплан-тація	Ксено-трансплан-тація
ЩЗ	Т4, нмоль/л	73,9 $\pm$ 6,1	19,2 $\pm$ 1,2*	60,1 $\pm$ 8,3	29,8 $\pm$ 5,5*	25,6 $\pm$ 7,2*
Сім'я-ники	Тестостерон, нмоль/л	3,6 $\pm$ 0,8	0,15 $\pm$ 0,05*	0,46 $\pm$ 0,16*	0,24 $\pm$ 0,06*	0,39 $\pm$ 0,07*
НЗ	Кортико-стерон, г%	37,7 $\pm$ 5,9	9,5 $\pm$ 3,6*	28,9 $\pm$ 6,2	10,1 $\pm$ 5,1*	-
	Кортизол, нмоль/л	-	-	-	-	148,9 $\pm$ 34,5*

Примітка: * – відмінності достовірні в порівнянні з інтактним контролем, $p < 0,05$.

Гістологічний аналіз зразків ауто-трансплантатів виявив добру збереженість тканин щитовидної залози, наднирників, сім'яників, тоді як в ало- і ксенографтах спостерігалися ознаки гострого відторгнення. На 25 добу після трансплантації в ало- і ксенографтах практично не спостерігалось ділянок з характерною для досліджуваних залоз будовою, відбувалося активне формування рихлої сполучної

тканини. У подальшому (30-35 доба спостереження) відбувалися ущільнення сполучної тканини і формування сполучнотканинного рубця.

Морфометричний аналіз серійних гістологічних зразків трансплантатів включав оцінку трьох основних показників: площі сполучної тканини S1, площі тканини з нешкодженою структурою S2, площі тканини з лейкоцитарною інфільтрацією S3 (у відсотках від загальної площі трансплантата). У всіх випадках ало- і ксенотрансплантації СВФ зміна цих показників мала подібний характер (Рис. 1) і відображала динаміку процесу розпізнавання і відторгнення трансплантатів. Лейкоцитарна інфільтрація розвивалася з перших днів, досягала свого максимуму на 5-7 добу, після чого спостерігалися певне зменшення кількості інфільтруючих клітин і стабілізація на постійному рівні. При цьому відбувалися два взаємообумовлених процеси: зменшення площі тканини трансплантата і збільшення площі сполучної тканини, в результаті яких трансплантат практично повністю заміщався сполучною тканиною. В ало- і ксенографтах СВФ НЗ протягом усього періоду спостереження зберігалася близько 25% тканини НЗ, яка не мала деструктивних змін.

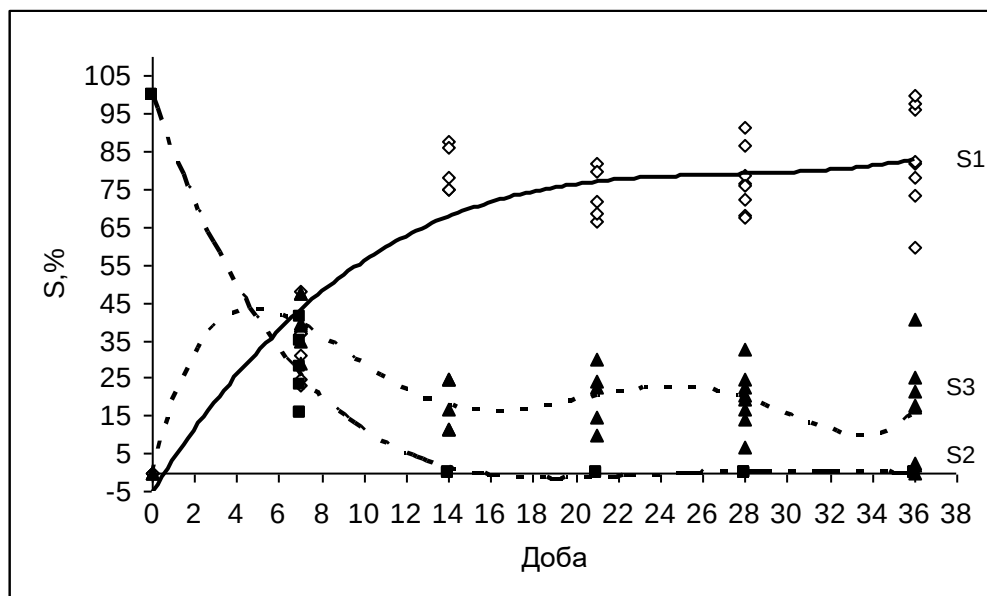


Рис. 1. Зміна морфометричних індексів СВФ ендокринної тканини: S1 – лінія тренду для даних площі сполучної тканини; S2 – лінія тренду для даних площі тканини з нешкодженою структурою; S3 – лінія тренду для даних площі тканини з лейкоцитарною інфільтрацією. Репрезентативний графік подано для алогraftа ЩЗ.

Оцінка логранкового критерію при порівняльному аналізі виживання трансплантатів тканин (Рис. 2) дозволила вважати, що виживання ало- і ксенографтів СВФ ЩЗ і сім'яників достовірно не відрізняється ($P_{\log\text{-rank}_{\text{ЩЗ}}} = 0,355$; $P_{\log\text{-rank}_{\text{сім'яник}}} = 0,663$). Виживання тканини НЗ була достовірно вище, ніж інших залоз ($P_{\log\text{-rank}_{\text{НЗ}}} = 0,003$), як і виживання ксенографтів НЗ у порівнянні з алогraftами ($P_{\log\text{-rank}_{\text{ксено}}} = 0,004$). Ймовірно, що збереженість тканини НЗ при трансплантації зумовлена її здібністю до синтезу глюкокортикоїдів, які мають

природні імуносупресивні властивості та можуть здійснювати локальну імунологічну протекцію трансплантата.

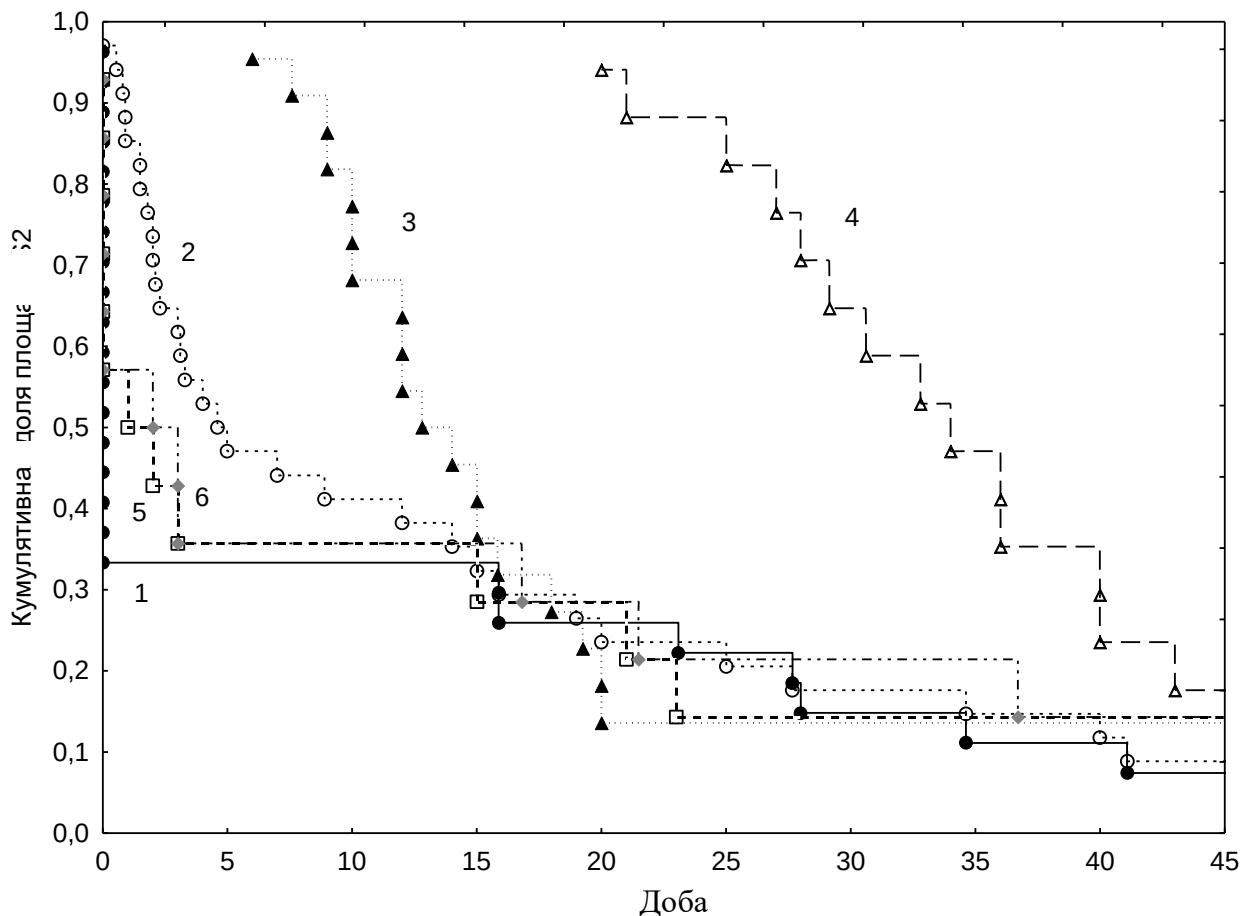


Рис. 2. Виживаність ало- і ксенографтів СВФ ендокринних залоз. Значення по осі Y були розраховані за морфометричними даними площі тканини з нешкодженою структурою S2: 1 – алотрансплантація ЩЗ; 2 – ксенотрансплантація ЩЗ; 3 – алотрансплантація НЗ; 4 – ксенотрансплантація НЗ; 5 – алотрансплантація сім'яників; 6 – ксенотрансплантація сім'яників.

2. Вплив кріоконсервування на кількість і фенотиповий склад антиген-презентуючих клітин ендокринних залоз

В результаті отриманих в попередніх роботах даних встановлено, що кріоконсервування є не тільки способом довгострокового зберігання тканин, але і способом зниження їх імуногенності (Цуцаєва А.А. и др., 1983; Гольцев А.М. зі співавт., 1994; Solanes N. et al., 2004; Wang F. et al., 2006; Yokomuro H. et al., 2010) завдяки деструкції дендритних клітин та резидентних макрофагів. Це є дуже важливим для пролонгування виживаності трансплантата. Цей факт став передумовою для наступного етапу нашої роботи, на якому ми досліджували вплив кріоконсервування з різною швидкістю охолодження на кількісний та фенотиповий склад АПК ендокринних залоз, а також на результат трансплантації кріоконсервованої тканини.

За допомогою методу проточної цитофлуориметрії було встановлено, що в суспензії клітин, отриманої з нативних НЗ мишей, міститься в середньому $7,9 \pm 3,6\%$

дендритних клітин мієлоїдного походження з фенотипом $CD11c^+CD8\alpha^-DEC205^-CD11b^+$ та $15,5\pm 6,8\%$ моноцитарно-макрофагальних клітин, які експресують $CD11b$.

Для вивчення впливу кріоконсервування на кількісний і якісний склад АПК НЗ нами був використаний кріопротектор ДМСО у концентрації 10% та 4 швидкості охолодження: 1, 10, 40, $>100^\circ\text{C}/\text{хв}$. Було встановлено, що кількість дендритних клітин ($CD11c^+$) та макрофагів ($CD11b^+$) достовірно зменшується після кріоконсервування зі швидкостями охолодження 10, 40 та $>100^\circ\text{C}/\text{хв}$ у порівнянні із зразками, замороженими зі швидкістю охолодження $1^\circ\text{C}/\text{хв}$ (Рис. 3).

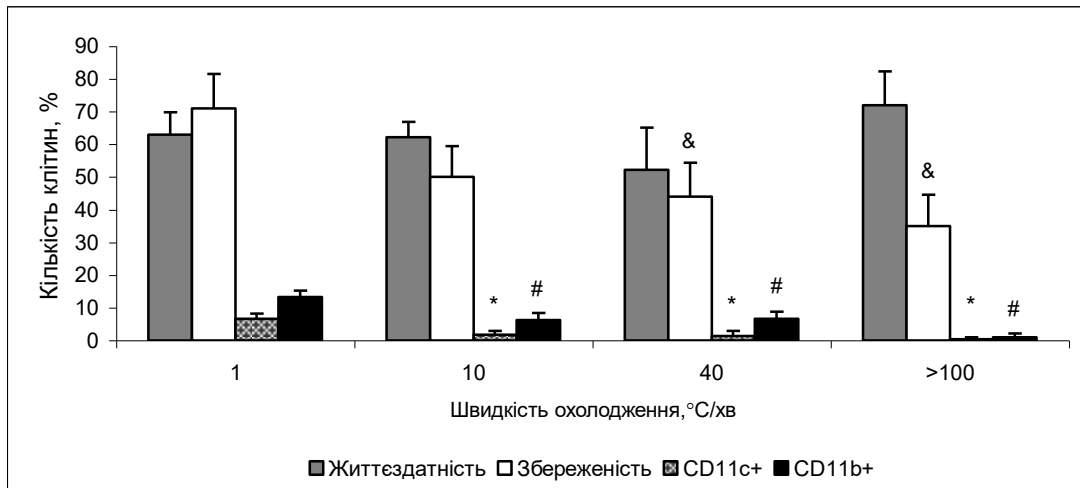


Рис. 3. Експресія $CD11c$ і $CD11b$, життєздатність та збереженість клітин, отриманих із кріоконсервованих фрагментів НЗ мишей. Кількість клітин представлена у відсотках від незамороженого контролю; *, # – достовірна різниця в кількості $CD11c^+$ - та $CD11b^+$ -клітин, відповідно, в порівнянні з показниками, отриманими при заморожуванні зі швидкістю охолодження $1^\circ\text{C}/\text{хв}$; & – достовірна різниця в збереженості клітин в порівнянні з незамороженим контролем ($p < 0,05$).

Загальна життєздатність клітин достовірно не змінювалась в залежності від використаних режимів, тоді як збереженість клітин зменшувалась на 56-65% відносно незамороженого контролю при підвищених швидкостях охолодження (40 та $>100^\circ\text{C}/\text{хв}$), що відображало елімінацію АПК з тканини НЗ. Таким чином, отримані результати показали можливість видалення АПК з тканини ендокринного походження шляхом варіювання режимів охолодження без істотного зменшення життєздатності паренхіматозних клітин.

Вплив елімінації АПК з ендокринної тканини на її структурно-функціональну збереженість було досліджено при алотрансплантації. Відомо, що головним чинником деструкції алографта є реакція гострого відторгнення з боку імунної системи реципієнта. Ознаками гострого відторгнення трансплантата є інфільтрація його Т-хелперами та Т-кілерами, у зв'язку з чим у трансплантатах за допомогою моноклональних антитіл до антигенів $CD4^+$ та $CD8^+$ було досліджено присутність цих клітин.

Було встановлено інтенсивне мічення клітин, що експресують CD4⁺ та CD8⁺, по всій площі трансплантатів, які не піддавали кріоконсервуванню. Кількість CD4⁺ і CD8⁺ клітин в середньому складала $8,91 \pm 8,85$ і $23,51 \pm 11,56$ в полі зору, відповідно.

В кріоконсервованих алографтах спостерігалось достовірне ($p < 0,05$) зниження вмісту клітин інфільтрату. Вони розташовувалися головним чином на межі між трансплантатом і ниркою. В трансплантатах, які були кріоконсервовані зі швидкістю охолодження $1^\circ\text{C}/\text{хв}$, кількість CD4-позитивних клітин становила в середньому $5,28 \pm 4,92$, а CD8-позитивних – $3,71 \pm 3,04$ в полі зору. Кількість CD4⁺-та CD8⁺-клітин у трансплантатах, кріоконсервованих зі швидкістю охолодження $>100^\circ\text{C}/\text{хв}$, була $4,97 \pm 4,40$ та $3,75 \pm 3,20$, відповідно. Таким чином, сукупність отриманих даних вказувала на те, що кріоконсервовані трансплантати ініціюють менш виражену імунну відповідь, ніж свіжовиділені.

3. Вплив кріоконсервування і культивування на виживання трансплантатів ендокринних тканин

Для порівняльного аналізу чутливості тканин ендокринних залоз до факторів кріоконсервування в експериментах використовували режими кріоконсервування, які умовно були розділені на «низькошвидкісні» ($1-5^\circ\text{C}/\text{хв}$) та «високошвидкісні» ($>100^\circ\text{C}/\text{хв}$). Вивчали структурно-функціональну збереженість: 1) фрагментів тканини ЩЗ після кріоконсервування у присутності 7% ДМСО зі швидкостями охолодження 2 та $>100^\circ\text{C}/\text{хв}$; 2) фрагментів тканини НЗ після кріоконсервування у присутності 10% ДМСО зі швидкостями охолодження 1 та $>100^\circ\text{C}/\text{хв}$; 3) фрагментів тканини сім'яників після кріоконсервування у присутності 10% ДМСО зі швидкостями охолодження 5 та $>100^\circ\text{C}/\text{хв}$.

При аналізі результатів кріоконсервування встановлено, що життєздатність клітин сім'яників достовірно зменшується зі збільшенням швидкості охолодження, тоді як клітини ЩЗ і НЗ виявилися досить стійкими до варіювання режимів (Рис. 4). При вивченні гормональної активності тканин ендокринних залоз після кріоконсервування було виявлено, що секреція Т4 фрагментами ЩЗ вище при використанні високошвидкісного охолодження, тоді як тестостерону сім'яниками – повільного. Секреція кортизолу фрагментами НЗ вірогідно не відрізнялася при використанні різних режимів.

Гістологічний аналіз зразків кріоконсервованих тканин показав наступне. Фрагменти ЩЗ, заморожені в повільному режимі, характеризувалися значним порушенням фолікулярної організації, присутністю фолікулів без колоїду і великих ділянок дезінтегрованих тироцитів. Для фрагментів ЩЗ, кріоконсервованих з високою швидкістю охолодження, в цілому зберігалась морфологічна цілісність тиреоїдної паренхіми, хоча в деяких ділянках виявлялися порушення міжфолікулярного простору, відшарування епітеліального пласта від базальної мембрани, десквамація тироцитів у порожнину фолікулів.

Фрагменти НЗ, кріоконсервовані за обома режимами охолодження, після розморожування зберігали характерну гістологічну структуру. У кортексі розрізнялися три зони: клубочкова, пучкова і сітчаста. У всіх кортикальних зонах

були присутні великі світлі клітини з крупнопінистою цитоплазмою і клітини з дрібними темними ядрами, хоча по периферії фрагмента були присутні ознаки гідропічної дистрофії та некрозу.

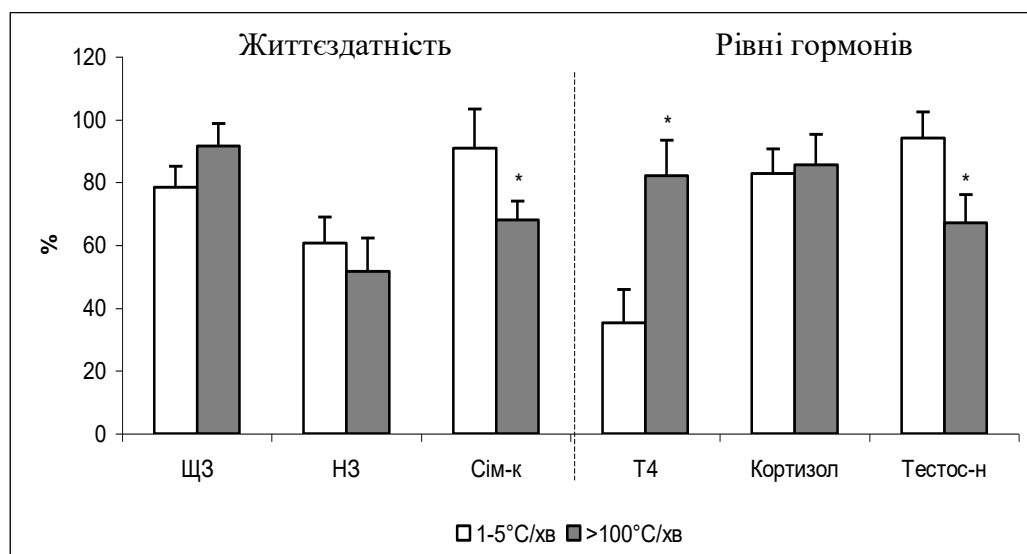


Рис. 4. Життєздатність клітин ЩЗ, НЗ, сім'яників новонароджених поросят і рівні гормонів в живильному середовищі після кріоконсервування (у % від інтактного контролю); * – відмінності достовірні у порівнянні з низькошвидкісним (1-5°C/хв) заморожуванням ($p < 0,05$).

Характерна каналцева будова сім'яників в цілому зберігалася після кріоконсервування в низькошвидкісному режимі. В каналцях спостерігався спермо-епітеліальний пласт клітин, який прилягає до базальної мембрани, в інтерстиції добре розрізнялися великі клітини з оксифільною цитоплазмою. Після кріоконсервування зі швидкістю охолодження $>100^{\circ}\text{C}/\text{хв}$ відбувалися значні зміни тканинної структури сім'яників. Міжканалцевий простір був сильно розширений, в каналцях були присутні розриви базальної мембрани і дезорієнтація клітинних шарів. Інтерстиціальні клітини мали ознаки гідропічної дистрофії.

На підставі отриманих даних щодо життєздатності, гормональної активності, а також гістологічного аналізу для подальшого використання при трансплантації нами були відібрані режими охолодження тканин ендокринних залоз, які максимально сприяли збереженню їх структурно-функціональних властивостей. При незначних відмінностях між режимами, як у випадку кріоконсервування НЗ, вибір був зроблений на користь режиму з більш високою швидкістю охолодження з метою реалізації ефекту елімінації АПК з тканини. Таким чином, для подальшої трансплантації були обрані наступні режими кріоконсервування: 1) фрагментів тканини ЩЗ у присутності 7% ДМСО зі швидкістю охолодження $>100^{\circ}\text{C}/\text{хв}$; 2) фрагментів тканини НЗ у присутності 10% ДМСО зі швидкістю охолодження $>100^{\circ}\text{C}/\text{хв}$; 3) фрагментів тканини сім'яників у присутності 10% ДМСО зі швидкістю охолодження $5^{\circ}\text{C}/\text{хв}$.

Відомий той факт, що культивування призводить до зменшення кількості клітин, які експресують антигени головного комплексу гістосумісності (ГКГ) II класу і зниження імуногенності тканини (Hullett D. et al., 1989; Stepkowski S. et al., 2006). Кріоконсервування в комплексі з культивуванням може посилити ефект зниження імуногенності (Flesch B. et al., 1991; Rutzky L. et al., 2002). Враховуючи це, нами було досліджено вплив культивування, яке було використане до або після кріоконсервування, на виживаність фрагментів ендокринних залоз при ало- і ксенотрансплантації.

Встановлено, що після ало- та ксенотрансплантації кріоконсервованих фрагментів ЩЗ, НЗ і сім'яників у крові реципієнтів виявляється присутність гормонів, однак їх рівні не досягають цільових показників інтактного контролю у всіх випадках (табл. 2). Аналізуючи значення рівнів гормонів, не було визначено переваг використання культивування фрагментів ендокринних залоз в комплексі з кріоконсервуванням.

Таблиця 2

Рівень гормонів у сироватці крові щурів-реципієнтів на 30 добу після ало- і ксенотрансплантації кріоконсервованих і культивованих фрагментів ендокринних залоз (% від інтактного контролю)

Обробка тканини	ЩЗ		НЗ		Сім'яник	
	Т4		11-ОКС	Кортизол	Тестостерон	
	А/Тр	К/Тр	А/Тр	К/Тр	А/Тр	К/Тр
Кріоконсервування	66,0±8,9 *	32,3±9,6 *	25,3±4,6 *	278,3±8,1 *	14,7±3,2 *	11,7±2,9 *
Культивування до кріоконсервування	38,4±9,6 *	54,9±8,5 *	20,4±8,1 *	183,4±19,9 *#	6,5±3,7 *	12,7±5,3 *
Культивування після кріоконсервування	54,0±7,2 *	56,0±7,9 *#	19,1±5,9 *	160,3±14,9 *#	10,5±2,8 *	8,9±3,1 *

Примітка: А/Тр – алотрансплантація; К/Тр – ксенотрансплантація; * – відмінності достовірні в порівнянні з контролем; # – відмінності достовірні в порівнянні з кріоконсервуванням, $p < 0,05$.

При порівняльному гістологічному і морфометричному аналізі кріоконсервованих і культивованих трансплантатів виявлено, що виживаність ало- і ксенографтів тканини ЩЗ та сім'яників є незначною і практично не залежить від умов передтрансплантаційної обробки (Рис. 5). Для ало- і ксенографтів НЗ характерною особливістю є порівняно високий рівень структурно-функціональної збереженості у досліджуваній строк після трансплантації. Виживаність алогографтів НЗ після кріоконсервування та культивування зростала в середньому в 4 рази, що може бути пов'язано з реалізацією ефекту елімінації АПК та зниженням імуногенності тканини після передтрансплантаційної обробки. Для ксенографтів

подібна динаміка не спостерігалася, в середньому виживаність тканини при цьому перебувала в межах 20-25%.

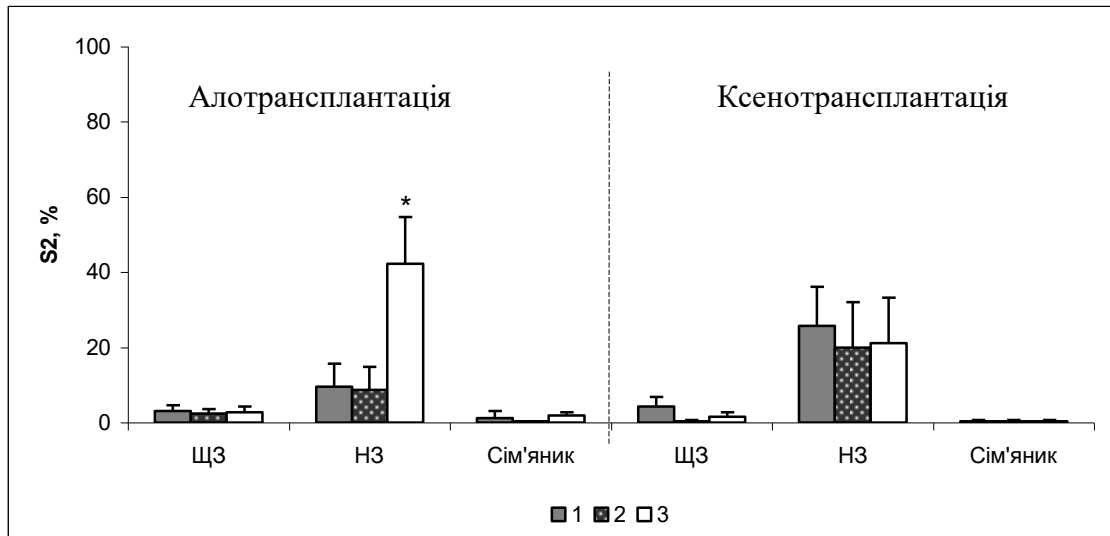


Рис. 5. Площа тканини з неущкодженою структурою (S2) кріоконсервованих і культивованих до та після кріоконсервування трансплантатів ендокринних залоз на 30 добу: 1 – кріоконсервування, 2 – культивування до кріоконсервування, 3 – культивування після кріоконсервування; * – відмінності достовірні в порівнянні з рештою зразків відповідної тканини ($p < 0,05$).

4. Вплив донор-специфічної трансфузії спленоцитів на виживання трансплантатів ендокринних тканин

Аналізуючи результати, отримані на попередньому етапі роботи, зроблено висновок про те, що використаний підхід до імуномодуляції ендокринної тканини за допомогою кріоконсервування і культивування є ефективним лише для алотрансплантації тканини НЗ. Для інших використаних ендокринних тканин не було показано значної переваги кріоконсервованих трансплантатів у порівнянні з свіжовиділеними. У зв'язку з цим на наступному етапі роботи ми застосували підхід, який полягав у зміні реактивності імунної системи реципієнта, і дослідили його вплив на структурно-функціональну збереженість ендокринних тканин після трансплантації.

Для корекції імунної відповіді реципієнта нами був використаний метод індукції донор-специфічної толерантності (ДСТ) до трансплантата, який реалізується шляхом передтрансплантаційної трансфузії спленоцитів донорського походження у портальну вену (*v. porta*) реципієнта за 7 діб до трансплантації органа чи тканини від того ж донора (Kenick S. et al., 1997; Oko A. et al., 2002; Iwata H. et al., 2002; Sato Y. et al., 2003). Враховуючи, що даний підхід при ксеногенній трансплантації є ефективним лише в присутності імуносупресії (Iwata H. et al., 2002), використання якої при трансплантації ендокринної тканини небажано, подальшу експериментальну роботу проводили тільки в алогенній системі донор-реципієнт.

Експерименти проводили на статевозрілих тваринах (щурах або мишах) двох ліній, однієї статі. Використовували СВФ ЩЗ і сім'яників, як ті, що не показали в попередніх дослідженнях значної виживаності при трансплантації, а також СВФ НЗ і яєчників, як ті, що мають імуномодуючі властивості (Fox-Marsh A. et al., 2002; Spaniel-Borowski K., 2011). Кількість спленоцитів, використаних для інтрапортальної трансфузії, становила 1×10^7 клітин/реципієнта.

Встановлено, що на 30 добу після оваріоектомії у сироватці крові щурів спостерігається 22% естрадіолу і 12% прогестерону у порівнянні з рівнем контрольних тварин. Рівень прогестерону у оваріоектомованих тварин із трансплантацією СВФ яєчників склав 47% від контролю, а з трансплантацією при індукції DST – 74% від контролю. Підвищення рівня естрадіолу до 44% від контролю спостерігалось тільки у випадку трансплантації в умовах індукції DST.

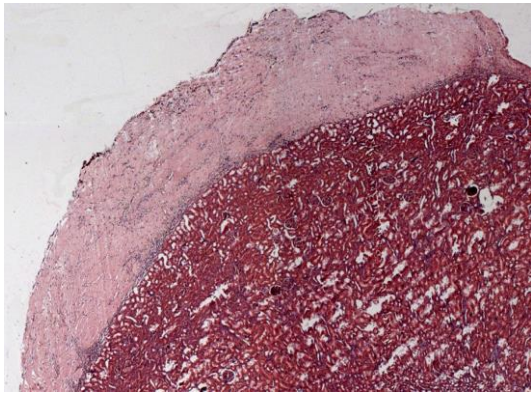
На 30 добу після орхіектомії у мишей спостерігався рівень тестостерону, який становив 9% від рівня інтактного контролю. При трансплантації СВФ сім'яників без індукції DST не встановлено значних відмінностей у рівні тестостерону в порівнянні з тваринами без трансплантації. При трансплантації в умовах індукції DST спостерігалось достовірне збільшення рівня гормону до 25% від контролю.

Тиреоїдектомія у щурів призводила до падіння рівня Т4 до $21,5 \pm 4,9$ нмоль/л у порівнянні з $73,9 \pm 6,5$ нмоль/л у контрольних тварин (29% від контролю). На 35 добу після трансплантації СВФ ЩЗ без індукції DST достовірного підвищення гормонального рівня не спостерігалось. У тварин з індукцією DST був встановлений значний розкид рівня гормону. Приблизно у 50% тварин спостерігався знижений рівень Т4, який знаходився в межах від 21,9 до 30,4 нмоль/л, що склало від 29 до 41% від значення Т4 у контролі. У решти експериментальних тварин цієї групи рівень Т4 знаходився в межах 52,5-64,1 нмоль/л, що складало 71-86% від контрольних значень.

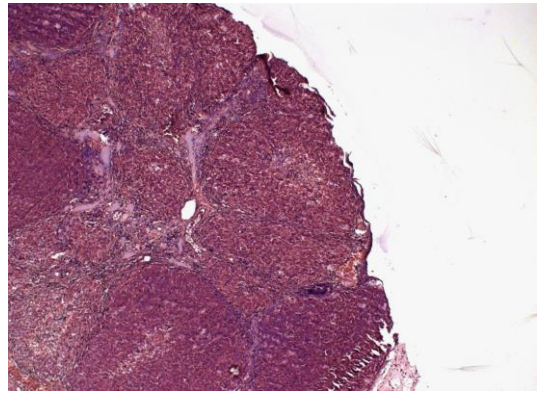
Гістологічний аналіз виявив відсутність структур, характерних для оваріальної тканини в алогографтах тканини яєчників без індукції DST (рис. 6, а). Алогографт був представлений грубою фіброзною тканиною з очагами лейкоцитарної інфільтрації, що свідчило про його відторгнення. В алогографтах тканини, пересадженої в умовах індукції DST, виявлено присутність добре васкуляризованої тканини характерної для яєчників будови (рис. 6, б). У тканині трансплантата спостерігалися фолікули різного ступеня зрілості (примордіальні, преантральні та антральні), а також жовті тіла.

Подібна картина спостерігалася при гістологічному аналізі алогографтів сім'яників і НЗ: наявність васкуляризованої тканини з характерною для пересаджених залоз будовою при алотрансплантації в умовах індукції DST (Рис. 6, г, е); лейкоцитарна інфільтрація і формування фіброзної тканини в протилежному випадку (рис. 6, в, д).

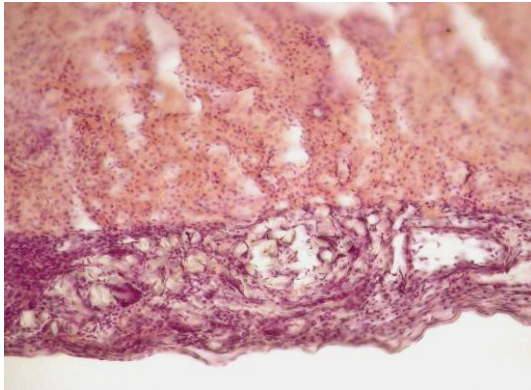
Серед зразків ЩЗ, трансплантованих в умовах індукції DST, спостерігалися виражені морфологічні відмінності. У тварин з рівнем Т4 нижче 50% від інтактного контролю були присутні явні ознаки відторгнення трансплантата (Рис. 6, ж), причому, гістологічна картина свідчить, що в даних алогографтах відбувається акселерація процесу відторгнення в порівнянні з трансплантатами без індукції DST.



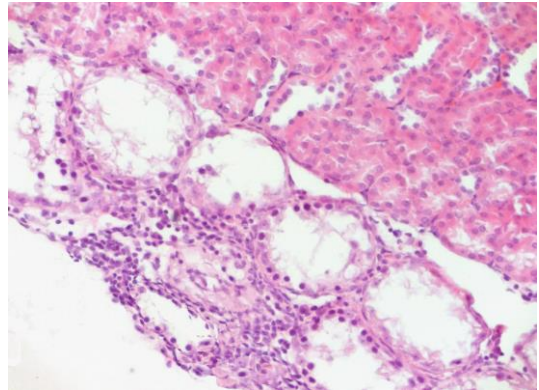
а



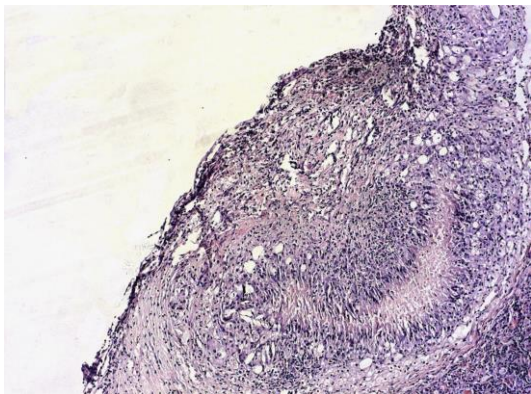
б



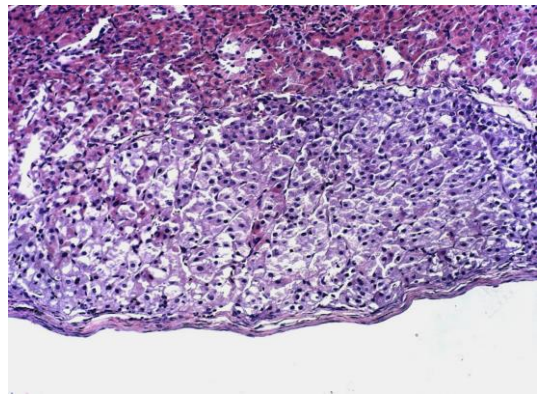
в



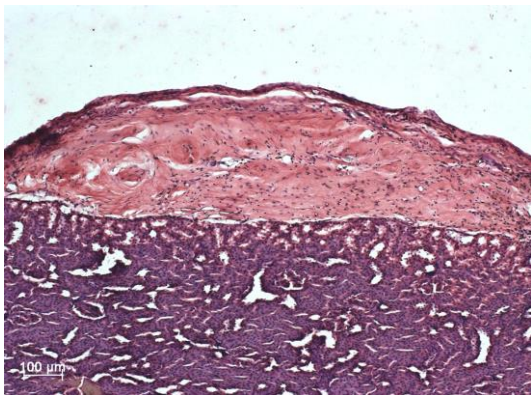
г



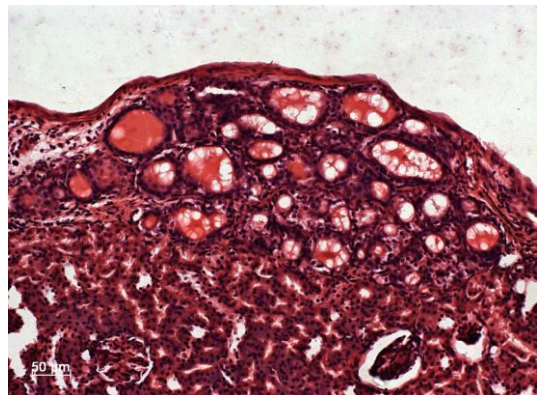
д



е



ж



з

Рис. 6. Зразки алографтів СВФ оваріальної тканини (а, б), сім'яників (в, г), НЗ (д, е) і ЩЗ (ж, з) на 30-35 добу після трансплантації в умовах індукції ДСТ (б, г, е, з) і без неї (а, в, д, ж). Забарвлення гематоксиліном і еозином.

У реципієнтів з рівнем Т4 вище 50% від інтактного контролю виявлена добре васкуляризована тканина щитовидної залози, яка містить фолікули, заповнені яскраво-рожевим колоїдом з вакуолями резорбції (Рис. 6, з). Інфільтрат і осередки фіброзу не виявлені.

Морфометричний аналіз встановив достовірне збільшення виживання алогографтів ендокринних тканин в умовах індукції ДСТ (Рис. 7).

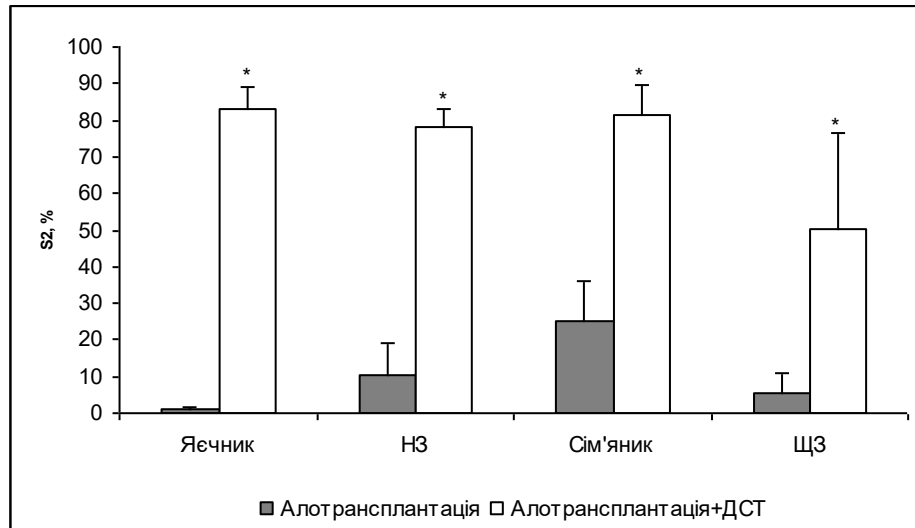


Рис. 7. Площа тканини з неушкодженою структурою (S2) СВФ ендокринних залоз, трансплантованих в умовах індукції ДСТ і без неї; * – відмінності достовірні у порівнянні з відповідними зразками без індукції ДСТ ($p < 0,05$).

Таким чином, використання підходу, який полягав в зміні реактивності імунної системи реципієнта шляхом індукції ДСТ, дозволило значно збільшити структурно-функціональну збереженість тканин ЩЗ, НЗ та статевих залоз після трансплантації.

5. Вплив кріоконсервування спленоцитів, призначених для донор-специфічної трансфузії, на виживаність алогографтів ендокринних тканин

Актуальним при індукції ДСТ є вивчення можливості використання в якості індукуючого агента кріоконсервованих спленоцитів. У цьому випадку кріоконсервування донорського біоматеріалу дозволить виконувати трансплантацію не в екстреному режимі, а планувати терміни операції в залежності від стану реципієнта.

Експерименти проводили на тваринах з тиреоїдектомією та адреналектомією, яким було трансплантовано СВФ ЩЗ і НЗ, відповідно. Кріоконсервування суспензії спленоцитів здійснювали за методом (Нем Е., 1976) з використанням кріопротектора ДМСО в концентрації 10% та швидкості охолодження $1^{\circ}\text{C}/\text{хв}$. Життєздатність клітин після кріоконсервування, яку визначали методом забарвлення трипановим синім, в середньому складала $85 \pm 7\%$.

У групі щурів із трансплантацією СВФ ЩЗ і трансфузією кріоконсервованих спленоцитів рівень Т4 знаходився в межах від 19,4 до 41,5 нмоль/л (медіана 27,5

нмоль/л), що складало 41% від контрольних значень і достовірно не відрізнялося від рівня Т4 при алотрансплантації без індукції ДСТ. При аналізі гістологічних зразків алографтів виявлені явні ознаки відторгнення трансплантата: лейкоцитарна інфільтрація, повна деградація фолікулярної будови тканини, заміщення трансплантата сполучною тканиною. Така ж закономірність була встановлена і для алографтів тканини НЗ. В умовах трансплантації з попередньою трансфузією нативних спленоцитів спостерігалася висока виживаність алографтів, тоді як при використанні кріоконсервованих клітин збереженої тканини НЗ не виявлено.

Причина скасування індукції толерантності до трансплантата після кріоконсервування могла полягати в тому, що внаслідок неоднакової чутливості клітин до охолодження субпопуляційний склад суспензії спленоцитів, призначеної для донор-специфічної трансфузії, зазнавав змін. У зв'язку з цим було проведено аналіз субпопуляційного складу суспензії спленоцитів до та після заморожування методом проточної цитофлуориметрії з використанням антитіл до Т, В-лімфоцитів і макрофагів. В результаті проведених досліджень встановлено 6-кратне зменшення вмісту макрофагів при збереженості решти субпопуляцій клітин (Рис. 8).

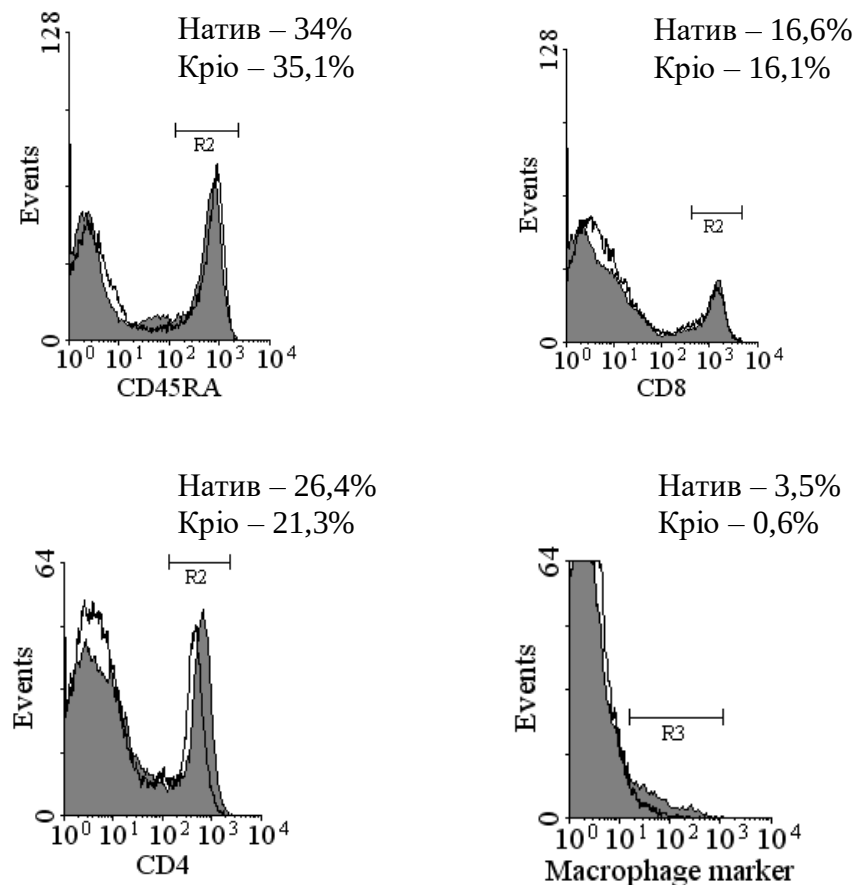


Рис. 8. Ступінь експресії специфічних маркерів В-лімфоцитів (CD45RA), Т-лімфоцитів (CD4, CD8) і макрофагів у суспензії клітин, отриманої з селезінки щурів. Зафарбовані гістограми – свіжовиділені, відкриті – кріоконсервовані клітини. Позначення на гістограмах – відсоток клітин, які експресують специфічний маркер.

Таким чином, субпопуляція макрофагів донорського походження відіграє значну роль при індукції ДСТ, а її зменшення внаслідок впливу факторів кріоконсервування призводить до зникнення ефекту. У зв'язку з цим було проведено експерименти, в яких кількість кріоконсервованих спленоцитів була збільшена з 1×10^7 (як для свіжовиділених) до $5,5 \times 10^7$ клітин/реципієнта. При подальшій трансплантації ендокринних тканин в умовах збільшення дози індукуючого агента виявлена висока виживаність ендокринної тканини.

Як один з можливих механізмів розвитку ДСТ, обговорюється процес презентації антигена макрофагами печінки – клітинами Купфера (Parker G. et al., 2005). Результати наших експериментів довели, що в механізмі розвитку ДСТ важливою є не тільки наявність макрофагів реципієнта, але й макрофагів донорського походження.

6. Дослідження експресії імунних протеасом і вмісту $CD4^+CD25^+Foxp3^+$ клітин у реципієнтів після індукції донор-специфічної толерантності

Для вивчення експресії імунних протеасом як можливого біомаркера толерантності після трансплантації тканини ендокринних залоз в умовах індукції ДСТ у якості трансплантаційного біоматеріалу були обрані тканини яєчників і щитовидної залози. За результатами попередніх експериментів встановлено, що при трансплантації тканини щитовидної залози, навіть з індукцією ДСТ, спостерігалася 50%-а виживаність алографтів на 30-35 добу. При такому рівні виживаності було можливо використовувати цю модель для вивчення пулу імунних протеасом в якості показника прийняття або відторгнення алографтів. Оваріальна тканина мала хорошу виживаність при трансплантації з індукцією ДСТ (в середньому 82%), що дозволяло використовувати алотрансплантацію цієї тканини в якості групи порівняння.

Після вивчення стану трансплантатів у тварин, яким була проведена індукція ДСТ, вони були поділені на тих, у яких відбулося відторгнення алографта (ДСТ1), та на тих, які мали високу структурно-функціональну збереженість алографтів (ДСТ2).

Існуючі уявлення про важливу роль регуляторних Т-лімфоцитів з фенотипом $CD4^+CD25^+Foxp3^+$ (Treg) в індукції та підтриманні толерантності до трансплантату (Fucs R. et al., 2006; Golshayan D. et al., 2007; Abe Y. et al., 2009) спіткали до того, щоб в наших дослідженнях було визначено вміст цієї популяції клітин у тварин-реципієнтів. У зв'язку з цим, у тварин груп без індукції ДСТ, ДСТ1 та ДСТ2 було досліджено вміст Treg клітин у крові на 30 добу після трансплантації.

Узагальнюючи отримані дані, не було встановлено достовірних відмінностей між кількістю Treg клітин в інтактному контролі та експериментальних групах, хоча спостерігалася тенденція до підвищення вмісту Treg клітин на 4% в групі ДСТ2. Отримані нами дані вказували на те, що вміст Treg клітин у периферичній крові не завжди може свідчити про стан толерантності реципієнта до трансплантата, що збігалось з висновками попередніх робіт інших авторів (Louis S. et al., 2006; Braudeau C. et al., 2007 ; Moraes-Vieira P. et al., 2010). У зв'язку з цим, існувала необхідність додаткової оцінки стану алографта, яка б більш повно характеризувала вектор імунної відповіді в бік прийняття або відторгнення трансплантата.

Останнім часом звертають на себе увагу свідчення про те, що у реципієнтів з так званою «оперативною толерантністю», які за різними причинами припиняли прийом імуносупресивних препаратів, не відбувалося відторгнення трансплантата (Brouard S. et al., 2007, 2011). В результаті досліджень експресії різних генів у толерантних пацієнтів значна різниця була встановлена в експресії гена TMTC3/SMILE (Newell K. et al., 2010), однією з функцій якого є регуляція експресії імунних субодиниць протеасом (Rasape M. et al., 2010). Дані факти свідчили про можливу роль протеасом в індукції толерантності до трансплантата, тому завданням наступного етапу дослідження було вивчення експресії імунних протеасом як можливого біомаркера толерантності в організмі реципієнта після трансплантації в умовах індукції ДСТ.

За допомогою імуногістохімічного мічення на 35 добу після трансплантації в умовах індукції ДСТ наявність субодиниць імунних протеасом LMP2 та LMP7 було виявлено в деяких алографтах оваріальної тканини та тканини ЩЗ (Рис. 9). В цих же трансплантатах, забарвлених гематоксиліном і еозином, серед зон, які зберігали клітинну структуру, характерну для паренхіми залоз, були присутні ділянки обширної інфільтрації імунокомпетентними клітинами.

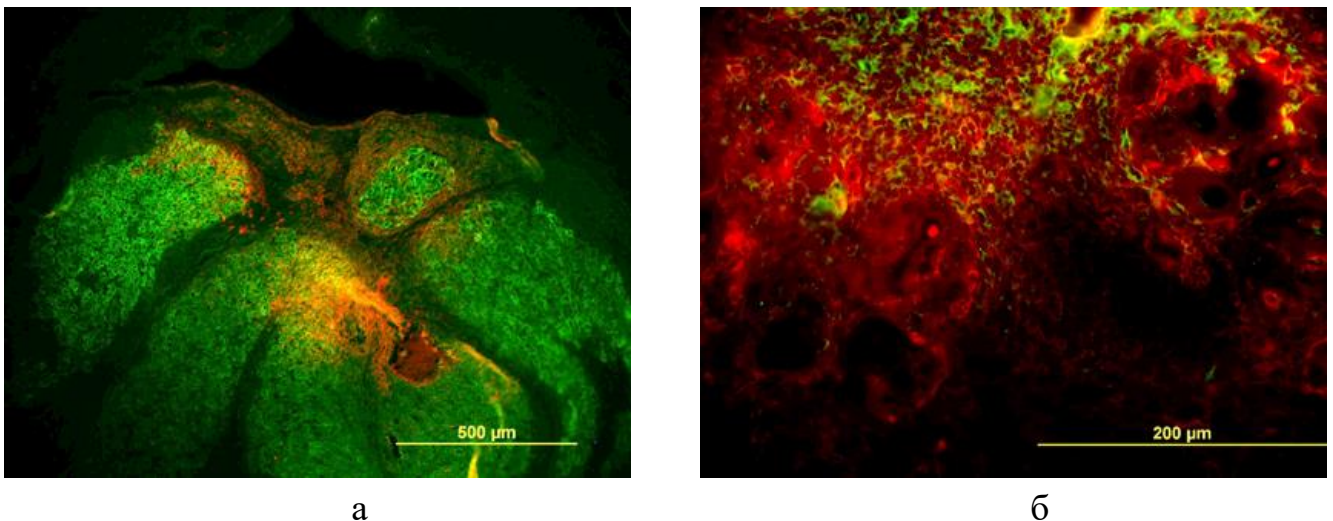


Рис. 9. Подвійне імунофлуоресцентне мічення алографтів тканини яєчників (а) і ЩЗ (б) антитілами до LMP7, міченими Alexa 488 (а) і Alexa 546 (б), а також антитілами до LMP2, міченими Alexa 546 (а) і Alexa 488 (б).

В інтактній тканині яєчника і ЩЗ, а також в трансплантатах, які були повністю заміщені сполучною тканиною, позитивного мічення субодиниць LMP2 та LMP7 практично не виявлялося. Це свідчило на користь того, що поява в алографті імунних протеасом пов'язана з його інфільтрацією і відображає процес розпізнавання антигенів трансплантата, їх процесінг і презентацію АПК.

В умовах звичайної алотрансплантації етап розпізнавання антигена і його презентації відбувається протягом перших 3-5 діб, після чого спостерігається поява в місці трансплантації значної кількості Т-лімфоцитів. При індукції ДСТ процес розпізнавання антигена, ймовірно, уповільнюється, розвиваючись за механізмами, відмінними від механізмів характерних для гострого відторгнення, внаслідок чого

поява обширних зон клітин, позитивно мічених антитілами до субодиниць протеасом LMP2 та LMP7, спостерігається тільки на 30-35 добу.

Для вивчення ролі протеасом у розвитку ДСТ, нами була визначена експресія субодиниць LMP2 та LMP7 у печінці (як місці введення донорських спленоцитів), селезінці і тимусі (як органах периферичного і центрального імунітету).

Виявлено, що на 1 добу після трансфузії клітин у печінці збільшується кількість експресії обох субодиниць у порівнянні з печінкою тварин, яким вводили фізіологічний розчин без спленоцитів (хибно-оперований контроль). Збільшення експресії відбувалося за рахунок припливу в печінку спленоцитів, які містять імунні протеасоми, а не активації імунітету печінки, оскільки пригнічення імунокомпетентних клітин печінки за допомогою гадолінію хлориду (GdCl₃) достовірно не впливало на вміст субодиниць. Зменшення експресії LMP2 і LMP7, яке відбувалося на 7 добу після трансфузії, з одного боку, може відображати деструкцію введених спленоцитів у печінці або їх розселення по організму реципієнта. З іншого боку, зменшення кількості протеасом нижче рівня хибно-оперованого контролю, можливо, свідчить про активний процес, що відбувається в печінці і відображає індукцію толерантності.

Достовірних кількісних відмінностей експресії LMP2 та LMP7 у селезінці не спостерігалось, тоді як у тимусі було встановлено достовірне збільшення LMP7 на 7 добу після індукції ДСТ.

У тварин з алотрансплантацією без індукції ДСТ на 30 добу встановлено достовірне збільшення вмісту субодиниць LMP2 у селезінці та тимусі (Рис. 10), що

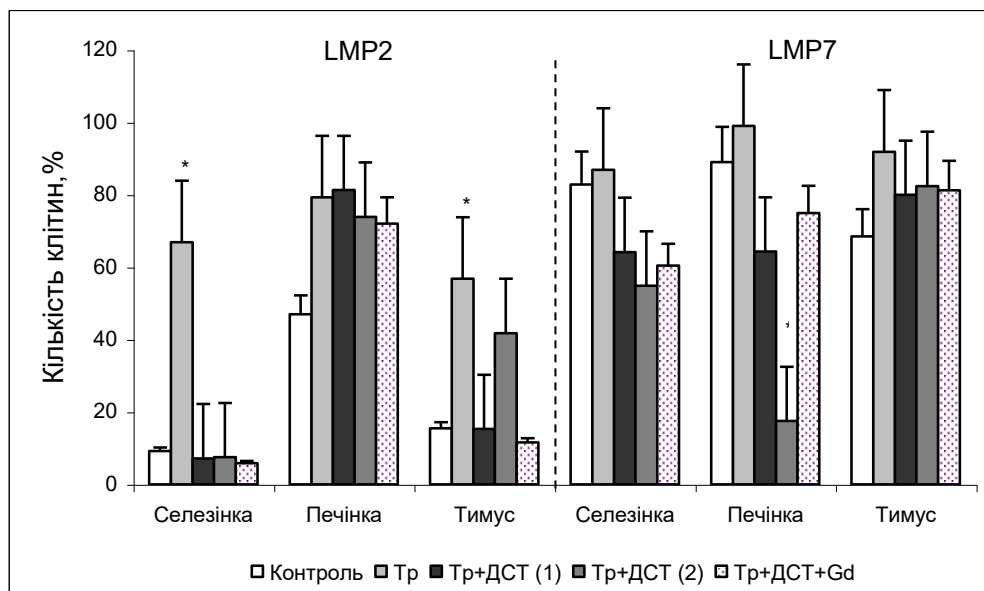


Рис. 10. Кількість клітин, позитивно мічених антитілами до субодиниць протеасом LMP2 та LMP7, у селезінці, печінці і тимусі тварин на 35 добу після алотрансплантації і індукції ДСТ. GdCl₃ (Gd) був введений за добу до трансфузії спленоцитів в якості негативного контролю (Tr – трансплантація); * – відмінності достовірні в порівнянні з групою ДСТ1 ($p < 0,05$).

може свідчити про реакцію імунної системи реципієнта на чужорідний трансплантаційний матеріал і відображати процес гострого відторгнення алографта. Вміст субодиноці LMP7 достовірно не відрізнявся від інтактного контролю у всіх досліджуваних органах тварин експериментальних груп, окрім тварин з індукцією ДСТ, у яких в печінці спостерігалось зменшення вмісту цієї субодиноці на 80% ($p < 0,05$).

При вивченні експресії LMP2 та LMP7 в трансплантатах на 30 добу методом вестерн-блотінгу було встановлено, що у всіх алографтах спостерігається збільшення кількості імунних протеасом (Рис. 11), однак їх розподіл у відторгнутих (ДСТ1) і прийнятих (ДСТ2) трансплантатах мав неоднаковий характер: у відторгнутих алографтах достовірно збільшувалася кількість LMP7, а в тих, які вижили, – LMP2.

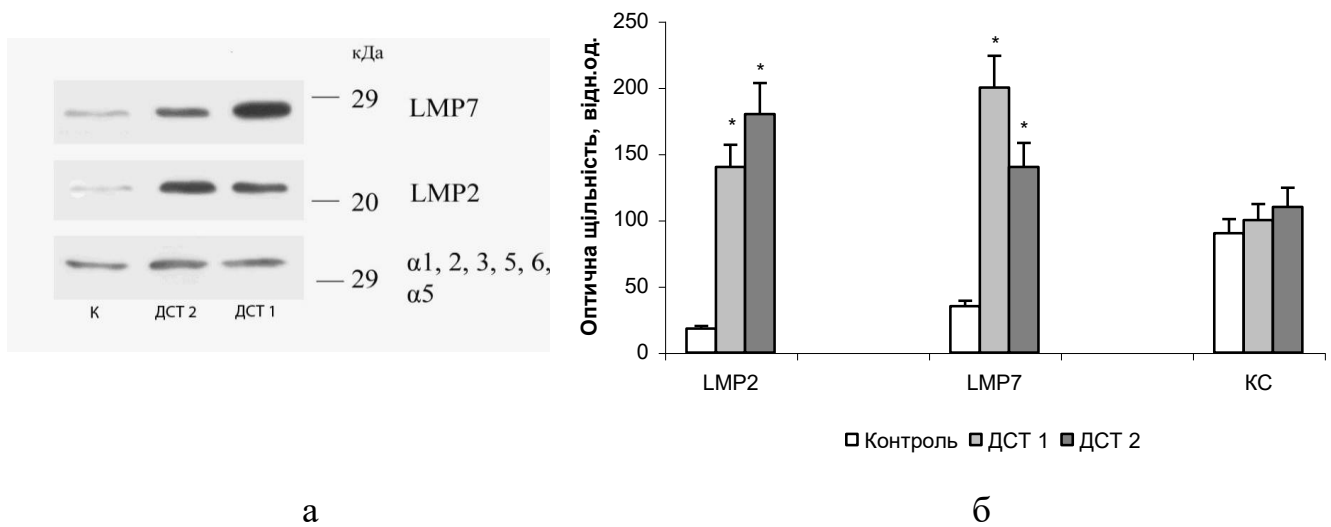


Рис. 11. Вміст імунних і конститутивних субодиноць (КС) протеасом у відторгнутих (ДСТ1) та прийнятих (ДСТ2) трансплантатах тканини яєчників: а – вестерн-блотінг освітлених гомоненатів з використанням антитіл до субодиноць LMP2, LMP7 та конститутивних субодиноць $\alpha 1, 2, 3, 5, 6, 7/\alpha 5$; б – відносна кількість імунних і конститутивних субодиноць; * – відмінності достовірні в порівнянні з контролем (К), в якості якого були використані нативні залози ($p < 0,05$).

Таким чином, зменшення експресії субодиноці LMP7 у тварин з прийнятим трансплантатом (група ДСТ2) на 30 добу було встановлено як в печінці реципієнтів, так і в трансплантатах. Отримані результати дозволяють зробити висновок, що при індукції ДСТ спостерігається зсув балансу LMP2 та LMP7, які експресуються в контролі приблизно в однаковій кількості, у бік збільшення LMP2 та зменшення LMP7 у реципієнтів із толерантністю.

Отримані дані дають підстави для використання показника співвідношення імунних протеасом LMP2 та LMP7 у трансплантаті і печінці реципієнта в якості біомаркера толерантності при трансплантації.

ВИСНОВКИ

Дисертаційна робота містить теоретичне обґрунтування та експериментальне вирішення проблеми забезпечення структурно-функціональної збереженості ендокринних тканин при трансплантації без використання імуносупресантів, яке полягає у використанні кріоконсервування для зниження імуногенності пересаджуваної тканини та індукції донор-специфічної толерантності шляхом передтрансплантаційної трансфузії свіжовиділених або кріоконсервованих спленоцитів. Застосування такого підходу дозволило підвищити гормональну продукцію трансплантатів тканини щитовидної залози, сім'яників, наднирників, яєчників, продовжити строк виживаності трансплантатів у порівнянні з вихідними показниками, а також виявити біологічні маркери трансплантаційної толерантності у реципієнтів.

1. Встановлені морфофункціональні зміни тканин ендокринних залоз (щитовидної залози, сім'яників, наднирників) після гетеротопічної трансплантації під капсулу нирки без застосування імуносупресії, а також визначені терміни виживаності трансплантатів. Ало- та ксенотрансплантати піддаються гострому відторгненню, яке включає в себе лейкоцитарну інфільтрацію, що розвивається з перших днів і досягає максимуму на 7-14 добу; прогресуюче зменшення площі тканини трансплантата і заміщення її сполучною тканиною до 35 доби.

2. Морфометричні дослідження дозволили встановити індивідуальні особливості виживаності алогенних і ксеногенних трансплантатів свіжовиділених тканин ендокринних залоз. Площа неушкодженої відторгненням тканини на 30 добу після трансплантації для ало- і ксенотрансплантатів становить, відповідно: 0,1 і 0,3% для тканини щитовидної залози; 25 і 0,1% для тканини сім'яників; 10,5 і 20% для тканини наднирників.

3. Кріоконсервування фрагментів надниркових залоз з використанням швидкостей охолодження в інтервалі $10 \rightarrow 100^\circ\text{C}/\text{хв}$ приводить до зменшення кількості антигенпрезентуючих клітин у тканині. Показники експресії CD11c як маркера дендритних клітин і CD11b як маркера моноцитарно-макрофагальних клітин зменшуються після кріоконсервування на 78,3 і 60% при заморожуванні зі швидкістю охолодження $10^\circ\text{C}/\text{хв}$, на 94,1 і 93,4% при заморожуванні зі швидкістю охолодження $>100^\circ\text{C}/\text{хв}$, відповідно.

4. Кріоконсервування з високою швидкістю охолодження ($>100^\circ\text{C}/\text{хв}$) в комплексі з культивуванням після відігрівання сприяє виживаності алогенних трансплантатів тканини наднирників. Площа тканини з неушкодженою структурою на 30 добу після трансплантації кріоконсервованої тканини наднирників склала 42,2%, що в 4 рази перевищувало значення даного показника, встановленого при трансплантації незаморожених фрагментів тканини.

5. При використанні кріоконсервованої тканини щитовидної залози та сім'яників для ало- і ксенотрансплантації не встановлено достовірних відмінностей у виживаності в порівнянні з незамороженим контролем. Площа тканини з неушкодженою структурою для ало- і ксенотрансплантатів на 30 добу після

трансплантації становить відповідно: 2,7 і 1,6% для кріоконсервованої тканини щитовидної залози; 1,9 і 0,1% для кріоконсервованої тканини сім'яників.

6. Індукція донор-специфічної толерантності шляхом трансфузії спленоцитів донорського походження в порталну вену реципієнтів за 7 діб до алотрансплантації забезпечує високу структурно-функціональну збереженість ендокринних тканин. Площа тканини з неушкодженою структурою після трансплантації в умовах індукції ДСТ становить 82,9% для тканини яєчників, 81,4% для тканини сім'яників, 78,4% для тканини наднирників, 50% для тканини щитовидної залози.

7. Використання кріоконсервованих спленоцитів в якості індукуючого толерантності агента в дозі 1×10^7 клітин/реципієнта, яка була встановлена для незаморожених клітин, не призводить до індукції донор-специфічної толерантності. Для реалізації ефекту індукції ДСТ необхідне збільшення дози кріоконсервованих спленоцитів до $5,5 \times 10^7$ клітин/реципієнта.

8. Показник вмісту регуляторних Т-лімфоцитів з фенотипом $CD4^+CD25^+Foxp3^+$ в периферичній крові реципієнтів на 30 добу після алотрансплантації в умовах індукції ДСТ не відображає стану толерантності до трансплантату ендокринної тканини. Кількість регуляторних Т-лімфоцитів достовірно не відрізнялася між показниками інтактного контролю та експериментальних тварин-реципієнтів, які мали високу структурно-функціональну збереженість трансплантата після індукції ДСТ.

9. Експресія імунних субодиниць протеасом в печінці як місці введення донорських спленоцитів віддзеркалює процеси, що відбуваються в імунній системі реципієнтів при індукції донор-специфічної толерантності. У печінці тварин-реципієнтів, які мали високу структурно-функціональну збереженість трансплантата, на 30 добу після трансплантації в умовах індукції ДСТ спостерігається зменшення експресії імунної субодиниці протеасом LMP7 на 80%.

10. Порівняльна оцінка вмісту імунних субодиниць протеасом в алографтах на 30 добу після трансплантації в умовах індукції ДСТ дозволила встановити достовірну різницю в експресії субодиниць LMP2 і LMP7 між відторгнутими та збереженими трансплантатами ендокринної тканини. В алографтах, які мали ознаки відторгнення, спостерігалось збільшення вмісту субодиниці LMP7, в той час як в алографтах з високою структурно-функціональною збереженістю збільшувався вміст субодиниці LMP2. На основі отриманої закономірності співвідношення субодиниць протеасом LMP2/LMP7 може бути рекомендовано в якості біомаркера толерантності імунної системи реципієнта до трансплантата.

11. Експериментально встановлено потенційну можливість розробки клінічних підходів для оптимізації лікування гормонодефіцитних станів за допомогою трансплантації тканин ендокринних залоз без використання імуносупресантів. Найбільш ефективним з вивчених методом, при якому спостерігається висока структурно-функціональна збереженість тканини ендокринної залози і відсутність ознак відторгнення на досліджуваному терміні спостереження 30-35 діб, є трансплантація тканини в умовах індукції донор-специфічної толерантності шляхом передтрансплантаційної трансфузії свіжовиділених або кріоконсервованих спленоцитів.

ПЕРЕЛІК НАУКОВИХ ПРАЦЬ, ОПУБЛІКОВАНИХ ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ

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 11-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. 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.
6. Бондаренко Т.П. Вплив диметилсульфоксиду та кріоконсервування на функціональні характеристики органної культури сім'яників / Т.П. Бондаренко, Н.М. Алабедадькарім, Г.А. Божок, Салех Абу-Жаяб // Проблемы эндокринної патології. – 2003. – №2. – С.57-62.
7. 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 // Проблемы екології та медицини. – 2003. – Т.7, №1-2. – С. 3-7.
8. Бондаренко Т.П. Ксенотрансплантація кріоконсервованого ендокринного матеріалу як метод корекції гіпофункції залоз в експерименті / Т.П. Бондаренко, Г.А. Божок, Є.І. Легач, Н.М. Алабедадькарім, Н.О. Волкова, С.В. Луговий, І.І. Самченко // Трансплантологія. – 2003. – Т.4, №1. – С. 60-63.
9. 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.

10. 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.
11. Божок Г.А. Вплив кріоконсервування на імунно-біологічні властивості фрагментів надниркових залоз при алотрансплантації / Г.А. Божок, Н.М. Алабедадькарім, Є.І. Легач // Трансплантологія. – 2004. – Т.5, №1. – С. 88-92.
12. 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.
13. Божок Г.А. Теоретические аспекты трансплантации эндокринных клеток и тканей / Г.А. Божок, Е.И. Легач, Н.М. Алабедадькарим, Т.П. Бондаренко // Трансплантологія. – 2005. – Т.8, №2. – С. 10-21.
14. 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.
15. 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.
16. 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.
17. Гурина Т.М. Влияние скорости охлаждения в различных температурных интервалах на сохранность стероидогенного потенциала суспензии интерстициальных клеток семенников взрослых крыс / Т.М. Гурина, А.В. Пахомов, Г.А. Божок // Проблемы криобиологии. – 2007. – Т.17, №4. – С. 394-402.
18. 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 // Проблеми ендокринної патології. – 2007. – №4. – С. 78-83.
19. 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 // Трансплантологія. – 2007. – Т.9, №1. – С. 19-21.
20. Легач Є.І. Ефект стимуляції тиротропіном на рівень тироксину в плазмі крові гіпотиреоїдних 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.
21. 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.
 22. 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 // Трансплантологія. – 2008. – Т.10, №1. – С. 143-145.
 23. 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.
 24. 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.
 25. Божок Г.А. Предтрансплантационное введение донорских лимфоцитов пролонгирует выживаемость аллогенной ткани яичников у овариэктомированных животных реципиентов / Г.А. Божок, В.В. Кирошка, Ю.О. Тищенко, Е.И. Легач // Проблеми ендокринної патології. – 2009. – №4. – С.79-84.
 26. 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.
 27. Божок Г.А. Влияние интрапортального введения донорских спленоцитов и хлорида гадолиния на выживаемость тканевых аллогraftов эндокринных желез / Г.А. Божок, В.В. Кирошка, Ю.О. Тищенко, Ю.В. Люпина, Я.Д. Карпова, Е.И. Легач // Медицина сьогодні і завтра. – 2011. – №1-2 (50-51). – С. 13-16.
 28. 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.
 29. Божок Г.А. Влияние введения донорских спленоцитов на выживаемость фрагментов ткани щитовидной железы при аллотрансплантации / Г.А. Божок // Проблеми ендокринної патології. – 2011. – №1. – С. 60-66.
 30. 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.
 31. 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.

32. 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. Богомякова, Т.П. Бондаренко, Н.П. Шарова // Вестник трансплантологии и искусственных органов. – 2011. – Т.13, №3. – С. 73-81.
33. 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.
34. 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. Liupina, E.I. Legach, T.M. Astakhova, A.A. Stepanova, T.P. Bondarenko, N.P. Sharova // Biology Bulletin. – 2012. – Vol.39, №3. – С. 244-249.
35. 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.
36. Бондаренко Т.П. Культивирование, криоконсервирование и трансплантация ткани эндокринных желез / Т.П. Бондаренко, Г.А. Божок, Е.И. Легач, В.В. Киروشка, В.Д. Устиченко, С.Б. Билявская, 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.
37. Пат. № 4845 Україна, МПК⁷ C12N 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.
38. 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.
39. 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.
40. Пат. № 46440 Україна, МПК⁷ C12N 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.

41. Пат. № 91787 Україна, МПК, А01N 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.
42. Бондаренко Т.П. Влияние димексида на базальную секрецию тиреоидных гормонов органотипической культурой щитовидной железы новорожденных поросят / Т.П. Бондаренко, С.В. Луговой, Н.М. Алабедадькарим, 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.
43. Бондаренко Т.П. Трансплантація кріоконсервованої культури клітин адренокортикальної тканини новонароджених поросят / Т.П. Бондаренко, Г.А. Божок, Н.М. Алабедадькарим, Є.І. Легач, С.В. Луговий, Г.В. Геращенко // Трансплантологія. – 2000. – Т.1, №1. – С.177-178.
44. Бондаренко Т.П. Влияние экстрактов гипофиза на содержание белка и 11-ОКС при культивировании органной культуры надпочечников новорожденных поросят / Т.П. Бондаренко, А.В. Геращенко, Н.М. Алабедадькарим, Г.А. Божок // Труды научной конференции, посвященной 100-летию со дня рождения акад. И.Н. Буланкина. – Харьков, 2001. – С. 22-23.
45. 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.
46. Волкова Н.А. Влияние трансплантации кріоконсервированной органной культуры щитовидной железы на содержание нуклеиновых кислот в печени кроликов / Н.А. Волкова, Г.А. Божок, Н.М. Алабедадькарим, Т.П. Бондаренко // Проблемы криобиологии. – 2002. – №1. – С. 115-116.
47. Волкова Н.А. Изучение функционирования кріоконсервированной 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.
48. 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.
49. 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. Алабедадькарим, Г.А. Божок // Матеріали науково-практичної конференції, присвяченій 150-річчю з дня народження академіка В.Я.Данилевського. – Харків, 2002. – С.27-28.

50. 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.
51. 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.
52. Алабедацькарім Н.М. Експериментальна трансплантація органотипової культури надниркових залоз в ало- та ксенотрансплантатних системах / Н.М. Алабедацькарім, Г.А. Божок, Є.І. Легач, Т.П. Бондаренко // Трансплантологія. – 2004. – Т.7, №3. – С. 223-225.
53. 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.
54. Бондаренко Т.П. Органні культури ендокринних залоз: кріоконсервування, трансплантація / Т.П. Бондаренко, Г.А. Божок, Є.І. Легач, Н.М. Алабедацькарім // Установчий з'їзд Українського товариства клітинної біології. – Львів, 2004. – С. 237.
55. Божок Г.А. Взаимная регуляция гормонопродукции нативных и криоконсервированных органных культур надпочечных и щитовидных желез / Г.А. Божок, Н.М. Алабедацькарім, Н.Ф. Губина // Матеріали науково-практичної конференції "Сучасні напрямки розвитку ендокринології". – Харків, 2004 – С. 12-13.
56. Божок Г.А. Функціональна активність кріоконсервованої органотипічної культури щитовидної залози при ксенотрансплантації: Матеріали конференції «Актуальні проблеми і досягнення кріобіології і кріомедицини» / Г.А. Божок, Є.І. Легач, Н.М. Алабедацькарім, С.Б. Білявська, Т.П. Бондаренко // Проблемы криобиологии. – 2005. – Т.15, №3. – С. 425-426.
57. 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.
58. 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.
59. 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, Є.І. Легач, Н.Ф. Губина, Б.І. Марков, Т.П. Бондаренко // Проблемы криобиологии. – 2005. – Т.15, №3. – С.433-434.

60. 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.
61. 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.
62. Легач Є.І. Биохимические показатели крови гипотиреоидных крыс после ксенотрансплантации органотипических культур щитовидной железы и семенников / Є.І. Легач, Г.А. Божок // Матеріали ІХ Українського біохімічного з'їзду. – Харків, 2006, Т.2. – С.77.
63. 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.
64. 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.
65. Божок Г.А. Использование флуоресцентных полиметиновых красителей в клеточной трансплантации / Г.А. Божок, Н.М. Алабедадькарим, 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.
66. 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.
67. 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.
68. 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.
69. 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.
70. 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.
71. 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.
 72. 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.
 73. 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, 2011. – P. 298-299.
 74. Сидоренко О.С. Получение и криоконсервирование первичной культуры клеток надпочечников новорожденных поросят / О.С. Сидоренко, Г.А. Божок, Е.И. Легач, Т.П. Бондаренко // Матеріали ІХ науково-практичної конференції „Ендокринна патологія у віковому аспекті”. – Харків, 2011. – С. 89-90.
 75. 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.
 76. 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.
 77. 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.

АНОТАЦІЯ

Божок Г.А. Кріоконсервування та індукція толерантності як фактори впливу на структурно-функціональну збереженість ендокринних тканин за умов трансплантації. — Рукопис.

Дисертація на здобуття наукового ступеня доктора біологічних наук за спеціальністю 03.00.19 – кріобіологія. – Інститут проблем кріобіології і кріомедицини НАН України, Харків, 2013.

Дисертаційна робота присвячена вивченню впливу кріоконсервування та індукції донор-специфічної толерантності на структурно-функціональну збереженість ендокринних тканин (щитовидної залози, наднирників, статевих залоз) за умов трансплантації тваринам з моделями гормональної недостатності.

Встановлено, що морфофункціональні зміни ендокринних тканин після гетеротопічної ало- та ксенотрансплантації під капсулу нирки без застосування імуносупресії відбуваються протягом перших тижнів та включають лейкоцитарну інфільтрацію, прогресуюче зменшення площі тканини трансплантата і заміщення її сполучною тканиною. Використання кріоконсервування для зниження імуногенності пересаджуваної тканини або індукції донор-специфічної толерантності у реципієнтів шляхом передтрансплантаційної трансфузії свіжовиділених або кріоконсервованих спленоцитів дозволяють значно підвищити гормональну продукцію трансплантатів ендокринних тканини та забезпечити їх високу структурно-функціональну збереженість у порівнянні з вихідними показниками. Встановлено, що рівень експресії імунних субодиниць протеасом LMP2 та LMP7 в трансплантаті та органах реципієнта (печінці, селезінці, тимусі) віддзеркалює процеси, що відбуваються в імунній системі реципієнтів при індукції донор-специфічної толерантності, на основі чого співвідношення субодиниць протеасом LMP2/LMP7 може бути рекомендовано в якості біомаркера толерантності імунної системи реципієнта до трансплантата.

Ключові слова: кріоконсервування, трансплантація, щитовидна залоза, наднирники, сім'яники, яєчники, донор-специфічна толерантність, протеасоми.

АННОТАЦИЯ

Божок Г.А. Криоконсервирование и индукция толерантности как факторы влияния на структурно-функциональную сохранность эндокринных тканей в условиях трансплантации. – Рукопись.

Диссертация на соискание ученой степени доктора биологических наук по специальности 03.00.19 – криобиология. – Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, Харьков, 2013.

Диссертационная работа посвящена изучению влияния криоконсервирования и индукции донор-специфической толерантности на структурно-функциональную сохранность эндокринных тканей (щитовидной железы, надпочечников, половых желез) в условиях трансплантации животным с моделями гормональной недостаточности.

С этой целью в работе проведено исследование сроков выживаемости и гормональной функции алло- и ксенографтов свежевыделенной ткани эндокринных

желез при гетеротопической трансплантации без использования иммуносупрессантов животным с моделями гормональной недостаточности; выявлены условия снижения иммуногенности ткани при варьировании скорости охлаждения на этапе криоконсервирования; проведен сравнительный анализ жизнеспособности, гормональной секреции и структурной целостности тканей эндокринных желез, криоконсервированных с разной скоростью охлаждения *in vitro* и при трансплантации; изучено влияние индукции донор-специфической толерантности, осуществляемой путем трансфузии свежевыделенных и криоконсервированных спленоцитов, на выживаемость и гормональную активность трансплантатов эндокринной ткани; исследованы субпопуляция регуляторных Т-лимфоцитов $CD4^+CD25^+Foxp3^+$ в крови реципиентов, экспрессия иммунных протеасом в трансплантатах ткани эндокринных желез и органах реципиентов (печени, селезенке, тимусе) после трансплантации в условиях нормы и индукции донор-специфической толерантности.

Результаты исходных экспериментов по определению сроков выживаемости свежевыделенной ткани эндокринных желез позволили 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 надпочечников достоверно выше, чем ткани щитовидной железы и семенников.

С целью пролонгирования срока выживаемости трансплантатов эндокринной ткани дальнейшие исследования были проведены в двух направлениях: уменьшение иммуногенности трансплантата с помощью криоконсервирования и индукция донор-специфической толерантности у реципиентов путем трансфузии свежевыделенных или криоконсервированных спленоцитов донорского происхождения. Структурно-функциональная сохранность эндокринной ткани оценивалась по двум основным показателям: содержанию гормонов в сыворотке крови реципиентов и выживаемостью ткани, верифицируемой при проведении гистологических и морфометрических исследований.

Установлено, что 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 82,7 и 56,2% после криоконсервирования со скоростью охлаждения $40^\circ\text{C}/\text{мин}$; на 94,1 и 93,4% при замораживании со скоростью охлаждения $>100^\circ\text{C}/\text{мин}$.

Использование криоконсервирования с высокой скоростью охлаждения ($>100^\circ\text{C}/\text{мин}$) в комплексе с культивированием после отогрева позволило повысить

выживаемость 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 исходного показателя.

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

Индукция донор-специфической толерантности путем трансфузии свежевыделенных спленоцитов донорского происхождения в портальную вену реципиентов за 7 суток до аллотрансплантации позволила обеспечить 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.

В работе показана возможность использования криоконсервированных спленоцитов в качестве индуцирующего толерантность агента. Экспериментально установлено, что для реализации эффекта индукции донор-специфической толерантности необходимо увеличение дозы криоконсервированных спленоцитов с 1×10^7 (как для свежевыделенных клеток) до $5,5 \times 10^7$ клеток/реципиента.

Проведенные исследования показали, что содержание регуляторных Т-лимфоцитов с фенотипом $CD4^+CD25^+Foxp3^+$ в периферической крови реципиентов на 30 сутки после трансплантации в условиях индукции донор-специфической толерантности 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.

Анализ экспрессии иммунных субъединиц протеасом LMP2 и LMP7 в трансплантатах ткани эндокринных желез и органах реципиентов (печени, селезенке, тимусе) позволил установить некоторые закономерности развития донор-специфической толерантности. Установлено, что в печени животных-реципиентов, имевших высокую структурно-функциональную сохранность трансплантата, наблюдается уменьшение экспрессии субъединицы LMP7 на 80%. Сравнительная оценка содержания иммунных субъединиц протеасом в аллогraftах на 30 сутки после трансплантации продемонстрировала достоверную разницу в экспрессии субъединиц LMP2 и LMP7 между отторгнутыми и прижившимися трансплантатами эндокринной ткани. В аллогraftах, имевших признаки отторжения, наблюдалось увеличение содержания субъединицы LMP7, в то время как в аллогraftах с высокой структурно-функциональной сохранностью 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.

Полученные в диссертационной работе экспериментальные результаты демонстрируют потенциальную возможность разработки клинических подходов для оптимизации лечения гормонодефицитных состояний с помощью трансплантации ткани эндокринных желез без использования иммуносупрессантов.

Ключевые слова: криоконсервирование, трансплантация, щитовидная железа, надпочечники, семенники, яичники, донор-специфическая толерантность, протеасомы.

ANNOTATION

Bozhok G.A. Cryopreservation and induction of tolerance as factors of impact on the structural and functional preservation of endocrine tissues after transplantation. - Manuscript.

Dissertation for the doctor of biological sciences degree in specialty 03.00.19 – Cryobiology. – Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine of the National Academy of Sciences of Ukraine, Kharkov, 2013.

The dissertation is devoted to studying the effects of cryopreservation and induction of donor-specific tolerance on structural and functional preservation of endocrine tissues (thyroid gland, adrenal glands, gonads) under transplantation to animals with models of hormone deficiency.

It was found that morphological and functional changes in endocrine tissues after heterotopic allo- and xenotransplantation underneath the kidney capsule without immunosuppression occurring during the first weeks and include leukocyte infiltration, progressive decrease and substitution of the graft area by connective tissue. The use of cryopreservation to reduce immunogenicity of transplanted tissues or induction of donor-specific tolerance in recipients by pretransplant transfusion of fresh or cryopreserved splenocytes can significantly increase the hormone production of endocrine tissue grafts and ensure their high structural and functional preservation compared with baseline indices. It was demonstrated that the expression of immune proteasome subunits LMR2 and LMR7 in graft and recipient organs (liver, spleen, thymus) reflects processes in the immune system of the recipient, which occur during induction of donor-specific tolerance, based on this, proteasome subunits LMP2/LMP7 ratio could be recommended as a biomarker of tolerance of recipient's immune system to the graft.

Key words: cryopreservation, transplantation, thyroid gland, adrenal glands, testes, ovaries, donor-specific tolerance, proteasome.

Відповідальний за випуск – д.б.н. Г.О. Бабійчук