## Для заказа доставки данной работы воспользуйтесь поиском на сайте по ссылке: <http://www.mydisser.com/search.html>

**АКАДЕМІЯ МЕДИЧНИХ НАУК УКРАЇНИ**

**НАЦІОНАЛЬНИЙ ІНСТИТУТ ХІРУРГІЇ ТА ТРАНСПЛАНТОЛОГІЇ**

**ІМЕНІ О.О.ШАЛІМОВА**

**ЛЕГАЧ ЄВГЕН ІВАНОВИЧ**

**УДК 616–089.843:615.361.43/.44.014.41**

КОМБІНОВАНА ТРАНСПЛАНТАЦІЯ КРІОКОНСЕРВОВАНИХ ОРГАНОТИПОВИХ КУЛЬТУР ЕНДОКРИННИХ ЗАЛОЗ

(експериментальне дослідження)

**14.01.08 – трансплантологія і штучні органи**

**14.01.35 – кріомедицина**

**АВТОРЕФЕРАТ**

**дисертації на здобуття наукового ступеня**

**доктора медичних наук**

**Київ – 2008**

Дисертацією є рукопис

Робота виконана в Інституті проблем кріобіології і кріомедицини Національної Академії наук України

**Науковий консультант:** доктор біологічних наук, професор

**Бондаренко Тетяна Петрівна**,

Інститут проблем кріобіології і кріомедицини

Національної Академії наук України,

завідувач відділом кріобіохімії і фармакології

нейрогуморальних систем

**Офіційні опоненти:** доктор медичних наук, професор

 **Денісов Віктор Костянтинович,**

Донецький Національний медичний

університет ім. М.Горького,

професор кафедри урології та нефрології,

Донецький трансплантаційний центр,

 керівник центру

доктор медичних наук, професор

**Малижев Вадим Олексійович**,

Український науково–практичний центр

ендокринної хірургії, трансплантації

ендокринних органів і тканин МОЗ України,

завідувач лабораторією клінічної імунології

доктор медичних наук, професор

**Бобирьова Людмила Єгорівна**,

Вищий державний навчальний заклад України

«Українська медична стоматологічна академія»,

завідувач кафедри ендокринології з лікувальною фізкультурою та спортивною медициною

Захист відбудеться «\_\_\_\_\_» \_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_ 2009 р. о \_\_\_\_\_ годині на засіданні спеціалізованої вченої ради Д 26.561.01 при Національному інституті хірургії та трансплантології імені О.О. Шалімова АМН України (03680, м. Київ, вул. Героїв Севастополя, 30)

З дисертацією можна ознайомитись у бібліотеці Національного інституту хірургії та трансплантології імені О.О. Шалімова АМН України (03680, м. Київ, вул. Героїв Севастополя, 30)

Автореферат розіслано «\_\_\_\_\_» \_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_ 2008 року.

Вчений секретар спеціалізованої

вченої ради Д 26.561.01

доктор медичних наук О. М. Литвиненко

ЗАГАЛЬНА ХАРАКТЕРИСТИКА РОБОТИ

**Актуальність теми**. Статистичні дані свідчать про зростання кількості захворювань ендокринної системи серед населення працездатного віку в світі та зокрема в Україні. Поширеність маніфестного гіпотиреозу в світі складає за різними оцінками 1,5–6%, а субклінічного – 4,3-15% (Н.А. Петунина, 2006; В.В. Фадеев, 2007). За даними ВООЗ смертність від цукрового діабету (ЦД) складає 5,2% від загальної летальності, а кількість людей, що страждають на ЦД, збільшиться до 2030 року майже до 366 млн осіб (S. Wild, 2004; G. Roglic, 2005). Загальновизнано, що 40–60% усіх випадків безпліддя чоловіків спричинено гіпогонадизмом, а віковий дефіцит андрогенів (синдром PADAM) спостерігається у 20% (С.Ю. Калиниченко, 2003; J.J. Brennan, 2006). Частота зустрічаємості первинної хронічної надниркової недостатності (ХНН) складає 0,0001% (И.И. Дедов, 2002), однак розвиток синдрому ХНН після відміни глюкокортикоїдів, що були призначені як протизапальні та імуносупресивні препарати, спостерігається у 50–70% хворих (М.И. Балаболкин, 2002).

Практично при всіх формах гіпотиреозу, гіпокортицизму, ЦД 1 типу та дефіциті андрогенів замісна гормональна терапія (ЗГТ) є терапією вибору. Велика кількість спостережень вказує на важливу роль ЗГТ у патогенезі порушень серцево–судинної, імунної систем та системи травлення (R. Polikar, 1993; B. Papaziogas, 2002; Г.А. Мельниченко, 2003; Ю.А. Орлова, 2006; М.Д. Тронько, 2006). Не можна також не враховувати те, що в організмі, скомпрометованому нейроендокринними порушеннями, існує загроза виникнення порочного метаболізму екзогенного гормонального препарату з проявом токсичних ефектів його дериватів, що веде до нечутливості або непереносимостіпрепарату і, в результаті − до повернення проблеми лікування гормональної недостатності.

Альтернативою ЗГТ є трансплантація клітин/тканин ендокринних залоз. Експериментальні та клінічні дані свідчать про успішне лікування методом трансплантації таких ендокринних порушень, як цукровий діабет та його ускладнення (В.И. Шумаков, 1993; A.M. Shapiro, 2000; R.A. Valdes–Gonzalez, 2007), гіпопаратиреоз (М.Д. Тронько, 2003; І.П. Пастер, 2004), гіпотиреоз (І.С.Турчин, 1996), недостатність наднирників (Р.М. Сичинава, 1997), гіпопітуїтаризм, дефіцит статевих гормонів (И.Д. Кирпатовский, 2005). У багатьох роботах трансплантація ендокринного органа, тканини або клітин розглядається як найбільш фізіологічний підхід до терапії ендокринних розладів (О.С. Ларін, 2007). Трансплантовані ендокринні залози, крім синтезу і секреції певних гормонів, здатні до продукції біологічно активних медіаторів в основному пептидної природи, що виконують функції як паракринних, так і аутокринних фізіологічних регуляторів.

Суттєвим недоліком методу лікування ендокринної недостатності шляхом трансплантації є нетривалий ефект. Без використання імуносупресантів максимальна тривалість дії трансплантату складає від 1,5 місяців до 1 року (Р.М. Січінава, 2003; S. Schlatt, 2006). Використання імуносупресивної терапії небажано і навіть протипоказано, тому що вона має пригнічуючий вплив на гормональну секрецію ендокринної тканини, яка пересаджується (T.G. Hammond, 1995; A. Penfornis, 2006). Ці обставини суттєво зменшують привабливість використання методу трансплантації у клінічній ендокринології.

У зв’язку з цим пошук способів подовження функціонування трансплантату є актуальною медичною проблемою. Одним з напрямків її рішення є комбінована трансплантація. В літературі зустрічаються поодинокі роботи щодо значної переваги комбінованих трансплантатів у порівнянні з монотрансплантатами. Ця перевага полягає в збільшенні продуктів секреції (C. Ricordi, 1991; A.M. Davalli, 1999), стимуляції проліферативних процесів (R.B. Aramant, 1999), а також імунопротекції (G.S. Selawry, 1993; H.P. Korbutt, 2000). Захисний агент – додатковий трансплантат, який пересаджують разом з основним трансплантатом – виконує протективну роль (наприклад, клітини Сертолі) та допомагає запобігти реакції відторгнення (J.M. Dufour, 2004). Використання комбінованої трансплантації може сприяти покращенню функціонування основного трансплантата за рахунок регуляторно–трофічних факторів, що секретуються додатковим трансплантатом. Це особливо важливо для гетеротопічних тканинних/клітинних трансплантатів, які при пересадці спочатку не мають васкулярної підтримки, внаслідок чого спостерігаються некроз і деструкція трансплантата.

Однак до теперішнього часу відсутнє комплексне дослідження результативності комбінованої трансплантації у корекції гормонодефіцитного стану. Крім того, безумовно актуальним є всебічне вивчення комбінованої трансплантації у разі необхідності заміщення функції одночасно декількох залоз, наприклад при поліендокринопатії.

На сучасному етапі розвитку технологій клітинного культивування використання тканинних і клітинних трансплантатів стає все більш розповсюдженим. Однак, при застосуванні цього методу для лікування ендокринних порушень необхідно враховувати,що функціональною одиницею ендокринних тканин є клітинні конгломерати (фолікули, острівці та ін.), тому в трансплантаті важливо зберегти нативну тканинну архітектуру і регуляторні взаємовідношення, а це можливо при отриманні органотипової культури.

Використання нового напрямку в трансплантаційних технологіях – комбінованої трансплантації – обумовило появу нових питань. Перш за все, це питання про можливість комбінованого культивування тканин перед трансплантацією. Особливо це стосується ендокринних тканин, функціонування яких пов’язано складними гуморальними взаємовідносинами в рамках гіпоталамо–гіпофізарно–ефекторної осі. Необхідно також оцінити можливість використання тканин наднирників, що секретують імуносупресорні гормони, як допоміжного трансплантату, який буде здійснювати імунопротекторний ефект. Також для досягнення трофічного ефекту і попередження пригнічення секреторної функції або життєдіяльності основного трансплантата при комбінованій трансплантації важливо врахувати, в яких регуляторно–метаболічних взаємозв’язках знаходяться ті чи інші тканини.

Потреба у довгостроковому зберіганні донорського матеріалу сприяла розробці технологій кріоконсервування клітин та тканин ендокринних залоз (В.І. Грищенко, 1993; В.А. Чуйко, 1995; Б.П. Сандомирський, 2000). Але, незважаючи на певні успіхи в галузі кріобіології, ряд принципових питань залишається невирішеним, що гальмує впровадження методу трансплантації у клінічну практику. Зокрема, це стосується питання заморожування фрагментів тканин або органотипової культури, тому що ці об’єкти мають більш складну структурну організацію в порівнянні з клітинами. Способи кріоконсервування, що були розроблені для клітинних суспензій, не прийнятні для органотипової культури, у зв’язку з чим розробка методів кріоконсервування органотипових культур ендокринних залоз є дуже актуальною.

Таким чином, актуальність вищезазначених проблем обумовила необхідність розробки оптимальних умов комбінованого культивування та кріоконсервування органотипових культур ендокринних залоз, а також вивчення їх гормонопродукуючого потенціалу при лікуванні гормональної недостатності методом комбінованої трансплантації.

**Зв’язок роботи з науковими програмами, планами, темами.** Роботавиконана у відділі кріобіохімії і фармакології нейрогуморальних систем Інституту проблем кріобіології і кріомедицини НАН України в рамках двох науково–дослідних тем: «Дослідження механізмів функціонування кріоконсервованих органних культур ендокринних тканин» (шифр 2.2.6.03, № державної реєстрації 0101U003478) та «Властивості ендокринних тканин за умов кріоконсервування та трансплантації експериментальним тваринам» (шифр 2.2.6.32, № державної реєстрації 0106U002163), в яких автор був відповідальним виконавцем.

**Мета і задачі дослідження**. Мета дослідження – вивчити ефективність та доцільність застосування комбінованого підходу на етапах передтрансплантаційної обробки біологічного матеріалу (тканин щитовидної, підшлункової залоз, наднирників та сім’яників) шляхом культивування та кріоконсервування, а також при трансплантації тваринам з експериментальними гіпотиреозом, інсулінозалежним діабетом, гіпокортицизмом та андрогендефіцитним станом.

Відповідно до поставленої мети передбачалося вирішити наступні **задачі.**

1. Вивчити гормональну активність органотипових культур ендокринних залоз (щитовидної і підшлункової залоз, сім’яників і наднирників) при комбінованому культивуванні в порівняльному аспекті з монокультурами, на основі чого розробити оптимальні умови комбінованого органотипового культивування кожної із зазначених залоз.

2. На основі оцінки життєздатності та функціональної активності органотипових культур ендокринних залоз (щитовидної і підшлункової залоз, сім’яників і наднирників) розробити способи їх кріоконсервування з використанням високих швидкостей охолодження.

3. Оптимізувати умови відновлення гормональної активності органотипових культур ендокринних залоз (щитовидної і підшлункової залоз, сім’яників і наднирників) після кріоконсервування за допомогою комбінованого рекультивування.

4. Створити модель експериментальної гормональної недостатності відповідних ендокринних залоз у тварин (хірургічним способом або з використанням фармакологічних препаратів).

5. Оцінити зміну гормонального стану та метаболічних показників у експериментальних тварин до та після трансплантації біологічного матеріалу ендокринних залоз, який піддавали різним видам передтрансплантаційної обробки (нативні фрагменти тканини, органотипові культури, кріоконсервовані органотипові культури та рекультивовані органотипові культури).

6. Порівняти стан експериментальних тварин з гормональною недостатністю після моно- та комбінованої трансплантації нативних фрагментів та незаморожених органотипових культур ендокринних залоз, а також культур, яких піддавали кріоконсервуванню і рекультивуванню, шляхом дослідження фізіологічних і біохімічних показників; на основі одержаних результатів зробити висновки про активність і тривалість функціонування ало – і ксенотрансплантатів.

7. В порівняльному аспекті оцінити гормонопродукуючий потенціал та ефективність корекції гормонодефіцитного стану за умов ауто–, ало– та ксенотрансплантації органотипових культур ендокринних залоз.

8. Провести гістологічний аналіз ало– і ксенотрансплантатів у різні терміни після моно– та комбінованої трансплантації, на основі чого зробити висновок про морфофункціональний стан та виживання застосованого біологічного матеріалу.

9. Виявити найбільш ефективні комбінації тканин зазначених залоз для подовження тривалості виживання та функціонування трансплантата, на основі чого обґрунтувати можливість використання методу комбінованої трансплантації для лікування гормонодефіцитного стану.

**Об’єкт дослідження:** гормональний статус і процеси метаболізму у тварин з гормональною недостатністю після комбінованої трансплантації нативних фрагментів ендокринних залоз (щитовидної і підшлункової залоз, сім’яників і наднирників), незаморожених органотипових культур вищевказаних залоз та культур, яких піддавали кріоконсервуванню і наступному рекультивуванню, а також морфофункціональний стан трансплантаційного матеріалу.

**Предмет дослідження:** нативні фрагменти і органотипова культура ендокринних залоз (щитовидної і підшлункової залоз, сім’яників і наднирників) при комбінованому культивуванні, кріоконсервуванні та комбінованій трансплантації.

**Методи дослідження:** органотипове культивування, комбіноване культивування, кріоконсервування в присутності диметилсульфоксиду, комбінована трансплантація під капсулу нирки, в підшкірну жирову клітковину та інтрапортально, визначення вмісту гормонів радіоімунним та імуноферментним методами, спектрофотометричне визначення біохімічних характеристик культур і показників крові реципієнтів, світлова та флуоресцентна мікроскопія, гістологічний аналіз, статистичний аналіз результатів.

**Наукова новизна одержаних результатів**. Дисертаційна робота містить теоретичне обґрунтування і експериментальну розробку нового підходу до вирішення науково–практичної проблеми лікування гормональної недостатності (гіпотиреозу, гіпокортицизму, андроген-дефіцитного стану, цукрового діабету I типу) методом комбінованої трансплантації кріоконсервованих органотипових культур ендокринних залоз (щитовидної, підшлункової залоз, наднирників і сім’яників).

Вперше детально вивчено параметри активації та інгібування секреторної функції ендокринних залоз (щитовидної, підшлункової залоз, наднирників і сім’яників) при комбінованому культивуванні, на підставі чого встановлено оптимальні умови отримання біоматеріалу для трансплантації, які дозволять подовжити тривалість його гормонопродукуючої функції в організмі реципієнта.

На основі порівняльної оцінки гормонопродукуючої здатності органотипових культур ендокринних залоз, отриманих від тварин різного віку, встановлено перевагу використання неонатального біоматеріалу в умовах in vitro та при комбінованій трансплантації.

В роботі вперше було проведено аналіз і зроблено наукове обґрунтування комбінованого підходу до трансплантації клітин/тканин ендокринних залоз для терапії гормонодефіцитних станів. Показана перспективність застосування комбінованих трансплантатів тканин щитовидної залози з тканиною наднирників та сім’яників, а також тканини наднирників з експлантатом гіпофіза.

Уперше в трансплантології випробовано метод комбінованої трансплантації з тканиною наднирників в якості імунопротектора основного трансплантата і зроблено висновки про можливість його використання при трансплантації щитовидної, підшлункової залоз і сім’яників. Доведено доцільність використання такого підходу за умов трансплантації тканини щитовидної залози.

Вперше проведено комбіновану інтрапортальну трансплантацію острівців підшлункової залози з клітинами Сертолі, що дозволило збільшити виживання острівців в 2,3 рази.

На підставі проведеної оцінки віддалених результатів трансплантації доведено, що комбінована трансплантація позитивно впливає на активність гормональної секреції та проліферативний потенціал пересаджуваної тканини, що має вирішальний вплив на тривалість виживання та ефективність її функціонування після трансплантації.

Уперше нами було запропоновано та апробовано метод реабілітації кріоконсервованого біологічного матеріалу перед трансплантацією – комбіноване рекультивування, що дозволяє значно покращити гормональну функцію in vitro та in vivo за умов трансплантації.

**Практичне значення одержаних результатів**. Вивчення впливу факторів комбінованої трансплантації дозволило з’ясувати деякі імунобіологічні аспекти клітинної і тканинної терапії, розробити методи посилення активності функціонування трансплантата з метою покращення терапевтичної дії препаратів ендокринних клітин. На підставі отриманих даних розроблена стратегія найбільш ефективного використання органотипових культур ендокринних залоз для комбінованої трансплантації, яка дозволяє подовжити тривалість функціонування трансплантата в організмі реципієнта.

Розроблені способи кріоконсервування культури адренокортикальної тканини (Патент України №34848), органотипової культури щитовидної залози (Патент України №9367) і органотипової культури сім’яників (Патент України №80497) дозволяють зберегти високий рівень гормонопродукуючої здатності і морфологічних властивостей біоматеріалу, що надає перевагу для його використання при трансплантації.

Розроблений спосіб підготовки кріоконсервованих органотипових культур після відігріву (Патент України №4845) дозволяє забезпечити довготривале виживання і функціонування культур ендокринних залоз після трансплантації.

Розроблений спосіб хірургічного моделювання гіпотиреозу (Є.І. Легач, 2005) дозволяє максимально зменшити рівень тиреоїдних гормонів у плазмі крові дрібних лабораторних тварин (щурів, мишей) у порівнянні з відомими хірургічними способами, що дає можливість використати даний спосіб при експериментальних медико–біологічних дослідженнях.

Отримані результати щодо можливості комбінованого культивування різних ендокринних тканин та їх комбінованої трансплантації мають науково–прикладне значення для розуміння механізмів регуляторно–метаболічних взаємовідношень ендокринної системи та можуть використовуватися в біотехнології.

Матеріали дисертаційного дослідження використовуються в навчальному процесі кафедри ендокринології Харківської медичної академії післядипломної освіти, в ДУ «Інститут загальної і невідкладної хірургії» АМН України, в Українському науково–практичному центрі ендокринної хірургії, трансплантації ендокринних органів і тканин МОЗ України, кафедри фізіології людини і тварин Харківського національного університету ім. В.Н. Каразіна.

**Особистий внесок здобувача.** Вибір теми дисертаційного дослідження, планування мети і задач, методологічна структура роботи належать авторові. Винесені до захисту результати роботи отримано дисертантом особисто. Експериментальні дослідження проведено самостійно на базі лабораторій і віварію Інституту проблем кріобіології і кріомедицини НАН України, консультацію надавали к.б.н. Божок Г.А. та співробітники відділу кріобіохімії і фармакології нейрогуморальних систем Інституту проблем кріобіології і кріомедицини НАН України. Дисертант самостійно провів патентний та інформаційний пошук з використанням Internet, аналіз отриманих результатів, написав всі розділи дисертації, сформулював висновки.

**Апробація результатів дисертації.** Загальні положення дисертації доповідались і обговорювались на засіданнях секцій вченої ради ІПКіК НАН України, Українського науково–практичного центра ендокринної хірургії, трансплантації ендокринних органів і тканин МОЗ України; 32nd Annual Meeting of the Society for Cryobiology (Madison, 1995); 35th Annual Meeting of the Society for Cryobiology (Pittsburgh, 1998); 2nd World Congress on Tissue Banking & 8th International Conference of EATB (Warsaw, 1999); V Національному з’їзді фармацевтів України (Харків, 1999); Всеукраїнській конференції з міжнародною участю «Актуальні проблеми відновлювальної хірургії» (Київ, 2001); 13th &18th European Students’ Cоnferences for promising biomedical scientists and future doctors (Berlin, 2002, 2007); III Міжнародній конференції «Medicine – Health XXI century» (Донецьк, 2002); Установчому з’їзді Українського товариства клітинної біології (Львів, 2004); науково–практичних конференціях «Фундаментальні питання експериментальної та клінічної ендокринології» (Харків, 2002, 2004, 2005); з’їздах трансплантологів України (Запоріжжя, 1995; Київ, 2000; Донецьк, 2004; Київ, 2007); 5th Parnas Conference «Molecular mechanisms of cellular signaling» (Kyiv, 2005); ІХ Українському біохімічному з’їзді (Харків, 2006); науково–практичній конференції «Профілактика, діагностика та лікування – основні складові терапії» (Харків, 2006); III Всеросійському симпозіумі з міжнародною участю «Актуальные вопросы тканевой и клеточной трансплантологии» (Москва, 2007).

**Публікація матеріалів.** Загальні положення дисертації викладені у 70 наукових публікаціях, які відображають зміст виконаної роботи: в 27 статтях у наукових фахових виданнях; 4 деклараційних патентах України; 37 тезах матеріалів конференцій; 2 методичних рекомендаціях, затверджених МОЗ України.

**Об’єм і структура дисертації.** Дисертація викладена на 336 сторінках машинописного тексту і містить вступ, огляд літератури, розділи «Матеріали і методи дослідження», «Результати та їх обговорення», узагальнення, висновки і список літератури, який включає 616 джерел, з них 489 – іноземні. Робота ілюстрована 8 таблицями, 76 мікрофотографіями і 62 рисунками.

##### ОСНОВНИЙ ЗМІСТ РОБОТИ

**Матеріали і методи дослідження.** Робота була виконана на нативних і кріоконсервованих органотипових культурах ендокринних залоз (ОКЕЗ) (щитовидна, підшлункова, надниркова залози, сім’яник, гіпофіз), що отримували від новонароджених поросят. Реципієнтами для трансплантації були щури масою 150–200 г та кролі масою 3-3,5 кг. Експерименти на лабораторних тваринах проводились з дотриманням загальних Національних норм з біоетики (І Національний конгрес з біоетики, Київ, 2001) і положень Європейської конвенції захисту хребетних тварин, які використовуються з експериментальною або іншими науковими цілями (Страсбург, 1985), та були підтримані Комітетом з біоетики ІПКіК НАН України.

Органотипове культивування здійснювали за методом (І.С. Турчин, 1993).

ОКЕЗ піддавали кріоконсервуванню з використанням диметилсульфоксиду (ДМСО) як кріопротектора. Заморожування здійснювали в кріостійких ампулах–контейнерах фірми „Nunc” на програмному заморожувачі „Cryoson 115” (Німеччина) або над дзеркалом азоту з наступним занурюванням у рідкий азот. Частина кріоконсервованих зразків була використана для рекультивування. Для цього розморожені зразки ОКЕЗ рекультивували протягом 2 діб у живильному середовищі 199 з додаванням 10% інактивованої ембріональної телячої сироватки та антибіотиків. Заміну середовища культивування здійснювали кожну добу.

Сумісне культивування ОКЕЗ у різних комбінаціях проводили в умовах, підібраних для основної культури, при цьому супутня культура була відокремлена від основної напівпроникненою перегородкою.

Життєздатність клітин контролювали методом суправітального забарвлення трипановим синім. Для вимірювання життєздатності ОКЕЗ суспензію клітин отримували ферментативним методом за допомогою 0,25% розчину трипсину.

Базальну секрецію гормонів ОКЕЗ вимірювали в живильному середовищі кожну добу культивування. Стимульовану секрецію гормонів вивчали при додаванні до ОКЕЗ дибутирил – цАМФ (1 мM), хоріонічний гонадотропін (1,5 ОД/мл) і екстракт гіпофіза.

Острівці підшлункової залози (ОПЗ) новонароджених поросят для інтрапортальної трансплантації отримували за методом (G.S. Korbutt, 1996), суспензію клітин Сертолі новонароджених поросят – за методом (R.V. Rajotte, 1997).

Для всіх хірургічних операцій і трансплантацій використовували комбінований наркоз (внутрішньочеревно): кетамін і ксилазин у концентрації 2,5 і 0,5 мг на 100 г маси тварини. Операції двосторонньої адреналектомії проводили за методом (M. Hoffmann, 2000), тиреоїдектомії - за методом (Є.І. Легач, 2005), двосторонньої орхіектомії - за методом (Я.М. Кабак, 1945). Цукровий діабет викликали у щурів массою 180-200 г шляхом одноразової внутрішньочеревної ін’єкції стрептозотоцину (СТЗ) в дозі 55 мг/кг маси тварини, у кролів − одноразової внутрішньовенної ін’єкції алоксану в дозі 100 мг/кг маси тварини.

Рівень глюкози в крові контролювали за допомогою індикаторних пластинок «Гемоглан» на глюкометрі Глюкофот–II.

В залежності від ендокринної недостатності виконували трансплантацію ОКЕЗ під капсулу лівої нирки тварини (органотипові культури щитовидної залози, наднирників та сім’яників), у підшкірну жирову клітковину (органотипова культура підшлункової залози) та інтрапортально (острівці підшлункової залози). Трансплантації органотипової культури щитовидної залози (ОКЩЗ), органотипової культури надниркових залоз (ОКНЗ) і органотипової культури сім’яників (ОКС) проводили безпосередньо після тиреоїдектомії, адреналектомії або орхіектомії. Доза трансплантованого матеріалу в цих випадках складала 35–40 мг. Щурам з ЦД виконували трансплантацію органотипової культури підшлункової залози (ОКПЗ) через тиждень після ін’єкції СТЗ в дозі, яка відповідала ендокринному матеріалу, отриманому з двох залоз новонароджених поросят для одного щура. При комбінованій трансплантації додатково використали ендокринний матеріал, отриманий з одного сім’яника або одного наднирника. Кролям з ЦД трансплантували ОПЗ на 21–23 добу після ін’єкції алоксану в дозі ~ 8,7х106 острівців.

Рівень Т4, ТТГ, тестостерону, кортизолу в середовищі культивування, а також в плазмі крові тварин проводили радіоімунним методом з використанням тест–наборів TOTAL T4 RIA KIT (Immunotech), РІА–Т4–СТ (Білорусь), TSH RIA KIT (Immunotech), РІА–Тестостерон–СТ (Білорусь), СТЕРОН–К–125І–М (Білорусь). Вміст інсуліну вимірювали імуноферментним методом за допомогою набору INSULIN ELISA KIT (DRG Diagnostic) на АІФ–Ц–01С. Кількість гормонів у середовищі культивування нормували на білок, який вимірювали за методом (M. Bradford, 1985).

Вміст альбуміну, холестерину і альфа–амілази досліджували спектрофотометричним методом за допомогою тест–наборів «Філісіт-діагностика» (Україна) та Chol 150 (Lachema), вміст фракції глікозильованого гемоглобіну HbA1c – за допомогою стандартних наборів GHB 100 та HB 400 S (Lachema).

Гістологічному аналізу піддавали цілу ендокринну залозу новонародженого поросяти як первинний досліджуваний матеріал, ОКЕЗ – після різної попередньої обробки, моно– і комбіновані трансплантати, отримані на 30 і 120 добу, – після трансплантації. Матеріал для гістологічного дослідження фіксували в 10%–му розчині нейтрального формаліну, за стандартною методикою заливали в парафін. Виготовлені на мікротомі зрізи (5–7 мкм) забарвлювали гематоксиліном і еозином та досліджували під світловим мікроскопом.

Для візуалізації острівців після інтрапортального введення в організм реципієнта використовували флуоресцентний поліметиновий барвник DiOC18. Досліджували забарвлені зразки та здійснювали мікрофотозйомку за допомогою люмінесцентного мікроскопа Olympus IX–71.

Статистичну обробку даних проводили за допомогою MS EXCELL 7.0 з використанням функції описової статистики; значення оцінки варіації виражали за допомогою довірчого інтервалу, використовували: t-критерій Стьюдента для кількісних нормально розподілених ознак, однофакторний дисперсійний аналіз. Дані представлені як середні значення, отримані у 2–х аналогічних експериментах і виміряних у 2–х паралельних пробах, ± стандартна похибка; вірогідними вважались відмінності при Р<0,05 і Р<0,01.

# ОСНОВНІ РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕННЯ

При підборі умов культивування ендокринної тканини важливо зберегти її гормональну функцію, тому на першому етапі досліджень необхідно було провести аналіз секреторної активності ОКЕЗ, отриманих від новонароджених поросят та статевозрілих щурів.

В експериментах з фрагментами тканин щитовидної залози, наднирників та сім’яників було встановлено падіння базальної гормональної секреції при тривалому культивуванні. Здатність до відповіді на стимуляцію (ХГ, дибутирил–цАМФ, сінактен, екстракт гіпофіза) зберігалася у ОКЕЗ на строці культивування, що не перевищував 3 доби. Гістологічні дослідження показали структурну і функціональну цілісність 2–3–добових органотипових культур щитовидної залози, наднирників та сім’яників, які були використані в подальшому для комбінованого культивування, кріоконсервування та трансплантації. Органотипова культура підшлункової залози зберігала інсулінопродукуючу функцію протягом усього дослідженого періоду (8 діб).

1. Гормонопродукуючий потенціал кріоконсервованої органотипової культури щитовидної залози при комбінованому культивуванні та трансплантації.

При вивченні параметрів збереження гормональної функції ОКЩЗ після кріоконсервування ми порівняли два режими заморожування: з низькою (2°С/хв) та високою (85–100°С/хв) швидкостями охолодження. В обох випадках використовували ДМСО в концентрації 7%. Встановлено, що заморожена зі швидкістю охолодження 2°С/хв ОКЩЗ відразу після відігрівання зберігає лише 35% гормональної активності, тоді як при швидкому режимі заморожування зберігалося 56% секреції Т4. Рекультивування ОКЩЗ приводило до підвищення гормональної активності та життєздатності культури за рахунок елімінації пролітичних клітин.

Для покращення збереженості функціональних властивостей ОКЩЗ при кріоконсервуванні ми вивчили декілька режимів насичення ОКЩЗ кріопротектором. Інкубацію ОКЩЗ з 7% ДМСО проводили за 4 режимами: 1) 15 хв при 4°С; 2) 15 хв при 4°С і 15 хв при 37°С; 3) 15 хв при 22°С; 4) 30 хв при 22°С.

Виявилось, що найбільш пошкоджуючим для тироцитів є другий режим насичення ДМСО (табл. 1). Четвертий режим насичення ДМСО (30 хв при 22°С), при якому зберігається максимальна кількість живих клітин (97,2%) і високий рівень секреції Т4, було обрано для подальших експериментів.

**Таблиця 1**

**Секреція Т4 і життєздатність клітин ОКЩЗ після кріоконсервування при різних режимах інкубації з 7% ДМСО та після 48 годин рекультивування (n=10)**

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| **Умови інкубації з ДМСО** | **Т4** | **Життєздатність, %**  |
| **нмоль/мг білка** | **%**  |
| **Нативна ОКЩЗ** | **30,47±4,36** | **100** | **100** |
| **Режим 1**  | **29,78±3,81** | **97,7** | **60,9\*** |
| **Режим 2**  | **24,76±2,11\*** | **81,2\*** | **50,1\*** |
| **Режим 3** | **32,48±5,15** | **106,5** | **79,9\*** |
| **Режим 4** | **29,15±1,01** | **95,6** | **97,2** |

 *Примітка.* \*– у порівнянні з нативною ОКЩЗ, Р<0,05.

В експериментах з вивчення впливу комбінованого культивування ми використовували експлантати гіпофіза (ЕГ), ОКНЗ та ОКС для культивування сумісно з тканиною ОКЩЗ. Показано, що присутність ЕГ у комбінованій культурі викликає типову реакцію активації секреції Т4(на 52% в порівнянні з монокультурою), яка зберігається протягом всього строку культивування. Встановили, що комбіноване культивування в присутності ОКНЗ призводить до значного підвищення вмісту Т4 (в 1,5–2,5 рази) при порівнянні з монокультурою. Андрогенні фактори, що виділяються ОКС в умовах комбінованого культивування, не змінювали рівень секреції Т4.

На 2 добу рекультивування після кріоконсервування гормональна продукція ОКЩЗ була зменшена в порівнянні з інтактною культурою, але при комбінованому рекультивуванні з ЕГ відбувалося збільшення продукції гормону на 40%. Присутність ОКНЗ та ОКС не впливала на рівень Т4 в живильному середовищі.

Гістологічний аналіз ОКЩЗ показав, що в зразках культур, комбінованих з ОКНЗ та ЕГ, спостерігаються нормофолікулярні елементи зі збільшеними розмірами епітеліальних клітин і наявністю внутрішньоколоїдних вакуолей резорбції. Тканина мала всі ознаки підвищення гормональної секреції. При комбінованому культивуванні ОКЩЗ з ОКС було виявлено ознаки процесу проліферації тиреоїдної паренхіми.

У наступних експериментах було вивчено гормонопродукуючий потенціал ОКЩЗ при трансплантації в алогенній та ксеногенній системах. Тиреоїдектомію виконували за розробленим нами методом, який дозволяє максимально видалити щитоподібну залозу (ЩЗ). Відомо, що при видаленні ЩЗ у щурів важко добитися повного зникнення тиреоїдних гормонів. Як правило, вже наприкінці першого місяця після операції спостерігається тенденція до відновлення рівня Т4 у плазмі крові. В роботі (Л.М. Шкуматов, 2001) на 28 добу після тиреоїдектомії у щурів спостерігали 45% Т4 від контрольних значень. За нашим методом видалення ЩЗ рівень Т4 в групі тиреоїдектомованих тварин на 30 добу знаходився в межах 11,3–18,0 нмоль/л (21–35% від контролю). Це свідчить про перевагу розробленого нами способу видалення ЩЗ.

Слід зазначити, що жоден з використаних видів трансплантатів повністю не відновлював гормональний рівень у тиреоїдектомованих тварин до контрольних значень. На 30 добу після ауто–, ало– і ксенотрансплантації нативних фрагментів ЩЗ у сироватці крові реципієнтів спостерігався рівень Т4 29,6±3,1, 34,6±9,8 і 27,8±1,34 нмоль/л відповідно (рис. 1). В середньому ці значення відповідали 55% компенсації рівня гормону в порівнянні з контролем.

Відомо, що органотипове культивування перед трансплантацією приводить до зменшення імуногенності пересаджуваної тканини і, як наслідок, − до пролонгування строку ії функціонування (P.Y. Benhamou, 1998). Однак ми не встановили позитивного впливу органотипового культивування ЩЗ алогенного походження на активність її гормонопродукції після трансплантації. Напроти, рівень Т4, що спостерігався в даному випадку, був нижчим в порівнянні з алотрансплантацією нативних фрагментів ЩЗ (рис.1). У випадку використання ОКЩЗ ксеногенного походження в крові реципієнтів після трансплантації спостерігався такий же рівень Т4, як і у випадку використання некультивованих фрагментів. Кріоконсервована ОКЩЗ характеризувалась зменшенням гормональної активності після трансплантації. При цьому трансплантація кріоконсервованої ОКЩЗ, яку піддавали рекультивуванню, приводила до зростання рівня Т4 у плазмі крові щурів.

**Рис. 1. Рівень Т4 і ТТГ у плазмі крові контрольних (1), тиреоїдектомованих (2) щурів і щурів з трансплантацією**: фрагментів аутологічної ЩЗ (3); алогенної ЩЗ (4); ксеногенної ЩЗ (5); органотипових культур: алогенної ОКЩЗ (6); ксеногенної ОКЩЗ (7); ксеногенної кріоконсервованої ОКЩЗ (8); ксеногенної кріоконсервованої і рекультивованої ОКЩЗ (9). *Примітки*: \* – відмінності значень Т4 вірогідні в порівнянні з тиреоїдектомією (Р<0,05); # – відмінності значень ТТГ вірогідні в порівнянні з тиреоїдектомією (Р<0,05).

Ці факти свідчили про відновлення секреторної активності трансплантатів кріоконсерованої ОКЩЗ після рекультивування. Рівень ТТГ практично у всіх випадках змінювався за принципом зворотної залежності від рівня тироксину.

У подальших експериментах з комбінованою трансплантацією встановлено, що на 30 добу за умов пересадки тканини ЩЗ сумісно з ЕГ рівень Т4 в плазмі крові щурів деяких експериментальних груп збільшується в порівнянні з монотрансплантатом, а саме у груп з трансплантатами кріоконсервованих (на 43%) та рекультивованих (на 17%) ОКЩЗ (рис. 2). Після комбінованої трансплантації з тканиною наднирників найбільш високі показники рівня Т4 в плазмі крові спостерігались у реципієнтів нативних фрагментів ЩЗ (на 39% вище за монотрансплантат).

Після комбінованої трансплантації фрагментів тканини ЩЗ і сім’яників рівень Т4 в крові реципієнтів всіх експериментальних груп досягав 37,81±2,83 нмоль/л, що склало 71% від контрольних значень та було на 18% вище за результат, отриманий за умов монотрансплантації. Також значний ефект комбінованої трансплантації був помітний у випадках трансплантації кріоконсервованих та рекультивованих органотипових культур ОКЩЖ і ОКС, на 55 та 16% відповідно вище за монотрансплантат. Треба відзначити, що ці результати спостерігались на досить тривалому терміні після трансплантації (на 120 добу), тому рівень Т4 є показником не тільки функції трансплантата, але й процесу регенерації власної залози реципієнта.

Для оцінки вкладу трансплантата в загальний тиреогормонопоез ми видалили нирку, що несе трансплантат. Тестували рівень Т4 на 7 добу після нефректомії, тому що за цей проміжок часу відбувається напіврозпад гормону в крові (В.В. Потемкин, 1999). При визначенні відсотка вмісту Т4 в плазмі крові щурів після нефректомії встанов-

|  |
| --- |
| **Рис. 2. Рівень Т4 в плазмі крові щурів на 30 добу після трансплантації тканини ЩЗ в комбінації з ЕГ і тканиною надниркової залози:** 1– контроль; 2– тиреоїдектомія; 3– фрагменти тканини; 4– органотипова культура; 5– кріоконсервована органотипова культура; 6– рекультивована органотипова культура. *Примітка.* \*– відмінності значень Т4 вірогідні в порівнянні з монотрансплантацією (Р<0,05). |

лено, що зменшення рівня Т4 відбулося у групі з комбінованою трансплан-тацією ОКЩЗ з ОКС на 18,05%, кріоконсервованих ОКЩЗ з ОКС – на 33,7%, кріоконсервованих і рекуль-тивованих ОКЩЗ з ОКС – на 26,4% (рис. 3). Це свідчило про те, що у тварин даних груп основним депо синтезу тиреоїдних гормонів є трансплантат, видалення якого з організму разом з ниркою привело до падіння рівня Т4.

 Макроскопічно трансплантат на 30 добу добре визначався як утворення білого кольору під капсулою нирки. Гістологічний аналіз аутологічного транс-плантата на 30 добу показав під капсулою нирки розташовані в декілька рядів фолікули рожевого кольору, які активно секретують колоїд. Більшість зразків алотрансплантатів фрагментів

|  |
| --- |
| **Рис. 3. Рівень Т4 у плазмі крові щурів з трансплантацією ксеногенної ЩЗ у комбінації з сім’яниками після видалення нирки, яка несе трансплантат:** 1– контроль; 2– тиреоїдектомія; 3– фрагменти ЩЗ; 4– ОКЩЗ; 5– кріоконсервована ОКЩЗ; 6– кріоконсервована і рекультивована ОКЩЗ. |

ЩЗ на 30 добу являли собою групи дезінтегрованих клітин ЩЗ, що не утворюють фолікули. Подібна морфологічна картина спостерігалась і у випадку трансплантації ксеногенних фрагментів ЩЗ. Однак після комбінованої ксенотрансплантації фрагментів ЩЗ з наднирковою залозою під нирковою капсулою спостерігались численні фолікули різного розміру, круглої або овальної форми, з кубічним та ущільненим епітелієм, що підтверджувало кращу збереженість секреторного епітелію. Після комбінованої трансплантації фрагментів ЩЗ з фрагментами сім’яників на гістологічних зразках були присутні ознаки проліферації тиреоїдної паренхіми.

**2.** **Гормонопродукуючий потенціал ОКС при комбінованому культивуванні та комбінованій трансплантації.**

На основі існуючих даних щодо кріоконсервування фрагментів тканини сім’яників новонароджених хом’яків (S. Schlatt, 2002) і фрагментів фетальних сім’яників людини (В.А. Керос, 2001) для розробки способу кріоконсервування 3–добової ОКС новонароджених поросят ми обрали кріопротектор ДМСО. При вивченні впливу ДМСО на гормональну активність ОКС встановлено, що інкубація з 5 і 10%–м ДМСО протягом 45 хв при 32°С практично не впливала на рівень базальної секреції тестостерону ОКС, тоді як 15%–й розчин ДМСО пригнічував цей показник. При порівнянні показників дибутирил–цАМФ–стимульованої гормональної секреції ОКС виявлено значне зростання рівня тестостерону в культурах, попередньо інкубованих з концентраціями ДМСО 5 і 10%, в той час як відсутність стимульованої продукції гормону при інкубації з розчином ДМСО 15% підтверджувала при цій концентрації пошкоджуючий вплив кріопротектора на клітинні структури, що відповідають за стероїдогенез.

Для подальшої розробки режиму кріоконсервування ОКС ми обрали концентрацію ДМСО 10%, тому що при використанні такої концентрації спостерігались найвищі показники секреції тестостерону. Заморожування здійснювали за двохступінчастою програмою, варіюючи швидкості охолодження на першому етапі, які складали 1, 5 і 10оС/хв. Зразки заморожували до –60оС з наступним занурюванням у рідкий азот. Також було використано заморожування над дзеркалом рідкого азоту зі швидкістю 85–100°С/хв протягом 3 хв при наступному занурюванні в рідкий азот. При дослідженні стероїдогенної активності ОКС встановлено, що мінімальна швидкість охолодження (1°С/хв) і швидкість вище 10°С/хв є пошкоджуючими для базальної та ХГ–стимульованої продукції тестостерону (табл. 2).

**Таблиця 2**

**Базальна і стимульована ХГ (1,5 ОД/мл) секреція тестостерону інтактною**

**3–добовою ОКС (контроль) і кріоконсервованою ОКС (n=9)**

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
|  **Умови експерименту** | **Базальна секреція**  | **Стимульована секреція**  |
| **нмоль/мг білка** | **%**  | **нмоль/мг білка** | **%**  |
| **Контроль**  | **25,46±1,47** | **100** | **32,03±1,99** | **100** |
| **1°С/хв** | **12,89±1,99 \*** | **50,62** | **33,43±6,47** | **104,37** |
| **5°С/хв** | **23,94±3,74** | **94,02** | **42,19±8,99\*** | **131,72** |
| **10°С/хв** | **17,48±1,89\*** | **68,65** | **23,92±3,14\*** | **74,67** |
| **85–100°С/хв** | **17,07±2,01\*** | **67,04** | **15,06±1,24\*** | **47,01** |

***Примітка.* \* – в порівнянні з контролем, Р<0,05.**

Аналіз життєздатності клітин ОКС після кріоконсервування методом суправітального забарвлення трипановим синім виявив зменшення кількості клітин, що активно виключають барвник, до 76% – при швидкості охолодження 10°С/хв і до 71% –при швидкості 85–100°С/ хв. у порівнянні з контролем. Для ОКС, кріоконсервованої зі швидкістю 1°С/хв, цей показник складав 84%. Найбільший відсоток життєздатних клітин (94%) був при кріоконсервуванні ОКС зі швидкістю 5°С/хв. Таким чином, режим кріоконсервування ОКС, що включав насичення 10%–м ДМСО протягом 20 хв та охолодження зі швидкістю 5°С/хв, ми використали в подальших експериментах.

На наступному етапі роботи проведено комбіноване культивування ОКС у поєднанні з ЕГ і ОКНЗ. При 3–добовому культивуванні ОКС сумісно з ЕГ встановлено падіння продукції тестостерону, що ймовірно відбувалося внаслідок **десенситизації клітин Лейдіга під впливом довготривалої аплікації гонадотропіну, що секретується ЕГ на протязі декількох діб культивування. Також було встановлено негативний вплив присутності ОКНЗ на гормональну функцію ОКС, що підтверджувало дані щодо пригнічення секреції тестостерону глюкокортикоїдами, отримані іншими авторами in vivo (**P. Juniewicz, 1987**). Ці ефекти були встановлені нами при дослідженні ОКС на двох видах тварин (новонароджених поросятах та статевозрілих щурах).**

**Рекультивування ОКС у присутності ЕГ після кріоконсервування не приводило до вірогідної різниці в гормонопродукції при порівнянні з монокультурою, але спостерігалася тенденція до підвищення секреції тестостерону. Рекультивування в присутності ОКНЗ характеризувалось зменшенням секреції гормону на 63,8%. Гістологічне дослідження підтвердило пригнічення функції клітин Лейдіга ОКС після культивування в присутності ЕГ і ОКНЗ, а також рекультивування в присутності ОКНЗ після кріоконсервування ОКС.**

**Гормонопродукуючий потенціал ОКС новонароджених поросят при порівнянні з ОКС статевозрілих щурів вивчали при трансплантації щурам, яких піддавали орхіектомії. Орхіектомія різко знижувала рівень тестостерону в крові щурів з 5,98±0,42 (контроль) до 0,20±0,11 нмоль/л. Аутотрансплантація фрагментів сім’яників на 30 добу приводила до підвищення рівня гормону до 2,17±0,31 нмоль/л, однак у зв’язку з невеликою дозою трансплантованого матеріалу (35–40 мг) в порівнянні з інтактними сім’яниками не була здатна повністю компенсувати дефіцит андрогенів. Слід також враховувати той факт, що при гетеротопічній пересадці тканини з мошонки в черевну порожнину під капсулу нирки, підвищується температура, яка необхідна для нормального стероїдогенезу сім’яниками.**

Ксенотрансплантація нативних фрагментів тестикулярної тканини підвищувала рівень тестостерону в плазмі крові орхіектомованих щурів у 3 рази. Культивування протягом 3 діб сприяло кращому виживанню ксенографта сім’яників і збільшенню гормональної продукції тестостерону в 4 рази у порівнянні з орхіектомією. Рекультивування кріоконсервованої ОКС не призводило до підвищення секретуючої функції тестикулярних ксенотрансплантатів у порівнянні з нативними фрагментами та незамороженою культурою, але за умов комбінованої з ЕГ трансплантації спостерігалось підвищення рівня тестостерону в плазмі крові на 47% в порівнянні з монотрансплантацією. Комбінована трансплантація ОКС з ОКНЗ у всіх випадках характеризувалась пригніченням продукції тестостерону. Зміна маси сім’яних пухирців, яка, як відомо, є дуже чутливим показником рівня андрогенів у крові (Я.М. Кабак, 1945), відповідала зміні рівня тестостерону в плазмі крові в усіх вивчених групах тварин.

**Таким чином, при комбінованій трансплантації ОКС з ОКНЗ фактор пригнічення стероїдогенезу переважав над імунопротекцією трансплантата глюкокортикоїдами, що секретуються тканиною наднирників.**

#### 3. Гормонопродукуючий потенціал кріоконсервованої ОКНЗ при комбінованому культивуванні та комбінованій трансплантації.

Встановлено, що в умовах комбінованого культивування з двома експлантатами аденогіпофізу (ЕАГ) ОКНЗ новонароджених поросят на 3 добу секретувала 107,4 нмоль/л кортизолу, що на 66% вище контролю (64,2 нмоль/л).

На момент виконання роботи існував розроблений нами раніше режим кріоконсервування 5–добової ОКНЗ новонароджених поросят (Т.П. Бондаренко, 1999), відповідно до якого заморожували зразки зі швидкістю охолодження 1°С/хв до –70°С, а потім їх занурювали в рідкий азот. Даний режим дозволяв зберігати 90% секреції кортизолу після розморожування і видалення кріопротектора.

Однак, враховуючи те, що за умов використання високих швидкостей охолодження процес заморожування може сприяти селективному видаленню антиген–презентуючих клітин (АПК), присутніх у тканині (А.О. Цуцаєва, 1988; M. Taylor, 1990), нами було апробовано метод кріоконсервування ОКНЗ зі швидкістю 85–100°С/хв.

При вивченні експресії антигенів ГКГ ІІ класу ми встановили, що вони виявляються одразу після розморожування кріоконсервованої ОКНЗ, однак після 2 діб рекультивування їх не спостерігали (Г.А. Божок, 2004). Цей факт свідчив про можливість пошкодження АПК після заморожування з високою швидкістю охолодження та їх видалення при наступному рекультивуванні протягом 2 діб. Таким чином, рекультивування – це важливий і основний етап для видалення АПК перед трансплантацією ОКНЗ для зменшення імуногенності трансплантата.

При аналізі секреторної активності ОКНЗ, кріоконсервованої за швидкого режиму (85–100°С/хв), відразу після відігрівання і видалення кріопротектора було встановлено зменшення продукції кортизолу на 21,1% від початкових значень гормону. На 2 добу рекультивування в такій культурі зберігався ще нижчий рівень кортизолу (на 36,5% менше від початкового рівня). Враховуючи важливість рекультивування і феномен зменшення активності стероїдогенезу в процесі органотипового культивування, ми дослідили можливість кріоконсервування фрагментів НЗ безпосередньо після їх забору.

В результаті використання такого підходу ми досягли збереження гормональної активності рекультивованих фрагментів НЗ на рівні, який перевищує рівень 5–добової ОКНЗ на 17%, а 5–добової кріоконсервованої і рекультивованої ОКНЗ – на 47%. Тому у подальших експериментах комбінованого рекультивування та трансплантації використовували кріоконсервування фрагментів НЗ, а не ОКНЗ.

Нами було встановлено, що рівень секреції кортизолу кріоконсервованими фрагментами НЗ був меншим за показники секреції інтактними фрагментами. Комбіноване рекультивування фрагментів НЗ у присутності ЕАГ дозволяло отримати рівень продукції кортизолу після розморожування на 43% вище, ніж при рекультивуванні поодиноких фрагментів НЗ.

Ефективність ксенотрансплантації ОКНЗ новонароджених поросят при комбінації з ЕАГ була досліджена на моделі післяопераційного гіпокортицизма у щурів. Трансплантацію проводили безпосередньо після адреналектомії. Летальність тварин у перші післяопераційні дні складала 15%. В результаті трансплантації у тварин всіх експериментальних груп зникали симптоми гіпокортицизма.

Поява кортизолу в крові реципієнтів була виявлена вже на 7 добу. На 20 добу після трансплантації в комбінації з ЕГ усі використані види тканини НЗ (фрагменти НЗ до та після кріоконсервування, органотипова культура), значно краще компенсували глюкокортикоїдну недостатність в порівнянні з монотрансплантацією.

Слід підкреслити, що у щурів основним з 11–оксикортикостероїдів, які циркулюють в крові, є кортикостерон, а у свиней – кортизол. Тому наявність кортизолу в сироватці крові слід розглядати як функцію трансплантата НЗ новонароджених поросят. Рівень кортизолу на досліджуваному терміні після монотрансплантації зростав до 82,5 нмоль/л (у випадку трансплантації нативних фрагментів), 115,66 нмоль/л (у випадку трансплантації органотипової культури) та 46,6 нмоль/л (у випадку трансплантації кріоконсервованих та рекультивованих фрагментів). Комбінована трансплантація з використанням ЕАГ дозволила підвищити ці показники відповідно на 34, 42 та 94% в порівнянні з монотрансплантатом.

Гістологічний аналіз трансплантатів показав, що характерною особливістю монотрансплантатів тканини НЗ була чітко виражена некротична реакція клітин, що знаходяться всередині фрагмента. Некроз був виражений не тільки на більш пізніх строках після трансплантації, але вже на 7 добу. При комбінованій трансплантації з ЕАГ не спостерігається некротичних зон, клітини розташовуються рівномірно по об’єму тканини, більшість з них знаходиться в функціонально активному стані. Це свідчить про чутливість клітин наднирників новонароджених донорів до регуляторно–метаболічних факторів саме неонатального періоду, що є підставою для використання тканини НЗ та гіпофіза у комбінованих культурах і для сумісної трансплантації.

**4. Гормонопродукуючий потенціал кріоконсервованої ОКПЗ при комбінованому культивуванні та комбінованій трансплантації.**

При дослідженні функціональної активності ОКПЗ після кріоконсервування з використанням 10% ДМСО та швидкості охолодження 1°С/хв за методом (Б.П. Сандомирський, 2000) було встановлено, що відразу після відігрівання і видалення кріопротектора ОКПЗ втрачала частину гормонопродукуючої здатности, однак рекультивування протягом 2 діб приводило до відновлення секреції інсуліну ОКПЗ.

Відомо, що постнатальна підшлункова залоза (ПЗ) за стандартних умов органотипового культивування практично повністю втрачає ацинарні клітини внаслідок аутолізу (L. Murrell, 1975). Культивування в присутності природних (гідрокортизон, кортикостерон) або синтетичних (дексаметазон) глюкокортикоїдів дозволяє зберегти екзокринний компонент ПЗ з нормальною функцією секреції амілази та інших ферментів (R. McEvoy, 1980). Однак відомо, що підвищений рівень глюкокортикоїдів може індукувати інсулінову резистентність і, як наслідок, інтолерантність до глюкози (R. Rizza, 1982). Враховуючи дані факти, ми перевірили морфофункціональний стан ОКПЗ новонароджених поросят при комбінованому культивуванні з ОКНЗ.

**З даних рис. 4 (а) випливає, що комбіноване культивування з ОКНЗ приводило до прогресуючого зменшення секреції інсуліну культурою ПЗ. Між секрецією контрольної культури і культури, комбінованої з ОКС, значних і вірогідних відмінностей не спостерігалось. Для виявлення ефекту комбінованого культивування на функціональний стан ацинарного компонента в органотиповій культурі ПЗ ми вимірювали рівень α–амілази. Встановлено, що рівень ферменту після 1 доби культивування є дуже високим (рис. 4, б), однак це обумовлюється не активністю ацинарних клітин, а, скоріш за все, їх лізисом і руйнуванням зимогенових гранул. На 2 добу після заміни живильного середовища рівень ферменту в монокультурі ОКПЗ різко зменшується і продовжує падати в процесі культивування. У комбінованих культурах зниження вмісту α–амілази відбувається протягом 2 діб культивування, а вже на 4 добу спостерігається деяке його підвищення.**

**Дані гістологічних досліджень довели, що ацинарний компонент зберігається при комбінованому органотиповому культивуванні з ОКНЗ і ОКС.**

**При вивченні стимульованої секреції in vitro виявилось, що в ОКПЗ, культивованій сумісно з ОКНЗ, не спостерігається підвищення секреції інсуліну у відповідь на присутність глюкози в концентрації 16,7 ммоль. Це свідчило про те, що функція острівців Лангерганса в цій культурі є пригніченою глюкокортикоїдами незалежно від збереження в ній ацинарних клітин. В ОКПЗ, культивованій сумісно з ОКС, спостерігалась відповідь на глюкозну стимуляцію. Таким чином, з отриманих даних випливає, що збереження ацинарних клітин в органотиповій культурі ПЗ новонароджених поросят не впливає на інсулінопродукуючу функцію острівців Лангерганса, при цьому присутність ОКНЗ в комбінованій культурі впливає на цю функцію негативно, а ОКС не має впливу.**

Рис. 4. Динаміка вмісту інсуліну (а) і альфа**–амілази (б) при комбінованому культивуванні ОКПЗ з ОКС і ОКНЗ.** ***Примітка.*** **\* – показники рівня інсуліну при комбінованому культивуванні вірогідні в порівнянні з монокультурою (Р<0,05).**

На наступному етапі роботи необхідно було на основі певного комплексу показників вуглеводного обміну тварин реципієнтів з’ясувати ступінь компенсації експериментального ЦД після комбінованої трансплантації органотипових культур ПЗ з тканинами сім’яників або НЗ.

Інсулінозалежний ЦД викликали у щурів за допомогою СТЗ. Для експериментів використовували лише тих тварин, у яких рівень глікемії складав не менш 16–18 ммоль/л, враховуючи, що легкий ступінь ЦД може пізніше привести до субкомпенсації (C. Bernard, 1998).

Вимірювання рівня глюкози в плазмі крові після трансплантації нативних фрагментів ПЗ та ОКПЗ (як монотрансплантатів, так і комбінованих з ОКНЗ та ОКС) показало значне його зниження вже на 1 тиждень у середньому до 14,9–11,8 ммоль/л. До 3–го тижня показники глікемії зменшились до 9,9 ммоль/л у групі з трансплантатами фрагментів ПЗ, а в групах з комбінованими графтами в середньому дорівнювали 7,3–6,3 ммоль/л. Даний показник залишався стабільним протягом останніх 12 тижнів спостереження.

Однак у реципієнтів після трансплантації кріоконсервованих культур спостерігалося уповільнення компенсації гіперглікемії в перші тижні після трансплантації. Показник вмісту глюкози залишався на рівні 18,73±3,37 ммоль/л як на перший, так і на 3 тиждень після трансплантації, але до 12 тижня повернувся до контрольних значень. При цьому для комбінованих трансплантатів була виявлена динаміка рівня глюкози, як і у інших вищеописаних групах. Це свідчило про перевагу комбінованої трансплантації в порівнянні з монотрансплантацією.

Незважаючи на те, що рівень глюкози в крові реципієнтів всіх груп до 21 тижня знаходився на рівні контролю, необхідно було вивчити ступінь компенсації вуглеводного обміну на віддалених строках після трансплантації. При проведенні тесту толерантності до вуглеводного навантаження, порушення виявилось у тварин без терапії ЦД, у тварин з трансплантатами нативних фрагментів ПЗ і комбінованими трансплантатами ПЗ і НЗ. В останніх групах спостерігалася скомпенсованість ЦД.

При візуальному огляді місця трансплантації на 21 тиждень у підшкірній жировій клітковині реципієнтів були виявлені незначні добре васкуляризовані фіброзні капсули, які підлягли гістологічному дослідженню. Аналіз показав, що в центральній частині трансплантата зберігаються залишки ацинарних структур з ознаками некрозу і окремі ендокриноцити. У цілому в трансплантаті чітко виражена інфільтрація поліморфно–ядерними лейкоцитами і гістіоцитами. Спостерігається заміщення зон трансплантата сполучною тканиною. Така картина характерна для всіх видів трансплантатів, незалежно від обробки і додаткового введення тканини НЗ або сім’яників. У багатьох реципієнтів в зоні трансплантації на 21 тиждень після трансплантації спостерігались сформовані рубці.

Таким чином, на 21 тиждень у місці трансплантації не визначалась достатня кількість β–клітинної маси, а рівень глікемії в крові реципієнтів не перевищував 5–10 ммоль/л. У зв’язку з цим виникало питання про механізм впливу трансплантатів на компенсацію ЦД, для відповіді на яке були досліджені ПЗ реципієнтів.

Для оцінки кількості і розмірів острівців ПЗ проведено аналіз гістологічних зрізів хвоста ПЗ, які нормували за масою. Острівці ПЗ умовно були поділені на великі (300–500 мкм), середні (100–300 мкм) і дрібні (30–100 мкм). Встановлено, що щури, які перенесли розвиток СТЗ діабету, мають практично однакову кількість великих острівців у порівнянні з контрольними тваринами. Основна відмінність полягає в кількості середніх і дрібних острівців, яких набагато менше у щурів з діабетом. У тварин з трансплантатами тканини ПЗ кількість великих острівців у порівнянні з контролем практично не відрязнялась. Однак сумарна кількість середніх і дрібних острівців змінюється в залежності від типу трансплантата. Найбільш низький рівень цього показника спостерігається у групах тварин з трансплантацією нативних фрагментів ПЗ+НЗ, ОКПЗ+ОКНЗ і кріоконсервованої ОКПЗ. При порівнянні сумарної кількості середніх і дрібних острівців ПЗ у різних експериментальних групах тварин з рівнем глікозильованого гемоглобіну була виявлена зворотна залежність цих показників (рис. 5), тобто у тварин з невеликою кількістю середніх і дрібних острівців вміст глікозильованого гемоглобіну був підвищеним, і навпаки.

Відомо, що об’єм β–клітинної маси ПЗ при 90%-й панкреатектомії у мишей і щурів активно зростає після операції за рахунок неогенезу β–клітин з прогеніторних клітин, локалізованих у стінках проток залоз або клітин, що знаходяться всередині існуючих острівців (S. Bonner–Weir, 1993). Така регенерація відбувається на протязі 40 діб і реалізується при виникненні, так званих, «фокальних» зон.

 Ймовірно, що у нашому випадку показник сумарної кількості серед-ніх і дрібних острівців відображав процес нео-генезу і регенерації в ПЗ реципієнтів.

|  |
| --- |
| **Рис. 5. Сумарна кількість дрібних і середніх острівців в ПЗ і вміст фракції глікозильованого гемоглобіну HbА1с у крові щурів:** 1 – з діабетом; 2 – інтактних ; з трансплантацією нативних фрагментів: 3 – ПЗ; 4 – ПЗ+НЗ; 5 – ПЗ+сім’яники; з трансплантацією органотипових культур: 6 – ОКПЗ; 7 – ОКПЗ+ОКНЗ; 8 – ОКПЗ+ОКС; з трансплантацією кріоконсервованих культур: 9 – ОКПЗ; 10 – ОКПЗ+ОКНЗ; 11 – ОКПЗ+ОКС; з трансплантацією кріоконсервованих і рекультивованих культур: 12 – ОКПЗ; 13 – ОКПЗ+ОКНЗ; 14 – ОКПЗ+ОКС. *Примітка.* **\*– показники вмісту HbA1c вірогідні в порівнянні з контролем (Р<0,05).** |

 Рівень глікозильованого гемоглобіну є додатковим показником, що свідчить про ступінь компенсації гіперглікемії у щурів протягом періоду спос-тереження. Таким чином, оцінюючи ці показники в комплексі, можна зробіти висновки не тільки про замісну гормональну функцію трансплантата, але й про функцію, яка стимулює власні пролі-феративні процеси в ПЗ реципієнта. З цієї точки зору найбільш успішними були монотрансплантати нативних фрагментів ПЗ і в комбінації з нативними фрагментами сім’яників, ОКПЗ окремо і в комбінації з ОКС, кріоконсервованих ОКПЗ разом з ОКНЗ, кріоконсервованих і рекультивованих ОКПЗ окремо і в комбінації з ОКНЗ і ОКС. Ймовірно, що в кожному із вказаних випадків компенсація діабету відбувалась завдяки високій гормональній активності трансплантата на початковому етапі і наявності стимулюючих проліферацію речовин на наступних строках після трансплантації.

Таким чином, в результаті експерименту з використанням стрептозотоцинового діабету, який викликали у щурів, було показано, що комбінована трансплантація тканини ПЗ та тканини сім’яників є позитивним фактором для досягнення довготривалої компенсації гіперглікемії, а кріоконсервування і рекультивування дозволяють одержати такий ж результат при використанні як монографтів ОКПЗ, так і комбінованих трансплантантів ОКПЗ разом з ОКНЗ або з ОКС.

**5. Гормонопродукуючий потенціал ОПЗ при комбінованій трансплантації.**

В експериментах з комбінованої ксенотрансплантації ОКПЗ і сім’яників новонароджених поросят у щурів зі СТЗ–індукованим діабетом були отримані позитивні результати. Для більш детального вивчення можливостей комбінованої ксенотрансплантації в наступній серії експериментів була обрана модель інтрапортального введення саме острівців підшлункової залози (ОПЗ) сумісно з клітинами Сертолі сім’яників. Реципієнтами для цієї моделі були обрані кролі з алоксановим діабетом.

ОПЗ, отримані від новонароджених поросят, перед трасплантацією мали високий рівень продукції інсуліну (100–110 мкМО/мл).Виходячи з даних, отриманих при вивченні діабету у кролів, трансплантацію острівців проводили на 21–22 добу. В експерименті використали лише тих тварин, у котрих спостерігалась стійка гіперглікемія (20–29 ммоль/л глюкози).

Для візуалізації та спостереження за функцією трансплантата ми маркерували острівці флуоресцентним барвником. Гідрофобний поліметиновий барвник групи карбоціанінів DiOC18, має довголанцюговий (С18) вуглеводневий «хвіст», завдяки якому він може вубудовуватися в мембранний бішар клітини і зберігатися там досить тривалий час (до 3–4 тижнів), істотно не впливаючи на життєздатність та клітинні функції (M.G. Honig, 1986). DiOC18 використовували для візуалізації клітин у зоні трансплантації. DiOC18–мічені ОПЗ новонароджених поросят на 21 тиждень були введені в праву долю печінки кролів із алоксановим діабетом, після чого спостерігалось повільне зниження рівня глюкози в крові та досягнення нормоглікемії (рис. 6).

трансплантація

гепатектомія

**Рис. 6. Вміст глюкози в плазмі крові кролів з алоксановим діабетом після трансплантації DiOC18– мічених ОПЗ та після виконання часткової гепатектомії.**

На 21 добу після трансплантації кролям була виконана часткова гепатектомія, тобто видалена доля печінки, яка несла трансплантат. В результаті рівень глюкози почав підвищуватися. Контрольним тваринам також була виконана гепатектомія, але подібного ефекту не спостерігалось.

Вилучену тканину печінки обробляли колагеназою і розділяли в градієнті щільності фіколу з метою відокремлення ОПЗ від гепатоцитів і клітин крові. Після градієнтного центрифугування методом флуоресцентної мікроскопії мічені ОПЗ було виявлено в шарі фіколу зі щільністю 1,088 г/см3. Таким чином, нами було доведено, що компенсація рівня глюкози в крові кролів з алоксановим діабетом на 21 добу після трансплантації відбувається за рахунок трансплантованих ОПЗ.

Динаміка глікемії після інтрапортальної моно– або комбінованої трансплантації ОПЗ в перші чотири тижні була подібна і характеризувалась поступовим зниженням глюкози до рівня контролю (рис. 7). Однак з 29–31 доби після трансплантації рівень глюкози у кролів з монотрансплантатом починав підвищуватися, що свідчило про пошкодження функції трансплантованих ОПЖ, ймовірно внаслідок імунологічного відторгнення. В цей час у тварин із комбінованими трансплантатами продовжувала зберігатися нормоглікемія.

**Рис. 7. Вміст глюкози в плазмі крові кролів з алоксановим діабетом після трансплантації острівців ПЗ у комбінації з клітинами Сертолі та клітинами НЗ.**

На 56–60 добу після трансплантації в групі тварин з монотрансплантатом спостерігалося 20 % летальності, пов’язаної з розвитком ускладнень діабету. У тварин з комбінованим трансплантатом ОПЗ разом з клітинами Сертолі гіперглікемія починала розвиватися лише на 70–75 добу після трансплантації. При цьому рівень глюкози збільшувався до 9–10 ммоль/л і залишався на цьому рівні протягом всього подальшого терміну спостереження (150 діб).

При інтрапортальному введенні ОПЗ при комбінації з клітинами НЗ після 45 доби у тварин відмічено лабільне протікання діабету з чергуванням фаз гіпо– і гіперглікемії. На терміні спостереження більше 100 діб у тварин цієї групи розвивалась гіперглікемія 9–10 ммоль/л.

З метою дослідження скомпенсованості вуглеводного обміну у реципієнтів проводилась проба толерантності до вуглеводів та визначався рівень глікозильованого гемоглобіну в крові реципієнтів. Порушення толерантності до навантаження глюкозою виявлено у тварин з монотрансплантацією. Вміст фракції HbA1c у тварин з монотрансплантом на 90 добу перевищував контрольні показники в 2 рази. У тварин з комбінованими трансплантатами цей показник був вищим за значень контрольних тварин, але нижчим, ніж у тварин з монотрансплантатом.

Таким чином, позитивний результат був досягнутий при інтрапортальній комбінованій трансплантації ОПЗ з клітинами Сертолі, коли нормоглікемію було подовжено в 2,3 рази в порівнянні з монотрансплантатом.

**ВИСНОВКИ**

Дисертаційна робота містить теоретичне й експериментальне обґрунтування нового рішення проблеми підвищення ефективності лікування гормональної недостатності (гіпотиреозу, цукрового діабету І типу, гіпокортицизму, андроген–дефіцитного стану), яке полягає у застосуванні методів комбінованої трансплантації, а також передтрансплантаційної обробки біологічного матеріалу (тканин щитовидної, підшлункової залоз, наднирників та сім’яників) при комбінованому культивуванні, кріоконсервуванні та рекультивуванні, що дозволило підвищити гормональну продукцію трансплантата і подовжити тривалість його виживання в організмі реципієнта.

1. Встановлено потенційну можливість підвищення ефективності терапії експериментальних гіпотиреозу, цукрового діабету І типу, гіпокортицизму, андроген–дефіцитного стану у тварин при використанні комбінованого підходу до передтрансплантаційної обробки біологічного матеріалу (культивування, кріоконсервування, рекультивування) та трансплантації органотипових культур ендокринних залоз. Визначено оптимальні комбінації тканин ендокринних залоз у трансплантаті при лікуванні досліджених патологій.

2. Показано, що комбіноване культивування та комбіноване рекультивування тканин ендокринних залоз мають виражений позитивний вплив на рівень гормональної секреції та проліферативні процеси in vitro, покращують функціонування та виживання трансплантатів in vivo в порівнянні з результатами, отриманими для монокультур.

3. Органотипове монокультивування тканин щитовидної залози, наднирників та сім’яників новонароджених поросят сприяє зберіганню гормонопродукуючої функції та реакції ендокринної тканини на тропні гормони гіпофіза протягом перших 3 діб; в наступні 4–5 доби культивування визначається зниження секреторної активності тканин. При органотиповому монокультивуванні фрагментів тканини підшлункової залози, а також ізольованих острівців, протягом 5–6 діб не знижується інсулінопродукуюча функція.

4. Гістологічні дослідження встановили морфологічні особливості переживання фрагментів ендокринних тканин за умов органотипового моно– та комбінованого культивування. Монокультивування тканин щитовидної залози, наднирників та сім’яників новонароджених поросят супроводжується розвитком дегенеративно–дистрофічних процесів, які починаються у центральній частині фрагментів тканини на 2–3 добу і охоплюють периферичні ділянки трансплантата протягом наступних діб. При монокультивуванні тканини підшлункової залози новонароджених поросят спостерігається значний аутоліз ацинарних клітин, який відсутній за умов комбінованого культивування з тканинами наднирників або сім’яників.

5. При комбінованому органотиповому культивуванні щитовидної залози новонароджених поросят встановлено: присутність у культурі експлантата гіпофіза викликає підвищення секреції Т4 в середньому на 50% протягом всього терміну культивування; у присутності тканини наднирників відбувається підвищення вмісту Т4 в 1,5–2,5 рази; присутність тканини сім’яників не впливає на гормональну секрецію при порівнянні з монокультурою. Гістологічними дослідженнями встановлено, що у зразках культур щитовидної залози, комбінованих з тканиною наднирників та ЕГ, спостерігаються всі ознаки підвищення гормональної секреції, а у зразках культур, комбінованих з тканиною сім’яників, було виявлено ознаки проліферації фолікулярного епітелію.

6. Комбіноване органотипове культивування тканини надниркових залоз новонароджених поросят з двома експлантатами аденогіпофіза призводить до підвищення секреції кортизолу на 66%. В результаті кріоконсервування відбувається падіння рівня секреції кортизолу фрагментами тканини наднирників у середньому на 20%, однак комбіноване рекультивування кріоконсервованої тканини у присутності експлантатів аденогіпофізу дозволяє досягти рівню продукції гормону на 43% вище, ніж при монорекультивуванні.

7. Комбіноване культивування тканини підшлункової залози новонароджених поросят із тканиною наднирників супроводжується прогресуючим зниженням вмісту інсуліну у живильному середовищі в порівнянні з монокультурою; реакція на присутність стимулюючої концентрації глюкози була відсутня, це свідчило про пригніченість функції острівців Лангерганса в цій культурі глюкокортикоїдами. При комбінованому культивуванні з тканиною сім’яників вірогідних відмінностей вмісту інсуліну не спостерігалося, відповідь на глюкозну стимуляцію була наявною, що свідчило про неушкодженість інсулінопродукуючої функції острівців при встановлених умовах комбінованого культивування.

8. Порівняльний аналіз результатів, отриманих in vitro при комбінованому культивуванні тканини сім’яників двох видів тварин (статевозрілі щури та новонароджені поросята), показав, що культивування тканини сім’яників з експлантатом гіпофіза і тканиною надниркових залоз призводить до зменшення рівня секреції тестостерону порівняно з монокультурою. Подібний ефект спостерігався in vivo при комбінованій ало– і ксенотрансплантації, що свідчить про пригнічення функції тестостерон–продукуючих клітин сім’яників при їхній експозиції тривалий час у присутності тропних факторів, які продукуються гіпофізом, а також глюкокортикоїдів, що секретуються наднирниками.

9. Розроблено методи кріоконсервування органотипових культур щитовидної залози, наднирників та сім’яників новонароджених поросят на основі використання ДМСО та високих (85-100°С/хв) швидкостей охолодження, що дозволяють зберігати основні структурно-функціональні властивості ендокринних тканин. Встановлено, що введений додатковий етап реабілітації кріоконсервованих культур після розморожування – (рекультивування) сприяє відновленню їх гормональної активності, здатності до реакції на стимулятори гормонопоезу, а також має імуномодулюючий вплив на виживання ендокринної тканини за умов трансплантації, ймовірно, внаслідок селективного видалення клітин, які експресують антигени ГКГ ІІ класу, що було встановлено за допомогою імуногістохімічного аналізу.

10. Встановлено, що ксенотрансплантація нативних фрагментів та органотипової культури щитовидної залози новонароджених поросят щурам з післяопераційним гіпотиреозом призводить до компенсації рівня тироксину в середньому на 50% в порівнянні з інтактними тваринами. Комбінована ксенотрансплантація фрагментів тканини щитовидної залози з фрагментами тканини сім’яників дозволяє підвищити цей показник до 71%, а з фрагментами тканини наднирників – до 85%. Показано перевагу комбінованих трансплантатів кріоконсервованих та рекультивованих культур щитовидної залози з експлантатом гіпофізу, в результаті чого збільшується рівень Т4 в плазмі крові тварин-реципієнтів відповідно на 43 та 17% у порівнянні з монотрансплантацією. Гістологічним дослідженням комбінованих трансплантатів встановлені краща збереженість та ознаки секреторної активності фолікулів щитовидної залози, ознаки секреторної активності (на 30 добу), а також ознаки проліферації фолікулярного епітелію (на 120 добу).

11. Порівняльна оцінка ефективності відновлення рівню гормонів в плазмі крові реципієнтів з експериментальною гормональною недостатністю при ало- та ксенотрансплантації ендокринних тканин статевозрілих щурів та новонароджених поросят дозволила встановити переваги комбінацій ксеногенного матеріалу в порівнянні з алогенним. При комбінованій ксенотрансплантації тканини щитовидної залози з тканиною наднирників, сім’яників та експлантатом гіпофіза було отримано показники вмісту Т4, які дорівнювали або перевищували на 30% (за умов комбінації з тканиною наднирників) і на 9% (при комбінації з тканиною сім’яників), що було встановлено за умов алотрансплантації.

12. Монотрансплантація нативних фрагментів наднирників новонароджених поросят, а також тканини наднирників після різних видів передтрансплантаційної обробки (органотипова культура, кріоконсервування та рекультивування) адреналектомованим щурам, приводить до появи кортизолу в крові, що пов’язано з функціонуванням пересадженої тканини. В результаті комбінованої трансплантації нативної, кріоконсервованої та рекультивованої тканини наднирників з експлантатом аденогіпофізу вміст кортизолу в крові експериментальних тварин збільшується відповідно на 34, 42 та 94% в порівнянні з монотрансплантатом. Гістологічний аналіз виявив позитивний вплив експлантату аденогіпофізу на збереженість тканини наднирників в комбінованому трансплантаті, що виражалося в зменшеній некротизації центральних ділянок пересаджених фрагментів наднирників у порівнянні з монотрансплантацією.

13. Експериментально встановлено потенційну можливість підвищення ефективності лікування інсулінозалежного цукрового діабету шляхом комбінованої ксенотрансплантації тканини підшлункової залози новонароджених поросят з тканинами наднирників або сім’яників. Використання комбінованої трансплантації кріоконсервованої органотипової культури підшлункової залози прискорювало корекцію гіперглікемії (2 тижні на відміну від 3-4 тижнів при монотрансплантації). На підставі комплексу показників вуглеводного обміну (тест толерантності до глюкози, вміст глікозильованого гемоглобіну) встановлено компенсацію цукрового діабету у тварин з комбінованою трансплантацією тканин підшлункової залози та сім’яників на тривалому терміні спостереження (3 місяці). Гістологічними дослідженнями показано, що досягнутий ефект обумовлений не тільки функціонуванням трансплантата, але й стимуляцією регенераторних процесів у підшлунковій залозі реципієнта.

14. Інтрапортальна монотрансплантація острівців підшлункової залози новонароджених поросят протягом 12–14 діб приводить до нормалізації рівня глюкози у кролів з алоксановим діабетом, однак після 29-31 доби у реципієнтів повертається гіперглікемічний стан. Інтрапортальна комбінована трансплантація острівців підшлункової залози з клітинами Сертолі дозволяє підвищити виживання острівців в 2,3 рази в порівнянні з монотрансплантатом. Ступінь компенсації вуглеводного обміну у тварин з комбінованою трансплантацією є значно вищим, ніж у тварин з монотрансплантацією.

**Список праць, опублікованих за темою дисертації**

1. Бондаренко Т.П. Криоконсервирование адренокортикальной ткани и ее использование в клинике / Т.П. Бондаренко, Е.И. Легач // Клінічна фармація. – 1999. – Т.3, №2. – С.112–115. Підбір режимів кріоконсервування, збирання матеріалу, написання статті.
2. Легач Е.И. Опыт клинического использования криоконсервированной адренокортикальной ткани // Проблемы криобиологии. – 2000. – №3. – С. 85–90.
3. Влияние криоконсервирования на динамику базальной секреции тестостерона органной культуры семенников крыс / Або Жаяб Салех, С.В. Луговой, Е.И. Легач [и др.] // Проблемы криобиологии. – 2002. – №1. – С. 50–53. Вибір методичних підходів до кріоконсервування, отримання культури, визначення гормональної активності, реферування джерел наукової інформації, написання основної частини статті.
4. Коррекция гормонального статуса у кастрированных и с экспериментальным гипогонадизмом крыс путем алло– и ксенотрансплантации органотипических культур / Т.П. Бондаренко, Або Жаяб Салех, Е.И. Легач [и др.] // Проблеми екології та медицини. – 2003. – Т.7, №1,2. – С.3–7. Моделювання гормональної недостатності, виконання трансплантації, визначення гормональної активності трансплантатів, написання основної частини статті, аналітична та статистична обробка результатів.
5. Ксенотрансплантація кріоконсервованного ендокринного матеріалу як метод корекції гіпофункції залоз в експерименті / Т.П. Бондаренко, Є.І. Легач, Г.А. Божок [та ін.] // Трансплантологія. – 2003. – Т.4, №1. – С.60–63. Трансплантація кріоконсервованих культур ендокринних тканин, аналіз результатів трансплантації, реферування джерел наукової інформації, написання основної частини статті.
6. Влияние ксенотрансплантации криоконсервированной органной культуры щитовидной железы на физиологические параметры экспериментальных животных / Н.А. Волкова, Г.А. Божок, Е.И. Легач [и др.] // Проблемы криобиологии. – 2003. – №1. – С.16–19. Моделювання гормональної недостатності, трансплантація кріоконсервованої культури, аналіз результатів трансплантації, написання основної частини статті.
7. Божок Г.А. Вплив кріоконсервування на імуно–біологічні властивості фрагментів надниркових залоз при алотрансплантаціі / Г.А. Божок, Н.М. Алабедалькарім, Є.І.Легач // Трансплантологія. – 2004. – Т.5, №1. – С. 88–92. Моделювання гормональної недостатності, трансплантація, аналіз результатів трансплантації, статистична обробка результатів.
8. Експериментальна трансплантація органотипової культури надниркових залоз в ало– та ксеногенній системах / Н.М. Алабедалькарім, Г.А. Божок, Є.І.Легач [та ін.] // Трансплантологія. – 2004. – Т.7, №3. – С. 223–225. Моделювання гормональної недостатності, трансплантація кріоконсервованої культури, аналіз результатів трансплантації, статистична обробка результатів.
9. Ксенотрансплантация: исторический аспект и современное состояние проблемы / Т.П. Бондаренко, Г.А. Божок, Е.И. Легач [и др.] // Трансплантологія. – 2004. – Т.7, №3. – С.130–135. Реферування джерел наукової інформації, написання основної частини статті.
10. Легач Є.І. Ксенотрансплантація органної культури надниркових залоз. Досвід клінічного застосування при ревматоїдному артриті та бронхіальній астмі / Є.І. Легач, В.В. Сирота // Трансплантологія. – 2004. – Т.6, №2. – С.39–41. Отримання трансплантаційного матеріалу, трансплантація, збирання клінічного матеріалу, аналітична та статистична обробка результатів, написання статті.
11. Пахомов А.В. Гормонпродуцирующая способность органной культуры семенников взрослых крыс при совместных культивировании и аллотрансплантации / А.В. Пахомов, Г.А. Божок, Е.И. Легач // Проблемы криобиологии. – 2004, № 3. – С.32–39. Вибір методичного підходу, моделювання гормональної недостатності, трансплантація, аналіз результатів трансплантації, написання основної частини статті.
12. Легач Е.И. Трансплантация надпочечных желез / Е.И. Легач, Т.П. Бондаренко // Трансплантологія. – 2005. – Т.8, №1. – С.21–27. Отримання трансплантаційного матеріалу, трансплантація, збирання клінічного матеріалу, аналітична та статистична обробка результатів, написання статті.
13. Теоретические аспекты трансплантации эндокринных клеток и тканей / Г.А. Божок, Е.И. Легач, Н.М. Алабедалькарим [и др.] // Трансплантологія. –2005. – Т.8, №2. – С.10– 20. Реферування джерел наукової інформації, написання основної частини статті.
14. Легач Е.И. Ретроградный способ тиреоидэктомии крыс как адекватная модель гипотиреоза // Трансплантологія. – 2005. – Т.8, №2. – С.92–94.
15. Комбинированное культивирование и гетеротопическая трансплантация тестикулярной ткани с эксплантатом гипофиза / Е.И. Легач, Г.А. Божок, А.В. Пахомов [и др.] // Трансплантологія. – 2005. – Т.8, №3. – С.28–34. Вибір методичних підходів, моделювання гормональної недостатності, комбінована трансплантація ендокринних тканин, аналіз результатів трансплантації, написання основної частини статті.
16. Показники білкового, ліпідного та вуглеводного обмінів при гіпотиреозі та після комбінованої трансплантації щитовидної та надниркових залоз / С.Б. Білявська, Г.А. Божок, Є.І. Легач [та ін.] // Клінічна ендокринологія та ендокринна хірургія. – 2005. – Т.12, № 3. – С. 31–36. Вибір методичних підходів, моделювання гормональної недостатності, комбінована трансплантація ендокринних тканин, аналіз результатів трансплантації, написання основної частини статті.
17. Легач Е.И. Клетки Сертоли: новые возможности комбинированной трансплантации / Е.И. Легач, Г.А. Божок // Трансплантологія. – 2005. – Т.8, № 4. – С. 30–34. Реферування джерел наукової інформації, аналітична обробка результатів трансплантації, написання статті.
18. Легач Е.И. Влияние комбинированной трансплантации органотипических культур семенников и надпочечных желез на уровень тестостерона у орхиэктомированных крыс // Експериментальна і клінічна медицина. – 2006. – № 3. – С. 37–41.
19. Показники вуглеводного обміну у щурів зі стрептозотоциновим діабетом після комбінованої ксенотрансплантації / Є.І. Легач, Г.А. Божок, І.С. Турчин [та ін.] // Клінічна ендокринологія та ендокринна хірургія. – 2006. – Т.16, № 2. – С. 64–68. Вибір методичних підходів, моделювання гормональної недостатності, комбінована трансплантація ендокринних тканин, аналіз результатів трансплантації, написання основної частини статті.
20. Легач Е.И. Комбинированная трансплантация надпочечных желез с гипофизом после адреналэктомии // Харківська хірургічна школа. – 2006. – Т.23, № 4. – С.53–55.
21. Легач Є.І. Ефективність комбінованої трансплантації щитовидної залози та сім’яників за умов експериментального гіпотиреозу // Український радіологічний журнал. – 2006. – Т.14, №4. – С. 444–449.
22. Легач Е.И. Интрапортальная комбинированная трансплантация островков с клетками Сертоли как способ коррекции нарушений углеводного обмена при экспериментальном сахарном диабете / Е.И. Легач, Н.В. Колот, Г.А. Божок // Трансплантологія. – 2007. – Т.9, № 1. – С.151–153. Вибір методичних підходів, моделювання гормональної недостатності, комбінована трансплантація, аналіз результатів трансплантації, написання основної частини статті.
23. 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 [и др.] // Трансплантологія. – 2007. – Т.9, №1. – С.19–21. Вибір методичних підходів, отримання органотипових культур ендокринних тканин, реферування джерел наукової інформації, написання основної частини статті.
24. Гормонопродуцирующий потенциал криоконсервированной органотипической культуры щитовидной железы при комбинированной ксенотрансплантации / Е.И. Легач, С.Б. Билявская, Г.А. Божок [и др.] // Проблемы криобиологии. – 2007. – Т. 17, №2. – С. 86–92. Вибір методичних підходів, кріоконсервування, моделювання гормональної недостатності, комбінована трансплантація, написання основної частини статті.
25. Легач Е.И. Влияние аденогипофиза на морфофункциональные свойства адренокортикоцитов в органотипической культуре и при трансплантации // Проблеми ендокринної патології. – 2007. – №2. – С.52–59.
26. Гормонопродуцирующая способность клеток интерстиция семенников и органотипической культуры семенников новорожденных поросят после криоконсервирования / А.В. Пахомов, Г.А. Божок, Е.И. Легач [и др.] // Проблемы криобиологии. – 2007. – Т. 17, № 2. – С. 179–185. Вибір методичних підходів, отримання органотипової культури, аналітична та статистична обробка результатів, написання основної частини статті.
27. Влияние места трансплантации островков поджелудочной железы на компенсацию углеводного обмена у кроликов с экспериментальным сахарным диабетом 1 типа / Н.В. Колот, Г.А. Божок, Е.И. Легач [и др.] // Проблеми ендокринної патології. – 2007. – №4. – С.71–77. Вибір методичних підходів, моделювання гормональної недостатності, трансплантація, аналітична та статистична обробка результатів, написання основної частини статті.
28. Патент №34848, Україна, МПК5 С12N5/02. Спосіб кріоконсервування культури клітин адренокортикальної тканини / Т.П. Бондаренко, Є.І. Легач (Україна). – Заявлено 13.07.99; Опубл. 15.03.01 // Промислова власність. – Бюл. № 2, ІІ ч. – С. 1.73. Розробка та впровадження запропонованого способу.
29. Патент №4845, Україна, МПК7 А12N5/08, A61K35/55. Спосіб підготовки кріоконсервованої органотипової культури надниркової залози для трансплантації / Н.М. Алабедалькарім, Г.А. Божок, Є.І. Легач, Т.П. Бондаренко (Україна). – Заявлено 29.04.2004; Опубл. 15.02.05 // Промислова власність. – Бюл. №2. Розробка та впровадження запропонованого способу.
30. Патент №9367, Україна, МПК7 А01N1/02. Спосіб кріоконсервування органної культури щитовидної залози новонароджених поросят / Т.П. Бондаренко, Є.І. Легач, Г.А. Божок, Н.М. Алабедалькарім (Україна). – Заявлено 28.03.05; Опубл. 15.09.05 // Промислова власність. – Бюл. №9. Розробка та впровадження запропонованого способу.
31. Патент №80497, Україна, МПК7 A01N 1/02. Спосіб кріоконсервування органотипової культури сім′яників новонародженних поросят / Г.А. Божок, Є.І. Легач, Т.М. Гуріна, Н.Ф. Губіна, Т.П. Бондаренко (Україна). – Заявлено 20.04.2006; Опубл. 25.09.07 // Промислова власність. – Бюл. №15. Розробка та впровадження запропонованого способу.
32. Cryopreservation effect on adrenocortical tissue of new born piglets / T.P. Bondarenko, E.I. Legach, I.I. Kiryushina [et al.] // 35th Annual Meeting of the Society of Cryobiology. – Pittsburg, USA. – 1998. – P. 132.
33. Bondarenko T.P. Clinical application of cryopreserved adrenocortical tissue / T.P. Bondarenko, E.I. Legach // 2nd World Congress on Tissue Banking & 8th International Conference of EATB. – Warsaw, 1999. – P.205.
34. Бондаренко Т.П. Ксенотрансплантация криоконсервированной органной культуры надпочечных желез / Т.П. Бондаренко, Е.И. Легач // Матеріали V національного з’їзду фармацевтів. – Харків, 1999. – С.637–638.
35. Трансплантація кріоконсервованої культури клітин адренокортикальної тканини новонароджених поросят / Т.П. Бондаренко, Г.А. Божок, Є.І. Легач [та ін.] // Мат. ІІ з’їзду трансплантологів України. – Київ, 2000. – Т.1, №1. – С. 177–178.
36. Легач Е.И. Ксенотрансплантация криоконсервированной культуры надпочечных желез / Е.И. Легач, С.В. Луговой // І Всеукр. конференція студентів і молодих вчених з питань трансплантології «Трансплантологія сьогодня». – Донецьк, 2000. – С.37–38.
37. Влияние димексида на базальную секрецию тиреоидных гормонов органотипической культурой щитовидной железы новорожденных поросят / Т.П. Бондаренко, С.В. Луговой, Е.И. Легач [и др.] // І Всеукраїнська конференція студентів і молодих вчених з питань трансплантології «Трансплантологія сьогодня». – Донецьк, 2000. – С.23–24.
38. Легач Е.И. Ксенотрансплантация криоконсервированной культуры адренокортикоцитов как альтернатива гормонотерапии / Е.И. Легач, А.В. Геращенко, И.И. Савченко // Конференція молодих вчених ХДМУ «Медицина третього тисячоліття», 17–18 січня 2001р. – Харків, 2001. – С.22.
39. Легач Е.И. Ксенотрансплантация надпочечных желез как альтернатива заместительной гормонотерапии / Е.И. Легач, И.М. Антонян, Р.В. Стецишин // IX Обл. науч.–практич. конф. с межрегиональным и международным участием «Актуальные проблемы урогинекологии» 21–22 июня 2001г. – Харьков, 2001. – С.328–330.
40. Исследование стероидогенной активности криоконсервированной органной культури надпочечников при ксенотрансплантации / Т.П. Бондаренко, Г.А. Божок, Е.И. Легач [и др.] // Всеукраинская научная конференция «Успехи и перспективы развития криобиологии и криомедицины» – Харьков, 2001. – С. 36.
41. Ксенотрансплантация криоконсервированной органной культуры надпочечных желез в лечении бронхиальной астмы / Е.И. Легач, Т.П. Бондаренко, С.В. Луговой [и др.] Всеукраинская конференция с международным участием «Актуальні проблеми відновлювальної хірургії». – Київ, 2001. – С.151.
42. Легач Є.І. Вплив кріопротекторів на стимулювальну активність адренокортикальної тканини та її чутливість до стимуляторів стероїдогенезу / Є.І. Легач, С.В. Луговий // Українській біохімічний журнал. – 2002. – Т.74, №4. – С.159.
43. Legach E.I. Clinical Results of Xenotransplantation of Adrenal Gland Organ Culture to Patients with Hypocorticoidism / E.I. Legach, G.A. Bozhok, N.M. Alabedalkarim // 13th European Students’ Cоnference for promising biomedical scientists and future doctors, October29th–November2nd. – Berlin, 2002. – P.269.
44. Бондаренко Т.П. Ксенотрансплантация эндокринных желез / Т.П. Бондаренко, Е.И. Легач, Г. Сарвар // Матеріали науково–практичної конференції «Патогенетичні аспекти фармакотерапії ендокринних захворювань» (Перші Данилевські читання), 6–7 лютого 2002р. – Харків, 2002. – С. 23–24.
45. Легач Е.И. Влияние ксенотрансплантации надпочечных желез на систему микроциркуляции при бронхиальной астме / Е.И. Легач, Т.П. Бондаренко, В.В. Сирота // Матеріали науково–практичної конференції «Сучасні напрямки розвитку ендокринології» (Другі Данилевські читання). – Харків, 2003. – С. 123–124.
46. Волкова Н.О. Ксенотрансплантація кріоконсервированої органної культури щитовидної залози кролям з експериментальним гіпотиреозом / Н.О. Волкова, Є.І. Легач, Т.П. Бондаренко // Українські медичні вісті. – 2003. – Т.5, №1. – С.126.
47. Сумісне культивування та сумісна алотрансплантація надниркових залоз та сім’яників в експерименті / Г.А. Божок, Є.І. Легач, Н.М. Алабедалькарім [та ін.] // Установчий з′їзд Українського товариства клітинної біології. – Львів, 2004. – C. 90.
48. Легач Є.І. Глюкокортикоїдна функція та кінетичні характеристики бета–адренорецепторів в клітинах адреналового кортексу до та після кріоконсервування / Є.І. Легач, В.В. Сирота, Х. Торрес // Установчий з′їзд Українського товариства клітинної біології. – Львів, 2004. – C. 20.
49. Органні культури ендокринних залоз: кріоконсервування, трансплантація / Т.П. Бондаренко, Є.І. Легач, Г.А. Божок [та ін.] // Установчий з′їзд Українського товариства клітинної біології. – Львів, 2004. – C. 237.
50. Легач Е.И. Лечение хронической надпочечниковой недостаточности путем трансплантации криоконсервированной органотипической культуры надпочечных желез // Науково–практична конференція з міжнародною участю «Актуальні питання ендокринології дітей та підлітків», 25–26 листопада 2004 р. – Харків. – С.54–55.
51. Легач Е.И.Гормонопродукция щитовидной железы и надпочечников при их совместном культивировании / Е.И. Легач, В.В. Сирота // Матеріали науково–практичної конференції «Сучасні напрямки розвитку ендокринології» (Треті Данилевські читання), 26–27 лютого 2004 р. – Харків, 2004 – С. 107–108.
52. 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 // Українській біохімічний журнал. – 2004. – Т.76, №4. – С.126.
53. Динаміка вмісту альбуміну у щурів після трансплантації органної культури щитовидної залози / С.Б. Білявська, Г.А. Божок., Є.І. Легач [та ін.] // Матеріали науково–практ. конф. «Фундаментальні питання експериментальної та клінічної ендокринології» (Четверті Данилевські читання), 24–25 лютого 2005 р. – Харків, 2005. – С.23–24.
54. Легач Е.И. Особенности морфофункционального состояния аллографтов органотипической культуры семенников при совместной трансплантации с фрагментами надпочечных желез / Е.И. Легач, Г.А. Божок, А.В. Пахомов // Матеріали науково– практ. конф «Фундаментальні питання експериментальної та клінічної ендокринології» (Четверті Данилевські читання), 24–25 лютого 2005 р. – Харків, 2005. – С. 26–27.
55. Легач Е.И., Бондаренко Т.П. Результаты лечения глюкокортикоидной недостаточности с помощью трансплантации органотипической культуры надпочечных желез / Е.И. Легач, Т.П. Бондаренко // Матеріали науково–практичної конференції «Фундаментальні питання експериментальної та клінічної ендокринології» (Четверті Данилевські читання), 24–25 лютого 2005 р. – Харків, 2005. – С. 127.
56. Вивчення показників вуглеводного, ліпідного та білкового обмінів при сумісному культивуванні та трансплантації органних культур щитовидних та надниркових залоз С.Б. Білявська, Г.А. Божок., Є.І. Легач [та ін.] // Українській біохімічний журнал. – 2005. – Т.77, № 5. – С.135.
57. Особливості базальної та стимульованої гормонопродукції нативних та кріоконсервованих органотипових культур сім’яників новонароджених поросят / О.В. Пахомов, Г.А. Божок, Є.І. Легач [та ін.] // Українській біохімічний журнал. – 2005. – Т.77, № 5. – С.153.
58. Thyroxine serum level after combined transplantation of organ cultures of thyroid and adrenal glands / S.B. Bilyavskaya, G.A. Bozhok, E.I. Legach [et al.] // Українській біохімічний журнал. – 2005. – Т.7, № 22. – С. 158.
59. Opposite effect of steroid hormones in combined culturing and combined transplantation / E.I. Legach, G.A. Bozhok, A.V. Pakhomov [et al.] // 5th Parnas Conference «Molecular mechanisms of cellular signaling», 26–29 April, 2005. – Kyiv, 2005. – Українській біохімічний журнал. – Т.7, № 22. – С. 200.
60. Функциональная активность криоконсервированной органотипической культуры щитовидной железы при ксенотрансплантации / Г.А. Божок, Е.И. Легач, Н.М. Алабедалькарим [и др.] // Проблемы криобиологии. – 2005. – Т.15, № 3. – С.425–426.
61. Морфофункциональные характеристики криоконсервированной органотипической культуры семенников новорожденных поросят после ксенотрансплантации / А.В. Пахомов, Г.А. Божок, Е.И. Легач [и др.] // Проблемы криобиологии. – 2005. – Т.15, № 3. – С.433–434.
62. Божок Г.А. Вплив донор–специфічної імунізації на виживання трансплантата тканини яєчка / Г.А. Божок, Є.І. Легач, Т.П. Бондаренко // Клінічна хірургія. – 2006. – №4–5. – С. 85–86.
63. Легач Є.І. Комбінована трансплантація як фактор поліпшення виживання кріоконсервованих тканинних трансплантатів // Є.І. Легач, Г.А. Божок, С.Б. Білявська // Клінічна хірургія. – 2006. – № 4–5. – С. 97–98.
64. Комбінована трансплантація як метод корекції рівню глікемії при експериментальному цукровому діабеті / Є.І. Легач, Г.А. Божок, Н.В. Скрипниченко [та ін.] // ХІ конгрес Світової Федерації українських лікарських товариств. 28–30 серпня 2006р. – Полтава, 2006. – С. 419–420.
65. Легач Е.И. Биохимические показатели крови гипотиреоидных крыс после ксенотрансплантации органотипических культур щитовидной железы и семенников / Е.И. Легач, Г.А. Божок // Матеріали ІХ Українського біохімічного з'їзду. 24–27 жовтня 2006р. – Харків, 2006. – Т.2 – С.77.
66. Легач Е.И. Комбинированная трансплантация органотипических культур эндокринных желез в профилактике и лечении эндокринопатий / Е.И. Легач, Г.А. Божок, Н.В. Скрипниченко Н.В. // Науково–практ. конф. «Профілактика, діагностика та лікування – основні складові терапії». Жовтень 2006р. – Харків, 2006. – С. 49.
67. Интрапортальная комбинированная ксенотрансплантация островков поджелудочной железы с клетками Сертоли в лечении экспериментального сахарного диабета / Е.И. Легач, Г.А. Божок, Н.В. Колот [и др.] // Материалы тезисов III Всероссийского симпозиума «Актуальные вопросы тканевой и клеточной трансплантологии». 25–26 апреля 2007г. – Москва, 2007. – С.75–76.
68. Использование флуоресцентных полиметиновых красителей в клеточной трансплантации: Г.А. Божок, Н.М. Алабедалькарим, Е.И. Легач [и др.] // Материалы тезисов III Международного симпозиума «Актуальные вопросы тканевой и клеточной трансплантологии». 25–26 апреля 2007г. – Москва, 2007. – С.56.
69. Заготівля, кріоконсервування та клінічне застосування органної культури наднирників новонароджених поросят в лікуванні недостатності наднирників / Метод. рекомендації // ІПКіК НАН України. – Уклад. Грищенко В.І., Бондаренко Т.П., Божок Г.А., Легач Є.І., Алабедалькарім Н.М., Геращенко А.В., Самченко І.І. – Харків, 2000. – 12 с. Розробка та впровадження запропонованого способу.
70. Заготівля, кріоконсервування та клінічне застосування органної культури щитовидної залози новонароджених поросят в лікуванні гіпотиреозів / Метод. рекомендації // ІПКіК НАН України. – Уклад. Грищенко В.І., Бондаренко Т.П., Бугаєв В.М., Турчин І.С., Божок Г.А., Легач Є.І., Алабедалькарім Н.М., Луговий С.В. – Харків, 2000. – 12 с. Розробка та впровадження запропонованого способу.

**Анотація**

**Легач Є.І. Комбінована трансплантація кріоконсервованих органотипових культур ендокринних залоз (експериментальне дослідження). –** Рукопис.

*Дисертація на здобуття наукового ступеня доктора медичних наук за двома спеціальностями: 14.01.08 – трансплантологія і штучні органи та 14.01.35 – кріомедицина. – Національний інститут хірургії та трансплантології імені О.О.Шалімова АМН України, Київ, 2008.*

Встановлено потенційну можливість підвищення ефективності терапії гіпотиреозу, цукрового діабету І типу, гіпокортицизму, андроген–дефіцитного стану при використанні комбінованого підходу до передтрансплантаційної обробки біологічного матеріалу (культивування, кріоконсервування) та при трансплантації органотипових культур ендокринних залоз (щитовидної, підшлункової залоз, наднирників та сім’яників). Передтрансплантаційне комбіноване органотипове культивування дозволяє підвищити рівень гормональної продукції та активізувати процеси проліферації секреторного епітелію. Розроблено методи кріоконсервування органотипових культур щитовидної залози, наднирників та сім’яників новонароджених поросят на основі використання ДМСО та високих (85-100°С/хв) швидкостей охолодження. Встановлено, що введення додаткового етапу реабілітації кріоконсервованих культур після розморожування (рекультивування) сприяє відновленню їх гормональної активності, здатності до реакції на стимулятори гормонопоезу, а також має імуномодулюючий вплив на виживання ендокринної тканини за умов трансплантації. Проведений аналіз показав, що комбінована трансплантація покращує функціонування та виживання пересаджених тканин в порівнянні з монотрансплантацією. На основі аналізу фізіологічних та біохімічних показників тварин з експериментальною гормональною недостатністю визначені оптимальні комбінації органотипових культур ендокринних залоз у трансплантаті при лікуванні досліджуваних патологій.

Ключові слова: **комбінована трансплантація, кріоконсервування, органотипове культивування, щитовидна залоза, підшлункова залоза, наднирники, сім’яникі, острівці підшлункової залози, клітини Сертолі.**

**АННОТАЦИЯ**

**Легач Е.И. Комбинированная трансплантация криоконсервированных органотипических культур эндокринных желез (экспериментальное исследование). –** Рукопись.

*Диссертация на соискание ученой степени доктора медицинских наук по двум специальностям: 14.01.08 – трансплантология и искусственные органы и 14.01.35 – криомедицина. – Национальный институт хирургии и трансплантологии имени А.А.Шалимова АМН Украины, Киев, 2008.*

Диссертационная работа содержит теоретическое и экспериментальное обоснование нового решения проблемы повышения эффективности лечения гормональной недостаточности (гипотиреоза, сахарного диабета I типа, гипокортицизма, андрогенодефициного состояния), которое состоит в использовании метода комбинированной трансплантации, а также предтрансплантационной обработки биологического материала (тканей щитовидной, поджелудочной желез, надпочечников и семенников) путем культивирования и криоконсервирования, что позволило не только повысить гормональную продукцию, но и продлить срок выживаемости трансплантата в организме реципиента.

С этой целью в работе проведено исследование морфофункционального состояния органотипических культур эндокринных желез in vitro, их гормонопродуцирующий потенциал и эффективность коррекции гормональной недостаточности при трансплантации, изучена гормональная активность органотипических культур эндокринных желез до и после криоконсервирования, а также при комбинированном рекультивировании.

На основе изучения гормональной секреции, жизнеспособности и гистологического анализа определены оптимальные сроки органотипического культивирования эндокринных желез. На основе сравнительного анализа существующих способов криоконсервирования тканей эндокринных желез подобраны оптимальные концентрации криопротектора ДМСО, время инкубации с криопротектором. Разработаны методы криоконсервирования органотипических культур щитовидной железы, надпочечников и семенников новорожденных поросят на основе высоких скоростей охлаждения (85-100°С/мин), позволяющих сохранять основные структурно-функциональных свойства эндокринных тканей.

Установлено, что введение дополнительного этапа реабилитации криоконсервированных культур эндокринных желез после размораживания (рекультивирования) способствует восстановлению их гормональной активности, способности к реакции на стимуляторы гормонопоэза, а также оказывает иммуномодулирующее влияние на выживаемость эндокринной ткани при трансплантации за счет селективного удаления антиген-представляющих и пролитических клеток.

Проанализирована динамика секреции гормонов трансплантатами нативных фрагментов эндокринных желез, органотипических культур до и после криоконсервирования, а также рекультивированных после криоконсервирования. На основе полученных результатов обоснована возможность комбинации эндокринных желез для улучшения результатов трансплантации. Показано, что ксенотрансплантация нативных фрагментов и органотипической культуры щитовидной железы новорожденных поросят крысам с послеоперационным гипотиреозом приводит к компенсации уровня тироксина в среднем на 50% по сравнению с интактными животными. Комбинированная ксенотрансплантация фрагментов ткани щитовидной железы с семенниками позволяет увеличить этот показатель до 71%, а с фрагментами ткани надпочечников – до 85%. Использование эксплантата гипофиза в качестве комбинированного трансплантата целесообразно при пересадке криоконсервированных и рекультивированных культур щитовидной железы, при этом наблюдается увеличение уровня тироксина в плазме крови экспериментальных животных соответственно на 43 и 17% по сравнению с монотрансплантатом.

Установлено, что в результате комбинированной трансплантации ткани надпочечников новорожденных поросят при всех видах предтрансплантационой обработки (нативные фрагменты, органотипическая культура, криоконсервированные и рекультивированные фрагменты) совместно с эксплантатом аденогипофиза содержание глюкокортикоидов в крови экспериментальных животных увеличивается соответственно на 34, 42 и 94% по сравнению с монотрансплантатом.

Экспериментально установлена потенциальная возможность повышения эффективности лечения инсулинозависимого сахарного диабета путем комбинированной трансплантации ткани поджелудочной железы новорожденных поросят с тканью надпочечников или семенников. При использовании криоконсервированного биоматериала продемонстрирована более быстрая нормализация параметров глюкозного гомеостаза после комбинированной трансплантации (2 недели в отличие от 3-4 недель при монотрансплантации). Комплексные показатели степени компенсации углеводного обмена (тест толерантности к глюкозе, содержание гликозилированного гемоглобина) выявили лучшую компенсацию сахарного диабета на более длительном сроке наблюдения (3 месяца) у животных с комбинированной трансплантацией тканей поджелудочной железы и семенников. Установлено, что нормализация уровня глюкозы у кролей с аллоксановым диабетом наблюдается через неделю после интрапортальной трансплантации островков поджелудочной железы новорожденных поросят, однако с 29-31 суток после трансплантации наблюдается возврат гипергликемического состояния. Интрапортальная комбинированная трансплантация островков поджелудочной железы с клетками Сертоли позволяет увеличить выживаемость островков в 2,3 раза по сравнению с монографтом. Степень компенсации углеводного обмена у животных с комбинированной трансплантацией значительно выше, чем у животных с монотрансплантацией.

На основе экспериментальных данных, полученных в работе, разработана стратегия наиболее эффективного применения комбинированных криоконсервированных органотипических культур для адекватной компенсации гормональной недостаточности эндокринных желез при гипофункции щитовидной, надпочечных, поджелудочной желез и семенников. Определены оптимальные комбинации тканей эндокринных желез в трансплантате для лечения исследованных патологий, на основе чего возможна выработка общей лечебной тактики при использовании метода трансплантации для терапии гормональной недостаточности.

**Ключевые слова:** комбинированная трансплантация, криоконсервирование, органотипическое культивирование, щитовидная железа, поджелудочная железа, надпочечники, семенники, островки поджелудочной железы, клетки Сертоли.

**SUMMARY**

**Legach E.I. Combined transplantation of cryopreserved organ cultures of endocrine glands (experimental study). –** Manuscript.

*The dissertation on competition of a scientific degree of the doctor of medical sciences on two specialties: 14.01.08 – transplantology and artificial organs and 14.01.35 – cryomedicine. – National institute of surgery and transplantology named after A.A.Shalimov of Academy of Medical Science of Ukraine, Kyiv, 2008.*

The potential possibility of increasing the effectiveness of hypothyroidism, type 1 diabetes mellitus, hypocorticism, androgen deficiency therapy using the combined approach to the pretransplantation treatment of biological material (culture, cryopreservation) and under transplantation of endocrine gland organ cultures (thyroid, adrenal glands, pancreas and testes) it was established. Pretransplantation combined culture gives the opportunity to enhance hormone production level and activate the processes of secretory epithelium proliferation. The cryopreservation methods for thyroid, adrenal and testis organ cultures on the basis of using the DMSO and high (85-100°С/min) freezing rate were worked out. It was determined that introduction of additional rehabilitation stage of cryopreserved cultures after thawing (reculture) promotes to recovery its hormone activity and response to stimulators of hormone synthesis, had the immunomodulating impact on survival of endocrine tissue under transplantation. Analysis of data had shown that combined transplantation improved functioning and survival of transplanted tissues comparing with monotransplantation outcomes. On the basis of analysis of physiologic and biochemical indices of the animals with experimental hormone insufficiency the optimal compositions of endocrine gland organ cultures in the graft were determined in all studied pathologies.

**Key words:** combined transplantation, cryopreservation, organ culture, thyroid gland, pancreas, adrenal glands, testes, islets, Sertoli cells.

***Для заказа доставки данной работы воспользуйтесь поиском на сайте по ссылке:*** [***http://www.mydisser.com/search.html***](http://www.mydisser.com/search.html)