

УДК 615.361.441.014.41

Е.И. ЛЕГАЧ<sup>1\*</sup>, С.Б. БИЛЯВСКАЯ<sup>2</sup>, Г.А. БОЖОК<sup>1</sup>, Т.П. БОНДАРЕНКО<sup>1</sup>

## Гормонопродуцирующий потенциал криоконсервированной органо-типической культуры щитовидной железы при комбинированной ксенотрансплантации

UDC 615.361.441.014.41

Ye.I. LEGACH<sup>1\*</sup>, S.B. BILYAVSKAYA<sup>2</sup>, G.A. BOZHOK<sup>1</sup>, T.P. BONDARENKO<sup>1</sup>

## Hormone-Producing Potential of Cryopreserved Organotypic Culture of Thyroid Gland During Combined Xenotransplantation

Изучали содержание Т4, ТТГ, альбумина, холестерина и глюкозы в плазме крови тиреоидэктомированных крыс с трансплантатами криоконсервированной органотипической культуры щитовидной железы (ОКЩЖ) новорожденных поросят, пересаженной в комбинации с тканью надпочечных желез. Показано, что котрансплантат нативных фрагментов щитовидной железы с фрагментами надпочечных желез, а также монотрансплантаты нативной и рекультивированной ОКЩЖ на 30-й день были способны субкомпенсировать гипотиреоидное состояние у крыс.

**Ключевые слова:** щитовидная железа, криоконсервирование, комбинированная трансплантация, Т4, ТТГ, альбумин, холестерин, глюкоза.

Вивчали вміст Т4, ТТГ, альбуміну, холестерину та глюкози у плазмі крові тиреоїдектомованих шурів з трансплантатами криоконсервованої органоїпової культури щитоподібної залози (ОКЩЗ) новонароджених поросят, пересаджених у комбінації з тканиною надниркових залоз. Показано, що котрансплантат нативних фрагментів щитоподібної залози з фрагментами надниркових залоз, а також монотрансплантати нативної та рекультивованої ОКЩЗ на 30-ту добу здібні субкомпенсувати гіпотиреоїдний стан у шурів.

**Ключові слова:** щитоподібна залоза, криоконсервування, комбінована трансплантація, Т4, ТТГ, альбумін, холестерин, глюкоза.

There have been studied T4, TSH, albumin, cholesterol and glucose in blood plasma of thyroidectomized rats with the transplants of cryopreserved organotypic culture of thyroid gland (COCTG) of newborn piglets grafted in combination with the tissue of adrenal glands. It has been shown that co-graft of native fragments of thyroid gland with ones of adrenal glands as well as mono-grafts of native and re-cultured COCTG to the 30<sup>th</sup> day were capable of subcompensating hypothyroid state in rats.

**Key-words:** thyroid gland, cryopreservation, combined transplantation, T4, TSH, albumin, cholesterol, glucose.

Апробация комбинированной клеточной трансплантации дала положительные результаты, выражавшиеся в долгосрочной нормализации уровня глюкозы у диабетических животных [16, 19], восстановлении моторных навыков у больных паркинсонизмом [9, 17], индукции толерантности к сердечному аллогraftу [21]. При комбинированной трансплантации, во-первых, достигается иммунологическая протекция основного трансплантата за счет защитных свойств определенных клеток, например клеток Сертоли, при трансплантации островков поджелудочной железы [12]. Во-вторых, дополнительное введение ткани, связанной с основным трансплантатом регуляторно-трофическими взаимоотношениями, может способство-

Approbation of a combined cell transplantation presented positive results manifested themselves in a normalization of glucose level in diabetic animals [16, 19], recovery of motor skills in the patients with parkinsonism [9, 17], induction of tolerance to cardiac allograft [21]. During combined transplantation first of all an immunological protection of main transplant is achieved due to protective properties of certain cells, e.g. Sertoli cells during transplantation of pancreatic islets [12]. Secondly, additional introduction of tissue related to main transplant by regulatory trophic interactions may contribute to its transplantability. So, for instance during co-transplantation of islet cells with pituitary tissue improved graft vascularization and the content of insulin in it increased [11].

<sup>1</sup>Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, г. Харьков

<sup>2</sup>Харьковский национальный университет им. В.Н. Каразина

\* Автор, которому необходимо направлять корреспонденцию: ул. Перейславская, 23, г. Харьков, Украина 61015; тел.: +38 (057) 373-30-07, факс: +38 (057) 373-30-84, электронная почта: cryo@online.kharkov.ua

<sup>1</sup>Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine of the National Academy of Sciences of Ukraine, Kharkov, Ukraine

<sup>2</sup>V.N. Karazin Kharkov National University, Kharkov, Ukraine

\* To whom correspondence should be addressed: 23, Pereyaslavskaya str., Kharkov, Ukraine 61015; tel.: +380 57 373 3007, fax: +380 57 373 3084, e-mail: cryo@online.kharkov.ua

вать его приживляемости. Так, например, при котрансплантации островковых клеток с тканью гипофиза улучшалась васкуляризация графта и увеличивалось содержание в нем инсулина [11].

Кора надпочечных желез (НЖ) вырабатывает глюко-кортикоидные гормоны, которые способны подавлять клеточный и гуморальный иммунный ответ, поэтому использование ткани адренокортекса как иммунопротектора при комбинированной трансплантации может пролонгировать срок функционирования основного трансплантата. Однако до настоящего момента влияние ткани/клеток НЖ на выживаемость основного графта при комбинированной трансплантации не было установлено.

На пролонгирование выживаемости клеточных трансплантатов также может влиять процесс криоконсервирования. В связи с повышенной чувствительностью антигенпредставляющих клеток к охлаждению скорость замораживания является фактором, изменяющим иммуногенность трансплантата [20]. В частности, положительный эффект криоконсервирования был отмечен при трансплантации кровеносных сосудов [15], островков Лангерганса [10], ткани надпочечников [1].

Использование трансплантации гормонопродуцирующих клеток эндокринных желез для лечения гормоно-дефицитных состояний не теряет своей актуальности. Преимущество такого вида лечения по сравнению с заместительной гормональной терапией в том, что при последней невозможна комплексная коррекция гормонального уровня, учитывающая физиологические потребности организма и гипоталамо-гипофизарную стимуляцию. При послеоперационном гипотиреозе применение тиреоидных препаратов усложняется их индивидуальной непереносимостью, ишемической болезнью сердца и гипертонической болезнью, возникновением побочных эффектов передозировки (тахикардией, уменьшением массы тела, нервно-психической возбудимостью, бессонницей).

Цель работы – изучение гормональной активности гетеротопических трансплантатов криоконсервированной органотипической культуры щитовидной железы (ОКЩЖ), пересаженных в комбинации с органотипической культурой надпочечных желез (ОКНЖ).

### **Материалы и методы**

Органотипические культуры щитовидной железы (ЩЖ) и надпочечных желез новорожденных поросят получали по методу [5]. Культивирование проводили на питательной среде RPMI, обогащенной 10%-й теплоинактивированной сывороткой крупного рогатого скота и йодидом калия (75 мкг/л).

При криоконсервировании ОКЩЖ использовали 7%-й раствор ДМСО и скорость замораживания 85-100°C/мин [7]. Криоконсервирование ОКНЖ

The adrenal glands (AG) cortex produces glucocorticoid hormones capable of suppressing cell and humoral immune response, therefore the use of adrenocortex tissue as immune protectant during combined transplantation may prolong the term of main transplant functioning. However up to now the effect of AG tissue/cells on survival of main graft under combined transplantation has not been established yet.

Cryopreservation also can affect the prolongation of survival of cell transplants. In connection with an increased sensitivity of antigen-presenting cells to cooling the freezing rate is the factor changing immunogeneity of transplant [20]. In particular, positive effect of cryopreservation was found during transplantation of blood vessels [15], Langerhans islets, adrenal tissues [1].

Use of transplantation of hormone-producing cells of endocrine glands for treatment of hormone-deficient states is still actual. The advantage of this treatment type in comparison with substitutive hormonal therapy consists in the fact that during the latter complex correction of hormonal level, taking into account physiological demands of an organism and hypothalamus-pituitary stimulation is impossible. At post-operational hypotheriosis the application of thyroid preparations is complicated by individual intolerance, ischemic cardiac and hypertonic diseases, appearance of side effect of overdosing (tachycardia, body degrowth, distraction, hyposomnia).

The research aim was to study hormonal activity of heterotopic transplants of cryopreserved organotypic culture of thyroid gland (COCTG) grafted in combination with the organotypic culture of adrenal glands (OCAG).

### **Materials and methods**

Organotypic cultures of thyroid gland (TG) and adrenal glands of newborn piglets were obtained according to the method [5]. Culturing was done with RPMI nutrient medium enriched with 10% heat-inactivated serum of the cattle and potassium iodide (75 µg/l).

During cryopreservation of OCTG 7% DMSO and freezing rate of 85-100°C/min were used [7]. Cryopreservation of OCAG was performed according to the method [8]. After thawing and cryoprotectant removal the part of samples was immediately transplanted and the rest was re-cultured [1].

White breedless female rats of 130-160g weight served as the recipients. Thyroidectomy was performed as described [3]. Either native fragments or OCTG ones in the dose of 30-35 mg were transplanted under renal capsule directly after thyroidectomy. At combined transplantation of TG with AG to the animals left-side adrenalectomy was made. All the operations were performed with a combined narcosis (2.5 mg ketamine, 1 mg/100 g of animal's body mass xylazine).

осуществляли по методу [8]. После размораживания и удаления криопротектора часть образцов немедленно трансплантировали, а остальные подвергали рекультивированию [1].

Реципиентами служили белые беспородные крысы-самки массой 130-160 г. Тиреоидэктомию выполняли по [3]. Трансплантацию нативных фрагментов либо ОКЩЖ в дозе 30-35 мг проводили под почечную капсулу непосредственно после тиреоидэктомии. При комбинированной трансплантации ЩЖ с НЖ животным выполняли левостороннюю адреналэктомию. Все операции проводили под комбинированным наркозом (кетамин – 2,5 мг, ксилазин – 1 мг/100 г массы тела животного).

На 30-е сутки после трансплантации в плазме крови животных определяли уровень тироксина (Т4) и тиреотропного гормона (ТТГ) радиоиммунологическим методом с помощью стандартных тест-наборов РИА-Т4-СТ (Беларусь) и ТТГ “Ирма” REF (Венгрия). Уровень альбумина в сыворотке крови определяли тест-набором производства “Филисит Диагностика” (Украина), уровень холестерина – тест-набором Chol 150 “Lachema” (Чехия). Для изучения гликемии с углеводной нагрузкой раствор глюкозы (0,1 г/крысу) вводили интратрубно за 40 мин до умерщвления животного.

Статистическую обработку результатов выполняли с использованием t-критерия Стьюдента.

Эксперименты проводили в соответствии с “Общими принципами экспериментов на животных”, одобренными I Национальным конгрессом по биоэтике (20.09.2001 г., Киев) и согласованными с положениями “Европейской Конвенции о защите позвоночных животных, используемых для экспериментальных и других научных целей” (1985 г., Страсбург).

### Результаты и обсуждение

Для комплексного изучения эффекта пересадки ткани НЖ совместно с тканью ЩЖ исследования проводили не только в системе ксеногенной, но и аутологичной трансплантации. Результаты измерения уровня Т4 в плазме крови реципиентов на 30-е сутки после операции показали достоверное его увеличение в группах животных как с аутологичными, так и с ксеногенными графтами (рис. а).

Следует отметить, что ни один из использованных видов трансплантатов полностью не восстанавливал гормональный уровень до контрольных значений. Среди монографтов наиболее отвечали в этом отношении трансплантаты нативных фрагментов аутологичной ЩЖ, а также трансплантаты нативной и рекультивированной ОКЩЖ. Достоверно высокие значения уровня Т4 при комбинированной трансплантации были отмечены в группах животных с нативными фрагментами ауто-

To the 30<sup>th</sup> day after transplantation in blood plasma of animals there was found the level of thyroxine and thyroid-stimulating hormone (TSH) with radio-immunologic method using standard test-kits RIA-T4-ST (Byelorussia) and TSH (“Irma” REF, Hungary). Albumin level in blood serum was examined with the test-kit (“Filisit Diagnostika”, Ukraine), cholesterol level was found with Chol 150 test-kit (“Lachema”, Czech Republic). To investigate glycemia with carbohydrate loading the glucose solution (0.1 g/rat) was intraperitoneally introduced 40 min prior to animal’s sacrificing.

The results were statistically processed using the Student’s t-criterion.

The experiments were performed in accordance with “General principles of experiments in animals” approved by the 1<sup>st</sup> National Congress on Bioethics (Kiev, 2001) and coordinated with the statements of “European convention about protection of vertebrate animals used for experimental and other purposes” (Strasbourg, 1985).

### Results and discussion

For the versatile studying the effect of AG tissue grafting jointly with the TG tissue the studies were done not only in the system of xenogeneic but also autologous transplantations. The results of measuring the level of T4 in blood plasma of recipients to the 30<sup>th</sup> days after operation have shown its statistically significant rise in the groups of animals both with autologous and xenogeneic grafts (Fig. a).

It should be noted that no one of the used graft types completely recovered a hormonal level up to the control values. Among monografts the grafts of native fragments of autologous TG responded mostly in this respect as well as the grafts of native and re-cultured OCTG. Statistically significant values of T4 level at combined transplantation were noted in the groups of animals with native fragments of autologous and xenogeneic glands. The change in the TSH level index in blood plasma of animals of these experimental groups was observed in inverse relationship from the level of thyroxine that confirmed the fact of hypothalamus-pituitary regulation of hormonal secretion by the grafts.

It is known that hypothyroid state at an organism level manifests in a decrease of the activity for all metabolic processes. In patients with hypotheriosis as a rule there is observed hypercholesterinemia as a result of the decreased utilization of cholesterol by the tissues, hypoalbuminemia as a result of suppression of synthetic processes, hyperglycemia at carbohydrate loading [4]. Taking into account this fact, it was logic to measure the content of cholesterol, albumin and glucose in blood plasma of experimental animals.

In Fig. b there are presented the values of albumin level in blood plasma of experimental animals to the 30<sup>th</sup> day after transplantation. The change in this index

логичных и ксеногенных желез. Изменение показателя уровня ТТГ в плазме крови животных этих экспериментальных групп наблюдалось в обратной зависимости от уровня тироксина, что подтверждало факт гипоталамо-гипофизарной регуляции гормональной секреции трансплантатами.

Известно, что гипотиреоидное состояние на уровне организма проявляется снижением активности всех метаболических процессов. У больных гипотиреозом, как правило, наблюдаются гиперхолестеринемия как следствие уменьшения утилизации холестерина тканями, гипоальбуминемия в результате угнетения синтетических процессов, гипергликемия при углеводной нагрузке [4]. Учитывая данный факт, обоснованно было измерить содержание холестерина, альбумина и глюкозы в плазме крови экспериментальных животных.

На рисунке б приведены значения уровня альбумина в плазме крови экспериментальных животных на 30-е сутки после трансплантации. Изменение данного показателя между группами животных соответствовало изменению концентрации Т4.

Изменения уровня холестерина и глюкозы после углеводной нагрузки в плазме крови крыс-реципиентов также соответствовали изменению уровня тироксина, а между собой имели сходный профиль (рис. в).

В целом показатели белкового, липидного и углеводного обменов косвенным образом подтверждали степень компенсации гипотиреоза у животных после трансплантации.

Обобщая полученные результаты, можно отметить факт субкомпенсации гипотиреоидного состояния прежде всего у животных с аутологичными трансплантатами ЩЖ, причем как для монографта фрагментов ЩЖ, так и для их кографта с фрагментами НЖ. Очевидно, что аутологичный трансплантат не испытывает влияния иммунологического отторжения, поэтому его функционирование может определяться не иммуносупрессорным действием глюкокортикоидов, секретируемых в месте трансплантации, а длительностью ишемии и скорости неоваскуляризации.

Значительное повышение уровня Т4 наблюдалось и при трансплантации кографта фрагментов ОКЩЖ с ОКНЖ по сравнению с монографтом фрагментов ОКЩЖ. Вероятно, в данном случае проявляется эффект локальной иммунопротекции трансплантата ЩЖ гормонами надпочечников.

Для криоконсервированной ОКЩЖ характерно уменьшение гормональной активности и после трансплантации она практически не способна уменьшить степень тироксиновой недостаточности у тиреоидэктомированных крыс. Трансплантация криоконсервированной ОКЩЖ, подвергнутой двухсуточному рекультивированию

between the groups of animals corresponded to the T4 concentration variation.

The alteration of the levels of cholesterol and glucose after carbohydrate loading in blood plasma of recipient-rats also corresponded to the change in thyroxine level and between themselves they had the similar profile (Fig. c).

In a whole the indices of protein, lipid and carbohydrate exchanges indirectly confirmed the degree of hypothyroidism compensation in the animals after transplantation.

Summarizing the obtained results it could be noted the fact of subcompensation of hypothyroid state primarily in animals with autologous grafts of TG, herewith both for monograft of TG fragments and for their co-graft with AH fragments. It is evident that autologous graft is not undergone the effect of immunological rejection therefore its functioning may be determined not immune suppressor effect of glucocorticoids secreted in transplantation site, but ischemia duration and neovascularization rate.

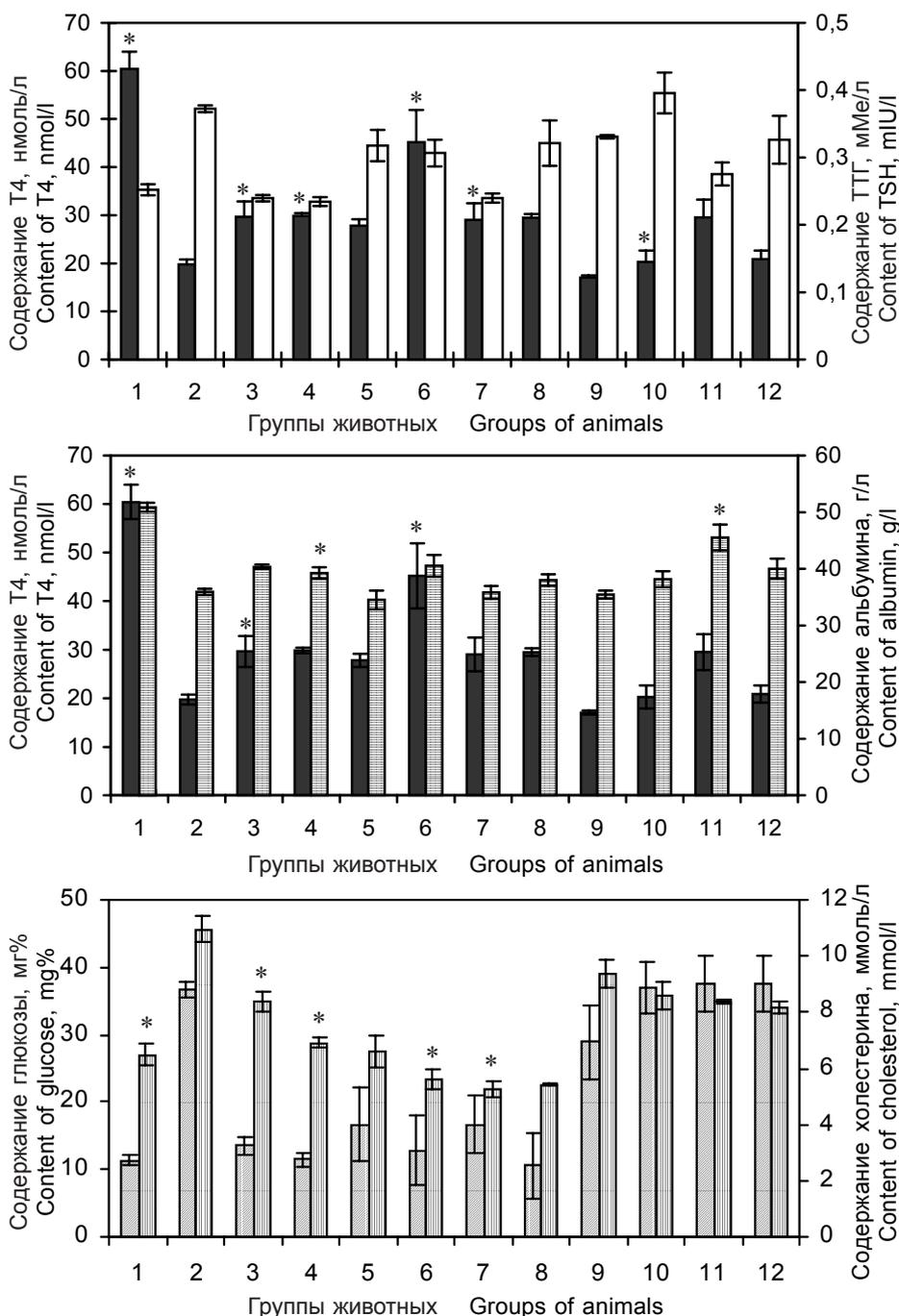
Significant rise in T4 level was observed also during transplantation of co-graft of the fragments of OCTG with OCAG if compared with monograft of OCTG fragments. In this case the effect of local immune protection of TG transplant by adrenal hormones is likely manifested.

For cryopreserved OCTG a decreased hormonal activity is characteristic and after transplantation it is not practically capable of reducing the rate of thyroxine deficit in thyroidectomized rats. Transplantation of cryopreserved OCTG subjected to 48 hrs' re-culturing after thawing resulted in the growth of T4 level and corresponding declining of TSH and in rat's blood plasma. Herewith statistically significant rise in albumin concentration was observed, testifying to a recovery of hormone-producing activity of the grafts of cryopreserved OCTG after re-culturing.

The studies performed in the slices of TG have shown that freezing affects some stages of its hormone-genesis: reduces iodide capture and decreases the activity of cathepsin D. In addition, the growth and proliferation after cryopreservation in culture slows down by 2-3 days if compared with intact tissue [2]. If the graft functioning after transplantation at early terms is determined by preserved follicular units and at the later terms it is done with newly formed ones the advantage of hormone-production of cryopreserved and re-cultured OCTG is getting clearer if compared with just cryopreserved one.

In this study no effect of combined transplantation at OCTG grafting in comparison with native TG fragments was noted.

As it was shown in multiple experiments with the tissues of pancreas and thyroid glands the culturing was the process decreasing the expression of antigens of main histocompatibility complex of the 1<sup>st</sup> and 2<sup>nd</sup>



Уровень Т4, ТТГ (а), альбумина (б), холестерина и глюкозы (в) в плазме крови контрольных (1); тиреоидэктомированных (2) крыс; крыс с трансплантацией нативных фрагментов аутологичной ЩЖ (3); нативных фрагментов аутологичных ЩЖ и НЖ (4); нативных фрагментов ксеногенной ЩЖ (5); нативных фрагментов ксеногенных ЩЖ и НЖ (6); ОКЩЖ (7); ОКЩЖ и ОКНЖ (8); криоконсервированной ОКЩЖ (9); криоконсервированных ОКЩЖ и ОКНЖ (10); криоконсервированной и рекультивированной ОКЩЖ (11); криоконсервированных и рекультивированных ОКЩЖ и ОКНЖ (12); ■ – Т4; □ – ТТГ; ▨ – альбумин; ▩ – глюкоза; ▪ – холестерин; \* – различия достоверны по сравнению с тиреоидэктомией (P < 0,05).

Level of T4, TSH (a), albumin (b), cholesterol and glucose (c) in blood plasma of the control (1); thyroidectomized (2) rats; those transplanted with native fragments of autologous TG (3); native fragments of autologous TG and AG (4); native fragments of xenogenous TG and AG (6); COCTG (9); cryopreserved OCTG and OCAg (10); cryopreserved and re-cultured OCTG (11); cryopreserved and re-cultured OCTG and OCAg (12); ■ – T4; □ – TSH; ▨ – albumin; ▩ – glucose; ▪ – cholesterol; \* – differences are statistically significant vs thyroidectomy (P < 0.05).

после размораживания, приводила к росту уровня Т4 и соответствующему убыванию ТТГ и в плазме крови крыс. При этом также наблюдалось достоверное увеличение концентрации альбумина, что свидетельствовало о восстановлении гормонопродуцирующей активности трансплантатов криоконсервированной ОКЩЖ после рекультивирования.

Исследования, выполненные на срезах ЩЖ, показали, что процесс замораживания влияет на некоторые стадии ее гормоногенеза: снижает захват йодида и уменьшает активность катепсина D. Кроме того, рост и пролиферация тиреоидной паренхимы после криоконсервирования в культуре замедляются на 2-3-е суток по сравнению с ин-

classes [14, 18]. Cryopreservation with a high cooling rate is also capable of modifying immunogeneity due to selective elimination of antigen-presenting cells of endocrine parenchyma [13, 20]. Thus it may be supposed that cultured and cryopreserved with a high cooling rate TG tissue possesses less immunogeneity if compared with native fragments. Correspondingly, in this case the presence effect in the transplantation site of the agent secreting immune-suppressive hormones, namely OCTG, is smoothed.

## Conclusions

Xenotransplantation of native fragments of TG of newborn piglets especially during its grafting in

тактной тканью [2]. Если функционирование трансплантата после пересадки на ранних сроках определяется сохранившимися фолликулярными единицами, а на более поздних сроках – новообразованными, становится понятно преимущество гормонопродукции криоконсервированной и рекультивированной ОКЩЖ по сравнению с криоконсервированной.

В данном исследовании было отмечено отсутствие эффекта комбинированной трансплантации при пересадке ОКЩЖ по сравнению с нативными фрагментами ЩЖ.

Как неоднократно было показано в экспериментах с тканью поджелудочной и щитовидной желез, культивирование является процессом, уменьшающим экспрессию антигенов главного комплекса гистосовместимости I и II класса [14, 18]. Криоконсервирование с высокой скоростью охлаждения также способно модифицировать иммуногенность за счет селективной элиминации антигенпредставляющих клеток из эндокринной паренхимы [13, 20]. Таким образом, можно предположить, что культивированная и криоконсервированная с высокой скоростью охлаждения ткань ЩЖ обладает меньшей иммуногенностью по сравнению с нативными фрагментами. Соответственно в данном случае влияние присутствия в месте трансплантации агента, секретирующего иммуносупрессорные гормоны, а именно ОКНЖ, сглаживается.

## Выводы

Ксенотрансплантация нативных фрагментов ЩЖ новорожденных поросят, особенно при пересадке ее в комбинации с фрагментами НЖ, а также нативной и рекультивированной ОКЩЖ приводит к увеличению уровня Т4, снижению уровня ТТГ, нормализации показателей белкового, липидного и углеводного обмена у экспериментальных животных.

Исходное функциональное состояние криоконсервированной ОКЩЖ после отогрева и удаления криопротектора имеет определяющее значение для ее гормонопродуцирующего потенциала после трансплантации, а присутствие ткани НЖ на него не влияет.

## Литература

1. Божок Г.А., Алабедалькарим Н.М., Легащ Е.И. Вплив криоконсервування на імунно-біологічні властивості фрагментів надниркових залоз при алотрансплантації // Трансплантологія.– 2004.– Т. 5, №1.– С. 88-92.
2. Грищенко В.И., Чуйко В.А., Пушкарь Н.С. Криоконсервация тканей и клеток эндокринных органов.– Киев: Наук. думка, 1993. – 241 с.
3. Легащ Е.И. Ретроградный способ тиреоидэктомии крыс как адекватная модель гипотиреоза // Трансплантология.– 2005.– Т. 8, №2.– С.92-94.

combination with AG as well as native and re-cultured OCTG results in a rise of T4 level, reduction of TSH level, normalization of the indices of protein, lipid and carbohydrate exchange in experimental animals.

Initial functional state of cryopreserved OCTG after thawing and removal of cryoprotectant has a determining value for its hormone-producing potential after transplantation and the presence of AG tissue does not affect it.

## References

1. Bozhok G.A., Alabedalkarim N.M., Legach E.I. Cryopreservation effect on immune and biological properties of adrenal gland fragments at allotransplantation // *Transplantologia*.– 2004.– Vol. 5, N1.– P. 88-92.
2. Grischenko V.I., Chuyko V.A., Pushkar N.S. Cryopreservation of tissues and cells of endocrine organs. – Kiev: Naukova dumka, 1993.– 241 p.
3. Legach E.I. Retrograde way of thyroidectomy of rats as adequate model of hypothyreosis // *Transplantologia*.– 2005.– Vol. 8, N2.– P. 92-94.
4. Potemkin V.V. Endocrinology: Manual.– Moscow: Meditsina, 1999.– 640 p.
5. Tronko M.D., Drozdovich I.I., Paster I.P. Morphofunctional characteristics of hypothalamus-pituitary system in Wistar rats with radiation-induced hypotheriosis at early terms after transplantation of thyroid gland organ culture of newborn piglets // *Endocrinologiya*.– 2000.– Vol. 5, N1.– P. 29-34.
6. Patent N 4845 Ukraine, IPC<sup>7</sup>, C 12N 1508. The way of preparing cryopreserved organotypic culture of adrenal gland for transplantation / N.M. Alabedalkarim, G.A. Bozhok, E.I. Legach, T.P. Bondarenko. Appl. 29.06.04. Publ. 15.02.05, Bul. N2.
7. Patent N 9367 Ukraine IPC<sup>7</sup> A01 N 1/02. Cryopreservation method for organ culture of thyroid gland of newborn piglets/ T.P. Bondarenko, E.I. Legach, G.A. Bozhok, N.M. Alabedalkarim. Appl. 28.03.05. Publ. 15.09.05, Bul. N9.
8. Patent N 4567 Ukraine IPC<sup>7</sup> A01N1/02. Cryopreservation method for organ culture of adrenal glands of newborn piglets / T.M. Gurina, N.M. Alabedalkarim, V.D. Ustichenko, T.P. Bondarenko. Appl. 17.06.04. Publ. 17.01.05. Bul. N1.
9. Borlongan C. V., Cameron D. F., Saporta A., Sanberg P. R. Intracerebral transplantation of testis-derived Sertoli cells promotes functional recovery in female rats with 6-hydroxydopamine-induced hemiparkinsonism // *Exp. Neurol.*– 1997.– Vol. 148, N1.– P. 388-392.
10. Bretzel R.G., Flesch B.K., Hering B.J. et al. Impact of culture and cryopreservation on MHC class II antigen expression in canine and porcine islets // *Horm. Metab. Res. Suppl.*– 1990.– Vol. 25.– P. 128-132.
11. Davalli A.M., Scaglia L., Brevi M. et al. Pituitary cotransplantation significantly improves the performance, insulin content, and vascularization of renal subcapsular islet grafts // *Diabetes*.– 1999.– Vol. 48, N1.– P. 59-65.
12. Emerich D.F., Hemendinger R., Halberstadt C.R. The testicular-derived Sertoli cell: cellular immunoscience to enable transplantation // *Cell Transplant.*– 2003.– Vol. 12, N4. – P. 335-349.
13. Foreman J., Moriya H., Taylor M. J. Effect of cooling rate and its interaction with pre-freeze and post-thaw tissue culture on the *in vitro* and *in vivo* function of cryopreserved pancreatic islets // *Transpl. Int.*– 1993.– Vol. 6, N4.– P. 191-200.
14. Hullett D. A., Sollinger H. W. Enhancement of thyroid allograft survival following organ culture: II. Induction of recipient peripheral tolerance // *Hum. Immunol.*– 1997.– Vol. 52, N2.– P. 127-137.
15. Ketheesan N., Kearney J.N., Ingham E. The effect of cryopreservation on the immunogenicity of allogeneic cardiac valves // *Cryobiology*.– 1996.– Vol. 33, N1.– P. 41-53.
16. Korbutt G. S., Elliott J. F., Rajotte R. V. Cotransplantation of allogeneic islets with allogeneic testicular cell aggregates allows long-term graft survival without systemic immuno-

4. *Потемкин В.В.* Эндокринология: Учебник. – М.: Медицина, 1999. – 640 с.
5. *Тронько М.Д., Дроздович І.І., Пастер І.П.* Морфофункціональна характеристика гіпоталамо-гіпофізарної системи у щурів лінії Вістар з радіаційно-індукованим гіпотиреозом в ранні строки після трансплантації органної культури щитовидної залози новонароджених поросят // *Ендокринологія.* – 2000. – Т. 5, №1. – С. 29-34.
6. *Пат. № 4845 Україна, МПК<sup>7</sup>, С12N5/08, А61К35/55.* Спосіб підготовки кріоконсервованої органотипової культури надниркової залози для трансплантації/ Н.М. Алабедалькарім, Г.А. Божок, Є.І. Легач, Т.П. Бондаренко. Заявл. 29.06.04. Публ. 15.02.05. Бюл. №2.
7. *Пат. №9367 Україна, МПК<sup>7</sup>, А01N1/02.* Спосіб кріоконсервування органної культури щитоподібної залози новонароджених поросят/ Т.П. Бондаренко, Е.І. Легач, Г.А. Божок, Н.М. Алабедалькарім. Заявл. 28.03.05. Публ. 15.09.05. Бюл. №9.
8. *Пат. №4567 Україна, МПК<sup>7</sup>, А01N1/02.* Спосіб кріоконсервування органної культури надниркових залоз новонароджених поросят/ Т.М. Гуріна, Н.М. Алабедалькарім, В.Д. Устиченко, Т.П. Бондаренко. Заявлено 17.06.04. Публ. 17.01.05. Бюл. №1.
9. *Borlongan C. V., Cameron D. F., Saporta A., Sanberg P. R.* Intracerebral transplantation of testis-derived Sertoli cells promotes functional recovery in female rats with 6-hydroxydopamine-induced hemiparkinsonism // *Exp. Neurol.* – 1997. – Vol. 148, N1. – P. 388-392.
10. *Bretzel R.G., Flesch B.K., Hering B.J. et al.* Impact of culture and cryopreservation on MHC class II antigen expression in canine and porcine islets // *Horm. Metab. Res. Suppl.* – 1990. – Vol. 25. – P. 128-132.
11. *Davalli A.M., Scaglia L., Brevi M. et al.* Pituitary cotransplantation significantly improves the performance, insulin content, and vascularization of renal subcapsular islet grafts // *Diabetes.* – 1999. – Vol. 48, N1. – P. 59-65.
12. *Emerich D.F., Hemendinger R., Halberstadt C.R.* The testicular-derived Sertoli cell: cellular immunoscience to enable transplantation // *Cell Transplant.* – 2003. – Vol. 12, N4. – P. 335-349.
13. *Foreman J., Moriya H., Taylor M. J.* Effect of cooling rate and its interaction with pre-freeze and post-thaw tissue culture on the *in vitro* and *in vivo* function of cryopreserved pancreatic islets // *Transpl. Int.* – 1993. – Vol. 6, N4. – P. 191-200.
14. *Hullett D. A., Sollinger H. W.* Enhancement of thyroid allograft survival following organ culture: II. Induction of recipient peripheral tolerance // *Hum. Immunol.* – 1997. – Vol. 52, N2. – P. 127-137.
15. *Ketheesan N., Kearney J.N., Ingham E.* The effect of cryopreservation on the immunogenicity of allogeneic cardiac valves // *Cryobiology.* – 1996. – Vol. 33, N1. – P. 41-53.
16. *Korbitt G. S., Elliott J. F., Rajotte R. V.* Cotransplantation of allogeneic islets with allogeneic testicular cell aggregates allows long-term graft survival without systemic immunosuppression // *Diabetes.* – 1997. – Vol. 46, N2. – P. 317-322.
17. *Lopez-Lozano J.J., Bravo G., Abascal J. et al.* Clinical outcome of cotransplantation of peripheral nerve and adrenal medulla in patients with Parkinson's disease // *J. Neurosurg.* – 1999. – Vol. 90, N5. – P. 875-882.
18. *Nicolls M.R., Coulombe M., Gill R.G.* The basis of immunogenicity of endocrine allografts // *Crit. Rev. Immunol.* – 2001. – Vol. 21, N1. – P. 87-101.
19. *Selawry H. P., Cameron D. F.* Sertoli cell-enriched fractions in successful islet cell transplantation // *Cell Transplant.* – 1993. – Vol. 2, N2. – P. 123-129.
20. *Taylor M.J., Bank H.L., Benton M.J.* Selective killing of leucocytes by freezing: potential for reducing the immunogenicity of pancreatic islets // *Diabetes Res.* – 1987. – Vol. 5, N2. – P. 99-103.
21. *Yoo-Ott K.A., Schiller H., Fandrich F. et al.* Co-transplantation of donor-derived hepatocytes induces long-term tolerance to cardiac allografts in a rat model // *Transplantation.* – 2000. – Vol. 69, N12. – P. 2538-2546.

*Accepted in 01.11.2006*

*Поступила 01.11.2006*