

## Влияние интрапортального введения криоконсервированных спленоцитов на выживаемость аллотрансплантата ткани щитовидной железы

UDC 611.41.018:611.441.018.089:57.043

G.A. BOZHOK

## Effect of Intraportal Administration of Cryopreserved Splenocytes on Thyroid Gland Tissue Allograft Survival

Исследовали влияние интрапортального введения криоконсервированных спленоцитов на выживаемость аллотрансплантата ткани щитовидной железы. Установлено, что при трансплантации фрагментов ткани щитовидной железы при отсутствии иммуносупрессии на 35-е сутки наблюдается острое отторжение аллотрансплантата, тогда как введение суспензии нативных спленоцитов донорского происхождения в портальную вену печени реципиентов за 7 суток до аллотрансплантации пролонгирует его выживаемость. При использовании размороженной суспензии спленоцитов этого эффекта не наблюдается, возможно, вследствие элиминации из нее макрофагов под действием факторов криоконсервирования.

**Ключевые слова:** щитовидная железа, спленоциты, криоконсервирование, аллотрансплантация, донор-специфическая толерантность.

Досліджували вплив інтрапортального введення криоконсервованих спленоцитів на виживання алотрансплантату ткани щитовидної залози. Встановлено, що за умов трансплантації фрагментів ткани щитовидної залози при відсутності імуносупресії на 35-у добу спостерігається гостре відторгнення алотрансплантату, тоді як введення суспензії нативних спленоцитів донорського походження в портальну вену печінки за 7 діб до алотрансплантації пролонгує його виживання. При використанні розмороженої суспензії спленоцитів цього ефекту не спостерігається, можливо, внаслідок елімінації з неї макрофагів під впливом факторів криоконсервування.

**Ключові слова:** щитовидна залоза, спленоцити, криоконсервування, алотрансплантація, донор-специфічна толерантність.

The influence of intraportal introduction of cryopreserved splenocytes on the survival of thyroid tissue allograft was investigated. An acute allograft rejection after transplantation of thyroid tissue fragments in the absence of immunosuppressant for 35 days was established, whereas introduction of native splenocytes of donor's origin into portal vein of the recipient's liver 7 days prior to allotransplantation prolongs an allograft survival. This effect is not observed when using post-thaw splenocyte suspensions, probably due to the elimination of macrophages under the influence of cryopreservation factors.

**Key words:** thyroid gland, splenocytes, cryopreservation, allotransplantation, donor-specific tolerance.

В современной клинической трансплантологии основным способом поддержания выживаемости аллогенного трансплантата является пожизненная иммуносупрессия. В связи с тем, что риск развития смертельных осложнений при приеме иммуносупрессантов очень велик [8], актуальной задачей является разработка методов индукции специфической толерантности к трансплантату.

Экспериментально показано, что инфузия клеток донора за несколько дней до аллотрансплантации органа от того же донора уменьшает выраженность реакции отторжения, а в некоторых случаях приводит к перманентной выживаемости трансплантата без применения иммуносупрессии [16, 17, 19, 21, 27]. Это явление получило название индукции донор-специфической толерантности (ДСТ).

Для индукции ДСТ применяют клетки, полученные из лимфоузлов, селезенки, костного мозга, пе-

In contemporary clinical transplantology the main method for maintaining the survival of allogeneic graft is live-long immune suppression. Because of a high risk of development of lethal complications when taking immune suppressants [8], an actual task is the developing of the methods inducing a graft-specific tolerance.

It has been shown in the experiments that donor cell infusion several days prior to allotransplantation of the organ from the same donor reduces the manifestation of rejection response and in some cases leads to permanent survival of the transplant with no application of immune suppression [16, 17, 19, 21, 27]. This phenomenon was called as the induction of donor-specific tolerance (DST).

To induce DST the cells obtained from lymph nodes, spleen, bone marrow, peripheral blood [15, 17, 27] are applied. At the first stage the donor cells are injected

риферической крови [15, 17, 27]. На первом этапе вводят донорские клетки внутривенно или в портальный кровоток печени за 7–14 дней до трансплантации. На втором этапе производят трансплантацию органа или ткани от того же донора. Многие протоколы индукции ДСТ предполагают повторную инфузию донорских клеток [19]. Несмотря на то, что такой метод достижения ДСТ активно используется в экспериментальной и клинической практике на протяжении последнего десятилетия, до сих пор не пытались применять в качестве индуцирующего агента криоконсервированные клетки. Криоконсервирование донорского биоматериала позволяет выполнять трансплантацию не в экстренном режиме, а планировать сроки операции в зависимости от состояния реципиента.

Ранее была показана лучшая выживаемость фрагментов яичников и щитовидной железы крыс при аллотрансплантации после инфузии спленоцитов донорской линии [1, 2]. В данной работе изучали возможность применения криоконсервированных клеток селезенки для индукции ДСТ при трансплантации фрагментов щитовидной железы (ФЩЖ).

Целью работы было изучение влияния интрапортального введения криоконсервированных спленоцитов на выживаемость аллотрансплантата ФЩЖ у тиреоидэктомированных крыс.

### Материалы и методы

Эксперименты проводили в соответствии с "Общими принципами экспериментов на животных", одобренными IV Национальным конгрессом по биоэтике (2010 г., Киев) и согласованными с положениями "Европейской Конвенции о защите позвоночных животных, используемых для экспериментальных и других научных целей" (Страсбург, 1986).

Исследования проводили на 3–4-месячных крысах линий Вистар и Август. В эксперименте были использованы следующие группы животных: 1 – интактный контроль (n = 5); 2 – с тиреоидэктомией (n = 14); 3 – с тиреоидэктомией и трансплантацией ФЩЖ (n = 15); 4 – с введением нативных спленоцитов, тиреоидэктомией и трансплантацией ФЩЖ (n = 10); 5 – с введением криоконсервированных спленоцитов, тиреоидэктомией и трансплантацией ФЩЖ (n = 10).

Спленоциты получали из селезенки крыс линии Вистар по методу [4]. Эритроциты удаляли трехкратной обработкой лизирующим раствором, содержащим 154 мМ хлорида аммония, 10 мМ бикарбоната натрия, 0,082 мМ ЭДТА.

Спленоциты криоконсервировали по методу [11]. Криозащитная среда, приготовленная на основе среды 199 ("РАА", Австрия), содержала 10% ДМСО и 25% фетальной телячьей сыворотки ("Биолот", Россия). Спленоциты замораживали на

либо внутривенно или в портальный кровоток за 7–14 дней до трансплантации. На втором этапе орган или ткань от того же донора трансплантируется. Многие протоколы ДСТ включают повторную инфузию донорских клеток [19]. Несмотря на то, что этот метод ДСТ активно используется в экспериментальной и клинической практике в последние десятилетия, до сих пор не пытались применять в качестве индуцирующего агента криоконсервированные клетки. Криоконсервирование донорского биоматериала позволяет выполнять трансплантацию не в экстренном режиме, а планировать сроки операции в зависимости от состояния реципиента.

Высокая выживаемость фрагментов яичников и щитовидной железы крыс после аллотрансплантации после инфузии донорских спленоцитов была показана недавно [1, 2]. Данное исследование посвящено возможности применения криоконсервированных клеток селезенки для индукции ДСТ при трансплантации фрагментов щитовидной железы (ТГФ).

Целью исследования было изучение влияния интрапортального введения криоконсервированных спленоцитов на выживаемость ТГФ аллотрансплантата у тиреоидэктомированных крыс.

### Materials and methods

The experiments were performed according to General Principles of Experiments in Animals, approved by the 4<sup>th</sup> National Congress in Bioethics (Kiev, 2010) and coordinated with the statements of European Convention on the Protection of Vertebrate Animals Used for Experimental and Other Scientific Purposes (Strasbourg, 1986).

The studies were carried-out in 3–4-month-old Wistar and August rats. In the experiment the following groups of animals were used: 1 – intact control (n = 5); 2 – thyroidectomized rats (n = 14); 3 – animals with thyroidectomy and TGF transplantation (n = 15); 4 – introduction of native splenocytes, thyroidectomy and transplantation of TGF (n = 10); 5 – introduction of frozen-thawed splenocytes, thyroidectomy and TGF transplantation (n = 10).

Splenocytes were isolated from Wistar rat spleen [4]. Erythrocytes were removed with three-fold treatment by lysing solution containing 154 mM ammonium chloride, 10 mM sodium bicarbonate, 0.082 mM EDTA.

Splenocytes were cryopreserved according to Hem E. [11]. Cryoprotective medium was prepared on the base of medium 199 (PAA, Austria), and contained 10% DMSO and 25% fetal bovine serum (Biolog, Russia). Splenocytes were frozen with programmable freezer (Cryoson, Germany) with 1 degree/min cooling rate down to –40°C with following plunging into liquid nitrogen. Later they were thawed in water bath at 40°C, afterwards cryoprotective medium was removed [23].

Viability of the obtained cells was examined by trypan blue staining. It made in average 90% for native and 85% for cryopreserved suspensions.

Thyroidectomy to the August rats was performed according to Legach E.I. [5] 7 days prior to transplan-

программном замораживателе “Cryoson” (Германия) со скоростью охлаждения 1 град/мин до  $-40^{\circ}\text{C}$  с последующим погружением в жидкий азот. Отогревали на водяной бане при температуре  $40^{\circ}\text{C}$ , после чего ступенчато удаляли криозащитную среду [23].

Жизнеспособность полученных клеток определяли с помощью окрашивания трипановым синим. Она составляла в среднем 90% для нативной и 85% для криоконсервированной суспензий.

Тиреоидэктомия крысам линии Август проводили по методу [5] за 7 суток до трансплантации. В эти же сутки животным групп 3 и 4 в портальную вену печени вводили 0,5 мл физиологического раствора, содержащего нативные или криоконсервированные спленциты ( $2 \times 10^7$  кл/мл) донорской линии Вистар.

Через 7 суток у крыс донорской линии Вистар забирали щитовидные железы, измельчали их на 4–5 фрагментов, отмывали 3–4 раза физиологическим раствором и трансплантировали под капсулу левой почки крысам линии Август.

На 35-е сутки после трансплантации животных забивали. Выживаемость трансплантата оценивали по двум параметрам: уровню T4 в сыворотке крови и сохранности структуры ткани трансплантата на гистологических образцах. Общий T4 измеряли радиоиммунологическим методом с помощью тест-набора Total T<sub>4</sub> RIA Kit (“Immunotech”, Франция). Для гистологического анализа почки с трансплантатами фиксировали в 10%-м формалине и заливали в парафин. Серийные срезы толщиной 5 мкм окрашивали гематоксилином и эозином. Гистологические образцы исследовали с помощью микроскопа Olympus 70XI и пакета прикладных программ для обработки изображения.

Анализ сохранности клеточных субпопуляций в суспензии спленцитов после криоконсервирования проводили с помощью проточной цитофлуориметрии. Набор антител, использованных для анализа, представлен в таблице. Окрашивание осуществляли в соответствии со стандартным протоколом [10]. Мертвые клетки идентифицировали с помощью 7-AAD (“eBioscience”, США). Флуоресценцию клеток измеряли на проточном цитофлуориметре BD FACS Calibur (“BD Bioscience”, США) и анализировали с использованием программного обеспечения CellQuestPro.

Статистическую достоверность данных оценивали с помощью

tation. Simultaneously the animals of groups 3 and 4 were injected into liver portal vein with 0.5 ml physiological solution, containing either native or frozen-thawed splenocytes ( $2 \times 10^7$  cells/ml) of Wistar line donors.

Seven days later thyroid glands of Wistar rat donors were isolated, disintegrated into 4–5 fragments, washed 3–4 times with physiological solution and transplanted under the capsule of left kidney to August rats.

To the 35<sup>th</sup> day after transplantation the animals were sacrificed. The graft survival was assessed by two parameters: T4 level in blood serum and integrity of graft tissue structure in histological samples. Total T4 was measured with radio immunological method by Total T<sub>4</sub> RIA Kit (Immunotech, France). For histological analysis the kidneys with grafts were fixed in 10% formalin and paraffin embedded. Serial sections of 5 mm width were stained with hematoxylin and eosin. Histological samples were studied by Olympus 70XI microscope and the image processing software.

Cell subpopulation survival in splenocyte suspension after freeze-thawing was analyzed by means of flow cytometry. The kit of antibodies used for analysis is presented in the Table. Staining was performed in accordance with the standard protocol [10]. Dead cells were identified by 7-AAD (eBioscience, USA). Cell fluorescence was measured with flow cytometer BD FACS Calibur (BD Bioscience, USA) and analyzed using CellQuestPro software.

The data were statistically processed using one way ANOVA test, the differences at  $p < 0.05$  were considered as statistically significant. The data are presented as a mean of the values obtained in 2 similar experiments and measured in two parallel samples,  $\pm$ SE.

Антитела для проточной цитофлуориметрии  
Antibodies used for flow cytometry

Антитело Antibody	Мишень Target	Конъюгат Conjugate	Клон Clone	Изотип Isotype	Фирма-производитель Producer
Anti-Rat Macrophage Marker	Макрофаг Macrophage	PE	HIS36	Mouse IgG2a,κ	eBioscience, San Diego, USA
Anti-Rat CD45RA	В-лимфоцит B cell	PE	OX-33	Mouse IgG1	Invitrogen, Life Technologies Corporation, USA
Anti-Rat CD8a	CD8 Т-лимфоцит T cell	—	OX8	Mouse IgG1	eBioscience, San Diego, USA
Anti-Rat CD4	CD4 Т-лимфоцит T cell	—	OX35	Mouse IgG2a	eBioscience, San Diego, USA
Secondary F(ab') <sub>2</sub> Anti-Mouse IgG	Mouse IgG	PE	Polyclonal	Donkey IgG	eBioscience, San Diego, USA

Примечание: PE – фикоэритрин.

Note: PE – phycoerythrin.



однофакторного дисперсионного анализа, достоверными считались различия при  $p < 0,05$ . Данные представлены как среднее значений, полученных в 2-х аналогичных экспериментах и измеренных в двух параллельных пробах,  $\pm$  стандартная ошибка.

### Результаты и обсуждение

Установлено, что на 35-е сутки у тиреоидэктомизированных крыс (группа 2) в сыворотке крови наблюдалось уменьшение уровня Т4. Значения уровня гормона у животных этой группы колебались от 15,3 до 26,1 нмоль/л (медиана 19,6 нмоль/л). Это составляло в среднем 27% от уровня гормона интактной группы ( $p < 0,05$ ), в которой значения Т4 были в пределах 44,5–88,6 нмоль/л (медиана 75,1 нмоль/л).

У животных группы 3 на 35-е сутки уровень Т4 был в пределах 23,5–48,7 нмоль/л (медиана 32,4 нмоль/л). Это составляло в среднем 46% от уровня Т4 у контрольных животных,  $p < 0,05$ .

В группе 4 наблюдался разброс уровня гормона от 27,7 до 64,1 нмоль/л (медиана 49,4 нмоль/л), что составляло в среднем 66% от значений Т4 у интактного контроля,  $p < 0,05$ .

У животных группы 5 уровень Т4 находился в пределах от 19,4 до 41,5 нмоль/л (медиана 27,5 нмоль/л), что составляло 41% от контрольных значений.

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

При анализе гистологических образцов почек с трансплантатами животных группы 3 выявлены явные признаки отторжения трансплантата: инфильтрация лимфоцитами, полная деградация фолликулярного строения ткани, замещение ткани трансплантата соединительной тканью (рис. 1, а).

У животных группы 4 в целом наблюдалась хорошая выживаемость трансплантатов (рис. 1, б). Видна сохранившаяся ткань щитовидной железы, содержащая фолликулы, выстланные высоким кубическим эпителием и заполненные коллоидом с вакуолями резорбции. Это является признаком гормоносинтезирующей функции трансплантата, что подтверждалось присутствием значительного уровня Т4 в сыворотке крови у крыс этой группы.

Гистологический анализ образцов трансплантатов группы 5 выявил отсутствие аллогraftов с сохранившейся тканью щитовидной железы. Наблюдалась те же признаки отторжения трансплантатов, как и у животных группы 3.

Таким образом, по уровню Т4 в сыворотке крови и сохранности структуры ткани трансплантата на гистологических образцах хорошая выживаемость

### Results and discussion

It has been found a decreased T4 level in blood serum to the 35<sup>th</sup> day in thyroidectomized rats (group 2). The values of hormone level in animals in the group varied from 15.3 to 26.1 nmol/l (median 19.6 nmol/l). This made in average 27% of the hormone level for intact group ( $p < 0.05$ ), wherein T4 values were within the range of 44.5–88.6 nmol/l (median 75.1 nmol/l).

In the animals of group 3 to the 35<sup>th</sup> day T4 level was within the range of 23.5–48.7 nmol/l (median 32.4 nmol/l). This made in average 46% of T4 level in the control animals,  $p < 0.05$ .

In the group 4 there was observed the hormone level dispersion from 22.7 to 64.1 nmol/l (median 49.4 nmol/l), making in average 66% of T4 values in intact control,  $p < 0.05$ .

In the animals of group 5 T4 level was within the range of 19.4–41.5 nmol/l (median 27.5 nmol/l), making 41% of the control values.

Thus the highest level of T4 was observed in blood plasma of the rats, which were 7 days prior to transplantation introduced with native splenocytes.

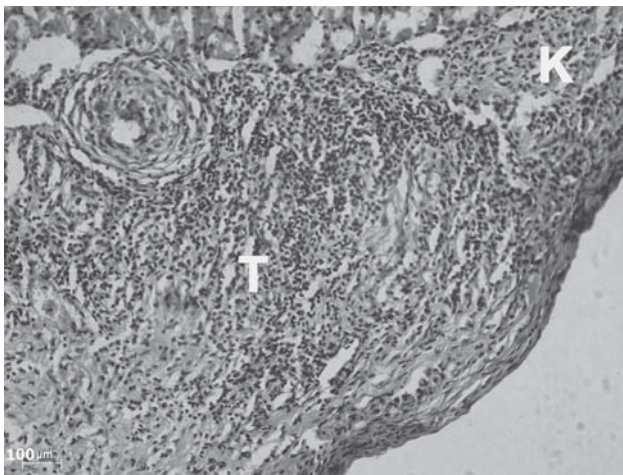
When analyzing histological sections of kidneys with the grafts of the group 3 animals there were revealed evident signs of graft rejection: infiltration with lymphocytes, complete degradation of tissue follicular structure, substitution of graft tissue with connective one (Fig. 1a).

In the group 4 animals in a whole there was observed a good survival of the grafts (Fig. 1b). There was found the preserved tissue of thyroid gland, containing the follicles, embedded with a high cubic epithelium and comprised colloid with resorption vacuoles. This is the sign of hormone-synthesizing graft function, confirmed with the presence of significant amount of T4 in blood serum of this group rats.

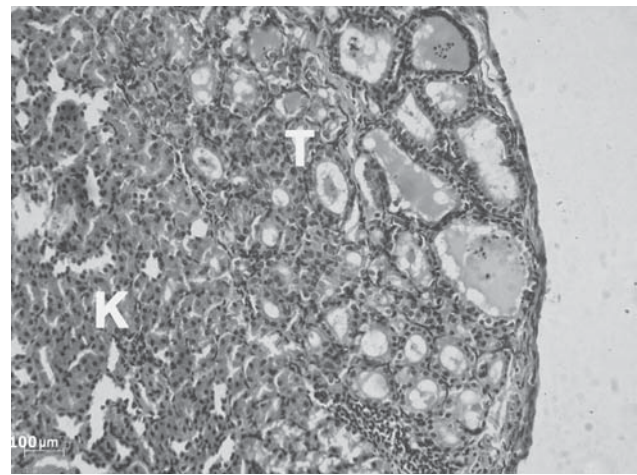
Histological analysis of the samples of group 5 grafts demonstrated the absence of allografts with a preserved tissue of thyroid gland. There were found the same signs of graft rejection as in the animals of group 3.

Thus based upon T4 level in blood serum and preservation of graft tissue structure in histological sections a good survival of TGF allografts was found only in the animals of group 4, which were introduced with native splenocytes. The cryopreservation of splenocytes led to the cancellation of the prolonged survival effect for TGF allografts. This result is in accordance with the data of Hollander *et al.* [13], showed no induction of DST after introduction of cryopreserved cells.

At the following stage of the study the freeze-thawing effect on subpopulational composition of splenocyte suspension was assessed. It is known that cell suspension isolated from spleen in addition to erythrocytes contains B and T lymphocytes, macrophages,



а



б

**Рис.1.** Гистологические образцы аллогraftов ФЦЖ на 35-е сутки после трансплантации под капсулу почки животным экспериментальных групп: а – группа 3; б – группа 4; К – ткань почки, Т – ткань трансплантата.

**Fig. 1.** Histological samples of allografts of TGF to the 35<sup>th</sup> day after transplantation under kidney capsule of experimental group animals: а – group 3; б – group 4; К – kidney tissue; Т – transplant tissue.

мость аллогraftов ФЦЖ была установлена лишь у животных группы 4, которым были введены нативные спленоциты. Криоконсервирование спленоцитов приводило к отмене эффекта пролонгирования выживаемости аллогraftов ФЦЖ. Этот результат согласуется с данными работы [13], в которой также отмечено отсутствие индукции ДСТ после введения криоконсервированных клеток.

На следующем этапе работы изучалось влияние криоконсервирования на субпопуляционный состав суспензии спленоцитов. Известно, что суспензия клеток, которую получают из селезенки, кроме эритроцитов, содержит В- и Т-лимфоциты, макрофаги, дендритные клетки [6]. При использовании антител к специфическим рецепторам различных субпопуляций спленоцитов с помощью точной цитофлуориметрии был проведен сравнительный анализ нативной и криоконсервированной суспензий клеток.

На гистограммах (рис. 2) представлены данные, выражающие степень экспрессии специфических маркеров субпопуляций клеток в нативной и криоконсервированной суспензиях спленоцитов.

В нативной суспензии спленоцитов около 34% клеток экспрессируют маркер В-лимфоцитов крыс CD45RA, 16% – маркер цитотоксических Т-лимфоцитов CD8, 26% – маркер Т-хелперов CD4 и 3,5% – макрофагальный маркер. После криоконсервирования отмечаются некоторые изменения в субпопуляционном составе суспензии спленоцитов. Количество В-лимфоцитов и CD8<sup>+</sup> – Т-лимфоцитов практически не изменяется. Количество CD4<sup>+</sup> – Т-лимфоцитов уменьшается в среднем на 20, а макрофагов – на 83%. Таким образом, основ-

ная дендритные клетки [6]. Keeping this in mind a comparative analysis of native and cryopreserved cell suspensions was performed using flow cytometry with antibodies to specific receptors of different splenocyte subpopulations.

The histograms (Fig. 2) represent the data on the expression rate of specific markers of cell subpopulations in native and cryopreserved suspensions of splenocytes.

In native suspension of splenocytes about 34% of cells express the markers of rat B lymphocytes CD45RA, 16% have the marker of cytotoxic T lymphocytes CD8, 26% of cells possessing CD4 helper T cell marker and 3.5% have macrophage marker. After freeze-thawing there are found some changes in subpopulational composition of splenocyte suspension. The number of B lymphocytes and CD8<sup>+</sup> T lymphocytes is almost not changed. The number of CD4<sup>+</sup> T lymphocytes decreases in average by 20%, and 83% of macrophages are lost. Thus the main distinction consists in a sharp reduction of macrophage subpopulations in the suspension of splenocytes after freeze-thawing.

The available data of freezing effect on subpopulational composition of the cells isolated from spleen are quite contradictory. Some authors [3, 22, 26] report no changes in antigenic properties of splenocyte suspension. Hem E. [12] established that spleen macrophages are less resistant to freeze-thawing unlike lymphocytes. According to other data [7, 14] the post-thaw survival and immune reactivity of splenocytes are reduced.

It is known that macrophages and dendritic cells have a high sensitivity to cooling rate. Optimum of macrophage and dendrocyte survival was found to be

ное различие состоит в резком уменьшении субпопуляции макрофагов в суспензии спленоцитов после криоконсервирования.

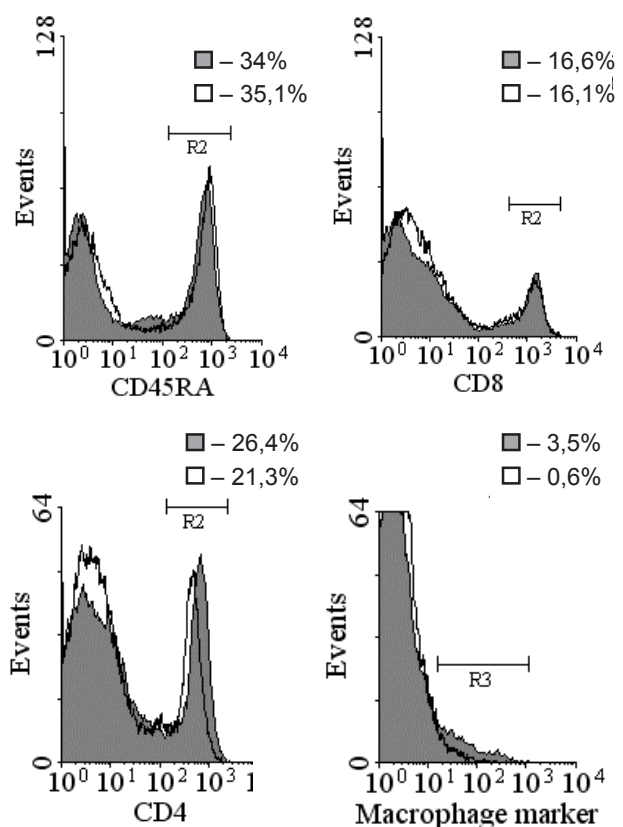
В научной литературе существуют противоположные данные о влиянии замораживания на субпопуляционный состав клеток, получаемых из селезенки. В работах [3, 22, 26] не обнаружены изменения антигенных свойств суспензии спленоцитов после криоконсервирования. В работе [12] установлено, что макрофаги селезенки менее устойчивы к процессу замораживания-оттаивания, чем лимфоциты. По данным [7, 14] после криоконсервирования снижались сохранность и иммунная реактивность спленоцитов.

Известно, что макрофаги и дендритные клетки имеют высокую чувствительность к скорости охлаждения. Оптимум выживаемости макрофагов и дендритных клеток наблюдался при использовании скоростей охлаждения в диапазоне 0,3–5 град/мин [24, 25]. В наших экспериментах скорость охлаждения составляла 1 град/мин, однако наблюдалось резкое уменьшение количества макрофагов.

Несмотря на то, что в практике клинической и экспериментальной трансплантации имеется достаточно данных об индукции ДСТ путем предварительного введения донорского антигена в организм реципиента, механизм развития этого явления до конца не выяснен. Известно, что наступление состояния толерантности к трансплантату зависит от места введения донорских клеток, при этом состояние ДСТ чаще наступает при введении клеток в портальную вену печени, а не периферические сосуды [17, 20]. Предполагается, что механизм развития ДСТ связан с особенностями процесса презентации антигена в печени, в частности макрофагами печени – клетками Купфера [18], так как при введении хлорида гадолиния, избирательно блокирующего функцию макрофагов, индукции ДСТ не наблюдается [9]. Результаты данного исследования показывают, что элиминация макрофагов из суспензии клеток, используемой для индукции ДСТ, также имеет значение для реализации этого феномена. По-видимому, для развития ДСТ важно наличие макрофагов не только реципиента, но и донорского происхождения.

## Выводы

Алло-трансплантация ФЦЖ без иммуносупрессии приводит к острому отторжению трансплантата на 35-е сутки, тогда как введение нативных спленоцитов донорского происхождения в портальную вену печени реципиентов за 7 суток до алло-трансплантации пролонгирует его выживаемость. При использовании размороженной суспензии спленоцитов этого эффекта не наблюдается, возможно, за счет элиминации из нее макрофагов под действием факторов криоконсервирования.



**Рис. 2.** Степень экспрессии специфических маркеров в суспензии клеток, полученной из селезенки: ■ – клетки, не подвергавшиеся замораживанию-оттаиванию; □ – замороженные-отогретые клетки. Цифры на гистограммах обозначают процент клеток, экспрессирующих специфические маркеры, в выделенном регионе. Представлены данные 5 независимых экспериментов.

**Fig. 2.** Expression rate of specific markers in spleen-derived cell suspension: ■ – non-frozen-thawed cells; □ – frozen-thawed cells. Numbers in histograms denote the percentage of cells, expressing specific markers in marked region. The data of 5 independent experiments are presented.

within the cooling rate range of 0.3–5 degree/min [24, 25]. In our experiments the cooling rate made 2 degree/min, but the number of macrophages reduced.

In spite of the fact that clinical and experimental transplantology accumulated a vast volume of observations of DST induction by preliminary introduction of donor antigen into a recipient organism, the mechanism of this phenomenon development has not been studied completely. It is known that onset of graft-tolerance state depends on the site of donor cells administration, herewith the DST state more frequently starts when the cells are administered into liver portal vein and not peripheral vessels [17, 20]. It is supposed that the mechanism of DST development is related to the peculiarities of antigen presentation in liver, in particular, liver macrophages, Kupffer cells [18], since the introduction of gadolinium chloride selectively blocking the function of macrophages prevents the DST induction [9]. The results of our experiments demon-



Автор выражает благодарность доктору мед. наук *Легачу Е.И.*, канд. биол. наук *Гуриной Т.М.*, канд. биол. наук *Зубову П.М.* и канд. биол. наук *Губиной Н.Ф.* за помощь в проведении экспериментов.

## Литература

1. Божок Г.А. Влияние введения донорских спленоцитов на выживаемость фрагментов ткани щитовидной железы при аллотрансплантации // Проблемы эндокринной патологии.– 2011.– №1.– С. 60–66.
2. Божок Г.А., Киришча В.В., Тищенко Ю.О., Легач Е.И. Предтрансплантационное введение донорских лимфоцитов пролонгирует выживаемость аллогенной ткани яичников у овариэктомированных животных реципиентов // Проблемы эндокринной патологии.– 2009.– №4.– С. 15–18.
3. Калужина Н.Н., Абрамов В.Ю. Изучение экспрессии HLA-антигенов II класса на криоконсервированных изолированных мононуклеарных клетках селезенки // Гематология и трансфузиология.– 1991.– Т. 36, №3.– С. 5–6.
4. Клаус Дж. Лимфоциты: Методы.– М.: Мир, 1990.– 395 с.
5. Легач Е.И. Ретроградный способ тиреоидэктомии крыс как адекватная модель гипотиреоза // Трансплантология.– 2005.– Т. 8, №2.– С. 92–94.
6. Роит А., Бростофф Д., Мейл Д. Иммунология.– М.: Мир, 2000.– 592 с.
7. Цуцаева А.А. Криоконсервирование клеточных суспензий.– Киев: Наук. думка, 1983.– 240 с.
8. Шумаков В.И. Трансплантология (руководство для врачей).– М.: Медицина, 1995.– 575 с.
9. Diaz-Peromingo J.A., Gonzalez-Quintela A. Influence of gadolinium-induced kupffer cell blockade on portal venous tolerance in rat skin allograft transplantation // Eur. Surg. Res.– 2005.– Vol. 37, N1.– P. 45–49.
10. Hawley T.S., Hawley R.G. Methods in Molecular Biology: Flow Cytometry Protocols, 2nd ed.– Totowa, NJ: Humana Press.– 2004.– 424 p.
11. Hem E. Freezing of rat lymphocytes. I. The effects of dimethyl sulfoxide and freezing on the phytohemagglutinin- and pokeweed mitogen-responding lymphocyte subpopulations // Cryobiology.– 1976.– Vol.13, N2.– P. 134–141.
12. Hem E. Freezing of rat lymphocytes. V. The effect of suppressor cells in phytohaemagglutinin-stimulated spleen cell cultures before and after freeze-thawing // Acta Pathol. Microbiol. Scand.– 1978.– Vol. 86, N4.– P. 153–158.
13. Hollander A.A.M.J., de Waal L.P., van Bockel H.J. et al. No tolerance induction with cryopreserved bone marrow cells after allogeneic kidney transplantation and antilymphocyte globulin in rhesus monkeys // Transplant. Int.– 1997.– Vol. 10, N3.– P. 249–250.
14. Jennings J.J., Yanari S.S., Reid R. Immune reactivity of frozen-thawed murine spleen cells // Cryobiology.– 1978.– Vol. 15, N3.– P. 272–278.
15. Kang H.G., Lee J.E., Yang S.H. et al. Donor-strain-derived immature dendritic cell pre-treatment induced hyporesponsiveness against allogeneic antigens // Immunology.– 2010.– Vol. 129, N4.– P. 567–577.
16. Kenick S., Lowry R.P., Forbes R.D.S. et al. Prolonged cardiac allograft survival following portal venous inoculation of allogeneic cells: What is "hepatic tolerance"? // Transplant. Proc.– 1987.– Vol. 19, N4.– P. 478–479.
17. Oko A., Idasiak-Piechocka I., Pawlaczyk K. et al. Prolongation of rat kidney graft survival after inoculation of allogeneic spleen cells: the effect of various routes of cell transfer // Ann. Transplant.– 2002.– Vol. 7, N2.– P. 51–53.
18. Parker G.A., Picut C.A. Liver immunobiology // Toxicol. Pathol.– 2005.– Vol. 33, N1.– P. 52–62.

strate that elimination of macrophages from cell suspensions, used for DST induction is also of some value for implementing this phenomenon. Not only the presence of recipient's macrophages but of donor's origin can be of importance for DST development as well.

## Conclusions

Allotransplantation of TGF without suppression leads to an acute rejection of the graft to the 35<sup>th</sup> day, whereas the introduction of native splenocytes of donor origin into recipient liver portal vein 7 days prior to the allotransplantation prolongs its survival. When using frozen-thawed suspension of splenocytes this effect is not observed, probably due to the elimination of macrophages due to the effect of cryopreservation factors.

*The author acknowledges Dr. E. I. Legach, Dr. T.M. Gurina, Dr. P.M. Zubov and Dr. N.F. Gubina for the help in performance of the experiments.*

## Литература

1. Bozhok G.A. Effect of introduction of donor splenocytes on survival of fragments of thyroid gland tissue at allotransplantation // Problemy Endokrinnoi Patologii.– 2011.– N1.– P. 60–66.
2. Bozhok G.A., Kirishka V.V., Tishchenko Yu.O., Legach E.I. Pre-transplanted administration of donor lymphocytes prolongs survival of ova allogenic tissue in ovariectomized animal recipients // Problemy Endokrinnoi Patologii.– 2009.– N4.– P. 15–18.
3. Kaluzhina N.N., Abramov V.Iu. Expression of class II HLA antigens on cryopreserved isolated mononuclear splenic cells // Gematol. Transfuziol.– 1991.– Vol. 36, N3.– P. 5–7.
4. Klaus G. Lymphocytes: Methods.– Moscow: Mir, 1990.– 395 p.
5. Legach E.I. Retrograde method of rat thyroidectomy as adequate model of hypothyroidism // Transplantologiya.– 2005.– Vol. 8, N2.– P. 92–94.
6. Roitt I., Brostoff J., Male D. Immunology.– Moscow: Mir, 2000.– 592 p.
7. Tsutsayeva A.A. Cryopreservation of cell suspensions.– Kiev: Naukova Dumka, 1983.– 240 p.
8. Shumakov V.I. Transplantation (Manual for doctors).– Moscow: Medicine, 1995.– 575 p.
9. Diaz-Peromingo J.A., Gonzalez-Quintela A. Influence of gadolinium-induced kupffer cell blockade on portal venous tolerance in rat skin allograft transplantation // Eur. Surg. Res.– 2005.– Vol. 37, N1.– P. 45–49.
10. Hawley T.S., Hawley R.G. Methods in Molecular Biology: Flow Cytometry Protocols, 2<sup>nd</sup> ed.– Totowa, NJ: Humana Press.– 2004.– 424 p.
11. Hem E. Freezing of rat lymphocytes. I. The effects of dimethyl sulfoxide and freezing on the phytohemagglutinin- and pokeweed mitogen-responding lymphocyte subpopulations // Cryobiology.– 1976.– Vol.13, N2.– P. 134–141.
12. Hem E. Freezing of rat lymphocytes. V. The effect of suppressor cells in phytohaemagglutinin-stimulated spleen cell cultures before and after freeze-thawing // Acta Pathol. Microbiol. Scand.– 1978.– Vol. 86, N4.– P. 153–158.
13. Hollander A.A.M.J., de Waal L.P., van Bockel H.J. et al. No tolerance induction with cryopreserved bone marrow cells after allogeneic kidney transplantation and antilymphocyte

19. Sato Y., Ichida T., Watanabe H. et al. Repeating intraportal donor-specific transfusion may induce tolerance following adult living-related donor liver transplantation // *Hepatogastroenterology*.– 2003.– Vol. 50.– P. 601–606.
20. Sato Y., Farges O., Buffello D. et al. Impact of 70% partial hepatectomy on administration of donor leukocytes in cardiac transplantation in rats // *Transplant. Proc.*– 1998.– Vol. 30, N7.– P. 3873–3875.
21. Sheng Sun D., Iwagaki H., Ozaki M. et al. Prolonged survival of donor-specific rat intestinal allograft by administration of bone-marrow-derived immature dendritic cells // *Transplant. Immunol.*– 2005.– Vol. 14, N1.– P. 17–20.
22. Sogut I., Hatipoglu I., Serhatli M. et al. Cryopreservation of spleen and lymph nodes as a source of mononuclear cells to be used for the development of monoclonal antibody producing hybridoma cells // *Cryo Letters*.– 2011.– Vol. 32, N3.– P. 266–274.
23. Stephens E.A., Sharma J.M. Cryopreservation of avian lymphoid cells // *Avian Diseases*.– 1981.– Vol. 25, N3.– P. 614–627.
24. Taylor M.J., Bank H.L., Benton M.J. Selective destruction of leucocytes by freezing as a potential means of modulating tissue immunogenicity: membrane integrity of lymphocytes and macrophages // *Cryobiology*.– 1987, N2.– Vol. 24.– P. 91–102.
25. Taylor M.J., London N.J., Thirdborough S.M. et al. The cryobiology of rat and human dendritic cells: preservation and destruction of membrane integrity by freezing // *Cryobiology*.– 1990.– Vol. 27, N3.– P. 269–278.
26. Tomita Y., Yoshikawa M., Zhang Q.W. et al. Immune and non-immune factors in cryopreserved tissues // *J. Heart Lung Transplant.*– 2003.– Vol. 22, N5.– P. 560–567.
27. Yang L., Du Temple B., Khan Q. et al. Mechanisms of long-term donor-specific allograft survival induced by pretransplant infusion of lymphocytes // *Blood*.– 1998.– Vol. 91, N1.– P. 324–330.
14. Jennings J.J., Yanari S.S., Reid R. Immune reactivity of frozen-thawed murine spleen cells // *Cryobiology*.– 1978.– Vol. 15, N3.– P. 272–278.
15. Kang H.G., Lee J.E., Yang S.H. et al. Donor-strain-derived immature dendritic cell pre-treatment induced hyporesponsiveness against allogeneic antigens // *Immunology*.– 2010.– Vol. 129, N4.– P. 567–577.
16. Kenick S., Lowry R.P., Forbes R.D.S. et al. Prolonged cardiac allograft survival following portal venous inoculation of allogeneic cells: What is "hepatic tolerance"? // *Transplant. Proc.*– 1987.– Vol. 19, N4.– P. 478–479.
17. Oko A., Idasiak-Piechocka I., Pawlaczyk K. et al. Prolongation of rat kidney graft survival after inoculation of allogeneic spleen cells: the effect of various routes of cell transfer // *Ann. Transplant.*– 2002.– Vol. 7, N2.– P. 51–53.
18. Parker G.A., Picut C.A. Liver immunobiology // *Toxicol. Pathol.*– 2005.– Vol. 33, N1.– P. 52–62.
19. Sato Y., Ichida T., Watanabe H. et al. Repeating intraportal donor-specific transfusion may induce tolerance following adult living-related donor liver transplantation // *Hepatogastroenterology*.– 2003.– Vol. 50.– P. 601–606.
20. Sato Y., Farges O., Buffello D. et al. Impact of 70% partial hepatectomy on administration of donor leukocytes in cardiac transplantation in rats // *Transplant. Proc.*– 1998.– Vol. 30, N7.– P. 3873–3875.
21. Sheng Sun D., Iwagaki H., Ozaki M. et al. Prolonged survival of donor-specific rat intestinal allograft by administration of bone-marrow-derived immature dendritic cells // *Transplant. Immunol.*– 2005.– Vol. 14, N1.– P. 17–20.
22. Sogut I., Hatipoglu I., Serhatli M. et al. Cryopreservation of spleen and lymph nodes as a source of mononuclear cells to be used for the development of monoclonal antibody producing hybridoma cells // *Cryo Letters*.– 2011.– Vol. 32, N3.– P. 266–274.
23. Stephens E.A., Sharma J.M. Cryopreservation of avian lymphoid cells // *Avian Diseases*.– 1981.– Vol. 25, N3.– P. 614–627.
24. Taylor M.J., Bank H.L., Benton M.J. Selective destruction of leucocytes by freezing as a potential means of modulating tissue immunogenicity: membrane integrity of lymphocytes and macrophages // *Cryobiology*.– 1987, N2.– Vol. 24.– P. 91–102.
25. Taylor M.J., London N.J., Thirdborough S.M. et al. The cryobiology of rat and human dendritic cells: preservation and destruction of membrane integrity by freezing // *Cryobiology*.– 1990.– Vol. 27, N3.– P. 269–278.
26. Tomita Y., Yoshikawa M., Zhang Q.W. et al. Immune and non-immune factors in cryopreserved tissues // *J. Heart Lung Transplant.*– 2003.– Vol. 22, N5.– P. 560–567.
27. Yang L., Du Temple B., Khan Q. et al. Mechanisms of long-term donor-specific allograft survival induced by pretransplant infusion of lymphocytes // *Blood*.– 1998.– Vol. 91, N1.– P. 324–330.

*Поступила 25.08.2011  
Рецензент В.А. Македонская*

*Accepted 25.08.2011*