

A.V. Куликов, Л.В. Архипова, Г.Н. Смирнова, Д.А. Куликов, Г.Т. Сухих

**ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ОСОБОГО ИММУНОЛОГИЧЕСКОГО СТАТУСА ЦНС ДЛЯ
СОЗДАНИЯ СПОСОБОВ КОМПЕНСАЦИИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫХ
ПАТОЛОГИЧЕСКИХ СОСТОЯНИЙ**

Институт теоретической и экспериментальной биофизики РАН, г. Пущино

Реферат. Использованы свойства относительной иммунологической привилегированности мозга и передней камеры глаза для разработки трансплантологических способов компенсации патологических состояний у животных. Разработаны трансплантологические способы компенсации норадренергической недостаточности, возрастной и стрессорной дегенерации thymus, диабета. Исследованы физиологические, биохимические особенности протекания экспериментальных патологий в периоде их инициации, течения и долговременной компенсации с помощью трансплантации тканей в мозг и переднюю камеру глаза. Показано, что после успешно проведенной операции происходит полная или частичная нормализация основных физиологических и биохимических показателей.

А.В. Куликов, Л.В. Архипова, Г.Н. Смирнова,
Д.А. Куликов, Г.Т. Сухих

УЗ•К НЕРВ СИСТЕМАСЫНЫ• МАХСУС
ИММУНОЛОГИК СТАТУСЫН ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬ
ПАТОЛОГИК ХАЛ•ТНЕ КОМПЕНСАЦИЯЛ•Ү
ЫСУЛЛАРЫН БУЛДЫРУ МАКСАТЫНДА КУЛЛАНУ

Хайваннарда патологик хал•тне компенсациял•үнене трансплантологик ысуулларын эшл•үд• ми h•м күзне• алты камерасыны• чагыштырмача иммунологик естенлек үзлекл•ре файдаланылды. Бугаз бизе, диабетны• норадренергик яктан •итешезлекле булмавын, яшк• карап h•м стрессор дегенерацияне компенсациял•үнене трансплантологик ысууллары эшл•нг•н. Миг• h•м күзне• алты камерасына тукымаларны трансплантациял•ү ярд•менд• эксперименталь патологияне• башлангыч, бару h•м озак вакытка ис•пл•нг•н компенсация чорындағы физиологик, биохимик үзенч•лекл•ре тикшерелг•н. У•ышыл ясалған операцияд•н со• төп физиологик h•м биохимик курс•ткечл•рне• тулысынча яки өлеішч• нормальл•ш• баруы абылланган.

A.V. Kulikov, L.V. Arkhipova, G.N. Smirnova,
D.A. Kulikov, G.T. Sukhikh

USE OF SPECIAL IMMUNOLOGIC CNS STATUS FOR
CREATING COMPENSATION OF EXPERIMENTAL
PATHOLOGICAL STATES

For developing transplantation ways of pathological state compensation in animals qualities of relative immunologic privilege of brain and anterior chamber of an eye were used. Transplantation ways of compensation for nor-adrenergic insufficiency, age and stress degeneration of thymus, of diabetes have been developed. There were investigated physiologic and biochemical peculiarities of experimental pathology proceedings at the periods of their initiation, course and long-time compensation with the help of transplantating tissues in brain and anterior chamber of an eye. It was shown that after a successive surgery there occurs complete or partial normalization of basic physiologic and biochemical indices.

Известно, что некоторые области организма млекопитающих обладают свойствами относительной иммунопривилегированности. Это позволяет проводить пересадку клеток и тканей в эти участки без применения иммуносупрессивной терапии или минимизировать ее. К иммунопривилегированным зонам относят в первую очередь некоторые отделы головного мозга, переднюю камеру глаза (ПКГ) и семенник, что связано с особым строением гисто-гематических барьеров этих областей, в норме не пропускающих иммунокомпетентные клетки. Те же активированные иммунные клетки, которые все же проникают в иммунопривилегированные области, элиминируются под действием Fas-ligand, экспрессированного в этих участках. Функционально активный Fas-L обнаружен в эпителии и эндотелии роговицы, радужной оболочке глаза и в мозге, где Fas/Fas-L-система протектирует иммунологическую привилегированность [7, 9, 10, 13, 14]. Интерес к трансплантации ткани в ПКГ и мозг связан еще и с тем, что в этих структурах нет лимфатического протока, в результате чего отсутствует афферентное звено иммунной реакции [3]. Кроме того, трансплантаты незрелой ткани ЦНС имеют очень низкий уровень антигенов главного комплекса гистосовместимости [6, 12].

Целью наших исследований было использование свойства относительной иммунологической привилегированности мозга и передней камеры глаза для разработки трансплантологических способов компенсации патологических состояний у животных.

В экспериментах использовали крыс-самцов Вистар и беспородных. Для операции отбирали животных одного возраста с начальной массой 200—230 г. Кролики-самцы породы шиншилла, используемые в экспериментах, имели начальную массу 2500—3000 г, самки-доноры — более 4500 г.

Всех животных выращивали в условиях вивария на стандартной диете.

Крыс с норадренергической недостаточностью получали с помощью введения новорожденным крысятам в первые трое суток подкожно нейротоксин 6-оксиодифенил (6-ОДА, «Sigma», США) в дозе 100 мг/кг, что позволяло достичь хроническое снижение уровня норадреналина в мозге.

Животных 6-месячного возраста с депривацией норадренергической системы оперировали в стерильных условиях в специально оборудованной операционной комнате. Для пересадки брали ткань 17-дневных эмбрионов. Ткань для трансплантации объемом около 1 мм³ иссекали из области синего пятна или из закладки гиппокампа. Последний был использован для контрольных опытов как структура, не содержащая норадренергических нейронов. Выделенный материал помещали в раствор Игла. Крысам-реципиентам под нембуталовым наркозом (40 мг/кг, в/б) слева на черепе делали трепанационное отверстие диаметром 2-3 мм, центр которого располагался над фронтальной корой, и отсасывали небольшой участок коры. Далее первой группе животных посредством шприца со стеклянным наконечником

вводили участки ткани гиппокампа, третьей (ложнооперированные) — эквивалентный раствор Игла.

Алло- и ксенотрансплантацию поджелудочной железы, ткани тимуса в переднюю камеру глаза, боковые желудочки мозга проводили по разработанным нами методам [9, 10]. Инициацию диабета, определение потребления воды, количества глюкозы выполняли по стандартным методикам.

Статистическую обработку данных производили с использованием программы Statistica. Для полученных величин подсчитывали среднеквадратическую ошибку. Различия средних величин признавались достоверными при $p < 0,05$.

Известно, что после раннего постнатального введения специфического нейротоксина 6-ОДА в мозге животных происходит снижение уровня норадреналина [11]. Изучалась возможность восстановления уровня норадреналина мозга, вызванного 6-ОДА, с помощью трансплантации в мозг эмбриональной ткани синего пятна (locus coeruleus) — основного источника восходящей норадренергической иннервации.

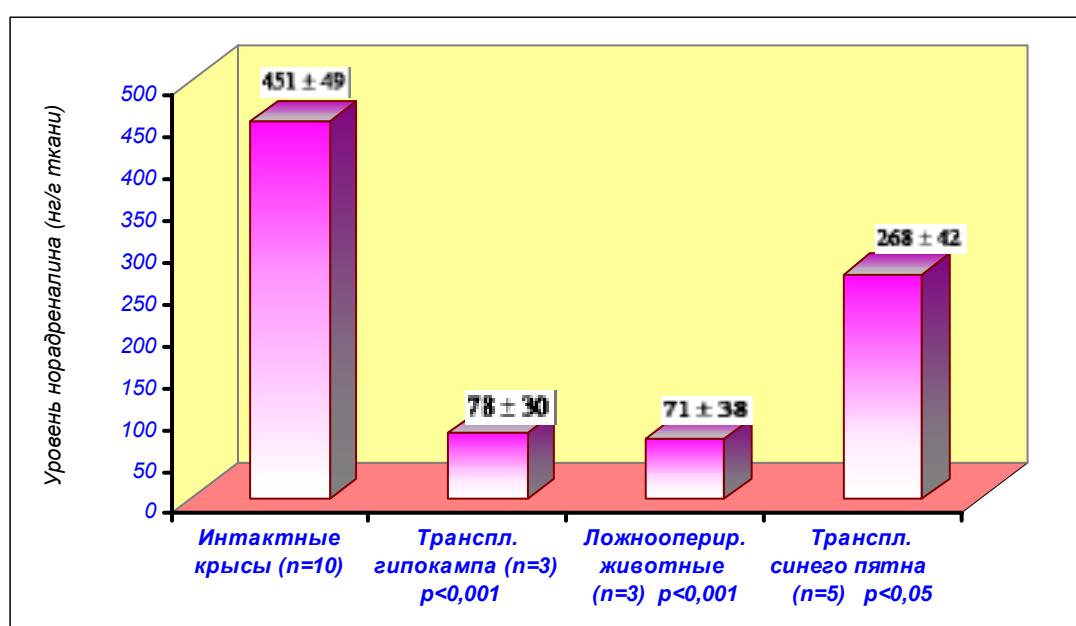


Рис. 1. Показатели норадреналина в неокортексе крыс различных групп.

вводили ткань из области закладки синего пятна. Один трансплантат вводили под углом через боковую стенку ямки в паренхиму коры контролateralного полушария, другой помещали на дно ямки. Второй группе таким же образом

Как видно из рис. 1, у ложнооперированных крыс с постнатальным введением 6-ОДА содержание норадреналина даже через 15 месяцев после введения нейротоксина составляло лишь 15% от нормы. У животных с контрольной

трансплантацией ткани гиппокампа в неокортекс биохимические показатели практически не отличались от показателей группы ложнооперированных животных.

У животных с трансплантатами ткани синего пятна в неокортекс наблюдалось значительное повышение уровня норадреналина в неокортексе (до 60% от нормы) по сравнению с таковыми в контрольных НА-депривированных группах.

Значительное повышение уровня норадреналина в коре при пересадке эмбриональной ткани синего пятна в неокортекс можно объяснить

трансплантации иммунокомpetентных тканей. Вначале была исследована динамика резкого снижения количества тимоцитов в вилочковой железе с возрастом. Исследовалось количество тимоцитов у 2, 5, 4, 5, 7, 8, 19, 20-месячных крыс. Показано, что количество тимоцитов у 20-месячных животных по сравнению с 2,5-месячными уменьшилось в 90,6 раза. На вопрос, можно ли предотвратить возрастную инволюцию тимуса у крыс разного возраста на более отдаленных сроках, мы попытались ответить в следующей серии экспериментов.

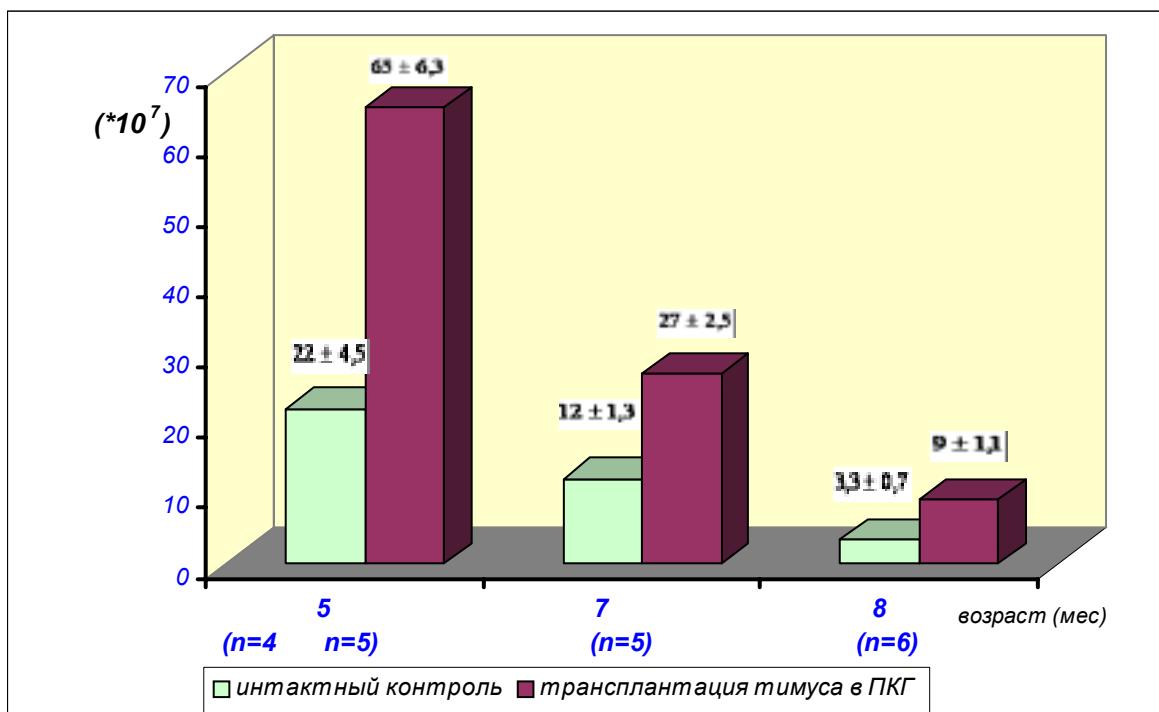


Рис.2. Количество тимоцитов в вилочковой железе у животных разного возраста через 3 месяца после трансплантации ткани в ПКГ.

приживлением и длительным функционированием трансплантированных норадренергических нейронов. Возможность прорастания волокон от синего пятна на значительное расстояние (до 12 мм) была показана при его трансплантации в другие области мозга [8]. Вместе с тем прорастающие аксоны не достигают отдаленных (столовых) отделов мозга, где норадреналин остается на том же уровне, что и у контрольных групп животных.

Следующими экспериментальными моделями, разработанными с использованием относительной иммунопривилегированности передней камеры глаза, были способы модуляции возрастной инволюции тимуса и компенсации иммунологической недостаточности у крыс с помощью

Как видно из рис. 2, количество тимоцитов через 3 месяца после трансплантации тимуса в ПКГ крыс увеличилось по сравнению с интактным контролем на 295% у 5-месячных животных, на 225% у 7-месячных и на 272% у 8-месячных крыс.

Известно, что половые железы находятся в антагонистических взаимоотношениях с тимусом. Именно в периоде полового созревания начинается резкая возрастная инволюция тимуса, а гонадэктомия приводит к повышению у старых животных массы и клеточности тимуса [1, 5], т.е. отсутствие антагонизма между тимусными и половыми гормонами дает возможность вилочковой железе прогрессивно развиваться. Поэтому в своих исследованиях мы брали для аллотрансплантации тимус неполовозрелых

животных, еще не подвергшийся угнетающему действию половых гормонов. Пролиферативный потенциал и способность к гормональной продукции таких трансплантатов выше, чем у трансплантатов от взрослых животных. Если учесть, что пересадку ткани проводили в относительно иммунопривилегированную переднюю камеру глаза, где она могла функционировать длительное время, становится понятно, почему относительно небольшой кусочек иммунокомпетентной ткани приостанавливает инволюции тимуса у животных разных возрастных групп.

При разработке способов трансплантологической компенсации экспериментального диабета мы применяли широко распространенную модель аллоксанового диабета. В экспериментах мы использовали животных с острым диабетом, у которых концентрация глюкозы в крови превышала 20 ммоль/л, а в моче была более 2000 мг%.

В процессе выполнения работы было разработано несколько моделей трансплантологической компенсации аллоксанового диабета. В данной серии использовали алло- и ксенотрансплантацию эмбриональной поджелудочной железы в переднюю камеру глаза и боковые желудочки мозга крыс и кроликов.

Таблица 1

Результаты аллотрансплантации фетальной поджелудочной железы в переднюю камеру глаза и боковые желудочки мозга животным с экспериментальным диабетом

| Реципиенты | Донор | Компенсация диабета, шт/% | | Всего |
|------------|------------|---------------------------|-----------|---------|
| | | полная | частичная | |
| Крысы | Крысы | | | |
| Вистар | Вистар | 153/49 | 124/40 | 311/100 |
| Крысы | Крысы | | | |
| Вистар | беспородн. | 15/40,5 | 15/40,5 | 37/100 |
| Крысы | Крысы | | | |
| Вистар* | Вистар* | 6/60 | 2/20 | 10/100 |
| Кролик | Кролик | | | |
| Шиншилла | Шиншилла | 3/30 | 4/40 | 10/100 |

Наиболее высокий процент компенсации экспериментального диабета был получен, когда в качестве донора и реципиента использовали крыс Вистар (89%). Полная компенсация (3,8—8,8 ммоль/л) отмечалась у 153 (49%) оперированных животных, а частичная (8,8—13,8 ммоль/л) — у 124 (40%). Для того чтобы убедиться, что нет больших различий при разных вариантах

аллотрансплантации, была проведена серия экспериментов по трансплантации эмбриональной поджелудочной железы беспородных крыс крысам Вистар. Компенсация диабета наступала у 81% животных, полная — у 15 (40,5%) оперированных животных и частичная — также у 15 (40,5%).

Трансплантация ткани в боковые желудочки мозга дала хорошие результаты, причем число крыс с полной компенсацией количества глюкозы в крови втрое выше, чем с частичной, тогда как в других вариантах эти показатели были примерно равными.

Использование кроликов для аллотрансплантации эмбриональной поджелудочной железы в ПКГ имеет свои недостатки и преимущества. Кролики требуют повышенного по сравнению с крысами внимания при уходе за ними, особенно в периоде индукции диабета и плохо переносят наркоз, зато являются идеальной моделью для динамической тонометрии оперированных глаз. Этот тест в силу его неприспособленности для мелких грызунов нельзя провести на крысах. У всех кроликов с полной или частичной компенсацией аллоксанового диабета провели динамическую тонометрию оперированных глаз. Повышение внутриглазного давления по сравнению с таковым в парном глазу без трансплантата и с внутриглазным давлением у контрольных животных обнаружено не было. Это свидетельствует о том, что трансплантат не мешает нормальной циркуляции глазной жидкости и не блокирует шлеммов канал, через который она оттекает от глаза.

В ходе выполнения работы исследовано более 15 физиологических и биохимических показателей (содержание глюкозы, инсулина, сывороточной ДНК, потребление воды, масса тела, концентрация инсулина в трансплантатах на отдаленных сроках после пересадки и т.д.). Все исследованные параметры в результате трансплантации полностью или частично компенсировались. Кроме того, авторами начата работа по аутотрансплантации ткани тимуса прошедшей длительную криокансервацию. Первые положительные результаты позволяют надеяться, что подобным образом можно восстанавливать клеточность тимуса при старении.

Использование свойства относительной иммунологической привилегированности мозга и передней камеры глаза позволило разработать новые трансплантологические методы компенсации экспериментальных нейрональных

и эндокринных патологических состояний. Разработан способ восстановления уровня норадреналина мозга при 6-оксиофаминовом разрушении норадренергической системы и последующей трансплантации в мозг эмбриональной ткани locus coeruleus — основного источника восходящей норадренергической иннервации. Разработаны способы аллотрансплантации иммунокомпетентных тканей в переднюю камеру глаза крыс. Показана возможность не только приостановки возрастной инволюции тимуса у животных разных возрастных групп, но и увеличения количества тимоцитов в вилочковой железе на отдаленных сроках после трансплантации.

Разработаны способы трансплантации фетальной поджелудочной железы в переднюю камеру глаза или боковые желудочки мозга, позволяющие добиться долговременной полной или частичной компенсации экспериментального диабета у животных.

Работа выполнена при финансовой поддержке программы Президиума РАН «Поддержка инноваций» (2005, 2006 г.), грантов Министерства промышленности правительства Московской области №21/06-05, №12/03-06.

ЛИТЕРАТУРА

1. Бутенко Г.М. // Проблемы старения и долголетия. — 1998. — Т.7. — № 3. — С.100—110.
2. Куликов А.В., Новоселова Е.Г., Корыстов Ю.Н. и др. // Успехи геронтол. — 2005. — Вып.17. — С.82—86.
3. Полежаев Л.В., Александрова М.А. Трансплантация ткани мозга в норме и патологии. — М., 1986.
4. Семенова Т.П., Брагин А.Г., Грищенко Н.И. и др. // Журн. высш. нервн. деят. — 1988. — Т. 38. — № 5. — С. 872—881.
5. Ярилин А.А., Беляков И.М. // Иммунология. — 1996. — №1. — С.4—10.
6. Ярыгин В.Н., Малинина И.Е., Бибаева Л.В. // Бюлл. экспер. биол. мед. — 1997. — Т. 7. — С. 106—108.
7. Bellgrau D., Gold D., Selawry H.P. et al. // Nature. — 1995. — Vol. 377. — P. 630—632.
8. Bjorklund L., Stremberg I. // Exp. Brain Res. — 1997. — Vol. 113. — P. 13—23.
9. Choi C., Benveniste E.N. // Brain Res. Rev. — 2004. — Vol. 44. — P. 65—81.
10. Griffit T.S., Brunner T., Fletcher S.M. et al. // Science. — 1995. — Vol. 270. — P.1189—1192.
11. Hart D.N.I., Fabre Y.W. // J. Exp. Med. — 1981. — Vol.154. — P. 347—361.
12. Kulikov A.V., Korystov Yu.N., Arbuzova M.I. et al. // Membr. Cell. Biol. — 1998. — Vol.11. — P. 737—742.
13. Qian H., Atherton S. // Curr. Eye Res. — 2003. — Vol. 26. — P.195—203.
14. Shin D.H., Lee E., Kim H.J. et al. // J. Neuroimmunol. — 2002. — Vol. 123. — P. 50—57.

Поступила 24.02.07.

• •