

А. В. Куликов<sup>1</sup>, Л. В. Архипова<sup>1</sup>, Д. А. Куликов<sup>1, 2</sup>, Г. Н. Смирнова<sup>1</sup>, П. А. Куликова<sup>3</sup>

## УВЕЛИЧЕНИЕ СРЕДНЕЙ И МАКСИМАЛЬНОЙ ПРОДОЛЖИТЕЛЬНОСТИ ЖИЗНИ ЗА СЧЕТ ТРАНСПЛАНТАЦИИ АЛЛОГЕННЫХ КЛЕТОК ТИМУСА В ПЕРЕДНЮЮ КАМЕРУ ГЛАЗА ЖИВОТНЫХ\*

<sup>1</sup> Институт теоретической и экспериментальной биофизики РАН, 142290 Московская обл., Пущино, Институтская ул., 3; e-mail: kulikov@iteb.ru; <sup>2</sup> Московский областной научно-исследовательский клинический институт им. М. Ф. Владимирского, 129110 Москва, ул. Щепкина, 61/2; <sup>3</sup> Московский государственный университет им. М. В. Ломоносова, 117192 Москва, Ломоносовский пр., 31, корп. 5

Исследовано влияние пересадки аллогенной ткани тимуса в иммунопривилегированную переднюю камеру глаза на продолжительность жизни реципиента в зависимости от его возраста. Пересадка ткани тимуса от молодых животных старым приводит к значимому увеличению как средней, так и максимальной продолжительности жизни реципиента.

**Ключевые слова:** возрастная атрофия вилочковой железы, трансплантация, старение, увеличение продолжительности жизни

Известно, что с возрастом в организме млекопитающих происходят изменения, связанные со значительной возрастной необратимой инволюцией вилочковой железы (тимуса) [2, 3, 7, 9, 12]. Имеются данные, что, наряду с наличием выраженных, ассоциированных с возрастом морфофункциональных изменений в вилочковой железе, она сохраняет способность к синтезу некоторых гормонов и дифференциации T-клеток даже у людей старшей возрастной группы [11, 13, 15]. В. О. Поляковой (2007) было показано увеличение экспрессии эндотелина-1 в сосудах тимуса при старении организма, что является компенсаторным механизмом в процессе инволюции тимуса и способствует поддержанию базового уровня продукции T-лимфоцитов [10].

Постоянство внутренней среды организма на всех стадиях развития обеспечивается за счет слаженного функционирования разных его систем. Современная медицинская наука обладает значительным арсеналом фармакологических средств, которые при необходимости могут быть назначены для поддержания этого слаженного взаимодей-

ствия и сохранения здоровья человека. Однако использование фармакологических препаратов не всегда оказывается эффективным. Альтернативой данному подходу может стать применение трансплантологических методик, ведущих к активации процессов физиологической и репаративной регенерации. Наличие в организме относительно иммунопривилегированных зон позволяет помещать в них разные типы клеток без опасения за их скорое отторжение. В таком случае появляется возможность отказаться от использования иммунодепрессантов (к слову, дорогостоящих и обладающих системными токсичными эффектами) [1, 5, 16, 17]. Исследование динамики возрастной инволюции тимуса и разработка трансплантологических способов модуляции этого процесса имеет важное общемедицинское значение и может помочь в понимании межсистемных отношений в организме.

В предыдущих работах нами было показано, что атопическая трансплантация иммунокомпетентных клеток значительно замедляет необратимую возрастную атрофию тимуса [6, 7]. При этом известно, что применение некоторых иммуномодуляторов способно восстанавливать компетентность иммунных клеток в стареющем организме и увеличивать продолжительность жизни животных [2, 3, 8, 14].

Целью настоящей работы стала проверка гипотезы, способна ли пересадка аллогенной ткани тимуса в относительно иммунопривилегированную область — переднюю камеру глаза — привести к увеличению продолжительности жизни экспериментальных животных.

\* Работа выполнена при финансовой поддержке программ президиума РАН «Поддержка инноваций и разработок» 2006, 2007, 2009 гг., «Фундаментальные науки – медицине» 2012, 2013 гг.

## Материалы и методы

В работе использовали крыс *Wistar* ( $n=320$ ). Ткань тимуса для трансплантации в переднюю камеру глаза (ПКГ) реципиента выделяли от крыс-самцов препубертатного возраста массой 110–130 г. В качестве реципиентов использовали животных разного возраста (от 3,5 до 19 мес) и массы (200–450 г). В чашке Петри со средой Игла ткань тимуса измельчали до фрагментов объемом примерно  $1 \text{ мм}^3$ . Операцию проводили под общей анестезией (Золетил+Ксилазин), премедикация — атропина сульфат в дозе  $0,04 \text{ мг/кг}$  подкожно за 15 мин до начала вмешательства. Крысам-реципиентам на глаз наносили по 1 капле  $0,1\%$  раствора атропина с тем, чтобы уменьшилась площадь радужной оболочки. Эта манипуляция помогает избежать повреждений богатых капиллярами структур. Через 5 мин на глаз наносили одну каплю  $0,5\%$  раствора Дикаина. На роговице делали разрез длиной  $1,5\text{--}2 \text{ мм}$  на «13 часов» по «воображаемому циферблату» в  $1\text{--}2 \text{ мм}$  от края роговицы. Ткань тимуса забирали из чашки Петри и помещали в ПКГ модернизированной микропипеткой с регулируемым объемом, общий объем трансплантата составлял  $3\text{--}5 \text{ мм}^3$ . Определение количества тимоцитов проводили по ранее описанной методике с авторскими модификациями [4].

Крысы содержали в стандартных условиях вивария при температуре  $21\text{--}23 \text{ }^\circ\text{C}$ . Они получали сбалансированный гранулированный корм, до-

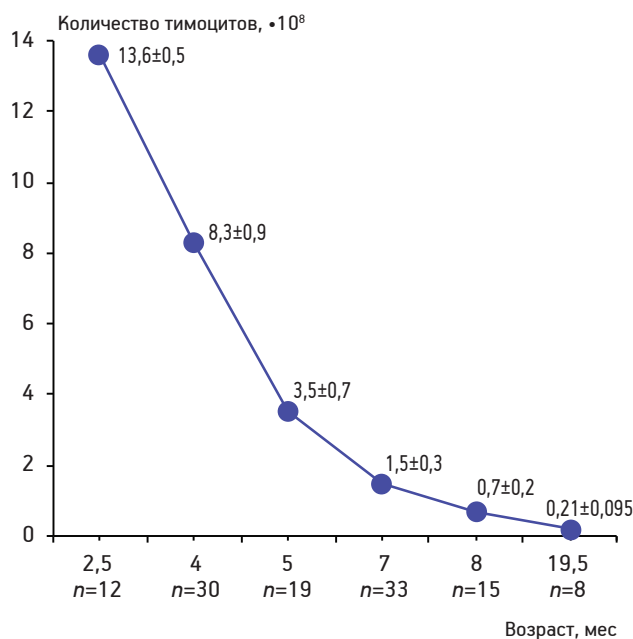


Рис. 1. Снижение количества тимоцитов у крыс с возрастом

ступ к питьевой воде был свободным. Работа выполнена с соблюдением принципов Хельсинкской декларации о гуманном отношении к животным, принципов гуманности, изложенных в директиве Европейского сообщества (86/609/ЕС), в Приказе Минздрава СССР № 755 от 12 августа 1977 г. «О мерах по дальнейшему совершенствованию организационных форм работы с использованием экспериментальных животных». Исследования проводили по протоколам, одобренным комиссией по этике Института теоретической и экспериментальной биофизики РАН. Статистическую обработку данных проводили с использованием программ Statistica 6.0, Microsoft Office Excel 2007. Для полученных величин проводили подсчет среднего значения, среднеквадратической ошибки. Различия средних величин признавали достоверным при уровне значимости  $p < 0,05$ .

## Результаты и обсуждение

Известно, что с течением жизни у млекопитающих снижается количество тимоцитов (необратимая возрастная инволюция тимуса). Детальная информация о динамике этого процесса, кроме феноменологического интереса, может иметь значение для понимания особенностей применения иммуномодулирующих, противовирусных и прочих фармакологических препаратов в разных возрастных группах. В эксперименте на 117 крысах мы проследили динамику возрастной инволюции тимуса крысы с 2,5 по 19-й месяц жизни (рис. 1).

На графике показано выраженное снижение количества тимоцитов с течением времени, этот процесс протекает особенно интенсивно в молодом возрасте (в промежутке от 2,5 до 8 мес количество тимоцитов снижается более чем в 19 раз). В наших предыдущих работах было продемонстрировано, что трансплантация аллогенной ткани тимуса молодых крыс в ПКГ более старых животных вызывает замедление возрастной инволюции тимуса реципиента [6]. Поскольку модуляция функциональной активности иммунокомпетентных клеток может увеличивать продолжительность жизни, мы предположили, что операция по пересадке ткани тимуса в ПКГ также окажет положительное влияние на этот показатель.

В первую серию экспериментов было включено 45 животных. Опытной группе ( $n=21$ ) в возрасте 3,5 мес выполнили пересадку аллогенной ткани тимуса в ПКГ. Интактную группу составили

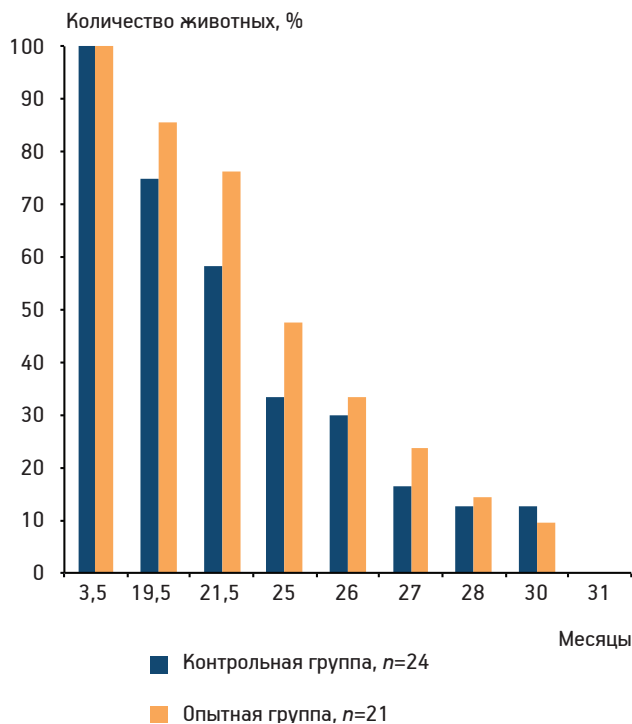


Рис. 2. Выживаемость животных контрольной группы и после аллотрансплантации ткани тимуса в ПКГ; возраст реципиентов — 3,5 мес

24 животных. Все крысы оставлены на выживание (рис. 2).

После операции наблюдали тенденцию к увеличению средней продолжительности жизни оперированных животных, однако данное увеличение оказалось незначимым.

В следующую серию экспериментов было включено 50 животных. На сроке жизни 14–17 мес от естественных причин умерло 8 крыс. С 18-го месяца жизни оставшиеся животные были разделены на две равные группы (по 21 животному). Первой группе проведена аллотрансплантация ткани тимуса в ПКГ, вторая группа была контрольной (рис. 3). Все животные оставлены на выживание.

Было показано, что аллотрансплантация ткани тимуса в ПКГ 17-месячной крысы приводит к увеличению средней (на  $19 \pm 5\%$ ) и максимальной (до 21%) продолжительности жизни реципиента.

Вероятно, значительно более скромные результаты трансплантации ткани тимуса молодым животным объясняются тем, что в молодом возрасте количество собственных тимоцитов еще достаточно высоко (см. рис. 1) и отсутствует потребность в экзогенной стимуляции иммунных процессов. Мы также полагаем, что процесс физиологической атрофии тимуса, наиболее выраженный в молодом возрасте, должен распространяться и

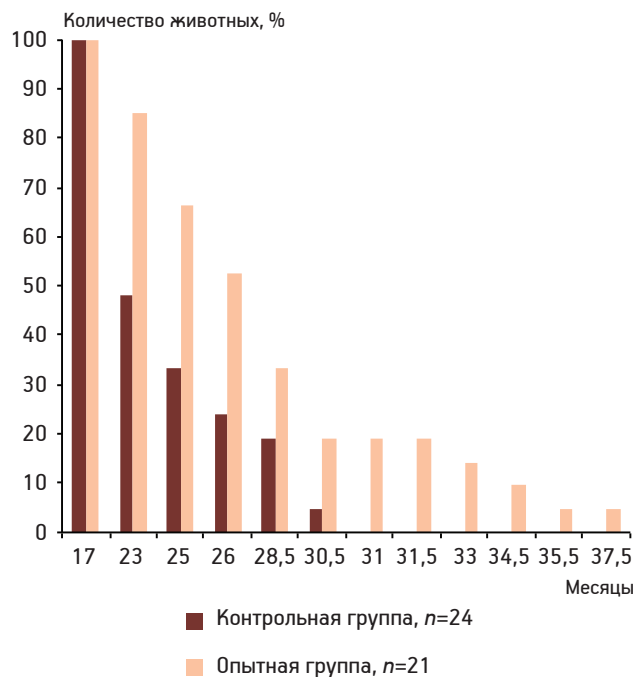


Рис. 3. Выживаемость животных контрольной группы и после аллотрансплантации ткани тимуса в ПКГ; возраст реципиентов — 17 мес

на ткань трансплантата, приводя к снижению его функциональной активности. Другими словами, трансплантат тоже «стареет», и с возрастом снижается степень его влияния на скорость атрофии тимуса реципиента. Косвенным подтверждением этому предположению может служить следующий факт: мы показали, что через 1 мес после пересадки трансплантата ткани тимуса, помещенный в ПКГ старого животного (19 мес), содержит в  $2,6 \pm 0,4$  раза больше тимоцитов, чем аналогичный трансплантат, помещенный в ПКГ шестимесячной крысы.

### Заключение

Как показывают результаты длительного эксперимента, пересадка ткани тимуса именно животным зрелого возраста может оказать наибольшее влияние на увеличение средней и максимальной продолжительности жизни. Предложенные в настоящем исследовании подходы могут быть использованы при изучении фундаментальных закономерностей сложноподчиненных взаимодействий разных систем организма в процессе его старения, а также при оценке действия иммуномодулирующих агентов (лекарственных средств).

## Литература

1. Александрова М. А., Подгорный О. В. Нейральные стволовые клетки // В кн.: Биология стволовых клеток и клеточные технологии. М.: Медицина, 2009. Т. 2. С. 163–189.
2. Анисимов В. Н. Молекулярные и физиологические механизмы старения. СПб.: Наука, 2008. Т. 1.
3. Анисимов В. Н. Молекулярные и физиологические механизмы старения. СПб.: Наука, 2008. Т. 2.
4. Корыстов Ю. Н., Куликов А. В., Архипова Л. В. и др. Социальный стресс в группах мышей: методы регистрации конфликта и его последствий // Докл. АН. 2003. Т. 390. № 6. С. 847–849.
5. Куликов А. В., Архипова Л. В., Смирнова Г. Н., Куликов Д. А. Возможно ли компенсировать сахарный диабет с помощью трансплантации инсулинпродуцирующей ткани в иммуноприлегируемые зоны организма? // Биозащита и биобезопасность. 2011. Т. 8. № 3. С. 18–23.
6. Куликов А. В., Смирнова Г. Н., Архипова Л. В. и др. Трансплантационные способы замедления необратимой возрастной атрофии тимуса // Пробл. старения и долголетия. 2009. Т. 18. № 1. С. 37–40.
7. Куликов А. В., Архипова Л. В., Смирнова Г. Н. и др. Замедление темпа необратимой возрастной атрофии вилочковой железы с помощью атопической аутопересадки длительно криоконсервированной ее ткани // Успехи геронтол. 2010. Т. 23. № 1. С. 76–80.
8. Морозов В. Г., Хавинсон В. Х. Пептидные биорегуляторы в профилактике и лечении возрастной патологии // Успехи геронтол. 1997. Т. 1. С. 74–79.
9. Пальцев М. А., Кветной И. М. Руководство по нейроиммуноэндокринологии. М.: Медицина, 2008.
10. Полякова В. О. Экспрессия серотонина и эндотелина-1 в тимусе человека при старении // Успехи геронтол. 2007. Т. 20. № 1. С. 47–51.
11. Севастьянова Н. Н., Трофимов Ф. В., Линькова Н. С. и др. Индуцированное старение тимуса: радиационная модель и перспективы применения низкоинтенсивного лазерного излучения // Успехи геронтол. 2010. Т. 23. № 4. С. 547–553.
12. Смирнов В. С., Фрейдлин И. С. Иммунодефицитные состояния. СПб.: Фолиант, 2002.
13. Фрейдлин И. С. Загадки тимуса. Возраст и иммунитет // Сорос. образов. журн. 1997. № 5. С. 26–29.
14. Anisimov V. N., Khavinson V. Kh., Morozov V. G. Effect of synthetic dipeptide Thymogen (Glu-Trp) on life span and spontaneous tumor incidence in rats // The Gerontologist. 1998. Vol. 38 (Spec. Iss. I). P. 7–8.
15. Nance D. M., Sanders V. M. Autonomic innervation and regulation of the immune system // Brain Behav. Immun. 2007. Vol. 21. № 6. P. 736–745.
16. Rodriguez-Diaz R., Speier S., Molano R. D. et al. Non-invasive in vivo model demonstrating the effects of autonomic innervation on pancreatic islet function // Proc. nat. Acad. Sci. USA. 2012. Vol. 109. № 52. P. 21456–21461.
17. Ruan G. P., Han Y. B., Wang T. H. et al. Comparative study among three different methods of bone marrow mesenchymal stem cell transplantation following cerebral infarction in rats // Neurol. Res. 2013. Vol. 35. № 2. P. 212–216.

Adv. geront. 2013. Vol. 26. № 4. P. 643–646

*A. V. Kulikov<sup>1</sup>, L. V. Arkhipova<sup>1</sup>, D. A. Kulikov<sup>1,2</sup>, G. N. Smirnova<sup>1</sup>, P. A. Kulikova<sup>3</sup>*

### THE INCREASE OF THE AVERAGE AND MAXIMUM SPAN OF LIFE BY THE ALLOGENIC THYMIC CELLS TRANSPLANTATION IN THE ANIMALS' ANTERIOR CHAMBER OF EYE

<sup>1</sup> Institute of Theoretical and Experimental Biophysics, RAS, 3 Institutskaya ul., Pushchino Moscow region 142290; e-mail: kulikov@iteb.ru; <sup>2</sup> M. F. Vladimirovsky Moscow Regional Research and Clinical Institute, 61/2 ul. Shchepkina, Moscow 129110; <sup>3</sup> M. V. Lomonosov Moscow State University, 31 Bldg.5 Lomonosovskiy pr., Moscow 119192

The effect of the allogenic thymic tissue transplantation in the immune-privileged anterior chamber of eye to the life expectancy of the recipient depending on its age was investigated. The thymic tissue transplantation from the young animals to the old ones leads to a significant increase in both the average and maximum life span of the recipient.

**Key words:** age-associated thymic atrophy, transplantation, aging, life span