

УДК 616.089.843

Вплив гетеротопічної трансплантації тканини гіпокампа на динаміку функціонально-морфологічної інтеграції з мозком реципієнта

Костюк К.Р.

Інститут нейрохірургії ім. акад. А.П.Ромоданова АМН України, м.Київ, Україна

Ключові слова: трансплантація, головний мозок, гіпокамп, електроенцефалограма, нейроспецифічні білки, експериментальне дослідження.

Вступ. Нейротрансплантація як метод відновлення порушених функцій нервової системи активно розвивається протягом останнього десятиріччя [10, 15]. Експериментально та клінічно доведено позитивний вплив нейротрансплантації при нейродегенеративних захворюваннях, травматичних та ішемічних ураженнях нервової системи, а також при епілепсії [5, 9]. Проте клінічне використання трансплантації нервової тканини обмежене через недостатнє вивчення механізмів структурно-функціональної інтеграції імплантованої тканини з мозком реципієнта.

У міру накопичення досвіду з використання в клінічній практиці імплантації ембріональної нервової тканини з'ясувалось, що нейротрансплантація може призводити в деяких випадках до підвищення рівня судомної готовності мозку [13, 14, 16]. Проте до цього часу не проводились дослідження, спрямовані на вивчення впливу різних клітинних компонентів транспланта на функціональну активність нейронів реципієнта. Оскільки електрична активність мозку значною мірою відображає функціональну активність нейронів, застосовуючи електрофізіологічні дослідження, можна виявити особливості функціональної інтеграції імплантата з мозком реципієнта та визначити епілептогенну готовність мозку.

Для того, щоб з'ясувати які види клітин можуть бути генераторами небажаної епілептогенної активності, в нашій роботі були використані тканини із різним складом клітинних компонентів.

Матеріали та методи. Експеримент проведено на 36 статевозрілих кролях-самцях породи шиншила віком 7—8-міс. Було сформовано три групи тварин по 12 у кожній. У першій групі проводили імплантацію ембріональної тканини гіпокампа (ЕмБТГ), у другій — постнатальної тканини гіпокампа (ПНТГ), в третій — гліальнозбагаченої фракції тканини гіпокампа (ГЗФГ).

Вибір тканини гіпокампа як трансплантата обґрунтований його активною участю у формуванні епілептичного синдрому, що доведено як клінічними, так і експериментальними дослідженнями [3, 19, 20]. Другим аргументом використання тканини гіпокампа є добре вивчена його морфологічна та нейромедіаторна організація, а саме: наявність основних медіаторів нервової системи — ацетилхоліну, норадреналіну, серотоніну та ін.

Ембріональну тканину брали у самок-донорів на 16—17-й день вагітності. Постнатальну тканину гіпокампа кролів одержували протягом першої доби після народження. Гліальнозбагачена фракція була насичена гліальним компонентом нервової тканини. Її використання в експерименті обумовлене існуючим припущенням, що гіперплазія глії може бути епілептогенним фактором [12]. Постнатальна тканина складалась як із гліальних, так і з більш диференційованих нейрональних клітинних елементів.

Для добування нейроглії проводилось культивування нервової тканини новонароджених кролів. При цьому використовувався метод первинної експлантації нервової тканини, завдяки котрому можна було отримати повноцінну зону росту культур, збагачених гліальними клітинами. Завдяки такому способу культивування вдалось досягти розмежування глії та нейронів у зв'язку з відмінностями їх гістобіологічних можливостей. Через відсутність міграційної здатності нейрони експлантатів залишаються на місці, тоді як клітини глії, яким властива значна рухливість та реактивність, активно мігрують з первинних експлантатів і формують зону росту гістотипової архітекtonіки, у якій значно переважають клітини нейроглії [4, 8].

Трансплантація здійснювалась дорослим кролям-самцям у кору сенсомоторної ділянки зліва. Застосовувалось інтрапаренхімальне введення тканини гіпокампа, при якому спостерігається мінімальна травматизація мозку реципієнта і

вдається досягти максимального співдотикання двох тканин, що сприяє їх кращій взаємодії.

Через 3 тиж після імплантації проводилось повторне оперативне втручання — встановлення 4 коркових реєструючих електродів: над зоною імплантації, над симетричною контрлатеральною сенсомоторною зоною та над фронтальними ділянками обох півкуль. Індиферентний срібний електрод розміром 2 мм на 5 мм встановлювали на кістці над лобовою придатковою пазухою. У подальшому, через 1 міс і 4 міс після імплантації тканини гіпокампа, вивчали електричну активність головного мозку тварин, а також аналізували участь різних медіаторних систем мозку у феноменах змін біоелектричної активності. Під час фонового запису у кожній групі зіставляли середні значення сумарної потужності, максимальної потужності та частоти ритму у зоні трансплантації з цими показниками в інших ділянках мозку. При цьому окремо досліджували реактивність потужно-частотних характеристик ритмів на світлову стимуляцію у кожній зоні мозку, над якою встановлено електрод, і також порівнювали з її величинами в різних ділянках мозку.

З метою визначення особливостей участі медіаторних систем імплантованої тканини у феноменах біоелектричної активності мозку реципієнта проводили порівняння змін ритмів ЕЕГ у зоні трансплантації та інших ділянках мозку через 15 хв та 30 хв після введення специфічних препаратів. Внутрішньом'язово вводили такі речовини медіаторної дії: галантамін — інгібітор холінергези; меліпрамін — інгібітор зворотного захвату моноамінів (переважно серотоніну); тизерцин — блокатор норадреночутливих рецепторів; виконували тест на судомну готовність після введення бемегриду. При всіх фармакологічних тестах застосовувалось функціональне навантаження у вигляді світлового подразнення. Проводилось порівняння у межах кожної експериментальної групи у різні строки після трансплантації потужно-частотних характеристик ритмів ЕЕГ та їх реактивності на світлове подразнення, при виконанні тесту на судомну готовність і при введенні речовин нейромедіаторної дії. Крім того, оцінювались відмінності вищезазначених параметрів у різних групах експериментальних тварин.

Статистична обробка отриманих даних здійснювалася за спеціально розробленою комп'ютерною програмою.

Для визначення особливостей впливу імплантації ГЗФГ гіпокампа та ЕмБТГ і ПНТГ на стан нейроімуноспецифічних процесів у віддалений період (через 4 міс та через 8 міс) у крові кролів-реципієнтів досліджували концентрацію аутоантитіл до нейроспецифічних білків: основного

білка мієліну (ОБМ), білка S-100 (маркера глії) та нейроспецифічної енолази (НСЕ). Нейроспецифічні білки (НСБ) виділяли з телячого головного мозку: ОБМ — за модифікацією А.В. Палладіна із співавторами (1970), S-100 і НСЕ — за методом Г.А. Бережного (1978, 1984). Антитіла до НСБ у сироватці крові експериментальних кролів визначали за методикою Т.М.Черенько (1989) із використанням непрямого імуноферментного методу.

З метою морфологічного контролю приживлення тканини гіпокампа та оцінки її структурної взаємодії з навколишньою мозковою тканиною реципієнта були проведені світло-оптичні та електронномікроскопічні дослідження тканин мозку кролів-реципієнтів у зоні імплантації через 4 міс та через 8 міс після імплантації.

Результати. На основі електрофізіологічних досліджень встановлено, що всі три імплантовані види тканини гіпокампа викликають появу специфічного для нього тета-ритму в оточуючих ділянках мозку реципієнта, що може свідчити про приживлення імплантованої тканини та її функціональну інтеграцію з мозком реципієнта. При цьому трансплантовані тканини зберігають характерні для гіпокампа електрофізіологічні ознаки. Така функціональна взаємодія була найбільше вираженою у тварин з імплантованою ембріональною тканиною.

Узагальнюючи отримані результати, можна стверджувати, що через 1 міс та через 4 міс після трансплантації у всіх групах тварин виникають процеси збудження мозку, які найбільшою мірою виявляються у групі тварин з імплантованою ГЗФГ. Найменше вони спостерігаються після трансплантації ЕмБТГ. Тенденція до зниження електричної активності після трансплантації ЕмБТГ має місце протягом усього терміну дослідження. Незважаючи на загальне підвищення електричної активності після імплантації, у тварин не виявлено ознак судомної готовності мозку. Через 1 міс в усіх групах тварин майже однаково зростає електрична активність при фотостимуляції. Проте тільки у групі тварин з імплантованою ЕмБТГ спостерігалась нормалізація ритмів ЕЕГ після припинення дії світлового подразника. Через 4 міс при світловому подразненні загальнономозкові процеси збудження спостерігаються більшою мірою після імплантації ПНТГ та ЕмБТГ. Ці процеси мають зворотний характер, електрична активність головного мозку наближається до фонового рівня після стимуляції.

При виконанні тесту на судомну готовність з введенням бемегриду виявлено значну уразливість мозку тварин з імплантованою ГЗФГ, яка має певний вогнищевий характер. Через 4 міс в зоні імплантації з'являються ЕЕГ-фено-

мени епілептичної активності у формі підвищення амплітуди та зменшення частоти ритму, утворення спайок. Ці зміни вказують на формування у зоні імплантації епілептичного вогнища. В свою чергу трансплантація ЕмБТГ сприяє виникненню гальмівних механізмів, які попереджають появу та поширення підвищеної електричної імпульсації.

Електрофізіологічне дослідження участі різних медіаторних систем у феноменах біоелектричної активності мозку тварин показало, що імплантація ЕмБТГ призводить до формування холінергічних медіаторних систем, які в процесі свого розвитку набувають характерних для гіпокампа ознак; спостерігається недостатня активність серотонінергічної медіаторної системи упродовж всього терміну дослідження; виявлено значну роль НА-ергічних структур у модуляції характерної для гіпокампа електричної активності, вираженість якої дещо знижується на четвертий місяць після трансплантації.

Доведено суттєву роль холінергічних структур імплантованої ГЗФГ у формуванні біоелектричної активності мозку реципієнта, однак вона має нетривалий характер. Серотонінергічна меді-

аторна система також бере участь у функціональній інтеграції з мозком реципієнта, вираженість якої зменшується з часом. Показано розвиток НА-ергічної системи зі збереженням специфічних феноменів електричної активності гіпокампа. Імплантована ПНТГ сприяє поступовому формуванню системи холінергічних зв'язків з характерними для гіпокампа рисами. Виявлено участь серотонінергічної системи у розвитку біоелектричної активності мозку реципієнта в межах фізіологічних реакцій. Спостерігається стійка активність НА-ергічної системи з характерними для гіпокампа електрофізіологічними феноменами.

Дослідження рівня антитіл до ОБМ, S-100 та НСЕ проведено у сироватці крові кролів через 4 міс і через 8 міс після імплантації ЕмБТГ, ГЗФГ та ПНТГ (табл.).

Як видно із таблиці, через 4 міс після імплантації різного типу тканин гіпокампа у сироватці крові експериментальних кролів виявлялись аутоантитіла до білків S-100 та НСЕ у групах тварин з імплантованою ГЗФГ та ПНТГ. У той же час у кролів з імплантованою ЕмБТГ визначалось лише помірне та невірогідне збільшення кількості аутоантитіл до ОБМ, а титри ауто-

Таблиця. Середні значення титру аутоантитіл до НСБ після нейротрансплантації, ум. од.

Аутоантитіла	Через 4 міс після імплантації			Через 8 міс після імплантації		
	ОБМ	S-100	НСЕ	ОБМ	S-100	НСЕ
ГЗФГ	5,53±0,53	6,70±0,12*	6,45±0,18*	6,61±0,94	7,62±0,75*	5,93±1,15#
ПНТГ	5,95±0,44	5,75±0,21	5,69±0,23	6,48±0,42	6,12±0,19	9,48±0,45*
ЕмБТГ	5,71±0,37	4,47±0,18	4,37±0,28	6,51±0,34	5,93±0,25	5,75±0,37
Контроль	5,44±0,75	5,44±0,22	4,3±0,44	5,38±0,44	5,56±0,38	4,32±0,28

Примітка: * — вірогідність різниці порівняно з контролем ($p < 0.05$);

— вірогідність різниці порівняно з показниками, одержаними в інших групах ($p < 0.05$).

антитіл до білків S-100 та НСЕ були меншими, ніж у контрольній групі.

На основі отриманих даних можна прийти до висновку, що після імплантації різних типів тканин гіпокампа в організмі реципієнта відбувається повільний розвиток гуморальних аутоімунних реакцій на нейроспецифічні білки, а саме: S-100 та НСЕ. Аутоантитіла до білків S-100 та НСЕ виявляються через 4 міс після імплантації, і їх титри наростають через 8 міс після трансплантації. Отже, явища нейросенсибілізації стійко утримуються у віддалені строки після трансплантації, спрямованість і ступінь їх вираженості безпосередньо залежать від типу імплантованої тканини гіпокампа. Імплантація ГЗФГ призводить до прогресуючого протягом 4 міс та 8 міс наростання титру аутоантитіл до маркера глії — білка S-100, в той час як трансплантація ПНТГ у ці проміжки часу після операції спричинювала подібне інтенсивне наростання титру аутоантитіл до маркера нейронів—

білка НСЕ. Необхідно зазначити, що у групі експериментальних тварин після імплантації ЕмБТГ аутоімунні реакції найменше виражені. У цій групі також спостерігається підвищення титру аутоантитіл, проте воно значно менше виражене порівняно з іншими групами тварин та не є вірогідним.

Вивчені за допомогою світлооптичних та електронномікроскопічних методів дослідження процеси морфологічної інтеграції різних типів трансплантованої тканини гіпокампа з мозком реципієнта показали, що імплантовані ГЗФГ та ЕмБТГ приживляються й адаптуються. Трансплантовані клітини цих тканин спроможні відновлювати пластичні властивості і диференціюватися у зрілі форми відповідно до своєї структурної специфічності. Найменша вираженість структурної інтеграції з мозком реципієнта встановлена після імплантації у мозок ПНТГ. Необхідно наголосити на формуванні та поширенні у зоні імплантації новоутворених судин, що

вказує на значну роль васкуляризації у приживленні та активному функціонуванні імплантованої тканини.

Висновки. Трансплантація нервової тканини зарекомендувала себе як перспективний напрямок реконструктивного малоінвазивного лікування нейродегенеративних і травматичних уражень нервової системи та судинних розладів [7]. На основі багатьох експериментальних досліджень виявлено декілька основних механізмів, за рахунок котрих імплантована тканина може впливати на мозок реципієнта, а саме: виділення нейротрофічних та стимулюючих ріст речовин; постійне дифузне виділення нейрогормонів або нейротрансмітерів в нейропіль реципієнта; іннервація мозку реципієнта із стабільним виділенням медіаторів на фізіологічному рівні; використання імплантованої тканини як матриксу для проростання відростків нейронів, що з'єднують розрізані ділянки ушкодженого мозку; реципрокна іннервація та інтеграція трансплантата з мозком реципієнта [17, 18].

Імплантована тканина може діяти за декількома механізмами одночасно або за допомогою багатьох механізмів у різні строки після трансплантації, залежно від рівня структурно-функціональної інтеграції з мозком реципієнта. Суттєву роль у виборі того чи іншого механізму взаємодії також відіграють характер та місце ураження мозку реципієнта, анатомічна структура, яка використовується як трансплантат, та місце її імплантації.

Дослідження, проведені у різні строки після трансплантації, виявили особливості функціональної активності мозку реципієнта, обумовлені типом імплантованої тканини та тривалістю періоду після імплантації. Це свідчить про структурнозалежну специфічність впливів імплантатів. Доведено, що імплантація різних типів тканини гіпокампа призводить до змін біоелектричної активності мозку реципієнта, як локального, так і системного характеру, що залежать від часу обстеження після трансплантації.

Отримані нами результати вказують на перспективність та безпечність використання трансплантації ембріональної тканини у клінічній практиці. Ця тканина добре приживлюється у мозку реципієнта, зберігаючи при цьому свої пластичні, а також електрофізіологічні властивості. Вона не сприяє формуванню епілептичного вогнища і не викликає явищ нейросенсibiliзації організму реципієнта.

Список літератури

1. *Бережной Г.А.* Прибор для препаративного разделения белков в полиакриламидном геле

// Укр. біохім. журн. — 1978. — Т.50, №1. — С.116—126.

2. *Бережной Г.А.* Выделение и некоторые свойства нейроспецифического антигена Д // Укр. біохім. журн. — 1984. — Т.56, №2. — С.123—126.

3. *Болдырев А.И.* Эпилепсия у взрослых. — М.: Медицина, 1984. — 288с.

4. *Дидимова Е.В., Сванидзе И.К.* Некоторые особенности сократительной активности глиальных клеток в эксплантатах и диссоциированных культурах // Мат. I Всесоюз. симпозиума "Возбудимые клетки в культуре ткани". — Пущино. — 1984. — №8. — С.18—23.

5. *Лапоногов О.А., Цымбалюк В.И., Антоненко В.Г., Костюк К.Р.* Стереотаксический метод трансплантации эмбриональной нервной ткани в лечении эпилепсии у детей // Мат. II съезда нейрохирургов Рос. Федерации (16—19 июля 1998 г., Нижний Новгород). — Нижний Новгород. — С.208.

6. *Палладін А.В., Терлицька Я.Т., Козуліна О.П.* Білки структурних утворень тканини головного мозку // Укр. біохім. журн. — 1970. — Т.42, №2. — С.144—154.

7. *Полежаев Л.В., Александрова М.А.* Трансплантация ткани мозга в норме и патологии. — М.: Наука, 1986. — 151с.

8. *Руководство по культивированию нервной ткани: Методы. Техника. Проблемы / Отв. ред. Б.Н. Вепринцев и др.* — М.: Наука, 1988. — 317с.

9. *Цымбалюк В., Пічкур Л., Цімейко О.* Трансплантация эмбриональной мозговой ткани у больных с органическими поражениями головного мозга // Тези доп. I з'їзду нейрохірургів України (24—26 листопада 1993 р., Київ). — Київ. — 1993. — С.120.

10. *Цымбалюк В.І., Лапоногов О.О., Костюк К.Р.* Аспекти впливу нейротрансплантації на епілептичну активність головного мозку // Укр. мед. часопис. — 1998. — Т. 4, №6, в.7—8. — С.5—16.

11. *Черенько Т.М.* Сенсебилизация к нейроспецифическим белкам у больных с закрытой черепно-мозговой травмой: Автореф. дис... канд. мед. наук. — Киев, 1989. — 26с.

12. *Черченко А., Цымбалюк В., Нагорний Є.,*

- Костюк К.* Епілептогенні властивості глії // Тези доп. I Конгресу Української протіепілептичної ліги. (18—20 вересня 1996 р., Одеса). — Одеса, 1996. — С.66.
13. *Burke J.E.* Neural and glial cell biology: Transplantation disease and regeneration // *Cur. Opin. Neurobiol.* — 1997. — V.7, N.5. — P.593—602.
14. *Buzsaki G., Bayardo F., Miles R., Wong R.K., Gagli F.H.* The grafted hippocampus: an epileptic focus // *Exp. Neurol.* — 1989. — N.105. — P.10—22.
15. *Conningham M., McKay R.* Transplantation strategies for the analysis of brain development and repair // *J. Neurol.* — 1994. — N.241. — P.40—42.
16. *Jones K.S.* Regeneration in the central nervous system — pharmacological innervation, xenotransplantation and stem cell transplantation. *Rewie* // *Clin. anat.* — 1998. — V.11, N.4. — P.263—270.
17. *Madrazo I., Franco-Bourland R., Kostrosky—Solid F. et al.* Neural transplantation (auto—adrenal, fetal nigral and fetal adrenal) in Parkinson's disease: The Mexican experience // *Prog. Res. Med.* — 1990. — V.82. — P.593—602.
18. *Purpura K.P., Gonzales—Monteagudo K.* Acute effects of methoxy pyridoxine on hippocampal end-blade neurons // *J. Neuropathol. and Exp. Ther.* — 1960. — V.19. — P.421.
19. *Saltykov S.* Versuche uber gehirnreplantation zugleich ein Beitrag zur Kenntniss reaktiver Vorgange an den zelligen Gehirnelementen // *Arch. Psychiatr. Nervenkr.* — 1905., V.40 — P.329—388.
20. *Swanson T.H.* The pathophysiology of human mesial temporal lobe epilepsy // *J. Clin. Neurophysiol.* — 1995. — V.12, N.1. — P.2—22.

Влияние гетеротопической трансплантации ткани гиппокампа на динамику функционально-морфологической интеграции с мозгом реципиента

Костюк К.Р.

В статье представлены результаты экспериментальных исследований, направленных на изучение влияния имплантации ткани гиппокампа с различным составом клеточных компонентов на мозг реципиента. Было сформировано три группы животных, которым проводили интрапаренхимальную трансплантацию в сенсомоторную область коры. Первой группе имплантировали эмбриональную ткань гиппокампа, второй — постнатальную, третьей — глиальнообогатенную фракцию ткани гиппокампа. В различные сроки после трансплантации выполнялись электрофизиологические исследования. Изучалась фоновая электрическая активность мозга реципиента при проведении теста с функциональной нагрузкой, теста на судорожную готовность мозга; выяснялась роль нейромедиаторных систем в феноменах биоэлектрической активности мозга. Продемонстрировано развитие гуморальных аутоиммунных реакций на нейроспецифичные белки. Показаны хорошее приживание эмбриональной ткани и глиальнообогатенной фракции гиппокампа и адаптация их к мозговой ткани реципиента. Установлено, что трансплантированные клетки этих тканей могут восстанавливать пластические свойства и дифференцироваться в зрелые формы согласно своей структурной специфичности.

The influence of heterotopic transplantation of hippocampal tissue on functional and morphologic integration with recipient

Kostiuk K.R.

In the article are represented the results of experimental researches directed on learning of influence implantation of hippocampal tissue with various cell components. These experiments were carried on three groups of animals which underwent intraparenchymal transplantation into the sensorimotor cortex. The first group received fetal hippocamp tissue, second — postnatal, thirds — glial-riched hippocampal suspension. In various terms following transplantation the electrophysiological studies are conducted. These studies directed on learning to background electrical activity of a brain of recipient. The test of functional load and test for convulsive readiness of a brain were executed. Also were studied role neuromediator systems in phenomena of bioelectrical activity of a brain. The development of autoimmunological responses to neurospecific proteins is shown. It is shown good survival and adaptation of fetal hippocamp and glial-riched hippocampal suspension. The grafted cells can restore their plastic properties and can be differentiated in the mature forms according to their structural specificity.