

И. Е. СИЗОВ, А. С. ШЕВЕЛЕВ, А. П. БОГДАНОВ

**ОСОБЕННОСТИ ИММУНОЛОГИЧЕСКОЙ ТОЛЕРАНТНОСТИ,
РАЗВИВАЮЩЕЙСЯ В РЕЗУЛЬТАТЕ ТРАНСПЛАНТАЦИИ
АЛЛОГЕННЫХ ЭМБРИОНАЛЬНЫХ КЛЕТОК ЭМБРИОНАМ
ВО ВТОРОМ ТРИМЕСТРЕ БЕРЕМЕННОСТИ**

(Представлено академиком Д. К. Беляевым 24 III 1975)

Известны два способа воспроизведения химеризма и иммунологической толерантности у эмбрионов млекопитающих: получение так называемых аллофенных мышей в результате слияния двух эмбрионов на стадии бластоцисты (³, ⁵) и трансплантация клеток взрослых животных эмбрионам в течение третьего триместра эмбриональной жизни (¹).

Нами разработана методика получения синхронных аллогенных химер в условиях сильной (Н-2) несовместимости в течение второго триместра беременности. В отличие от традиционных методов индукции химеризма и иммунологической толерантности у эмбрионов, мы получали химеры в результате трансплантации донорских эмбриональных клеток реципиентам, находящимся на той же стадии развития. Предполагалось, что данная аранжировка опытов создает оптимальные условия для воспроизведения аллогенных химер.

Для получения датированной беременности 3—7-месячным самкам вводили внутривбрюшинно по 30 ед. сыворотки жеребых кобыл и через 48 час. производили внутривбрюшинную инъекцию хорионального гонадотропина в дозе 30 ед. и подсаживали самцов. О начале беременности судили по возникновению у самок вагинальных пробок. За 2 часа до операции мышам вводили подкожно по 0,1 мл 1% масляного раствора прогестерона в целях уменьшения механической возбудимости мускулатуры матки. Наркоз производили путем внутривбрюшинного введения 0,2 мг барбитала на 1 г веса.

Донорские клетки, имеющие хромосомный маркер Т6, определяли по модифицированному методу (²). 8—13,5-дневным эмбрионам мышей линии (С57В1/6) вводили взвесь клеток диспергированных 8—13,5-дневных эмбрионов (С57В1/6j×СВА/НТ6Т6)_{F₁}(F₁/Н-Т6). Суспензию в количестве 0,01 мл вводили стерильно после разреза кожи живота каждому эмбриону с помощью туберкулинового шприца и иглы № 20 с ограничителем в виде одетого на нее куска пластика. Взвесь клеток готовили на ледяном растворе Хэнкса с таким расчетом, чтобы она содержала в 1 мл 10⁹ живых клеток, и добавляли к 1 мл взвеси 0,01 мл 0,01-процентного раствора трипанового синего для подтверждения после рождения мышат достоверности попадания иглой в эмбрион при введении клеток.

В качестве доноров использовано 178 эмбрионов, имеющих хромосомный маркер Т6, в качестве реципиентов 897 эмбрионов от 99 беременных самок.

При инъекции взвеси клеток диспергированных эмбрионов 8—12-дневным эмбрионам-реципиентам в 100% случаев наступали аборт. При введении эмбриональных клеток 13—13,5-дневным эмбрионам удалось добиться нормального развития и рождения 51 аллогенной химеры, у которых при помощи хромосомной метки установлен тотальный химеризм во всех изученных органах (табл. 1). С возрастом степень химеризма постепенно снижалась и у 6-месячных мышей клетки с хромосомным маркером пол-

Таблица 1

Результаты цитогенетического исследования аллогенных мышинных химер F₁/H-T6→C57Bl/6j

Возраст животных мес.	Число животных	Содержание донорских клеток в органах, %									
		костный мозг	селезенка	лимфатич. узлы	вилочковая железа	печень	почки	семенники	яичники	легкие	кожа
2 недели	9	2,3-16,9 9,8±1,6	1,6-16,3 8,7±2,1	1,3-17,1 8,5±2,3	2,5-16,6 9,6±2,6	0,8-10,9 6,7±1,4	1,0-11,1 6,5±1,3	0,5-8,4 3,4±0,7	0,4-7,9 2,2±0,6	1,9-17,9 10,4±1,2	0,4-4,3 1,9±0,2
1	8	1,1-9,2 4,4±0,8	0,8-8,4 4,5±1,3	1,0-9,6 5,2±1,4	0,8-9,5 4,9±0,9	0,7-7,2 3,9±1,2	0,6-5,9 2,8±0,6	0,4-4,5 1,8±0,5	0,3-3,5 1,4±0,2	1,7-15,2 3,7±0,8	0,2-4,1 1,1±0,4
2	5	0,5-6,8 2,1±0,5	0,6-8,0 1,7±0,8	0,7-7,6 2,3±0,4	0,5-5,9 1,9±0,3	0,6-4,4 1,3±0,2	0,5-4,2 1,2±0,3	0,3-3,9 1,7±0,3	0,3-3,2 1,1±0,1	1,1-11,2 2,2±0,1	0,2-4,0 0,7±0,05
3	11	0,2-3,4 1,3±0,3	0,2-4,2 1,5±0,2	0,3-4,2 1,4±0,1	0,4-4,5 1,7±0,2	0,4-4,1 1,1±0,2	0,4-4,1 1,1±0,2	0,3-3,6 1,3±0,1	0,2-3,1 1,0±0,08	1,0-10,8 1,1±0,1	0,1-9,6 0,6±0,1
4	10	0,1-2,2 0,9±0,23	0,2-2,0 1,1±0,3	0,2-2,1 1,0±0,08	0,3-4,4 1,2±0,1	0,3-4,0 0,8±0,06	0,1-3,9 0,8±0,05	0,2-2,9 1,0±0,08	0,1-2,8 0,5±0,07	0,7-6,5 1,0±0,07	0,1-2,7 0,1±0,02
5	4	0-0,52 0,13±0,04	0,1-0,54 0,22±0,05	0,2-1,6 0,17±0,04	0,2-2,7 0,16±0,04	0-0,7 0,11±0,03	0-0,8 0,08±0,03	0,1-2,1 0,32±0,04	0-1,3 0,04±0,01	0,2-2,1 0,11±0,08	0-0,2 0,02±0,002

Примечание. Верхние цифры в графах обозначают колебания процента донорских клеток в органах, нижние — $M \pm m$. При возрасте животного 6 мес. и более (4 животных) и 2 недели — 3 мес. (8 животных) данные равны 0.

ностью исчезали. По размеру, весу и окраске шерсти химеры не отличались от контрольных мышей реципиентской линии C57Bl/6j того же возраста и пола.

В возрасте 2—4 мес. 21 химере пересадили аллотрансплантаты кожи мышей донорской линии. В этих опытах у химер регистрировалась частичная иммунологическая толерантность к донорским антигенам: кожа отторгалась значительно позднее, чем у контрольных мышей C57Bl/6j, которым не производили инъекций клеток в эмбриональной жизни (табл. 2). Ареактивность была специфичной: пересаженные одновременно лоскуты кожи мышей BALB/c отторгались в те же сроки, что и у контрольных мышей C57Bl/6j.

Таблица 2

Сроки отторжения кожи мышей линии F₁/H-T6 и BALB/c при трансплантации на аллогенные мышинные химеры F₁/H-T6→C57Bl/6j

Реципиенты	Сроки отторжения кожного трансплантата, сутки		P
	F ₁ /H-T6	BALB/c	
Аллогенные мышинные химеры	24,9±0,86	12,8±0,57	<0,01
Интактные мыши (контроль)	11,7±0,46	12,6±0,54	>0,01

Примечание. В обоих случаях в опыте было по 18 животных.

Таблица 3

Результаты подкожной трансплантации тканей эмбрионов линии F₁/H-T6 и C57Bl/6j мышинным химерам F₁/H-T6→C57Bl/6j и интактным мышам C57Bl/6j

Эмбрионы-доноры	Характер суспензии	Число клеток в 1 мл суспензии	Число мышей с опухолью у реципиентов	
			C57Bl/6j	аллогенные химеры F ₁ /H-T6→C57Bl/6j
F ₁ /H-T6	Взвесь изолированных клеток	3·10 ⁶	30/0	36/0
C57Bl/6j			30/0	36/0
F ₁ /H-T6	Взвесь фрагментов органов	—	30/0	36/36
C57Bl/6j			30/30	36/36

Примечание. Слева от черты — общее число реципиентов, справа — число животных с опухолью. Возраст эмбрионов-доноров 13—14 дней. Объем введенной суспензии 0,5 мл.

Поскольку толерантность индуцировали введением эмбриональных клеток, была проверена способность химер реагировать против донорских эмбриональных трансплантационных антигенов путем подкожного введения взвеси фрагментов измельченных 13—14-дневных эмбрионов донорской линии.

Как видно из табл. 3, у всех химер и сингенных мышей через 7—12 дней вырастали опухоли со строением тератомы, тогда как у контрольных мышей C57Bl/6j тератом не было обнаружено. Через 32—56 дней после инъекции у аллогенных химер опухоли регрессировали и полностью рассасывались, тогда как у сингенных химер они сохранялись без изменений в течение 6 мес. (срок исследования).

В других опытах обнаружено полное приживление трансплантатов кожи химер у мышей донорской линии и их 100% отторжение в течение двух месяцев у реципиентов C57Bl/6j, что свидетельствует о гетерогенизации кожи химер и наличии в ней трансплантационных антигенов донорского типа.

Таким образом, у аллогенных мышинных химер, полученных в результате интраэмбриональных инъекций эмбрионам C57Bl/6j клеток эмбрионов гено-

типа (C57Bl/6j×CBA/HT6T6)F₁ регистрировалась только частичная иммунологическая толерантность как к антигенам взрослых доноров (увеличение продолжительности жизни аллотрансплантатов кожи), так и к клеткам эмбрионов того же генотипа (рост тератом). Более выраженную толерантность химер по отношению к эмбриональным клеткам можно объяснить тем, что химеризм был вызван введением клеток эмбрионов.

Отторжение тератом вряд ли было связано с ослаблением иммунологической толерантности к эмбриональным антигенам, поскольку повторные инокуляции фрагментов эмбрионов приводили к новому росту опухоли с периодом выживания, не отличающимся от продолжительности роста опухоли после первичной инокуляции. Более вероятно, что в процессе роста тератом имело место изменение их антигенных свойств в результате наступающей дифференцировки незрелых эмбриональных тканей. Этим же обстоятельством можно отчасти объяснить элиминацию донорских клеток у аллогенных химер. Отторжение аллотрансплантатов кожи донорского генотипа связано, по-видимому, с постепенной элиминацией донорских клеток из организма химер.

Известно, что инъекция взрослых аллогенных клеток эмбрионам в течение третьего триместра беременности обуславливает индукцию полной толерантности к донорским антигенам (¹), тогда как у аллофенных мышей развитие толерантности происходит только в том случае, если в процессе развития эмбриона не наблюдается элиминации одного из генотипов (²). Наши опыты показали, что в случае индукции толерантности в течение второго триместра беременности в опытах воспроизведения синхронных эмбриональных химер степень индуцированной толерантности зависит от скорости элиминации донорских клеток в теле химер, что, возможно, связано с изменением их антигенных свойств в процессе дифференциации. Тот факт, что у химер был химеризм трансплантационных антигенов в коже, дает основание предполагать, что химеризм клеток иммунной системы в условиях наших опытов был менее стабильным, чем химеризм клеток в коже.

Смоленский государственный
медицинский институт

Поступило
24 III 1975

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

¹ R. E. Billingham, L. Brent, P. B. Medawar, *Nature*, № 4379, 603 (1953). ² C. E. Ford, J. L. Hamerton et al., *Nature*, v. 177, 452 (1966). ³ B. Mintz, *Am. Zoologist*, v. 2, 432 (1962). ⁴ B. Mintz, W. K. Silvers, *Science*, v. 158, 1484 (1967). ⁵ A. K. Tarkowsky, *Nat. Cancer Inst. Monogr.*, v. 4, 11, 51 (1963).