

УДК: 612.67.017.1:612.014.3

## РАННИЕ ПРОЯВЛЕНИЯ ИНДУКЦИИ ВОЗРАСТНЫХ ИЗМЕНЕНИЙ Т-КЛЕТОЧНОГО ЗВЕНА ИММУННОЙ СИСТЕМЫ МОЛОДОГО ЖИВОТНОГО ПРИ ГЕТЕРОХРОННОМ ПАРАБИОЗЕ

*ШИТИКОВ Д.В., РОДНИЧЕНКО А.Е., ПИШЕЛЬ И.Н.*

Государственное Учреждение «Институт геронтологии им. Д.Ф. Чеботарева  
Национальной академии медицинских наук Украины»

Старение негативно сказывается на многих системах организма, в том числе и иммунной. На данный момент известны и описаны многочисленные возрастные изменения в иммунологических параметрах организма, которые включают в себя атрофию тимуса, ухудшение гемо- и лимфопоэза, снижение образования наивных лимфоцитов, изменение субпопуляционного состава клеток крови и лимфоидных органов, накопление Т-лимфоцитов с фенотипом клеток иммунологической памяти, снижение способности клеток иммунной системы отвечать на активаторные стимулы [1]. Все это ведет к неэффективному развитию иммунного ответа и сопровождается процессами хронического воспаления, которое, как известно, есть ключевым фактором в патогенезе многих возрастных патологий, в том числе сердечно-сосудистой системы, обмена веществ, онкологических заболеваний. Коррекция этих процессов может способствовать улучшению состояния здоровья представителей старших возрастных групп.

Как известно, Т-лимфоциты играют чрезвычайно важную роль в иммунной системе, участвуя в развитии высокоэффективного адаптивного иммунного ответа, осуществляя клеточные иммунные реакции и регулируя иммунный ответ, и именно они с возрастом претерпевают наиболее выраженные возрастные изменения. С возрастом происходит снижение соотношения CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup> Т-клеток в крови и селезенке; снижается количество наивных Т-клеток и происходит накопление CD44<sup>+</sup> Т-клеток (фенотип Т-клеток иммунологической памяти), которые имеют ограниченные функциональные свойства; падает пролиферативная способность Т-клеток при их активации; изменяется профиль производимых цитокинов [1].

В работах Бутенко Г.М. и сотрудников [2, 3] на модели гетерохронного парабиоза было рассмотрено индукцию старения иммунной системы молодого гетерохронного парабионта. В нашей недавней работе [4] были изучены и более подробно охарактеризованы возрастные изменения в иммунной системе молодого партнера по гетерохронному парабиозу. Было показано, что после 3 месяцев сосуществования в парабиотической паре у молодых гетерохронных

партнеров снижается соотношение CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup> клеток в селезенке, повышается количество Т-клеток с фенотипом клеток иммунологической памяти, снижается фагоцитарная активность макрофагов селезенки, а также снижается пролиферативная активность спленоцитов *in vitro* при их стимуляции ФГА. В то же время индукция возрастных изменений клеточности, массы, либо субпопуляционного состава тимуса выявить не удалось. Иными словами, индукция возрастных изменений в иммунной системе молодых гетерохронных парабионтов произошла в периферическом ее звене, в то время как тимус оставался относительно неизменным. Этот факт может свидетельствовать о том, что возрастные изменения в периферических лимфоидных органах могут играть ключевую роль в развитии возрастных изменений всей иммунной системы.

В последнее время все большее внимание уделяется функциональной роли клеток лимфоидной ниши в обеспечении работы лимфоидных клеток. Известно, что работа Т-лимфоцитов в немалой степени зависит от состояния и активности антиген-презентирующих клеток, способных регулировать работу Т-лимфоцитов [5]. Чрезвычайно важная роль отводится также и клеткам стромы лимфоидных органов. Они обеспечивают правильную структуру и организацию лимфоидных органов, миграцию в них Т-лимфоцитов и антиген-презентирующих клеток, поддержание толерантности к ауто-антигенам [6, 7]. Именно потому мы предполагаем, что изменения в периферической лимфоидной нише могут играть ключевую роль в развитии возрастных изменений Т-клеточного звена иммунной системы, обнаруженных на модели гетерохронного парабиоза.

В недавней работе нашего коллектива [4] были рассмотрены изменения, возникающие в Т-клеточном звене иммунной системы молодого партнера по гетерохронному парабиозу после 12 недель сосуществования. Для выявления и изучения механизма индукции этих изменений наибольший интерес имеет более ранний срок возникновения данных изменений. Определить более ранний срок начала возникновения изменений Т-клеточного звена иммунной системы

молодого партнера в гетерохронной парабиотической паре было целью данной работы.

**МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ**

Опыты проводились на мышах линии СВА/Са разводки ГУ «Институт геронтологии им. Д. Ф. Чеботарева НАМН». В работе использовались молодые (3-5 месяцев, n=23) и старые (23-25 месяцев, n=19) самцы. Животных содержали в условиях вивария при свободном доступе к воде и корму и естественном режиме освещения. При проведении исследований соблюдали международные принципы Хельсинской декларации о гуманном обращении с животными.

Исследования проводили на модели гетерохронного парабиоза. Мышей объединяли хирургическим путем по методу *E. Bunster* и соавт. [8] на срок в 6 недель, после чего через соответствующее время сосуществования проводили эвтаназию с использованием тиопенталового наркоза и у мышей забирали биологический материал на анализ. Анализ состояния Т-клеточного звена иммунной системы проводился у молодых и старых изохронных парабионтов, а также у гетерохронных парабионтов, у которых анализировались молодые и старые партнеры. В качестве возрастных контролей к соответствующим партнерам по гетерохронному парабиозу использовались молодые и старые изохронные парабионты.

В данном эксперименте изучались изменения таких параметров, как вес и клеточность тимуса и селезенки, субпопуляционный состав клеток селезенки и тимуса, пролиферативный ответ на фитогемагглютинин (ФГА) в условиях *in vitro* цельной популяции клеток селезенки, а также изменения фагоцитарной активности макрофагов селезенки. Забор селезенки и тимуса подопытных мышей проводился в стерильных условиях. Органы измельчались в стеклянном гомогенизаторе до суспензии клеток, после чего полученные клетки использовались при анализе названных выше иммунологических параметров.

Пролиферацию спленоцитов *in vitro* оценивали после их стимуляции ФГА (10 мкг/мл, Sigma-Aldrich) [9].  $2 \cdot 10^6$  клеток культивировали в среде RPMI-1640, которая содержала 10 % эмбриональной телячьей сыворотки, 20 ммоль HEPES, 10 ммоль 2-меркаптоэтанол, 100 ед/мл бензилпеницилина, 0,1 мг/мл стрептомицина, в течении 72 часов при температуре 37° С в присутствии или отсутствии ФГА. Интенсивность пролиферации лимфоцитов, измеряли колориметрическим методом с использованием МТТ-теста [10].

Процентный состав субпопуляций Т-лимфоцитов в селезенке и тимусе оценивали иммунофлюоресцентным методом с

использованием антител к антигенам CD4-PE, CD8-PE/TxRD, CD44-APC (PICKCELL Laboratories). Инкубацию с антителами проводили 30 мин на льду в солевом растворе Дюльбекко (pH 7.6) с добавлением 15 mmol HEPES, 0,1 % азидо натрия и 2 % телячьей эмбриональной сыворотки. После отмывки клетки фиксировали в 2 % р-ре параформальдегида. Подсчет относительного количества окрашенных лимфоцитов проводили с использованием проточного цитофлуориметра CyAn™ ADP (DAKO).

Фагоцитарную активность макрофагов селезенки определяли с использованием метода, который основан на морфологическом определении количества частиц латекса, которые поглощаются макрофагами *in vitro*. Для этого,  $1,5 \cdot 10^7$  спленоцитов в 2 мл среды RPMI-1640, содержащей 10 % эмбриональной телячьей сыворотки, вносили в чашки Петри диаметром 35 мм и инкубировали 2 часа при 37 °С. После окончания инкубации все неприлипшие клетки удаляли интенсивным смыванием раствором Хенкса. К оставшимся прилипшим клеткам вносили 0,5 % раствор латекса (в концентрации  $2,5 \cdot 10^8$ /мл), выдерживали в термостате при 37 °С в течение 30 мин, смывали непоглощенный латекс раствором Хенкса. Препарат высушивали при комнатной температуре, фиксировали в метаноле 10 мин и красили по Романовскому-Гимза. При микроскопии окрашенных мазков подсчитывали 100 макрофагов. При этом определяли количество макрофагов, которые поглотили латексные частицы (фагоцитарный индекс - ФИ), а также фагоцитарную активность общей популяции макрофагов селезенки, выраженную через среднее число поглощенных частиц латекса по отношению к общему количеству подсчитанных макрофагов (в дальнейшем условные единицы, у.ед.).

Статистическую обработку результатов проводили с использованием параметрического t-критерия Стьюдента.

**РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ**

Для изучения и сравнения были выбраны параметры иммунной системы, которые наиболее сильно меняются с возрастом, а именно – субпопуляционный состав клеток селезенки, масса тимуса, пролиферативный ответ спленоцитов на стимуляцию ФГА.

Ранее было показано, что сосуществование животных в гетерохронной парабиотической паре сроком в 3 месяца не оказывало негативного влияния на массу и клеточность тимуса молодого гетерохронного парабионта [4]. После 1,5 месяцев сосуществования в гетерохронной парабиотической паре у молодых партнеров не наблюдалось существенного падения массы тимуса (рис. 1А). Клеточность тимуса молодых

партнеров по гетерохронному парабиозу достоверно ( $P < 0,05$ ) снижалась по сравнению с молодыми изохронными животными, но она не достигала уровня старых животных. Как было показано в предыдущей работе [4], в дальнейшем у молодых партнеров по гетерохронному парабиозу также не отмечалось снижения этих параметров до уровня старых животных, и более того, они восстанавливались до уровня молодых изохронных парабионтов.

В предыдущей работе было показано, что наиболее драматические изменения в состоянии иммунной системы молодых гетерохронных парабионтов происходят в периферических лимфоидных органах, хотя срок появления наиболее ранних стойких изменений еще не выяснен. Поэтому следующим этапом нынешней работы было выяснить изменения в периферической иммунной системе на более ранних сроках сосуществования.

Анализ иммунологических параметров у молодых гетерохронных парабионтов выявил индукцию изменений уже после 6 недель сосуществования в парабиотической паре, хотя и не столь остро, как после 12 недель парабиоза. Так, индекс пролиферации спленоцитов при стимуляции их ФГА *in vitro* не менялся между разными экспериментальными группами (рис. 2А), в то время как соотношение  $CD4^+/CD8^+$ -клеток в селезенке молодого гетерохронного парабионта снижалось до уровня старого партнера ( $P < 0,05$ , рис. 2Б). Анализ субпопуляций спленоцитов по маркерам  $CD4^+$  и  $CD8^+$  показал, что этот процесс вполне вероятно происходил из-за снижения количества  $CD4^+$ -клеток (рис. 2В), сопровождаемого также тенденцией к повышению количества  $CD8^+$ -клеток в селезенке молодого партнера по гетерохронному парабиозу (рис. 2Г).

Кроме того, у молодых партнеров по гетерохронному парабиозу было выявлено достоверное повышение количества  $CD8^+44^+$ -клеток в селезенке ( $P < 0,05$ , рис. 3А), что является одним из характерных возрастных изменений состояния иммунной системы, а также ассоциируется с негативным прогнозом для людей старших возрастных групп [11].

Известно, что клетки лимфоидной ниши играют чрезвычайно важную роль в функционировании Т-лимфоцитов, снабжая их трофическими факторами и регулируя их функционирование [12]. Несмотря на всю важность клеток лимфоидной ниши, возрастные изменения ее в данный момент изучены недостаточно. В литературе встречаются данные, которые показывают, что клетки лимфоидной ниши участвуют в регулировке образования клеток иммунологической памяти [13], а также участвуют в поддержании данной популяции в перифериче-

ских лимфоидных органах [14]. В более ранних работах Бутенко Г.М. и сотрудников [15] было показано, что при гетерохронном парабиозе происходит снижение параметров иммунного ответа. В предыдущей статье нами было показано, что после 3 месяцев сосуществования в гетерохронной парабиотической паре в селезенке молодых партнеров происходит достоверное повышение Т-клеток иммунологической памяти, и, кроме того, происходило снижение фагоцитарной активности адгерентных клеток селезенки. Именно поэтому было решено проверить функциональные параметры данной популяции клеток у молодых партнеров по гетерохронному парабиозу после сосуществования в течении 6 недель. Одним из наиболее важных функциональных показателей макрофагов есть их способность к фагоцитозу. Было показано отсутствие изменений в параметрах фагоцитарной активности макрофагов селезенки у молодых партнеров по гетерохронному парабиозу (рис. 4).

Это несколько не сходится с ранее полученными данными, где было показано достоверное снижение фагоцитарной активности и индекса фагоцитоза у общей популяции макрофагов селезенки молодых партнеров по гетерохронному парабиозу, но следует отметить, что в предыдущей работе изучался гораздо более длительный срок сосуществования животных в парабиотической паре – 12 недель. Вполне вероятно, что такие глубокие изменения функциональных свойств произошли при более длительном взаимодействии молодой системной среды со средой старого организма.

В предыдущей работе нами были описаны изменения в Т-клеточном звене иммунной системы молодых животных, сосуществующих в гетерохронной парабиотической паре в течении 12 недель, а также высказано предположение о лидирующей роли изменений в нише Т-клеток, что привело к индукции наблюдаемых возрастных изменений иммунной системы молодого гетерохронного парабионта [4]. В нынешней работе нам не удалось выявить таких серьезных изменений в Т-клеточном звене иммунной системы молодого партнера по гетерохронной парабиотической паре. Тем не менее, нам удалось выявить ряд изменений (изменения в соотношении  $CD4^+/CD8^+$  клеток селезенки, увеличение количества  $CD8^+44^+$ -клеток), которые наличествовали уже на таком сроке сосуществования животных в парабиотической паре, хотя и в гораздо более мягкой форме. Кроме того, в других работах, проведенных на этой модели, было показано, что приблизительно на этом сроке отмечались также возрастные изменения в нервной ткани [16], сердечно-сосудистой системе [17].

Имеются также данные, отмечающие определенные положительные изменения в организме старых партнеров по гетерохронному парабиозу [18], в частности, улучшение регенеративных свойств клеток-предшественников мышечной ткани. Тем не менее, следует отметить, что в цитируемой работе применялся существенно меньший срок сосуществования в парабиотической паре (не более 4 недель), чем тот, который применялся в наших экспериментах, и полученные авторами результаты могли быть следствием влияния прохождения процессов активной регенерации после весьма травматичной операции – хирургического объединения животных. Таким образом, срок в 1,5 месяцев (6 недель) может соответствовать времени начала наиболее драматичных изменений в разнообразных системах организма молодого партнера, а особенно в иммунной системе, и далее эти изменения становятся более выраженными. До сих пор неизвестным остается механизм возникновения и развития изменений состояния иммунной системы, отмечаемых при гетерохронном парабиозе. Вероятными причинами этого может быть обмен клетками и растворимыми факторами крови, в частности: лейко- и лимфоцитами, стволовыми клетками, гормонами и прочими сигнальными белками [16]. В работе [19] было показано, что при парабиозе в нормальных условиях (без воздействия повреждающих ткани факторов) обмен стволовыми клетками между парабионтами как правило не приводит к взаимному встраиванию и дифференцировке стволовых клеток одного партнера в ткани второго партнера. Таким образом, наблюдаемые в нынешнем (и более раннем [4]) исследовании изменения в иммунной системе молодых партнеров по гетерохронному парабиозу могли быть вызваны либо следствием обмена лимфоидными клетками, либо воздействием неких растворимых факторов на иммунную систему молодого партнера.

Было показано, что ранние возрастные изменения в состоянии дифференцировки и, возможно, гомеостатической пролиферации Т-клеток селезенки молодого гетерохронного парабионта происходят уже после 6 недель парабиоза. Уловить и изучить механизмы индукции данных изменений есть задачей для дальнейшей работы.

Авторы выражают благодарность Перегудову Алексею Геннадиевичу, исполнительному директору Института биологии старения (Москва, Россия) за поставку ценных реактивов для данного исследования.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Larbi A., Franceschi C., Mazzatti D. et al. Aging of the immune system as a prognostic factor for human longevity // *Physiology*.– 2008.– **23**, № 2.– P. 64–74.
2. Бутенко Г. М., Губрий И. Б. Изучение механизма угнетения иммунного ответа при парабиозе животных разного возраста // *Бюл. эксперим. биол. мед.*– 1981.– № 9.– P. 318-319.
3. Бутенко Г. М., Губрий И. Б. Первичный иммунный ответ у парабионтов разного возраста // *Бюл. эксперим. биол. мед.*– 1980.– № 4.– Ст. 435-436.
4. Д. В. Шитиков, Т. Н. Янкова, А. Е. Родниченко, И. Н. Пишель. Индукция возрастных изменений в Т-клеточном звене иммунной системы у молодых партнеров по гетерохронному парабиозу // *Пробл. старения и долголетия.*– 2013.– 22, № 1.– С.
5. Cools N., Ponsaerts P., Van Tendeloo V. F., Berneman Z. N. Balancing between immunity and tolerance: an interplay between dendritic cells, regulatory T cells, and effector T cells. // *J. Leukoc. Biol.*– 2007.– **82**, № 6.– P. 1365-1374.
6. Mebius RE, Kraal G. Structure and function of the spleen. // *Nat Rev Immunol.* – 2005. – 5, №8. – P.606-16.
7. Den Haan JM, Mebius R and Kraal G. Stromal cells of the mouse spleen. *Front. Immun.* – 2012. – 3, №201. – doi: 10.3389/fimmu.2012.00201
8. Bunster E., Meyer R. K. An improved method of parabiosis // *Anat. Res.*– 1933.– 57.– P. 339-343.
9. Пишель И., Дубилей Т., Родниченко А., Утко Н., Леонов Ю., Мигован С., Азарскова М., Кирик В., Бадова Т., Евтушенко О.А., Клименко П., Ахаладзе Н., Варус В.И., Мурадян Х., Бутенко Г. Прогрессивное снижение иммунологических функций при гетерохронном парабиозе: результаты предварительного исследования. // *Проблемы старения и долголетия.* – 2008. –17, № 2. – ст.164-172.
10. Mosman T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assay // *J. Immunol Methods.* – 1983. – V. 65, № 1 – P. 55-63
11. Larbi A., Franceschi C., Mazzatti D. et al. Aging of the immune system as a prognostic factor for human longevity // *Physiology*.– 2008.– **23**, № 2.– P. 64–74.

12. Cools N., Ponsaerts P., Van Tendeloo V. F., Berneman Z. N. Balancing between immunity and tolerance: an interplay between dendritic cells, regulatory T cells, and effector T cells. // *J. Leukoc. Biol.*– 2007.– 82, № 6.– P. 1365-1374.
13. Farber D. L. Differential TCR signaling and the generation of memory T cells // *J. Immunol.*– 1998.– 160, № 2.– P. 535-539.
14. Surh C. D., Sprent J. Homeostasis of naive and memory T cells // *Immunity.*– 2008.– 29, № 9.– P. 848-862.
15. Butenko G. M., Gubrii I. B. Inhibition of the immune responses of young adult CBA mice due to parabiosis with their old partners // *Exp. Geront.*– 1980.– 15, № 2.– P. 605-610.
16. Villeda SA, Luo J, Mosher KI, Zou B, Britschgi M, Bieri G, Stan TM, Fainberg N, Ding Z, Eggel A, Lucin KM, Czirr E, Park JS, Couillard-Després S, Aigner L, Li G, Peskind ER, Kaye JA, Quinn JF, Galasko DR, Xie XS, Rando TA, Wyss-Coray T. The ageing systemic milieu negatively regulates neurogenesis and cognitive function. // *Nature.* – 2011. – 477, №7362. – P.90-94.
17. Deyl Z., Butenko G. M., Haussman J. et al. Increased glycation and pigmentation of collagen in aged and young parabiotic rats and mice // *Mech. Aging Develop.*– 1990.– 55, № 1.– P. 39-49.
18. Conboy IM, Conboy MJ, Wagers AJ, Girma ER, Weissman IL, Rando TA. Rejuvenation of aged progenitor cells by exposure to a young systemic environment // *Nature.*–2005. – 433, №17. – P.760-764.
19. Wagers A. J., Sherwood R. I., Christensen J. L., Weissman I. L. Little evidence for developmental plasticity of adult hematopoietic stem cells // *Science.*– 2002.– 297, № 5590.– P. 2256-2259.

**РЕЗЮМЕ**

**РАННІ ПРОЯВИ ІНДУКЦІЇ ВІКОВИХ ЗМІН Т-КЛІТИННОЇ ЛАНКИ ІМУННОЇ СИСТЕМИ МОЛОДОЇ ТВАРИНИ ПРИ ГЕТЕРОХРОННОМУ ПАРАБІОЗІ**

Шитиків Д.В., Родніченко А. Е., Пішель І.Н.

ДУ «Інститут геронтології ім. Д.Ф. Чеботарьова Національної академії медичних наук України»

У статті представлені дані з вивчення змін показників стану імунної системи молодих мишей лінії СВА/Са, кровотворна система яких була об'єднана зі старими мишами цієї ж лінії упродовж 6 тижнів (модель гетерохронного парабіозу). Встановлено, що на цьому терміні співіснування відбувається ряд вікових змін у стані Т-клітинної ланки імунної системи молодого партнера, хоча й не настільки виражених, ніж при більш тривалому співіснуванні тварин у парабіотичній парі. Зроблено припущення, що саме цей термін співіснування характеризується найбільш важливими змінами в показниках стану імунної системи, та є найбільш цікавим для подальшого дослідження виникнення вікових змін імунної системи.

**Ключові слова:** гетерохронний парабіоз, старіння, імунна система, лімфоїдна ніша, Т-клітини, селезінка.

**SUMMARY**

**EARLY PROYAVLENYSS INDUCTIONS OF AGE-DEPENDENT CHANGES OF T-CELLULAR LINK OF THE IMMUNE SYSTEM OF YOUNG ANIMAL AT A GETEROKHRONNOM PARABIOSIS**

Schitikov D.V., Rodnychenko A.E., I.N. Pyshe I.N.

Public institution «Institute of gerontology the name of D.F. Chebotareva of the National academy of medical sciences of Ukraine

The article presents results of investigation of changes in immune system of young mice which had undergone heterochronic parabiosis with old mice during 6 weeks. There were observed age-related changes in T-cell compartment of young heterochronic parabionts. We assume that exactly this term of heterochronic parabiosis is characterized with the most important changes in the immune system of young partners and is the most interesting for further investigation.

**Keywords:** geterokhronnyy parabiosis, senescence, immune system, lymfoydnyaya niche, T-cages, spleen.