

Д. В. Шитіков, М. С. Шкумат, О. В. Бальва,  
Т. М. Янкова, І. М. Пішель

Державна установа "Інститут геронтології  
ім. Д. Ф. Чеботарьова НАМН України", 04114 Київ

## ЗМІНИ РІВНЯ ПРОЛІФЕРАЦІЇ T-ЛІМФОЦИТІВ ПІД ВПЛИВОМ КЛІТИН ЛІМФОЇДНОЇ НІШІ (дослідження на моделі гетерохронного парабіозу)

На моделі гетерохронного парабіозу (1,5 міс) на молодих (3–5 міс) та старих (22–23 міс) самцях мишей лінії *СВА/Са* досліджено вплив старіння на коstimуляторні властивості елементів лімфоїдної ніші T-клітин селезінки. Оцінювалася проліферативна активність T-лімфоцитів у відповідь на стимуляцію мітогеном, вплив на цей показник окремих популяцій периферичної лімфоїдної ніші (*CD11c<sup>+</sup>*-дендритних клітин та популяції клітин селезінки, збагаченої макрофагами) при сумісному культивуванні *in vitro* та вплив клітин лімфоїдної ніші на молекулярні механізми активації T-лімфоцитів. Показано, що дендритні клітини селезінки молодих гетерохронних парабіонтів не мали значимого негативного впливу на проліферативну відповідь T-лімфоцитів при сумісному культивуванні *in vitro*. Виражений негативний вплив на проліферацію T-лімфоцитів *in vitro* мала популяція клітин селезінки, збагачена макрофагами. Цей негативний вплив супроводжувався зниженням експресії фактора RelA та активації каспази 3. Сумісне культивування T-лімфоцитів старих ізохронних парабіонтів із популяцією клітин, збагаченою макрофагами, сприяла корекції проліферативного відгуку. При цьому відзначалися позитивні зміни у молекулярних механізмах активації T-клітин. Найбільш імовірним ключовим фактором у розвитку дисфункції імунної системи молодого партнера по гетерохронній парабіотичній парі є міграція лімфоїдних клітин між партнерами, що може призводити до порушень функціонування клітин лімфоїдної ніші.

**Ключові слова:** гетерохронний парабіоз, дендритні клітини, макрофаги, T-клітини, селезінка.

Вікові зміни імунної системи починають розвиватися одними з найперших, одразу після статевого дозрівання організму. Особливо значні негативні зміни відбуваються в адаптивній ланці імунної системи, головним чином внаслідок змін у популяції *T*-лімфоцитів периферичних лімфоїдних органів [10, 13].

Ефекторні властивості *T*-лімфоцитів з віком значно знижуються. Негативні зміни виражаються у зниженні проліферативної відповіді *T*-лімфоцитів при антигенній стимуляції, погіршуються цитотоксичні функції клітин *T*-кілерів, знижується або стає диспропорційним синтез цитокінів. Також відбуваються зміни у співвідношенні різних популяцій *T*-лімфоцитів: підвищується кількість дефектних *CD8<sup>+</sup>*-ефекторних клітин [20], співвідношення клітин *CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup>* у периферичних лімфоїдних органах та у крові значно знижується, підвищується кількість *T*-лімфоцитів із фенотипом клітин імунологічної пам'яті, знижується утворення наївних *T*-клітин у тимусі [22]. Це все призводить до значних порушень у роботі імунної системи загалом, а порушення її функцій є ключовим фактором у розвитку багатьох вікових захворювань [1]. Саме тому корекція вікових змін у *T*-клітинній ланці імунної системи є перспективним напрямом досліджень.

Велику роль у функціонуванні *T*-лімфоцитів відіграють клітини ніші периферичних лімфоїдних органів. *T*-клітини розташовуються у періартеріолярній муфті селезінки або паракортексі лімфовузлів. *T*-клітинна ніша представлена антигенпрезентуючими клітинами (АПК) та ретикулярними клітинами. Останні забезпечують *T*-лімфоцити трофічними факторами (Іл-7 та Іл-15), а також відіграють важливу роль у підтриманні периферичної толерантності [9, 16].

Властивість презентувати антиген *T*-лімфоцитам мають *B*-клітини, макрофаги (МФ), дендритні клітини (ДК), але професійними АПК, які формують нішу периферичних лімфоїдних органів, є саме останні 2 типи клітин. Ці клітини в залежності від ситуації та оточуючих сигналів здатні як стимулювати, так і інгібувати розвиток імунної відповіді [8].

ДК — це дуже гетерогенний тип клітин, що має декілька типів клітин-попередників та напрямків їх диференціації [14]. Класичним клітинним маркером, що відрізняє їх від інших клітин мієлоїдної гілки гемопоетичних клітин-попередників, є мембранний протеїн *CD11c*. Тим не менш, унікальність цього типу клітин на даний момент підлягає сумнівам, оскільки МФ також мають здатність до презентації антигену *T*-клітинам [11]. Обидва типи клітин, ДК і МФ, завдяки своїй здатності презентувати антигени *T*-лімфоцитам значною мірою регулюють напрямки диференціації та активацію *T*-лімфоцитів. Механізми, за якими здійснюється регуляція функцій *T*-лімфоцитів, містять у собі паракринні взаємодії (цитокіни та хемокіни), а також контактні взаємодії, серед яких особливо велику роль відіграє рецептор *CD28*, що регулює проліферацію *T*-клітини, та її ліганд *CD80/CD86* [23]. Оскільки процес ко-стимуляції є надзвичайно важливим для проліферації *T*-лімфоцитів, то дисфункція АПК може істотно впливати на виникнення вікових змін стану імунної системи.

Механізми старіння T-клітин досліджені вже значною мірою, але вікові зміни клітин мікрооточення T-лімфоцитів, механізми розвитку цих змін та наслідки на даний момент описані набагато гірше. У попередніх роботах, проведених у нашій лабораторії, показано виникнення вікових змін в імунній системі молодих тварин, які мали спільний кровообіг зі старими тваринами, наявні вже через 1,5 міс гетерохронного парабіозу [5]. Тим не менш, припущення про роль змін у властивостях ніші селезінки перевірено не було.

Метою даної роботи було дослідити вікові зміни у функціональних властивостях клітин мікрооточення T-лімфоцитів селезінки на моделі гетерохронного парабіозу.

**Матеріал та методи.** Для визначення впливу гетерохронного парабіозу на костимуляторні властивості клітин мікрооточення T-лімфоцитів використовували молодих (3–4 міс) та старих (23–25 міс) мишей-самців лінії *CBA/Ca* із розпліднику ДУ "Інститут геронтології ім. Д. Ф. Чеботарьова НАМН України", яких утримували в умовах віварію з вільним доступом до води та їжі.

Тварин розподілили на такі експериментальні групи: 1 — молоді ізохронні парабіонти, 2 — молоді партнери по гетерохронним парабіотичним парам, 3 — старі партнери по цим же парабіотичним парам, 4 — старі ізохронні парабіонти. В якості відповідних контрольних груп використовувалися ізохронні парабіотичні пари.

Операції було проведено за методом *E. Bunster* [7]. Після 1,5 міс парабіозу проводилася еутаназія та відбиралися зразки тканин. Пари, де хоча б один із партнерів мав видимі пухлини, вибраковувалися. Проводили аналіз проліферативної відповіді та змін у молекулярних механізмів активації T-клітин під впливом клітин ніші.

Експерименти було проведено у двох блоках. Перший блок було присвячено дослідженню змін властивостей ДК селезінки, другий блок — дослідженню функціональних змін МФ селезінки.

Селезінку виймали в асептичних умовах і поміщали у повне стерильне середовище *RPMI-1640*. У подальшому селезінку гомогенізували, а отриману суспензію спленоцитів використовували для проведення тесту проліферативної активності цільної популяції спленоцитів, виділення клітин ніші селезінки (ДК та МФ), T-лімфоцитів, що використовувалися для проведення тесту проліферативної активності спленоцитів *in vitro* у різних умовах сумісної культивування з клітинами ніші селезінки.

Проліферацію спленоцитів та T-лімфоцитів *in vitro* оцінювали після їх стимуляції фітогемалютиніном (ФГА, 20 мкг/мл, *Sigma-Aldrich GmbH*).  $2 \cdot 10^6$  клітин культивували у повному середовищі *RPMI-1640*, що містило ембріональну телячу сироватку, *HEPES*, 2-меркаптоетанол та антибіотики, протягом 72 год при температурі 37 °C у присутності або відсутності ФГА. Індекс стимуляції (ІС), що характеризує інтенсивність проліферації лімфоцитів, вимірювали колориметрично за допомогою методу, що ґрунтується на здатності живих клітин до хімічного відновлення тетразолія [15].

*T*-клітини виділяли із суспензії спленоцитів за допомогою очистки *T*-клітин у колонках з нейловою ватою (*Polyscience, Inc.*) за методикою, наданою виробником. Кількість клітин підраховували у камері Горяєва з використанням розчину Тюрка.

Протягом першого блоку експерименту проводили виділення та аналіз властивостей загальної популяції ДК селезінки. Виділення проводили за допомогою позитивного відбору за маркером *CD11c* на магнітні частинки з використанням набору реагентів *EasySep (Stemcell Technology)* за протоколом виробників. Для цього селезінку розділяли на 2 половини. З першої половини виділяли *T*-лімфоцити за методом, описаним вище. Іншу половину селезінки лізували за допомогою колагенази *D*, після чого з отриманих клітин виділяли ДК. У пробірці, де проходила стимуляція *T*-лімфоцитів, вносилися *T*-лімфоцити та ДК у співвідношенні 100/1 і проводився тест проліферативної активності *T*-лімфоцитів.

Виділення та аналіз функціональної активності загальної популяції МФ селезінки проводили протягом другого блоку експерименту. МФ селезінки виділяли за загальноприйнятою методикою [3], але з модифікацією методу. Половину селезінки подрібнювали у скляному гомогенізаторі до отримання однорідної суспензії спленоцитів. Далі  $10 \cdot 10^6$  спленоцитів у об'ємі 0,5 мл вносили до пластикової пробірки та інкубували протягом 2 год при 37 °C у середовищі *RPMI-1640* з 10 % ембріональною телячою сироваткою. У подальшому відбирали клітини, що не прилипили до пластику, та пробірку промивали *RPMI-1640*. У подальшому у пробірці, де були нанесені макрофаги, вносили *T*-лімфоцити у приблизному співвідношенні до макрофагів 10/1 та мітоген *T*-клітин (ФГА, 20 мкг/мл).

Вплив МФ та ДК селезінки на проліферацію *T*-лімфоцитів аналізували за допомогою сумісної культивування *T*-лімфоцитів селезінки парабіонтів разом з ДК або МФ селезінки тварин цієї ж експериментальної групи, або разом з ДК та МФ селезінки молодих інтактних тварин. Зміни у молекулярних механізмах активації *T*-лімфоцитів під впливом МФ селезінки аналізували за допомогою імуноблотингу. Для цього *T*-лімфоцити і МФ селезінки парабіонтів виділяли методами, описаними вище. Сумісну культивування проводили за двома схемами, теж наведеними вище: *T*-клітини селезінки парабіонтів культивували разом з МФ селезінки тварин тієї ж експериментальної групи або з МФ селезінки молодих інтактних тварин. Для цього  $5 \cdot 10^6$  *T*-клітин культивували разом з МФ, як описано вище, у присутності або без ФГА (20 мкг/мл, *Sigma-Aldrich GmbH*, США). Стимуляція тривала 2 або 18 год.

Аналіз змін вмісту сигнальних білків проводили з використанням антитіл (АТ) до наступних білків: NFκB p65, IκBa, каспаза 3 (*Santa Cruz*) та β-Actin (*Abcam*, використано в якості референтного білка). В якості вторинних АТ використовували поліклональні АТ до кролячих імуноглобулінів, кон'югованих з пероксидазою хрину (*Abcam*). Цільноклітинні лізати готували за методикою, описаною в [12]. Денситограми нормалізували відносно референтного білка та контрольного зразка, в

якості якого використовували лізат стимульованих *T*-лімфоцитів селезінки від молодих ізохронних парабіонтів або контрольних інтактних тварин.

Статистичний аналіз результатів проводили параметричними (*t*-критерій Стьюдента) та непараметричними (*U*-критерій Вілкоксона — Манна — Уїтні) методами. Наведено середні значення та стандартні відхилення від середнього арифметичного.

**Результати та їх обговорення.** Одним із функціональних параметрів імунної системи є здатність до мітогеніндукованої проліферації *T*-лімфоцитів. Саме тому ми вирішили її перевірити на першому етапі експерименту.

Ми стимулювали загальну популяцію спленоцитів тварин різних експериментальних груп *T*-клітинним мітогеном ФГА (рис. 1), однак не отримали статистично достовірної різниці у рівні проліферації спленоцитів від молодих та старих гетерохронних парабіонтів, і ці дані співпадають з результатами попередніх досліджень [5], де було показано, що 1,5 міс є строком, протягом якого лише починається розгортання вікових змін в імунній системі молодого партнера. Тим не менш, ми отримали статистично достовірне ( $P_{(t)} < 0,05$ ) зниження рівня проліферації спленоцитів від старих ізохронних парабіонтів у порівнянні зі спленоцитами молодих ізохронних парабіонтів (див. рис. 1), що вказує на наявність вікового впливу.

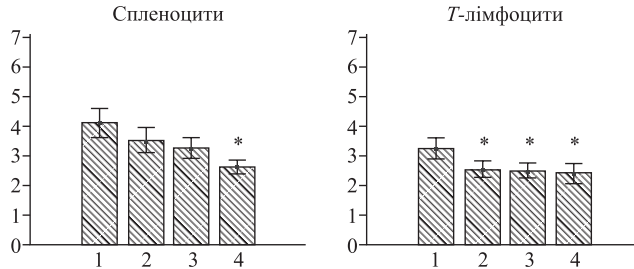


Рис. 1. Індекси проліферації спленоцитів та цільної популяції *T*-лімфоцитів селезінки тварин різних експериментальних груп через 1,5 міс гетерохронного парабіозу. Позначення експериментальних груп (тут і на рис. 2–5): 1 — молоді ізохронні парабіонти, 2 — молоді партнери по гетерохронній парабіотичній парі, 3 — старі партнери по гетерохронній парабіотичній парі, 4 — старі ізохронні парабіонти. \* —  $P_{(t)} < 0,05$  порівняно з молодими ізохронними парабіонтами.

При перевірці проліферативної відповіді популяції очищених *T*-лімфоцитів селезінки було виявлено статистично достовірне ( $P_{(t)} < 0,05$ ) зниження проліферативної активності *T*-клітин селезінки молодих гетерохронних парабіонтів до рівня старих тварин у порівнянні з *T*-лімфоцитами молодих ізохронних парабіонтів (див. рис. 1). Це може свідчити

про наявність індукції негативних змін у здатності  $T$ -клітин селезінки молодих гетерохронних парабіонтів до проліферації.

Роль впливу клітин лімфоїдної ніші на функціонування  $T$ -лімфоцитів значна і полягає у забезпеченні трофічними факторами, регуляції репертуару  $T$ -клітинного рецептору, презентації антигену та стимуляції або пригніченні імунної відповіді [9, 14, 17]. Тим не менш, вікові зміни цього важливого елементу імунної системи нині майже не описані. Ми вирішили перевірити здатність різних типів клітин, що формують нішу селезінки, впливати на проліферацію  $T$ -лімфоцитів. Для цього було створено систему сумісної культивування  $T$ -лімфоцитів та цільних популяції ДК або МФ селезінки тварин різних експериментальних груп *in vitro*.

Значного вікового зниження проліферації  $T$ -лімфоцитів селезінки молодих гетерохронних парабіонтів при їх сумісній культивуванні разом з ДК селезінки тварин їх же експериментальної групи не було отримано (рис. 2). Тим не менш, статистично достовірна ( $P_{(t)} < 0,05$ ) різниця індексу проліферації була присутня між старими і молодими тваринами (див. рис. 2). Сумісна культивування  $T$ -клітин селезінки молодих гетерохронних парабіонтів з МФ селезінки тварин цієї ж експериментальної групи була знижена аж до рівня старих тварин (див. рис. 2,  $P_{(t)} < 0,05$ ).

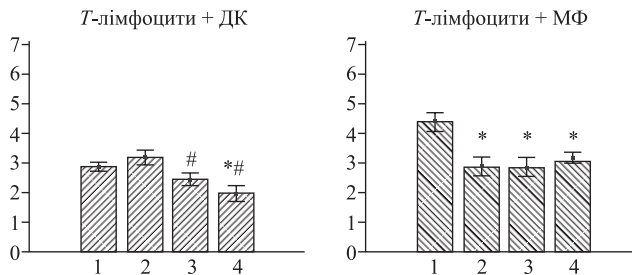


Рис. 2. Індекси проліферації цільної популяції  $T$ -лімфоцитів селезінки тварин різних експериментальних груп у присутності цільної популяції ДК або МФ селезінки тварин тієї ж експериментальної групи через 1,5 міс гетерохронного парабіозу. \* —  $P_{(t)} < 0,05$  порівняно з молодими ізохронними парабіонтами, # —  $P_{(t)} < 0,05$  порівняно з молодими партнерами по гетерохронній парабіотичній парі.

Оскільки найбільший вплив на проліферацію  $T$ -клітин було отримано в популяції МФ селезінки, то вирішено було також перевірити зміни у молекулярних механізмах активації  $T$ -лімфоцитів під їх впливом. Аналіз змін у молекулярних механізмах активації  $T$ -клітин при сумісній культивуванні їх з МФ селезінки тварин однієї експериментальної групи показав статистично достовірне зниження експресії ряду ключових клітинних факторів, що беруть участь у активації  $T$ -лімфоцитів. Після двох годин стимуляції у старих ізохронних парабіонтів у порівнянні з молодими тваринами відзначалося зниження експресії NF $\kappa$ B p65 (RelA) та активованої форми каспази 3, її форми p20 (рис. 3,  $P_{(t)} < 0,05$ ).  $T$ -клітини молодих гетеро-

хронних парабіонтів при їх сумісній культивуванні з МФ селезінки цієї ж експериментальної групи через 2 год стимуляції показали зниження експресії RelA у порівнянні з молодими ізохронними парабіонтами до рівня старих ізохронних парабіонтів без достовірного зниження активації каспази 3 (див. рис. 3,  $P_{(U)} < 0,05$ ). Цікавим є наявність високого рівня проліферації *T*-клітин у молодих ізохронних парабіонтів, незважаючи на високий рівень активації каспази 3.

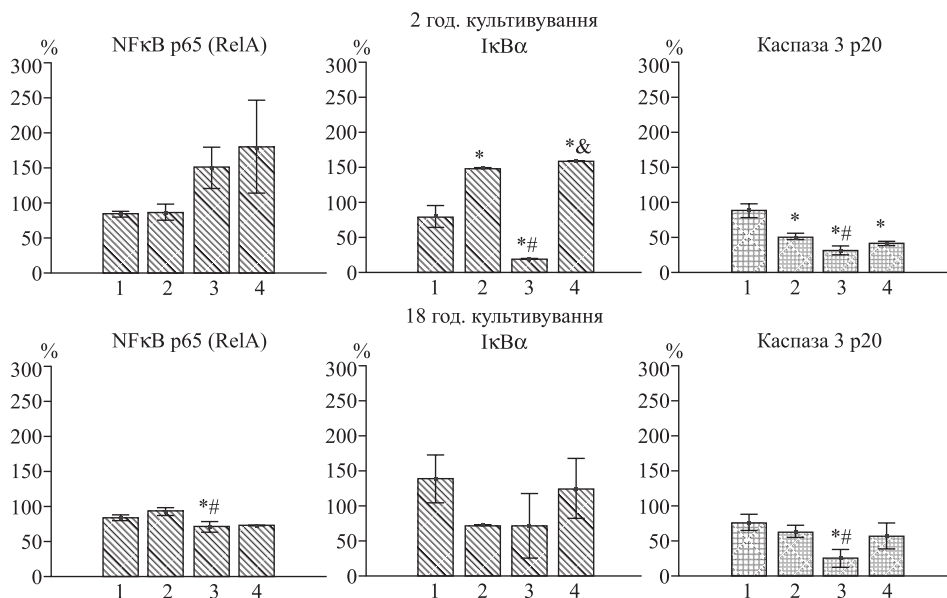


Рис. 3. Зміни відносної експресії факторів NFκB p65 (RelA), IκBα, каспази 3 p20 у *T*-лімфоцитах селезінки тварин різних експериментальних груп при їх сумісній культивуванні з МФ селезінки тварин тих же експериментальних груп протягом 2 год або 18 год. Тут і на рис. 5: \* –  $P_{(U)} < 0,05$  порівняно з молодими ізохронними парабіонтами, # –  $P_{(U)} < 0,05$  порівняно з молодими партнерами по гетерохронній парабіотичній парі.

Достовірних змін у експресії IκBα між тваринами різних експериментальних груп відзначено не було. Після 18 год стимуляції *T*-лімфоцитів селезінки у присутності МФ селезінки тварин цієї ж експериментальної групи було відзначено вирівнювання експресії NFκB p65 (RelA) між *T*-клітинами тварин різних експериментальних груп. Тим не менш, експресія активованої форми каспази 3 не вирівнялася між різними віковими групами (старими і молодими тваринами) і так і залишилася на достовірно вищому рівні у молодих тварин (див. рис. 3,  $P_{(U)} < 0,05$ ).

Поряд із дослідженням впливу клітин ніші селезінки парабіонтів на проліферацію *T*-лімфоцитів було перевірено можливість відновлення проліферативної активності *T*-клітин за допомогою заміни клітин їх ніші. *T*-клітин селезінки парабіонтів сумісно стимулювали *in vitro* разом

з МФ та ДК селезінки молодих інтактних тварин за аналогічними схемами.

Ми знову ж таки не отримали корекції вікових змін проліферативної активності  $T$ -лімфоцитів селезінки старих гетерохронних парабіонтів при їх сумісній культивуванні з ДК селезінки молодих інтактних тварин (рис. 4). На противагу, проліферативна активність  $T$ -лімфоцитів селезінки старих ізохронних парабіонтів достовірно ( $P_{(t)} < 0,05$ ) виросла у порівнянні з проліферативною активністю  $T$ -клітин селезінки тварин інших експериментальних груп при їх сумісній культивуванні з МФ селезінки молодих інтактних тварин (див. рис. 4). Оскільки сумісна культивування  $T$ -лімфоцитів селезінки старих ізохронних парабіонтів зі цільною популяцією МФ селезінки молодих тварин показала відновлення проліферативної активності, було вирішено проаналізувати зміни молекулярних механізмів активації  $T$ -клітин.

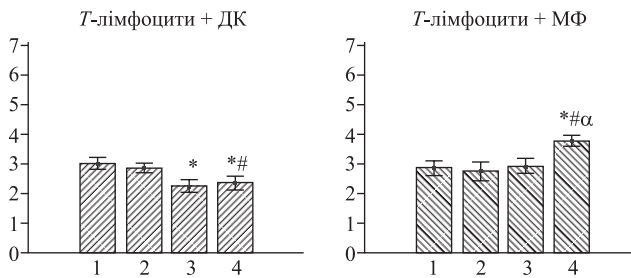


Рис. 4. Індекси проліферації цільної популяції  $T$ -лімфоцитів селезінки тварин різних експериментальних груп через 1,5 міс гетерохронного парабіозу у присутності цільної популяції ДК або МФ селезінки молодих інтактних тварин. \* —  $P_{(t)} < 0,05$  порівняно з молодими ізохронними парабіонтами, # —  $P_{(t)} < 0,05$  порівняно з молодими партнерами по гетерохронній парабіотичній парі, α —  $P_{(t)} < 0,05$  порівняно зі старими партнерами по гетерохронній парабіотичній парі.

Виявилось, що сумісна культивування  $T$ -лімфоцитів селезінки старих ізохронних парабіонтів з МФ селезінки молодих тварин сприяла значному підвищенню експресії NFκB p65 (RelA) на ранніх етапах стимуляції до рівня молодих ізохронних тварин (рис. 5) та експресії активованої форми каспази 3 до рівня молодих тварин при подальшій стимуляції (див. рис. 5), що може вказувати на позитивний вплив сумісного МФ молодих тварин при їх культивуванні з  $T$ -клітинами старих тварин. Відсутність аналогічного впливу на  $T$ -лімфоцити старих ізохронних парабіонтів може бути пояснена змішуванням та взаємодією з клітинами молодої тварини.

Неефективний захист імунної системи від інфекційних агентів з віком призводить до більш тяжкого перебігу інфекційних захворювань. Роль хронічних інфекційних агентів у розвитку та патогенезі багатьох вікових захворювань вже досить давно висвітлюється [3]. Тим не менш, ефективна терапія, що могла б зняти це інфекційне навантаження, на



даний момент ще не розроблена. Численні роботи показують значну роль лімфоїдної ніші у функціонуванні T-лімфоцитів. Тим не менш, вікові зміни клітин лімфоїдної ніші поки що добре не описані.

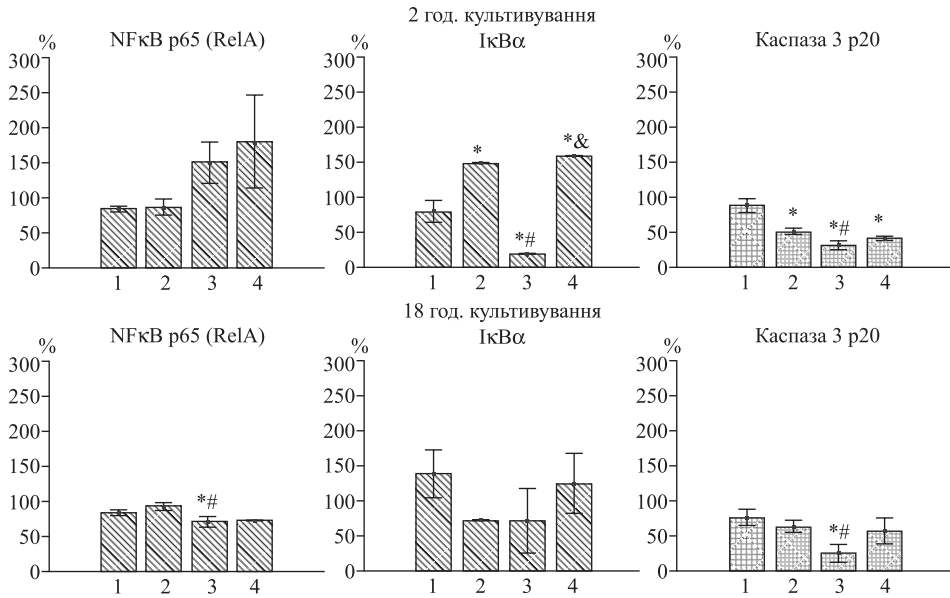


Рис. 5. Зміни відносної експресії факторів NFκB p65 (RelA), IκBα, каспази 3 p20 у T-лімфоцитах селезінки тварин різних експериментальних груп при їх сумісній культивуванні з МФ селезінки молодих інтактних тварин протягом 2 год або 18 год.

Відомо, що ДК та МФ відіграють дуже суперечливі ролі у канцерогенезі. З одного боку, клітини цих типів мають захисні властивості і здатні проводити як прямий клінінг ракових пухлин, так і опосередкований завдяки презентації антигенів імунокомпетентним клітинам [19]. З іншого боку, пухлина створює специфічну нішу, в якій активація ДК та МФ інгібується, що сприяє подальшому розвитку патологічного процесу [6].

Надзвичайно важливу роль відіграє дисфункція МФ у розвитку серцево-судинних захворювань, зокрема у патогенезі атеросклерозу. Неможливість перетравити ліпопротеїнові комплекси призводить до загибелі МФ, що їх поглинають, та у подальшому — до розвитку запального процесу, утворення атероми та ушкодження стінки судини [18]. Неконтрольована міграція МФ, ДК та інших клітин імунної системи у сайт запалення, а також їх нездатність закінчити запальну реакцію сприяє тому подальшому ушкодженню судини і підвищує ризик ускладнень [24].

Попередніми роботами нашої лабораторії було показано, що гетерохронний парабіоз призводить до негативних змін функцій імунної системи молодих партнерів [2, 4]. При цьому механізм виникнення цих

змін до кінця з'ясовано не було. Ми припустили, що порушення у процесах диференціювання та проліферативній здатності *T*-лімфоцитів молодих партнерів по гетерохронному парабіозу можуть бути викликані змінами у функціонуванні клітин лімфоїдної ніші. У нинішній роботі ми підтвердили це припущення і показали, що зміни у функціонуванні *T*-клітин можуть бути пояснені змінами у властивостях окремих типів клітин лімфоїдної ніші.

Нами не було виявлено негативного впливу гетерохронного парабіозу на здатність ДК селезінки молодих гетерохронних парабіонтів регулювати проліферацію *T*-клітин. Відомо, що при парабіозі відбувається активна міграція клітин між партнерами, але клітини, що формують струму органу, як правило не мігрують, у тому числі ДК [21].

Отримані результати вказують на те, що зміни у функціональних властивостях МФ селезінки молодих партнерів по гетерохронному парабіозу можуть відіграти ключову роль у дисфункції *T*-клітинної ланки імунної системи. Так, *T*-лімфоцити селезінки молодого партнера по гетерохронній парабіотичній парі мали гіршу проліферативну активність при їх сумісному культивуванні з МФ селезінки тварин цієї групи. Було відзначено зниження експресії *RelA*, що є ключовим транскрипційним фактором, який значною мірою впливає на проходження антигенстимульованої проліферації *T*-лімфоцитів.

Оскільки умови *in vitro* дають можливість коректувати проліферативну активність *T*-лімфоцитів навіть старих тварин, ми спробували замінити клітини їх лімфоїдної ніші. Сумісне культивування *T*-клітин старих тварин з МФ молодих сприяло відновленню їх проліферативної активності, причому у старих *T*-клітинах відбувалось підвищення експресії *RelA*, що може пояснити механізм відновлення проліферативної активності.

Таким чином, нами було продемонстровано важливість ролі вікових змін у функціональних властивостях МФ селезінки та роль цих процесів у розвитку вікових порушень імунної системи на моделі гетерохронного парабіозу. З нашої точки зору, найбільш імовірним ключовим фактором у розвитку дисфункції імунної системи молодого партнера по гетерохронній парабіотичній парі є міграція лімфоїдних клітин між партнерами, що може призводити до порушень функціонування клітин лімфоїдної ніші.

*Авторський колектив висловлює вдячність виконавчому директору Інституту біології старіння (Москва, РФ) О. Г. Перегудову за допомогу у проведенні дослідження.*

### Список використаної літератури

1. Алибек К., Гречаный Л., Клименко Т., Пашкова А. Пятая революция в медицине: о роли инфекций в патогенезе старения и хронических болезней человека // Лікарська справа. — 2008. — № 1/2. — С. 3–30.
2. Бутенко Г. М., Губрий И. Б. Изучение механизма угнетения иммунного ответа при парабіозе животных разного возраста // Бюл. эксперим. биол. мед. — 1981. — № 9. — Р. 318–319.

3. Дёрфлинг П., Вихнер З. Выделение макрофагов из суспензии спленоцитов // Иммунологические методы / Под ред. Г. Фримеля. — М.: Медицина, 1987. — С. 373–375.
4. Шитиков Д. В., Янкова Т. Н., Родниченко А. Е., Пишель И. Н. Индукция возрастных изменений в Т-клеточном звене иммунной системы у молодых партнеров по гетерохронному парабиозу // Пробл. старения и долголетия. — 2013. — 22, № 1. — С. 29–39.
5. Шитиков Д. В., Янкова Т. Н., Родниченко А. Е., Пишель И. Н. Ранние проявления индукции возрастных изменений т-клеточного звена иммунной системы молодого животного при гетерохронном парабиозе // Імунологія та алергологія. — 2013. — № 1. — С. 29–39.
6. Agrawal A., Agrawal S., Tay J., Gupta S. Biology of dendritic cells in aging // J. Clin. Immunol. — 2008. — 28. — P. 14–20.
7. Bunster E., Meyer R. K. An improved method of parabiosis // Anat. Res. — 1933. — 57, № 4. — P. 339–343.
8. 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.
9. den Haan J. M., Mebius R. E., Kraal G. Stromal cells of the mouse spleen // Front Immunol. — 2012. — 3, article 201. — P. 1–5.
10. Holland A. M., van den Brink V. R. M. Rejuvenation of the aging T cell compartment // Curr. Opin. Immunol. — 2009. — 21, № 4. — P. 454–459.
11. Hume D. A. Macrophages as APC and the Dendritic Cell Myth // J. Immunol. — 2008. — 181. — P. 5829–5835.
12. Kaufmann W. K., Behe C. I., Golubovskaya V. M. et al. Aberrant cell cycle checkpoint function in transformed hepatocytes and WB-F344 hepatic epithelial stem-like cells // Carcinogenesis. — 2001. — 22, № 8. — P. 1257–1269.
13. 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.
14. Merad M., Sathe P., Helft J. et al. The dendritic cell lineage: ontogeny and function of dendritic cells and their subsets in the steady state and the inflamed setting // Annu Rev. Immunol. — 2013. — 31. — P. 563–604.
15. Mosman T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assay // J. Immunol. Methods. — 1983. — 65, № 1. — P. 55–63.
16. Mueller S. N., Germain R. N. Stromal cell contributions to the homeostasis and functionality of the immune system // Nat. Rev. Immunol. — 2009. — 9, № 9. — P. 618–629.
17. Nazimek K., Bryniarski K. The biological activity of macrophages in health and disease // Postepy Hig. Med. Dosw. — 2012. — 66. — P. 507–520.
18. Pinke K. H., Calzavara B., Faria P. F. et al. Proinflammatory profile of *in vitro* monocytes in the ageing is affected by lymphocytes presence. // Immunity & Ageing. — 2013. — 10. — P. 22–32.
19. Shurin M. R., Shurin G. V., Chatta G. S. Aging and the dendritic cell system: implications for cancer // Crit. Rev. Oncol. Hematol. — 2007. — 64, № 2. — P. 90–105.
20. Surh C. D., Sprent J. Homeostasis of naive and memory T cells // Immunity. — 2008. — 29, № 9. — P. 848–862.
21. Swirski F. K., Nahrendorf M., Etzrodt M. et al. Identification of splenic reservoir monocytes and their deployment to inflammatory sites // Science. — 2009. — 325, № 5940. — P. 612–616.

22. Tsukamoto H., Clise-Dwyer K., Huston G. E. et al. Age-associated increase in lifespan of naive CD4 T cells contributes to T-cell homeostasis but facilitates development of functional defects // PNAS. — 2009. — **106**, № 43. — P. 18333–18338.
23. Wang S., Chen L. T lymphocyte co-signaling pathways of the B7-CD28 family // Cell. Mol. Immunol. — 2004. — **1**, № 1. — P. 37–42.
24. Woollard K. J., Geissmann F. Monocytes in atherosclerosis: subsets and functions // Nat. Rev. Cardiol. — 2010. — **7**, № 2. — P. 77–86.

Надійшла 14.04.2014

**ИЗМЕНЕНИЯ УРОВНЯ ПРОЛИФЕРАЦИИ  
T-ЛИМФОЦИТОВ ПОД ВЛИЯНИЕМ КЛЕТОК  
ЛИМФОИДНОЙ НИШИ  
(исследование на модели гетерохронного парабиоза)**

**Д. В. Шитиков, М. С. Шкумат, А. В. Бальва, Т. Н. Янкова,  
И. Н. Пишель**

Государственное учреждение "Институт геронтологии  
им. Д. Ф. Чеботарева НАМН Украины", 04114 Киев

На модели гетерохронного парабиоза (1,5 мес) на молодых (3–5 мес) и старых (22–23 мес) самцах мышей линии *СВА/Са* исследовано влияние старения на костимуляторные свойства элементов лимфоидной ниши *T*-клеток селезенки. Оценивались пролиферативная активность *T*-лимфоцитов в ответ на стимуляцию митогеном, влияние на нее отдельных популяций периферической лимфоидной ниши (*CD11c*<sup>+</sup>-дендритных клеток селезенки и популяции клеток селезенки, обогащенной макрофагами) при сокультивации *in vitro* и влияние клеток лимфоидной ниши на молекулярные механизмы активации *T*-лимфоцитов. Показано, что дендритные клетки селезенки у молодых гетерохронных парабионтов не имели значительного негативного влияния на пролиферативный ответ *T*-лимфоцитов при сокультивации *in vitro*. Выраженное негативное влияние на пролиферацию *T*-лимфоцитов *in vitro* оказывала популяция клеток селезенки, обогащенная макрофагами. Это негативное влияние сопровождалось снижением экспрессии фактора RelA и активации каспазы 3. Сокультивация *T*-лимфоцитов старых изохронных парабионтов с популяцией клеток, обогащенной макрофагами, способствовала коррекции пролиферативного ответа. При этом отмечались позитивные изменения молекулярных механизмов активации *T*-клеток. Наиболее вероятным ключевым фактором в развитии дисфункции иммунной системы молодого партнера по гетерохронной парабиотической паре является миграция лимфоидных клеток между партнерами, что может приводить к нарушениям функционирования клеток лимфоидной ниши.

**INFLUENCE OF LYMPHOID NICHE CELLS ON CHANGES  
IN THE LEVEL OF T-CELL PROLIFERATION  
(study on the model of heterochronic parabiosis)**

**D. V. Shytikov, M. S. Shkumat, A. V. Balva, T. N. Yankova,  
I. N. Pishel**

State Institution "D. F. Chebotarev Institute of Gerontology  
NAMS Ukraine", 04114 Kyiv

Influence of aging on the mice spleen *T*-cell costimulatory properties of peripheral lymphoid niche was analyzed during experiment. Heterochronic parabiosis (3–5 mo. and 22–23 mo. *CBA/Ca* males mice) was used as a study model. Parabiotic pairs were created for 6 weeks. Mitogen-induced proliferation of *T*-cells *in vitro* and influence of splenic CD11c<sup>+</sup> dendritic cells and macrophages on it were analyzed. Also analyzed were changes in the *T*-cellular molecular regulatory mechanisms. The spleen's dendritic cells of young heterochronic parabionts were shown to have no significant negative effect on proliferating response of *T*-cells at co-cultivation *in vitro*. A population of macrophage-enriched splenic cells produced a marked negative effect on *T*-cell proliferation *in vitro*. Such negative effect was accompanied with a decrease in the expression of RelA factor and activation of caspase 3. Co-cultivation of *T*-cells of old isochronic parabionts with a population of macrophage-enriched splenic cells facilitated correction of proliferating response. Positive changes were noted in the molecular mechanisms of *T*-cell activation. Migration of lymphoid cells between partners is a most probable key factor in the development of dysfunction of the immune system of young partner of heterochronic parabiotic pair; this may result in disturbances of the function of lymphoid niche cells.

**Відомості про авторів**

**Лабораторія імунології та патофізіології**

Д. В. Шитіков — м.н.с. (shytikov.dmitrij@gmail.com)

М. С. Шкумат — м.н.с.

О. В. Бальва — м.н.с.

Т. М. Янкова — м.н.с.

І. М. Пішель — гол.н.с., д.м.н.