

УДК 612.67:612.017.1

*И.Н.Пишель, А.Е.Родниченко, Т.Н.Орлова, Д.В.Шитиков, М.Д.Кучма,
М.С.Юзик, Г.М.Бутенко*

НАРУШЕНИЕ ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ ДИФФЕРЕНЦИРОВКИ Т-КЛЕТОК КАК МЕХАНИЗМ УСКОРЕННОГО СТАРЕНИЯ ИММУННОЙ СИСТЕМЫ

Лаборатория патофизиологии и иммунологии (зав. – акад. АМН Украины Г.М.Бутенко)
ГУ “Институт геронтологии АМН Украины”, г. Киев

Резюме. Снижение иммунологических функций с возрастом является хорошо известным фактом. Предполагается, что иммунные нарушения обусловлены либо изменениями в самих лимфоцитах, или их микроокружении, либо гуморальными факторами. С целью выявить пусковой механизм возрастных изменений иммунитета мы создали гетерохронные парабиотические пары с разным сроком сосуществования и определили последовательность возникновения возрастных нарушений у молодых партнеров по гетерохронному парабиозу. Операции по парабиозу были проведены на молодых (3 мес.) и старых (24 мес.) самцах мышей линии СВА/Са, со сроком сосуществования 3, 6 и 12 недель. Были использованы рутинные иммунологические методы исследования и RT-PCR.

Мы получили резкое снижение иммунологических функций у молодого партнера по гетерохронному параби-

озу, которое прогрессировало по мере сосуществования животных. Первичные изменения иммунологических параметров касались состава Т-клеточных субпопуляций в селезенке, первым из которых было резкое повышение относительного количества CD8+CD44+ клеток через три недели после операции. Прогрессивное изменение клеточного состава спленоцитов в конечном итоге привело к снижению функциональных показателей иммунной системы у молодых гетерохронных партнеров.

Полученные результаты свидетельствуют о том, что возрастные изменения, возникающие в иммунной системе молодых гетерохронных партнеров, могут быть опосредованы нарушением периферической дифференцировки Т-лимфоцитов.

Ключевые слова: иммунитет, Т-клетки памяти, периферическая дифференцировка, парабиоз, старение.

Введение. Снижение иммунологических функций с возрастом является хорошо документированным фактом [1, 4]. Это снижение обусловлено наличием множества факторов и механизмов. В их числе – снижение массы и функциональной активности тимуса, процента циркулирующих наивных Т-клеток и повышение количества Т-клеток памяти, изменение спектра продуцируемых лимфоцитами цитокинов, а также изменение активности внутриклеточных каскадов передачи сигнала с мембраны клетки и, как следствие, изменение скорости пролиферации антиген-специфических клонов лимфоцитов, снижение первичного иммунного ответа. С целью выявления пускового механизма возрастных изменений иммунитета мы создали гетерохронные парабиотические пары с разным сроком сосуществования.

Цель исследования. Выявить первичные изменения, возникающие у гетерохронных партнеров, а также определить последовательности и возможные механизмы возникновения возрастных нарушений иммунной системы.

Материал и методы. Эксперименты проведены на молодых (3-4 мес.) и старых (23-25 мес.) мышак-самцах линии СВА/Са. Операции по парабиозу осуществляли согласно методу Bunster et al.

Для установления динамики возникновения возрастных нарушений в эксперимент животных брали одновременно с разными сроками сосуществования. Операции проводились блоками, по 6 групп экспериментальных животных в каждом: Гр. 1 – молодые ложнооперированные; Гр. 2 – молодые, изохронный парабиоз; Гр. 3 – молодые, гетерохронный парабиоз; Гр. 4 – старые гетерох-

ронный парабиоз; Гр. 5 – старые, изохронный парабиоз; Гр. 6 – старые, ложнооперированные.

В день эксперимента мышак подвергали тиопенталовому наркозу и обескровливали. Селезенку и тимус извлекали в асептических условиях и измельчали в стеклянном гомогенизаторе со стерильным раствором RPMI-1640.

Пролиферацию клеток *in vitro* оценивали после их стимуляции ФГА при помощи метода, который основывается на способности живых клеток к химической редукции МТТ тетразолия [2].

Процентный состав субпопуляций Т-лимфоцитов в селезенке и тимусе оценивали иммунофлуоресцентным методом с использованием антител к антигенам CD3-FITC, CD4-PE, CD8-TxRD, CD44-APC (PICKCELL Laboratories). 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*. При этом определяли количество макрофагов, которые поглотили латексные частицы (фагоцитарный индекс – ФИ), определяли среднее количество частиц латекса в одном фагоцитирующем макрофаге (фагоцитарное число), а также фагоцитарную активность – количество поглощенных частиц латекса деленное на общее количество подсчитанных макрофагов.

Статистическую обработку результатов проводили с использованием t критерия Стьюдента и U критерия Вилкоксона-Манна-Уитни.

Результаты исследования и их обсуждение.

Показано, что гетерохронный парабиоз практически не оказывает влияния на массу тимуса молодых партнеров (рис. 1А). В то же время происходит достоверное по отношению к изохронному парабиозу снижение пролиферативной активности Т-лимфоцитов (рис. 1Б). Поскольку масса тимуса практически не менялась, следует предположить, что снижение пролиферативной активности происходит за счет изменения субпопуляционного состава спленоцитов, который может быть индуцирован миграцией клеток от старого партнера. Следует отметить, что эксперименты по изучению миграции клеток у парабионтов показали отсутствие дифференцировки циркулирующих стволовых клеток в клетки нелимфоидных органов [3]. Поэтому все эффекты, полученные в исследовании, можно объяснить преимущественно миграцией гемопоэтических клеток и взаимным влиянием двух кроветворных систем. Это предположение подтверждается также исследованием, которое показало, что летальное облучение старого партнера значительно снижает его ингибирующее влияние на иммунную систему молодого.

Мы проверили динамику изменения субпопуляционного состава селезенки при гетерохронном парабиозе. Установлено, что по мере сосуществования и взаимной миграции лимфоцитов происходит существенное изменение соотношения популяций Т-клеток в селезенке молодых партнеров по гетерохронному парабиозу.

Соотношение CD4+/CD8+ клеток в селезенке через 6 нед. после операции снижалось до уровня старых и оставалось на этом уровне до максимального исследуемого срока – 12 нед. (рис. 2Б; $P_{(t)} < 0,05$). Это снижение наблюдалось, в основном, благодаря снижению общего количества CD4+-клеток, которое наблюдалось в этот же период (рис. 2А; $P_{(t)} < 0,05$).

Еще одно изменение в составе популяций Т-клеток – это повышение относительного количества CD8+/CD44+ -клеток памяти в селезенке молодых партнеров по гетерохронному парабиозу. Эта популяция клеток существенно увеличивается уже через три недели после операции (рис. 2Г; $P_{(t)} < 0,05$), остается на этом же уровне через 6 недель, и снижается к 12 нед. парабиоза. Это первое стабильное возрастное изменение, появляющееся в ранние сроки после операции.

Установлено также увеличение количества CD4+/CD44+-клеток памяти в селезенке молодых партнеров через 12 нед. после операции (рис. 2В; $P_{(t)} < 0,05$).

Эффект ускоренного старения у молодых партнеров проявляется уже через три недели после операции и активно прогрессирует по мере сосуществования животных. Причем чем дольше срок парабиоза – тем более многочисленны и выражены возрастные изменения. Все эффекты, полученные в исследовании, можно объяснить преимущественно миграцией лимфоидных клеток и взаимным влиянием двух лимфоидных систем, включая лимфоциты, системные факторы сыворотки крови и клетки микроокружения.

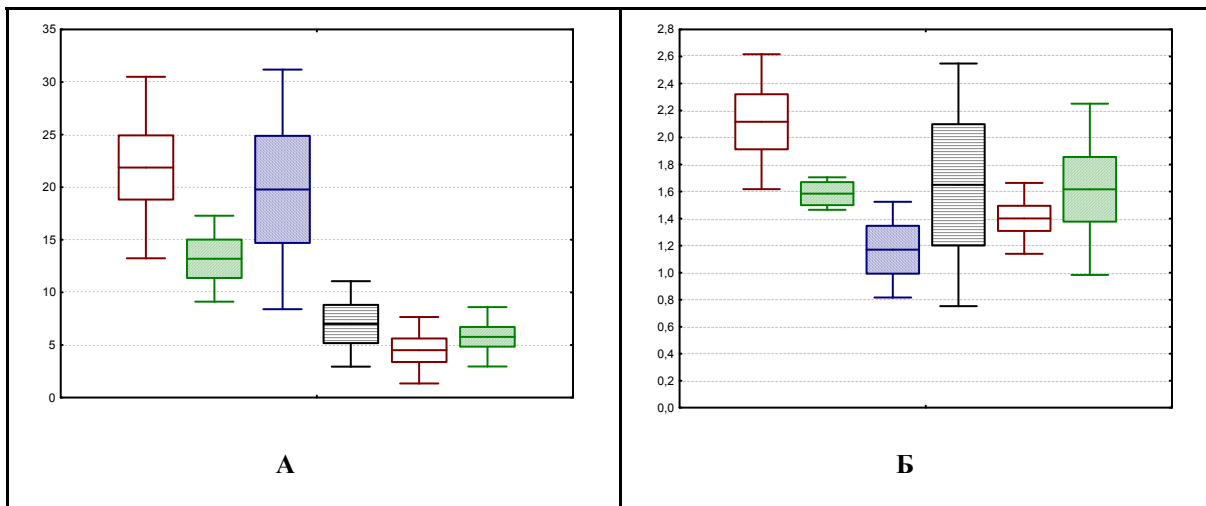
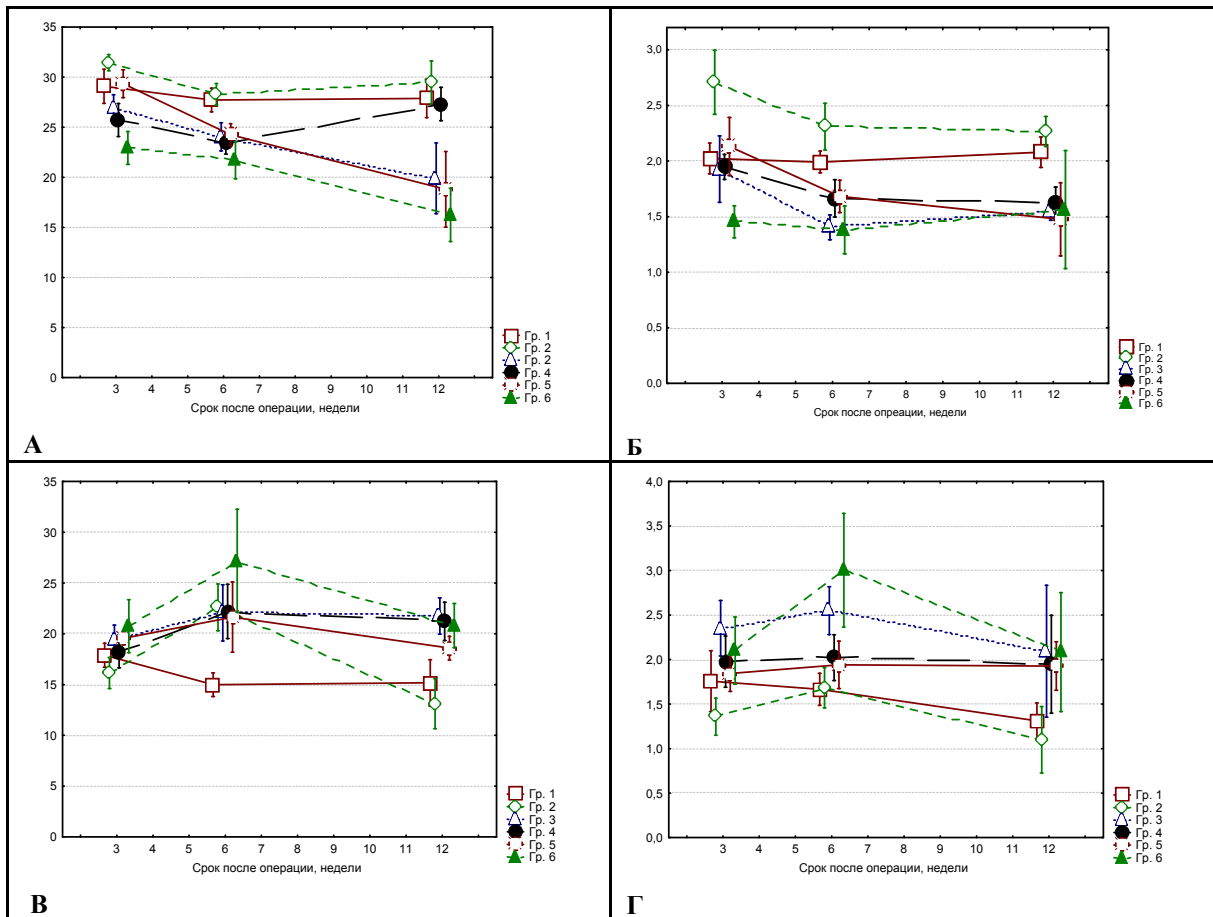


Рис. 1. Масса тимуса (А, мг) и пролиферативная активность спленоцитов (Б, у.ед.) у животных разных экспериментальных групп через 12 месяцев после операции

Примечания. 1. Номера групп животных указаны с 1 по 6 слева на право (по порядку). 2. Указаны среднее значение (центральная полоса), ошибка средней (верхняя и нижняя границы столбика) и среднеквадратическое отклонение (вертикальные границы разбросов). 3. * - $P_{(t)} < 0,05$ по отношению к соответствующему изохронному контролю



Вывод

Полученные результаты свидетельствуют о том, что возрастные изменения, возникающие в иммунной системе молодых гетерохронных партнеров, могут быть опосредованы нарушением периферической дифференцировки Т-лимфоцитов.

Благодарности. Работа выполнена при поддержке Института биологии старения (Москва, Россия).

Литература

1. Grubeck-Loebenstien B. The aging of the immune system / B.Grubeck-Loebenstien, G.Wick // Adv. Immunol. – 2002. – Vol. 80. – P. 243-284.

2. Mosman T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assay / T.Mosman // J. Immunol. Methods. – 1983. – Vol. 65. – P. 55-63.
3. Wagers A.J. Little Evidence for Developmental Plasticity of Adult Hematopoietic Stem Cells / J.Wagers, R.I.Sherwood, J.L.Christensen [et al.] // Science. – 2002. – Vol. 297, № 5590. – P. 2256-2259.
4. Weng N.P. Aging of the immune system: how much can the adaptive immune system adapt? / N.P.Weng // Immunity. – 2006. – Vol. 24. – P.495-499.

ПОРУШЕННЯ ПЕРИФЕРИЧНОГО ДИФЕРЕНЦЮВАННЯ Т-КЛІТИН ЯК МЕХАНІЗМ ПРИСКОРЕНОГО СТАРІННЯ ІМУННОЇ СИСТЕМИ

І.Н.Пішель, А.Е.Родниченко, Т.Н.Орлова, Д.В.Шитіков, М.Д.Кучма, М.С.Юзик, Г.М.Бутенко

Резюме. Зниження імунологічних функцій з віком є добре відомим фактом. Передбачається, що імунні порушення зумовлені або змінами в самих лімфоцитах, їх найближчому мікрооточенні, або гуморальними чинниками. З метою виявлення пускового механізму вікових змін імунітету ми створили гетерохронні парабіотичні пари з різним терміном співіснування, а також визначили послідовність виникнення вікових порушень у молодих партнерів по гетерохронному парабіозу. Операції по парабіозу проведені на молодих (3 міс.) і старих (24 міс.) самцях мишей лінії СВА/Са, з терміном співіснування 3, 6 і 12 тижнів. Використані рутинні імунологічні методи дослідження і RT-PCR. Отримано різке зниження імунологічних функцій у молодого партнера по гетерохронному парабіозу, яке прогресувало в міру співіснування тварин. Первинні зміни імунологічних параметрів стосувалися складу Т-клітинних субпопуляцій у селезінці, першим з яких було різке підвищення відносної кількості CD8+CD44+ клітин через три тижні після операції. Прогресивна зміна клітинного складу спленоцитів зрештою призвела до зниження функціональних показників імунної системи в молодих гетерохронних партнерів. Отримані результати свідчать про те, що вікові зміни, які виникають в імунній системі молодих гетерохронних партнерів, можуть бути опосередковані порушенням периферичного диференціювання Т-лімфоцитів.

Ключові слова: імунітет, Т-клітини пам'яті, периферичне диференціювання, парабіоз, старіння.

IMPAIRMENT OF PERIPHERAL DIFFERENTIATION OF T-CELLS A MECHANISM OF ACCELERATED AGING OF THE IMMUNE SYSTEM*I.N.Pishel, A.E.Rodnichenko, T.N.Orlova, D.W.Shitikov, M.D.Kuchma, M.S.Yuzik, G.M.Butenko*

Abstract. A decrease of the immune functions with age is a well established fact. It can be assumed that this decrease is caused either by changes in the cells and lymphoid organ or by some humoral factors or due to some unknown regulatory influences at the cell population level. In order to analyze the trigger mechanism of age-related changes in the immune system we made the heterochronic pairs with different terms of coexistence. Objectives: to determine the sequence of age-related alterations in the young immune system. Methods. Young and old male CBA/Ca mice were joined by parabiosis. Total 6 groups were made: young and old single controls, young and old isochronic pairs, and heterochronic pairs, each group having 3, 6 and 12 weeks of coexistence. Routine immunological methods and RT-PCR were used. Results. We observed age changes of the immune parameters in young heterochronic partners, which were progressing with an increasing term of animal coexistence. Initial changes in the immune parameters of the young heterochronic partners refer to the T-cell subpopulations in the spleen. The first change noticed was the increase of high proliferate CD8+CD44+ cell number after 3 weeks of pair coexistence. The progressive age-related changes in the T-cells subpopulations caused a complete dysfunction of the immune system, such as decrease of primary immune response to SRBC, PHA-stimulated lymphocyte proliferation in vitro, and splenic macrophage phagocytic function in young heterochronic partners. Conclusion. These results may suggest that primary age-related changes in young heterochronic partners may develop in T-cells migration and homeostatic differentiation.

Key words: immunity, memory T-cell, homeostatic differentiation, parabiosis, aging.

Ukrainian Academy of Medical Science, Institute of Gerontology (Kyiv)

Рецензент – доц. Н.В.Черновська

Buk. Med. Herald. – 2009. – Vol.13, №4.–P.227-230

Надійшла до редакції 6.08.2009 року

© И.Н.Пишель, А.Е.Родниченко, Т.Н.Орлова, Д.В.Шитиков, М.Д.Кучма, М.С.Юзик, Г.М.Бутенко, 2009

УДК 616.681-053.1-053.31]-092:618.3-008.6

*С.М.Потапов, А.Ф.Яковцова***РОЛЬ ПРЕЕКЛАМПСІЇ В ПОРУШЕННІ МОРФОФУНКЦІОНАЛЬНОГО СТАНОВЛЕННЯ КЛІТИН ЛЕЙДИГА СІМ'ЯНИХ ЗАЛОЗ ПЛОДІВ**

Кафедра патоморфології (зав. – проф. В.Д.Марковський)
Харківського національного медичного університету

Резюме. Проведено морфологічне та морфометричне дослідження впливу прееклампсії на клітини Лейдига у плодів і новонароджених. Виявлені зміни стосуються будови і морфометричних параметрів даних клі-

тин. Ступінь виразності змін прямо пропорційна ступеню тяжкості прееклампсії.

Ключові слова: прееклампсія, сім'яна залоза, клітина Лейдига.

Вступ. Андрологічна патологія є не тільки причиною різних сексуальних порушень, що ведуть до формування комплексу неповноцінності, психічним порушенням і репродуктивним проблемам у шлюбі [5], але й нерідко супроводжується порушенням синтезу тестостерону, якому властива виражена анаболічна активність. Наслідком зниженої продукції тестостерону є порушення синтезу білків, еритропоезу, затримка закриття епіфізарних зон росту і формування різноманітної патології систем організму [3, 6]. У зв'язку з цим, тестостерон є показником не тільки статевого, але і соматичного стану чоловіка протягом всього його життя [1, 7]. Відомо, що затримка статевого дозрівання юнаків, найбільше часто має місце в дітей, народжених від матерів з патологічним впливом вагітності [1] і трапляється з частотою від 0,4 до 9,8 % [4].

Мета дослідження. Вивчення морфофункціонального стану клітин Лейдига плодів і ново-

народжених від матерів із прееклампсією різного ступеня тяжкості.

Матеріал і методи. Всі спостереження розділені на групи: "ПЕ 1", "ПЕ 2" і "ПЕ 3" (відповідно плоди і новонароджені від матерів, вагітність яких була ускладнена ПЕ легкої, середньої тяжкості й тяжкої ПЕ). Групу контролю ("К") склали плоди і новонароджені від матерів з фізіологічною вагітністю. Загальна кількість спостережень – 75. Причинами смерті плодів було гостре порушення матково-плацентарного і пуповинного кровообігу.

Тканину сім'яних залоз (СЗ) піддавали стандартній проводці і заливці в парафін, після чого виготовляли зрізи товщиною $4-5 \times 10^{-6}$ м, які фарбували гематоксиліном і еозином. При оглядовій мікроскопії оцінювали гістологічні особливості клітин Лейдига, після чого вивчали їх морфометричні параметри: середню площу ядра, клітини і цитоплазми, а також ядерно-цитоплазматичне

© С.М.Потапов, А.Ф.Яковцова, 2009