Інститут геронтології АМН України

На правах рукопису

Максюк Тетяна Володимирівна

ВІКОВІ ОСОБЛИВОСТІ ВЗАЄМОДІЇ СТРОМАЛЬНИХ І КРОВОУТВОРЮЮЧИХ КЛІТИН КІСТКОВОГО МОЗКУ

14.00.17 - Нормальна фізіологія

Автореферат
дисертації на здобуття наукового ступеня
кандидата біологічних наук

Київ - 1995

ЛННБ України ім.В.Стефаника
00777915 (-)

Дисертацією є рукопис.

Робота виконана в інституті геронтології АМН України

Науковий керівник: академік АМН України, член-кореспондент НАН України та АМН Росії, доктор медичних наук, професор Г.М.Бутенко

Офіційні опоненти: доктор біологічних наук, професор І.М.Алексєєва

доктор медичних наук З.Д. Савцова

Провідна організація: Науковий центр радіаційної медицини АМН України

Захист відбудеться "20" квітня 1995 р. о 11[00] годині на засіданні спеціалізованої вченої ради Д 001.28.01 при Інституті геронтології АМН України (Київ-114, вул. Вишгородська, 67).

З дисертацією можна ознайомитися у бібліотеці Інституту геронтології АМН України.

Автореферат розісланий "10" березня 1995 р.

ЛНБ ім. В. Стефаника
АН України

Вчений секретар
спеціалізованої вченої ради Р.І.Потапенко

Ав-32.058

Актуальність проблеми. Система кровоутворення і імуногенезу є ключовою в життєзабезпеченні і збереженні цілісності організму і виду. Диференційовані ефекторні клітини з різних кровоутворюючих ростків та молекули, які вони виробляють, приймають участь в транспорті дихальних газів і тканинному газообміні (еритроцити), здійснюють імунний нагляд (клітини лімфоїдного, макрофагального, гранулоцитарного ростків), беруть участь в репарації тканинних пошкоджень (макрофаги, тромбоцити).

Порушення нормального функціювання системи кровоутворення і імуногенезу відіграє важливу роль у патогенезі ряду захворювань, які розвиваються при старінні і є ведучими чинниками смерті (атеросклероз та його ускладнення, злоякісні пухлини, інфекції, імунопатологія та інші) (Д.Ф.Чеботарьов, В.В. Фролькіс, та ін., 1990).

Гістогенез кровоутворюючої і імунної систем ссавців - це є процес диференціювання родових кровоутворюючих клітин кісткового мозку від стадії поліпотентних попередників до стадії диференційованих елементів крові і системи імунітету.

В процесі розвитку організму система імунітету зазнає дуже значних вікових змін, які приводять до зниження ефективності імунних реакцій при старінні більше, ніж на порядок (Г.М. Бутенко та ін., 1985, M.E. Weksler, 1990).

Механізми таких зрушень залишаються нез'ясованими до цього часу. Чітко продемонстровані вікові зміни лише в одному первинному органі імунітету - тимусі. Відносно вікових змін у клітинах кісткового мозку даних небагато і вони суперечливі. Потребує уточнення "локалізація" дефекту в системі гемо-, імунопоезу: чи зміни виникають в уже диференційованих клітинах-ефекторах чи з'являються на більш ранніх ступенях розвитку

цих клітин. Ще менш вивченим є питання про вікові зміни стромальних клітин кісткового мозку, котрі є складовою частиною мікрооточення кровоутворюючої тканини. Між тим відомо, що функціювання цих клітин відіграє важливу роль в проліферації і диференціюванні гемопоетичних клітин. І останнє, потребує детальної розробки питання про те, чи пов'язані зміни в системах кровоутворення і імунітету з їх генетично обумовленою програмою старіння кожної клітини, чи вони виникають як реакція на зміни (старіння) макро- і мікрооточення. Є докази того, що із факторів макрооточення - нейроендокринна система як регулятор і координатор багатьох фізіологічних процесів посідає центральне місце серед впливів, які викликають вікові порушення функцій систем гемо-, імунопоезу (L.Piantanelli et al., 1980). З другого боку, стромальне мікрооточення кровоутворюючих і лімфоїдних органів створює умови, що дозволяють чи не дозволяють родовим гемопоетичним клітинам реалізувати певні можливості, котрі закладено в їхньому генетичному апараті (О.О. Лурія, О.Я. Фріденштейн, 1981).

Мета та задачі дослідження. Виходячи з вищезгаданого, основною метою роботи було з'ясування вікових особливостей проліферації, диференціювання і взаємодії кровоутворюючих та стромальних клітин кісткового мозку, а також оцінка внеску макрооточення в зміни цих процесів при старінні.

Відповідно поставленій меті було сформульовано такі задачі: 1) вивчити абсолютний і відносний вміст, а також проліферативну активність родових клітін, так званих колонієутворюючіх клітин селезінки (КУК-С) та комітованих колонієутворюючих клітин, гранулоцитарно-макрофагальних попередників (КУК-ГМ), в кістковому мозку молодих і старих тварин; 2) охарактеризувати у тварин різного віку вміст і проліферативну активність

стромальних клітин кісткового мозку, які здатні формувати колонії фібробластів in vitro (КУК-Ф); 3) дослідити вікові особливості функціювання і взаємодії кровоутворюючих і стромальних клітин в інтактному кістковому мозку та в стані репарації; 4) оцінити відносний внесок внутрішнього середовища цілісного організму і мікрооточення кісткового мозку в вікові особливості функціювання кровоутворюючих і стромальних клітин.

Наукова новизна. Отримані нові дані про різну ступінь вікових змін у кількості та проліферативній активності кровоутворюючих і стромальних клітин-попередників кісткового мозку.

Використання експериментальних моделей з гетерохронним вмістом клітинних елементів дозволило виявити ряд нових віково-специфічних рис в функціюванні кровоутворюючої системи кісткового мозку. Вперше показано пригноблюючу дію гемопоетичних клітін кісткового мозку старого донора на стромальні клітини-попередники фібробластів у молодого опроміненого реципієнта; вперше показано,що стромальна тканина кісткового мозку старої тварини після пошкодження не відновлювала свої функції мікрооточення. Виявлено, що вплив внутрішнього середовища старого організму на кровоутворюючу систему опосередковується через мікрооточення кровоутворюючих органів.

Отримані нові дані про вплив на кровоутворюючу систему старих тварин з боку молодих партнерів по парабіозу.

Теоретична та практична цінність. Отримані результати важливі для пояснення механізмів вікових змін систем гемо- та імунопоезу. Результати досліджень свідчать про те, що джерелом сигналів, специфічно модулюючих функції систем кровоутворення і імунитету при старінні, є внутрішнє середовище цілісного організму. Показано, що вплив таких сигналів опосередковується, зокрема, через стромальну тканину мікрооточення кісткового

мозку, де відбувається проліферація і комітування кровоутворюючих клітин, в тому числі майбутніх ефекторів імунітету. Таким чином, детермінація вікових особливостей імунної системи відбувається вже на ранніх етапах гемо- і імунопоеза. Встановлення цього факту може бути важливим в спрямованому пошуку шляхів корекції вікових змін в системі імунітету, що є необхідним для успішного лікування та профілактики деяких захворювань людей похилого віку.

Розроблені експериментальні моделі, які дозволяють оцінити in vivo вплив внутрішнього середовища організму на функціювання кровоутворюючих і стромальних клітин кісткового мозку. Дані моделі можуть бути використані як в експериментальних дослідженнях в галузі клітинної біології, так і в клінічній гематології і імунології, а також в практиці лабораторій, які досліджують вплив шкідливих факторів довкілля, зокрема, гемо- і імунотоксичних.

Основні положення, що виносяться на захист, базуються на результатах, одержаних особисто пошукувачем.

1. Зміни вмісту кровоутворюючих клітин-попередників кісткового мозку при старінні відрізняються в окремих субпопуляціях (КУК-С і КУК-ГМ). Співвідношення між гемопоетичними проліферуючими клітинами і клітинами в стані спокою, з віком майже не змінюється.

2. Вміст стромальних клітин-попередників (КУК-Ф) кісткового мозку збільшується з віком тварин. Проліферативний потенціал цих клітин при цьому не змінюється.

3. Вікові зміни у функціюванні і взаємодії стромальних і кровоутворюючих клітин, чітко проявляються лише при регенерації кровоутворення в кістковому мозку після жорстких пошкоджуючих дій.

4. Зміни окремих характеристик кровоутворюючої і стромальної

тканини кісткового мозку в системі гетерохронного парабіозу спостерігаються у обох партнерів. Вплив старого і молодого організму на партнерів протилежного віку має різноспрямований характер.

Апробація роботи. Результати дослідження були повідомлені та обговорені на Всесоюзній школі-семінарі молодих вчених і спеціалістів " Старіння і патологія" (Тернопіль, 1989), на засіданні лабораторії імунології Інституту геронтології при медицинському Університеті ім. Земмельвейса (Будапешт, 1990), на засіданнях Українсько-Ізраїльського симпозіуму "Механізми старіння" (Київ, 1993), на конференції в Марбургському університеті (Марбург, 1993), на II конгресі геронтологів та геріатрів України (Київ, 1995), на наукових конференціях інституту геронтології АМН України.

Публікації. По матеріалам дисертації опубліковано 8 робіт.

Обсяг та структура дисертації. Робота викладена на 166 сторінках (враховуючи 13 малюнків та 22 таблиці). Дисертація складається із введення, огляду літератури, розділу "Матеріал та методи", 4-х глав власних досліджень, заключення, висновків та переліку цитованої літератури.

МАТЕРІАЛ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ

Робота виконана на 306-ти мишах-самках лінії CBA/Ca,Sto двох вікових груп: молодих (3-4 міс) та старих (23-25 міс).

Механічне пошкодження кісткового мозку стегнової кістки in situ (кюретаж) проводили за 3 міс до дослідження. Тваринам двох вікових груп крізь колінний суглоб з подальшим проникненням в кістково-мозковий канал стегнової кістки вводили зуболікувальний буравчик. Потім інтенсивно вимивали кістковий мозок фізіологічним розчином. В другій постановці досліду, молодих

мишей після кюретажу однієї стегнової кістки в цей же день опромінювали апаратом РУМ-17 в дозі 8,5 Гр та вводили внутрішньовенно клітини кісткового мозку від молодих чи від старих сингенних тварин.

Гетеротопну трансплантацію стегнових кісток від молодих і старих донорів здійснювали під шкіру бокової поверхні тіла з кожного боку молодим мишам-реципієнтам. В другій групі тварин перед імплантацією стегнової кістки було проведено її кюретаж. Імплантати виймали і досліджували через 2,5 міс після операції.

Операції по утворенню парабіотичних пар проводились за 2,5 міс до дослідження за методикою E.Bunster, R.Meyer (1933).

Всі хірургічні маніпуляції проводились під загальною анестезією (1-1.5 мг кетаміну на 10 г маси тіла).

Для оцінки кількості клітин в кістковому мозку використовували такий показник, як "клітинність" (абсолютна кількість ядровміщуючих клітин в одній стегновій кістці).

Для характеристики початкових етапів гістогенезу кровоутворюючих клітин кісткового мозку був застосований метод реєстрації родових кровоутворюючих (КУК-С) і комітованих (КУК-ГМ) клітин-попередників. Для визначення КУК-С реципієнтам, опроміненим у дозі 8,5 Гр, через 2 години внутрішньовенно вводили $0,75 \times 10^5$ клітин кісткового мозку від молодих або старих донорів. На 8-й день селезінки вилучали з подальшим підрахунком в них числа макроскопічних кровотворних колоній (J. Till, E. McCulloch, 1961). Клітини-попередники для гранулоцитарно-макрофагальних колоній (КУК-ГМ) визначали в агарових культурах, для чого експлантували клітини кісткового мозку (1×10^5) у пластмасові чашки в 1 мл живлячого середовища McCoy 5A з добавкою 15 % колоніестимулюючого фактору і 0,3 % розплавленого агару. Культури інкубували 10 днів при 37^0C в вологій газовій суміші,

яка складалась з 10 % CO_2 і 90 % повітря. Кожний експеримент складався не менше, ніж з 3-4 культур. В кінці строку інкубації під інвертованим мікроскопом підраховували число кровоутворюючих колоній, які вміщували не менш 50 клітин (J.K. Bradley, D. Metcalf, 1966., J.V. Parker, D. Metcalf, 1974).

З компонентів стромального мікрооточення кісткового мозку були досліджені клітини, здатні утворювати колонії (КУК-Ф) та кластери (КлУК-Ф) фібробластів *in vitro*. Їх визначали методом культивування кісткового мозку в моношарових культурах. З метою стійкого колонієутворення в культури додавали опромінені в дозі 45 Гр клітини кісткового мозку морської свинки, які слугували в якості ксеногенного фідера. Через 12 діб культури були зафіксовані 96 % етанолом і пофарбовані азур-еозином. Результати оцінювались по двом категоріям: 1) колонії, в яких було більше 50 клітин (КУК-Ф), 2) кластери, які вміщували менше 50 клітин (КлУК-Ф). В колоніях і кластерах підраховувалась кількість клітин (A.J. Friedenstein , et al., 1974).

Оцінку проліферативної здатності КУК-С і КУК-Ф кісткового мозку мишей проводили через 18 годин після внутрішньочеревного введення оксисечовини.(ОС) в дозі 1 мг на 1 г маси тіла двічі з інтервалом 7 годин.

Статистичну обробку результатів та побудування графіків проводили на персональному компьютері IBM PC/XT, за допомогою програм "Statgraphics" та "Storyboard Plus". Дані були проаналізовані за допомогою методів параметричної статистики.

РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕННЯ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Завданням першого етапу роботи було: порівняння в кістковому мозку у молодих та старих мишей числа ядровміщуючих клітин і кровоутворюючих клітин-попередників, кількості стромаль-

них клітин-попередників, та отримання їх проліферативних характеристик. Було встановлено, що у старих мишей в порівнянні з молодими в кістковому мозку стегнової кістки суттєво збільшується кількість ядровміщуючих клітин (P< 0,05). Цей факт підтверджується роботами інших дослідників (D.Popp, R.Popp, 1979; О.В. Сидоренко, 1983; Г.М. Бутенко, Л.Ф. Андріанова, 1986).

За рахунок збільшення клітинності кісткового мозку зростає з віком і абсолютна кількість родових кровоутворюючих клітин-попередників (КУК-С). Однак дані про зростання абсолютного вмісту КУК-С не можна однозначно пояснити тільки за рахунок збільшення пулу родових кровоутворюючих клітин (РКК), тому що цей відділ гетерогенний і представлений каскадом попередників, які мають різний потенціал самооновлення, проліферативні і диференцировочні характеристики (R. Schofield, 1978; L. Botnik et al., 1979; M. Rosendaal et al., 1979). Припущенню про інтактність чи збільшення з віком пула РКК суперечить також зниження у старих тварин концентрації КУК-С в загальній кількості клітин. В процесі індивідуального розвитку, можливо, відбуваються зміни популяції в бік збільшення числа клітин, що знаходяться в стані спокою (L. Botnick et al., 1982), котрі при стандартному методі тестування КУК-С не вдається виявити. Однак при введенні піддослідним тваринам ОС, яка селективно елімінує клітини в S-фазі клітинного циклу (G. Hodson et al., 1975), виявилась відсутність зміни концентрації КУК-С і у молодих, і у старих мишей при більш, ніж вдвічі зниженій клітинності кісткового мозку.

In vitro були досліджені більш просунуті, комітовані кровоутворюючі клітини-попередники, у вигляді гранулоцитарно-макрофагальних колоній. Було встановлено, що концентрація грану-

лоцитарно-макрофагальних клітин-попередників кісткового мозку старих тварин суттєво не відрізняється від відповідного показника молодих. Не суттєвим був також приріст абсолютного вмісту попередників цієї категорії у старих тварин. Ці дані погоджуються з результатами нечисленних повідомлень інших авторів (M. Tyan, 1982; L. Williams et al., 1983; R. Schofield, 1986) і свідчать, що ця популяція клітин в ході індивідуального розвитку, включаючи старіння, в цілому змінюється мало. Висказане припущення підтверджується результатами дослідів на гетерохронних радіохимерах кровоутворюючої і лімфоїдної тканини (D. Harrison et al., 1975, 1983).

Відомо, що вікі зміни гемо- та імунопоезу можут бути обумовлені гістогенетично незалежними клітинами строми кісткового мозку, серед яких фібробласти є одним із головних структурно-функціональних компонентів (A. Piersma et al., 1985; G. Gulati et al., 1988). Згідно з нашими даними, при старінні суттєво збільшується як концентрація, так і абсолютний вміст КУК-Ф в кістковому мозку стегнової кістки мишей. Не можна виключити можливості того, що приріст числа колоній фібробластів, отриманих із кісткового мозку старих мишей, іде не лише за рахунок зміни вмісту стромальных родових клітин, а й за рахунок зміни процесів проліферації. Таке припущення було перевірене при порівнянні середньої клітинності колоній фібробластів в культурах кісткового мозку від мишей різного віку. Було встановлено, що за показником середньої клітинності колонії від молодих і старих донорів між собою суттєво не відрізняються. Зроблені на підставі цих даних розрахунки свідчать, що більшість колоній утворюється в результаті 8-10 поділів КУК-Ф (65 % всіх колоній в культурах кісткового мозку від молодих мишей і 70 % в культурах від старих тварин). Однак, КУК-Ф мо-

лодих і старих мишей відрізнялись по чутливості до введенної in vivo оксисечовини, тобто знаходились в різних стадіях клітинного циклу. В результаті дії ОС збільшилась концентрація кістковомозгових КУК-Ф і у молодих (в 1,7 рази) і у старих (в 1,2), в порівнянні з контрольними культурами того ж віку. Така різниця в реакції на введення циклоспецифічної речовини у молодих і у старих тварин може свідчити про те, що у старих кількість КУК-Ф, які знаходяться в S-фазі клітинного циклу більша, ніж у молодих. Таким чином, з отриманих даних випливає, що КУК-Ф від старих донорів більш активні в проліферації in vitro , а також більша їх кількість знаходиться в синтетичній фазі мітотичного циклу in situ.

Цікаво відзначити різницю в поведінці КУК-Ф і КУК-С після введення ОС. Ця різниця була обумовлена тим, що концентрація кістковомозкових КУК-Ф зростала, а КУК-С - не змінювалась при одночасному зниженні загальної клітинності кісткового мозку (таблиця).

Таблиця.

Вплив оксисечовини (ОС), введеної in vivo, на кількість ядровміщуючих клітин, КУК-С та КУК-Ф в кістковому мозку стегна мишей різного віку

Вік мишей, міс	Введ ОС	Клітинність 1 стегна, 10^5	Концентрація КУК-С /1^10^5	Загальна кількість КУК-С в 1 стегні	Концентрація КУК-Ф /1^10^6	Загальна кількість КУК-Ф в 1 стегні
3-4	-	119± 13	17± 1,4	1615 ± 356	2,3± 0,2	309 ± 29
3-4	+	47± 9 *	16± 1,6	735 ± 128 *	3,9± 0,4 *	152 ±13 *
.....	....	.....	.....	.....	.....	.....
24-25	-	205± 6	13± 1,0	2564 ± 167	3,9± 0,2	775 ± 25
24-25	+	94± 6 *	13± 4,7	1146 ± 429 *	4,7± 0,2 *	389± 24 *

Пояснення. Різниця між відповідними показниками контрольних та дослідних тварин (введення оксисечовини) одного віку: P<0,01(*).

Це може означати, що зниження клітинності кісткового мозку відбувається більше за рахунок пошкодження пулу проліферуючих гемопоетичних клітин.

Отримані результати свідчать про зміни регуляторних процесів в системі гемопоезу при старінні організму. Можна припустити, що ці процеси включають або міжклітинні взаємодії, або зміни функціональних властивостей стромальних клітин, або регуляторний вплив цілісного організму.

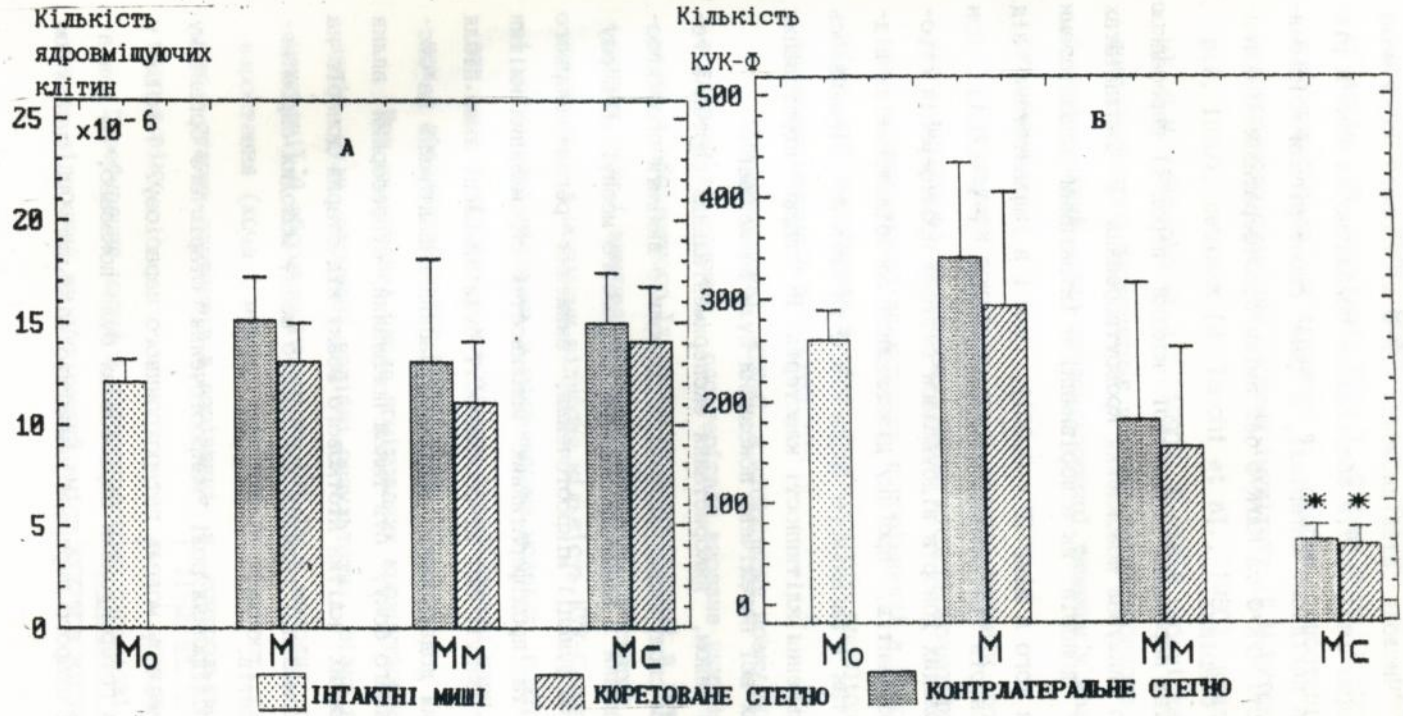
Для перевірки даних припущень другий етап наших досліджень передбачав використання експериментальних моделей з пошкодженням системи, або з конструюванням хімер, які складалися з елементів різного походження.

При механічному пошкодженні однієї стегнової кістки основним джерелом для відновлення цитоархітектоніки кісткового мозку є місцеві, родові елементи строми і паренхіми, які збереглися після операції, а також ті кровоутворюючі клітини, які прибули з інших джерел. Через 3 - 4 місяці після такого пошкодження відбувається повне відновлення функцій мікрооточення стромальної тканини кісткового мозку, що проявляється в відновленні клітинності кісткового мозку і кількості родових кровоутворюючих клітин-попередників. Не було виявлено різниці в регенераторних здібностях стромальних попередників кісткового мозку старих мишей в порівнянні з молодими. В той же час в контрлатеральному стегні молодих мишей було виявлено збільшений вміст КУК-Ф, збільшений вміст родових кровоутворюючих та комітованих клітин-попередників в порівнянні з контрольною групою тварин. У старих мишей подібний ефект спостерігався тільки в відділі кровоутворюючих клітин-попередиків. Тобто, вилучення кістковомозгових клітин з одного стегна привело до посиленої проліферації їх в другому, що може бути пов'язано з

падінням концентрації інгібиторів проліферації (кейлонів).

З метою порівняння функціональної спроможності молодого та старого кісткового мозку, було використовано модель радіаційних хімер з застосуванням кюретажу стегнової кістки у молодих тварин. В такій моделі опромінена строма належить молодому реципієнту, а гемопоетичні клітини - молодим або старим донорам. У радіаційних хімер всіх експериментальних груп повне відновлення клітинності кісткового мозку відбувалося через 3-4 міс, що свідчить про задовільну регенерацію кісткового мозку незалежно від віку введених гемопоетичних клітин (мал. 1, А). Але спостерігалось значне зменшення як концентрації, так і загальної кількості КУК-Ф: і в кюретованому і в контрлатеральному стегні, в порівнянні з аналогічними групами інтактних мишей. Несподівано у радіохімер, котрим було введено старий кістковий мозок, концентрація та загальний вміст КУК-Ф були ще нижчими ніж у тих кому вводили молодий кістковий мозок (мал. 1, Б). Цей факт може означати, що гемопоетичні клітини старої тварини мають пригнічуючу дію на строму молодого опроміненого реципієнта. В літературі подібний феномен ще не був описаний.

З метою вивчення стромальної тканини кісткового мозку, яка є складовою частиною мікрооточення для мієлоідних клітин, нами був використаний метод комбінації кюретажу з наступною гетеротопною трансплантацією стегнової кістки під шкіру. В такій моделі стромальна тканина має донорське походження, а власне кровоутворююча - реципієнське (T. Hotta et al., 1983, H. Patt et al., 1982). Через 2,5 міс після операції імплантати від молодих та старих донорів вилучували та досліджували. Було виявлено, що інтактні імплантати від молодих та старих донорів між собою суттєво не відрізнялись ні за числом ядровміщуючих клітин, ні за кількістю кровоутворюючих клітин-попередників



Мал. 1. Кількість ядровміщуючих клітин (А) та число КУК-Ф (Б) в кістковому мозку радіохімер з коретажем стегна in situ: **Мо** - інтактні миші; **М** - миші з коретажем одного стегна; **Мм** - радіохімери, після введення кісткового мозку молодих донорів; **Мс** - радіохімери, після введення кісткового мозку старих донорів. * $P_{Мс-М} < 0,05$.

(КУК-ГМ). Числове співвідношення КУК-Ф кісткового мозку молодих та старих імплантатів зберігалось приблизно на тому ж рівні, що і в вихідному матеріалі, а саме: спостерігали збільшення кількості КУК-Ф та КлУК-Ф без зміни проліферативного потенціалу при старінні.

Кюретаж порожнини стегнової кістки перед її пересадкою драматично знижував поновлення кровоутворенння в імплантатах від старих донорів як в порівнянні з інтактними імплантатами від тварин того ж віку ($P < 0,001$), так і з імплантатами від молодих донорів (інтактними та кюретованими, $P < 0,001$). При цьому у молодих донорів відбувалася суттєва проліферація стромальних елементів, про яку дізнавалися по збільшенню як відносного, так і загального числа КУК-Ф та КлУК-Ф. Відмічалось також збільшення клітинності кластерів. В "старих" кюретованих імплантатах всі перелічені показники були зниженими.

Таким чином, використання експериментальних систем з гетерохронним сполученням елементів дозволило виявити особливості функціювання і взаємодії клітин кісткового мозку. В першу чергу втрата функції мікрооточення, зниження регенераторного потенціалу та проліферативних можливостей стромальних клітин кісткового мозку. Всі ці особливості були виявлені лише після використання додаткових, екстраординарних навантажень на систему. З іншого боку, був також показаний супресорний вплив кровоутворюючих клітин кісткового мозку від старих донорів на клітини стромальної тканини кісткового мозку молодих опромінених реципієнтів.

Для дослідження ролі "макрооточення" старіючого організму використовувалась модель гетерохроннного парабіозу. Раніше у дослідах на гетерохронних парабіонтах було показано, що тривалість життя старого партнера неможливо збільшити з допомогою

підшивання до нього молодого (Ф. Лудург, Р. Елашофф, 1972; C. Astle, D. Harrison, 1984). Більше того, в організмі молодого парабіонта, з'єднаного зі старим, спостерігали ознаки прискореного старіння системи імунітету (Г.М.Бутенко, І.Б.Губрій, 1980), печінки (H. Tauchi et al., 1980), колагену (Z. Deyl, G.M. Butenko et al., 1990). В нашій роботі вивчався вплив довготривалого перебування в стані гетерохронного парабіозу на функціональний стан кровоутворюючої тканини у молодих та старих мишей.

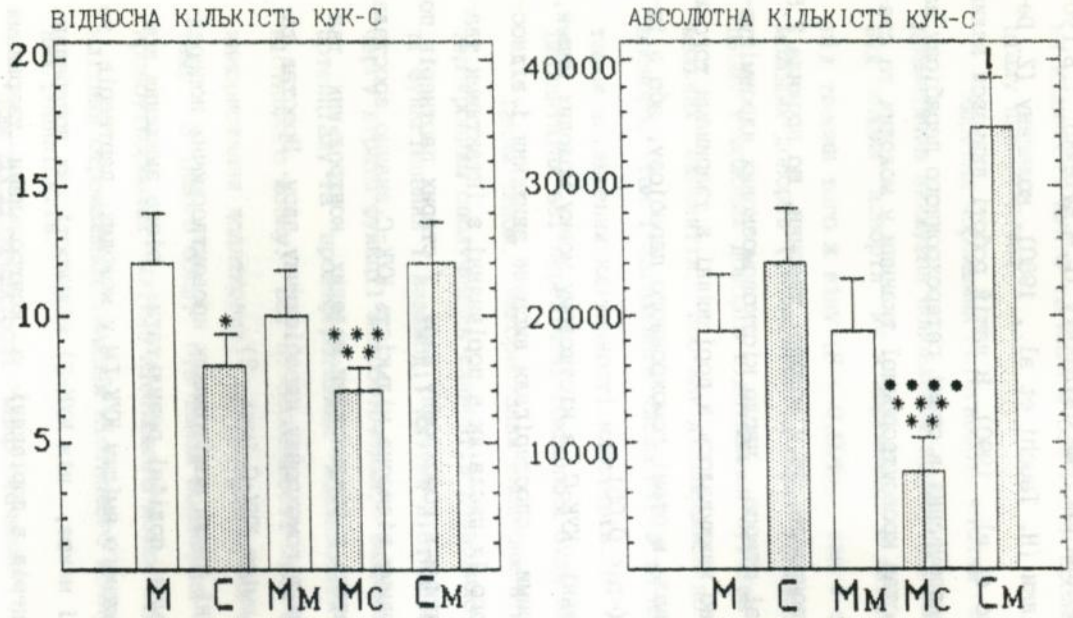
Результати показали, що у молодої тварини, що прожила 2,5 міс в парабіозі зі старою, число кістковомозкових ядровміщуючих клітин значно знижувалось в порівнянні з тваринами того ж віку, які перебували в стані гомохронного парабіозу, або з інтактними мишами ($p < 0,05$).

При визначенні КУК-С в кістковому мозку молодих мишей, з'єднаних зі старими, спостерігали виразне зниження і відносного і абсолютного їх числа як в порівнянні з інтактними тваринами, так і зшитими в гомохронну пару. У старих партнерів по парабіозу з молодими відносна кількість КУК-С значно зростала і могла порівнюватись з показниками молодих контрольних тварин, або з'єднаних в гомохронну парабіотичну пару. Зростав також і абсолютний вміст КУК-С (мал. 2).

При визначенні числа комітованих кровоутворюючих попередників були отримані подібні результати: різке зниження концентрації й абсолютного вмісту КУК-ГМ у молодих партнерів та наростання (хоча і менше, ніж КУК-С) кількості цих попередників у старих партнерів в порівняні з контрольними тваринами того ж віку.

ЛНБ ім. В. Стефаника
АН України

Перебування мишей в гетерохронному парабіозі впливало також на відносний та абсолютний вміст КУК-Ф в кістковому мозку.



Мал. 2. Відносна (в розрахунку на 10^5 клітин) та абсолютна кількість КУК-С в кістковому мозку стегна парабіонтів. **М** - інтактний молодий контроль; **С** - інтактний старий контроль; **Мм** - молодий партнер по гомохронному парабіозу; **$М_С$**- молодий партнер, **См** - старий партнер по гетерохронному парабіозу.

* Рм-с<0,05; **Рм-$м_С$<0,01; ***$Р_{М_М}$-$м_С$<0,01; **** $Р_{М_С}$-$с_М$<0,01,

! Р<0,01 у порівнянні з усіма іншими групами.

Спостерігалось різке зменшення кількості цієї категорії клітин у молодих партнерів, зшитих зі старими. У старих партнерів вміст КУК-Ф суттєво не змінювався.

Таким чином, з'єднання молодих та старих тварин в гетерохронні пари, що супроводжувалось взаємообміном клітинами та гуморальними факторами, привело до суттєвого пригнічення кровоутворюючого ростка у молодих партнерів. В той же час необхідно зазначити, що у старого партнера по парабіозу спостерігалось підвищення вмісту кровоутворюючих клітин-попередників кісткового мозку.

Таким чином, на підставі отриманих в нашій роботі фактів слід вважати, що вікові зміни системи імунітету охоплюють всі рівні гістогенезу цієї системи, починаючи з ранніх етапів гемота імунопоезу. При цьому власне кровоутворююча тканина кісткового мозку (в усякому разі ті види попередників, що вивчалися нами) змінюється не так як стромальна. Схоже що, зміни гемопоетичних попередників при старінні обумовлені, головним чином, змінами регуляторних сигналів, а вплив макрооточення опосередковується також через стромальну тканину мікрооточення кісткового мозку.

Разом з тим, клітини кісткового мозку функціонують в старіючому організмі досить стабільно. Недостатність стромальної регуляції та/або зміни чутливості гемопоетичних клітин до регулюючих сигналів чітко проявляються лише в умовах жорстких впливів, що пошкоджують кістковий мозок.

ВИСНОВКИ

1. При старінні у мишей лінії СВА збільшується кількість ядровміщуючих клітин в кістковому мозку стегна.

2. Вікові зміни кровоутворюючих клітин кісткового мозку

залежать від стадії їх диференціювання: концентрація родових кровоутворюючих клітин-попередників (КУК-С) знижується, а абсолютна кількість цих клітин збільшується з віком; відносне і абсолютне число комітованих попередників (КУК-ГМ) при цьому не змінюється.

3. Вміст (відносний та абсолютний) стромальних клітин-попередників (КУК-Ф) в кістковому мозку старих мишей збільшується.

4. Відносна кількість ранніх кровоутворюючих попередників, які знаходяться в інтактному кістковому мозку в S-фазі клітинного циклу, з віком практично не змінюється; концентрація стромальних попередників - зростає.

5. Вперше виявлена можливість "зворотніх" регуляторних взаємодій паренхіми і строми кісткового мозку : гемопоетичні клітини старого донора пригнічували стромальні клітини-попередники фібробластів молодого опроміненого реціпієнта.

6. Регенераторна і регуляторна активності стромальної тканини кісткового мозку досить стабільні; їх зниження з віком проявляється лише в умовах жорстких пошкоджуючих впливів.

7. В системі гетерохронного парабіозу виявлено пригнічення кровоутворюючих (КУК-С та КУК-ГМ) і стромальних клітин-попередників (КУК-Ф) у молодого партнера і збільшення вмісту обох типів гемопоетичних попередників у старого парабіонта.

8. В цілому кровоутворююча система старих мишей характеризується високим рівнем стійкості, і тільки додаткові жорсткі дії виявляють залежну від віку неспроможність її клітин відновлювати свої функції після пошкодження.

ПЕРЕЛІК РОБІТ,ОПУБЛІКОВАНИХ ЗА МАТЕРІАЛАМИ ДИСЕРТАЦІЇ:

1. Sidorenko A.V., Gubrii I.B., Andrianova L.F., Macsijuk T.V, Butenko G.M. Functional rearrangement of lymphohemopoietic system in heterochronically parabiosed mice // Mech. Ageing Dev. - 1986. - Vol.36 , N 1. - P.41-56.
2. Сидоренко А.В., Максюк Т.В. Особенности восстановления кроветворения в подкожных имплантатах кости у мышей при старении // Бюлл. экспер. биол. мед.,1987.- Т.103 N 4.- С.468-470.
3. Андрианова Л.Ф.,Сидоренко А.В.,Максюк Т.В. Содержание кроветворных и стромальных клеток-предшественников в костном мозге молодых и старых мышей линии СВА // Тез.докладов I Всесоюзн. съезда иммунол., Сочи-Дагомыс, 1989.- С.385.
4. Sidorenko A.V., Andrianova L.F., Macsyuk T.V., Butenko G.M. Stromal hemopoietic microenvironment in aging // Mech. Ageing Dev.- 1990.- V.54, N 2.- P.131-142.
5. Максюк Т.В., Драгунова В.А. Влияние кюретажа бедренной кости на содержание кроветворных клеток-предшественников у молодых и старых животных // В кн.: Механизмы старения и долголетия. Материалы конференции. Сухуми, 19-21 июня 1991 г., с.231.
6. Бутенко Г.М., Максюк Т.В., Сидоренко А.В. Пролиферативная и поддерживающая гемопоэз несостоятельность стромальных элементов костного мозга старых мышей, выявляемая при повреждающем воздействии // Проблемы старения и долголетия. - 1991. - Т.1, N.1. - с.18-22.
7. Butenko G.M., Andrianova L.F., Kharazi A.I., Pishel I.N., Maksyuk T.V., Kudinov Yu. G. Interrelations between central and peripheral lymphoid organs in aging // The 4th

Asia/Oceania Regional Congress of Gerontology. Yokohama, Oct.31-Nov.3, 1991, Abstracts. - P.385.

8. Butenko G.M., Labunetz I.F., Macsyuk T.V., Pishel I.N., Kudinov Y.G.. Age-dependent changes in intra- and extrasystemic immunoregulation // Abstracts of XVth Congress of the International association of Gerontology. Budapest,Hungary, 1993.- P.97.

Максюк Т.В. " Возрастные особенности взаимодействия стромальных и кроветворных клеток костного мозга мышей линии СВА". Диссертация на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 14.00.17 - Нормальная физиология, ин-т геронтологии АМН Украины, Киев, 1995. Защищается 8 научных работ, которые содержат экспериментальные исследования особенностей функционирования клеток костного мозга при старении организма. Установлено, что, в целом, кроветворная система старых мышей характеризуется высокой степенью устойчивости, и только дополнительные жесткие меры воздействия обнаруживают возраст-зависимую неспособность ее клеток восстановить свои функции после повреждения.

Maksyuk T.V. " Interaction of hemopoietic and stromal cells of bone marrow in CBA mice in aging ". Thesis for a degree of Candidate of biological sciences, specialization 14.00.17 - Normal Physiology, Institute of Gerontology Academy of Medical Sciences, Kiev, Ukraine, 1995. The results published in 8 articles are presented for scientific discussion. The hemopoietic system of bone marrow in mice has been shown to maintain

its stability and unchageability during aging. Age-dependent changes in functional capacity of stromal microenvironment could be visualized only owing to the extraordinary local bone marrow demage.

Ключові слова: кістковий мозок, кровоутворюючі клітини, строма, старіння.

№ 7917

Ав 32.058

Друк офс. Умовн.друк.арк.1.0 тир. 100

Київська книжкова друкарня наукової книги. Київ, Рєпіна,4.