

Міністерство освіти і науки України  
Київський національний університет імені Тараса Шевченка

ДОВГИЙ РОМАН СЕРГІЙОВИЧ



УДК 57.017.67: 612.017.11: 571.27

**ФУНКЦІОНАЛЬНА ПОЛЯРИЗАЦІЯ ФАГОЦИТІВ ТА ЇЇ КОРЕКЦІЯ У  
ТВАРИН РІЗНИХ ВІКОВИХ ГРУП**

03.00.09 – імунологія

**АВТОРЕФЕРАТ**

дисертації на здобуття наукового ступеня кандидата біологічних наук

Київ – 2018

Дисертацією є рукопис

Роботу виконано на кафедрі мікробіології та імунології Навчально-наукового центру «Інститут біології та медицини» Київського національного університету імені Тараса Шевченка МОН України

**Науковий керівник:** доктор біологічних наук, професор  
**Сківка Лариса Михайлівна,**  
Київський національний  
університет імені Тараса Шевченка,  
ННЦ «Інститут біології та медицини»,  
завідувач кафедри мікробіології та імунології

**Офіційні опоненти:** доктор біологічних наук, старший науковий співробітник  
**Гаркава Катерина Григорівна,**  
Національний авіаційний університет МОН України,  
Інститут екологічної безпеки,  
завідувач кафедри біотехнології

кандидат біологічних наук  
**Родніченко Анжела Євгенівна,**  
Державна установа «Інститут генетичної та  
регенеративної медицини НАНМ України»,  
провідний науковий співробітник  
лабораторії експериментального моделювання

Захист дисертації відбудеться 4 червня 2018 року о 14:00 годині на засіданні спеціалізованої вченої ради Д 26.001.24 Київського національного університету імені Тараса Шевченка за адресою: м. Київ, проспект Академіка Глушкова, 2, ННЦ «Інститут біології та медицини», ауд. 434

Поштова адреса: 01601, м. Київ, вул. Володимирська, 64/13, Київський національний університету імені Тараса Шевченка, ННЦ «Інститут біології та медицини», спеціалізована вчена рада Д 26.001.24

З дисертацією можна ознайомитися у науковій бібліотеці ім. М. Максимовича Київського національного університету імені Тараса Шевченка за адресою: м. Київ, вул. Володимирська, 58, зала №12

Автореферат розісланий: «4» травня 2018 року

Вчений секретар  
спеціалізованої вченої ради

Н. Г. Ракша

## ЗАГАЛЬНА ХАРАКТЕРИСТИКА РОБОТИ

**Актуальність теми.** Старіння супроводжується порушенням функціонування усіх систем організму, у тому числі й імунної системи (Davalli et al., 2016). Це зумовлює підвищення захворюваності з віком на злоякісні новоутворення, автоімунні хвороби, а також підвищення захворюваності та смертності від інфекцій (Simon et al., 2015). Крім того, вікові зміни імунної реактивності асоційовані з явищем «інфламейджингу» (від англ. Inflamm-aging) – розвитком хронічного запального процесу, котрий вважають однією з основних причин серцево-судинних захворювань, метаболічного синдрому та інших вікових хвороб запальної етіології (Franceschi et al., 2017). Кількість людей похилого віку у світі постійно зростає, що актуалізує дослідження вікових порушень імунної системи.

Виключна роль у забезпеченні імунної резистентності і контролі імунної реактивності організму належить фагоцитам: мононуклеарним (моноцитам і макрофагам) та поліморфнонуклеарним (нейтрофілам) (Kumar et al., 2018). Макрофаги є резидентними клітинами усіх тканин організму і виконують функцію підтримки тканинного гомеостазу, а також функції клітин-патрульних, які забезпечують першу лінію імунного захисту організму і значною мірою визначають спрямованість і характер адаптивної імунної відповіді, у тому числі опосередкованої Т-лімфоцитами (Okabe et al., 2016). Оскільки Т-лімфоцити є важливим елементом захисної системи організму, порушення їхніх функцій зумовлює розвиток численних вікових захворювань (Goronzy et al., 2017). Враховуючи здатність клітин вродженої імунної системи, у тому числі й тканинних макрофагів, ініціювати та регулювати адаптивну імунну відповідь (Roberts et al., 2015), припускається, що саме макрофаги старого організму можуть викликати розвиток вікових змін Т-лімфоцитів.

Нейтрофіли представлені, головним чином, короткоживучими циркулюючими клітинами і складають найбільшу частку у складі лейкоцитів периферичної крові. Ці клітини першими рекрутуються у ділянку розвитку запальних реакцій і є важливими ефекторами протиінфекційного імунного захисту, а також ефекторними чинниками інфламейджингу.

Загальноприйнятою є концепція активації макрофагів, що передбачає поляризацію цих клітин у 2 протилежні активаційні стани: прозапальні, або класично активовані (M1), та протизапальні, або альтернативно активовані (M2) (Murray et al., 2017). Центральним регулятором активації мононуклеарних фагоцитів є метаболізм аргініну. Два протилежні шляхи обумовлюють метаболічні перетворення аргініну у цих клітин. Синтаза оксиду азоту перетворює аргінін на оксид азоту, радикали якого обумовлюють цитотоксичну дію прозапальних (M1) макрофагів, а аргіназа – на пролін та поліаміни, які відіграють важливу роль у синтезі колагену та клітинній проліферації, обумовлюючи, таким чином, репаративну функцію протизапальних (M2) макрофагів (Rodriguez et al., 2017). Подібна поляризація метаболізму властива також нейтрофілам (Ma et al., 2016).

Дослідження останніх років значно розширили наше розуміння онтогенезу тканинних макрофагів. Більшість резидентних макрофагів мають ембріональне

походження і в нормі не потребують міграції моноцитів в тканини для підтримання своєї кількості (Ginhoux et al., 2016]. Виявлено, що в окремих тканинах з віком відбувається прогресивне заміщення макрофагів ембріонального походження на макрофаги, які диференціюються з циркулюючих моноцитів (Swirski et al., 2016). Крім того, показано, що у макрофагів ембріонального походження при старінні спостерігається порушення фагоцитарної функції, у той час як у макрофагів моноцитарного походження таких змін не виявлено (Albright et al., 2016). Це свідчить про можливу роль онтогенезу у розвитку вікових порушень цих клітин. Натомість, особливості функціонального профілю макрофагів різної локалізації та онтогенезу, а також метаболічні зміни нейтрофілів при старінні залишаються практично недослідженими.

Чимало патологічних станів різної органної локалізації пов'язані з тим чи іншим метаболічним зсувом фагоцитів, який не відповідає фізіологічним потребам певної тканини (Sica et al., 2015). З огляду на це активно розробляються терапевтичні підходи для маніпуляції поляризаційним статусом фагоцитів при різних захворюваннях (Mantovani et al., 2017). Одним з таких терапевтичних підходів може розглядатися клітинна терапія з використанням мультипотентних мезенхімних стромальних клітин (ММСК). ММСК є перспективним засобом для лікування захворювань імунної системи, у тому числі обумовлених феноменом інфламейджингу, завдяки їх здатності регулювати реакції запалення, однією з основних клітинних ефекторних ланок якого є фагоцити (Yao et al., 2016). Розробка таких методів вимагає глибокого знання вікових фенотипово-функціональних особливостей цих клітин.

**Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами.** Дисертаційна робота на кафедрі мікробіології та імунології ННЦ «Інститут біології та медицини» Київського національного університету імені Тараса Шевченка у рамках науково-дослідних тем «Механізми реалізації адаптаційно-компенсаторних реакцій організму за умов розвитку різних патологій» (2011-2015 рр., № д/р 0111U004648) та «Механізми регуляції метаболічних процесів в організмі за умов розвитку патологічних станів» (2016-2018 рр., № д/р 0116U002527).

Автор висловлює особливу подяку завідувачу лабораторії патофізіології та імунології Бутенку Г.М. та всьому колективу лабораторії за неоціненну допомогу у проведенні досліджень на моделі гетерохронного парабіозу.

**Мета і задачі дослідження:** Метою роботи було дослідити фенотипово-функціональний профілю фагоцитів та його корекцію у мишей різних вікових груп.

Для досягнення мети були поставлені наступні завдання:

1. Дослідити спрямованість метаболізму аргініну резидентних тканинних макрофагів та макрофагів, диференційованих з моноцитів, отриманих від мишей різного віку.
2. Провести порівняльне дослідження фагоцитарної активності та оксидативного метаболізму макрофагів та нейтрофілів мишей різного віку.
3. Визначити особливості спонтанної та індукованої співкультуванням з ММСК тимусу (тММСК) експресії фенотипових маркерів функціональної зрілості макрофагами мишей різного віку.

4. Дослідити вплив макрофагів старих мишей на фенотиповий профіль Т-лімфоцитів лімфоїдних органів молодих тварин на моделі гетерохронного парабіозу.
5. Дослідити контактний вплив мультипотентних мезенхімних стромальних клітин тимусу (тММСК) на метаболічний профіль тканинних макрофагів та макрофагів моноцитарного походження, отриманих від мишей різного віку.

*Об'єкт дослідження:* функціональна поляризація фагоцитів у мишей різного віку.

*Предмет дослідження:* експресія фенотипових маркерів функціональної зрілості, метаболізм аргініну, фагоцитарна активність та оксидативний метаболізм макрофагів та нейтрофілів, фенотипово-функціональні зміни фагоцитів за умов співкультивування з тММСК.

*Методи дослідження:* для виконання поставлених завдань у роботі використано імунологічні та цитофлуориметричні (визначення поглинальної активності та продукції РФК фагоцитами, субпопуляційного складу лімфоцитів та макрофагів вторинних лімфоїдних органів, експресії фенотипових маркерів функціональної зрілості макрофагами), біохімічні та спектрофотометричні (визначення аргіназної активності та продукції оксиду азоту), культуральні (диференціювання зрілих макрофагів з попередників кісткового мозку *in vitro*, співкультивування макрофагів та тММСК), та статистичні методи.

**Наукова новизна отриманих результатів.** Вперше виявлено та охарактеризовано особливості змін метаболічного профілю фагоцитів різної локалізації та походження з віком у мишей. Встановлено, що макрофагам моноцитарного походження (кістковомозкові та селезінкові) старих тварин властивий прозапальний (M1) зсув метаболізму аргініну, у той час як макрофагам ембріонального походження (перитонеальні, альвеолярні) притаманний протизапальний зсув метаболізму аргініну (M2) зі зниженням оксидативного метаболізму.

Розширено існуючі уявлення стосовно впливу макрофагів лімфоїдних органів на вікові зміни Т-лімфоцитів. На моделі гетерохронного парабіозу показано, що макрофаги старих тварин характеризуються посиленою міграцією в селезінку і лімфоїдні вузли. Збільшення відносної кількості макрофагів у лімфовузлах асоціюється зі збільшенням у їх складі частки Т-лімфоцитів з фенотипом регуляторних клітин. Міграція макрофагів старих тварин у селезінку супроводжується зменшенням відносної кількості регуляторних Т-клітин.

Отримано нові дані стосовно модуляторного впливу тММСК на метаболічний профіль макрофагів. В умовах *in vitro* продемонстровано можливість модуляції метаболізму аргініну у макрофагів різної локалізації та онтогенетичного походження, отриманих від старих мишей, при співкультивуванні тММСК молодих тварин. Продемонстровано більш виразний модуляторний ефект тММСК на макрофаги моноцитарного походження, отримані від старих мишей, порівняно з відповідними клітинами молодих тварин; не виявлено залежності модуляторного впливу тММСК на макрофаги ембріонального походження від віку мишей-донорів цих клітин.

**Практичне значення одержаних результатів.** Результати дисертаційного дослідження експериментально обґрунтовують можливість застосування клітинної терапії з використанням тММСК для протизапальної метаболічної поляризації тканинних макрофагів.

За результатами роботи розроблено методику індукування неонатальної толерантності до GFP-позитивних лейкоцитів, яка може бути використана у дослідженнях, присвячених вивченню процесів міграції і хомінгу клітин імунної системи.

Матеріали дисертаційної роботи використовуються в учбовому процесі кафедри мікробіології та імунології ННЦ «Інститут біології та медицини» (у структурі курсу лекцій «Імунологія репродукції» для студентів імунологів освітнього рівня магістр).

**Особистий внесок здобувача.** Спільно з науковим керівником д.б.н., Л.М. Сківкою розроблено концепцію дисертаційної роботи, сформульовано мету та завдання дисертаційного дослідження. Автором самостійно були проаналізовані дані літератури, що стосуються проблематики дисертаційної роботи. Здобувачем проведені дослідження фенотипово-функціонального профілю фагоцитів різної тканинної локалізації та походження. Експерименти на моделі гетерохронного парабіозу проведені за підтримки і консультативної допомоги д.м.н., професора, академіка НАМН України, член-кореспондента НАН України та РАМН, Г.М. Бутенко. Дослідження по співкультивуванню тММСК проведені за підтримки і консультативної допомоги завідувача лабораторії імунології Державної установи «Інститут генетичної та регенеративної медицини НАМН України», д.м.н., професора І.С. Нікольського. Автор висловлює також глибоку вдячність за консультативну допомогу д.м.н. І.М. Пішель.

**Апробація результатів дисертації.** Результати дисертаційної роботи були представлені на Міжнародній конференції молодих вчених 2015 (CYS-2015) «Today's challenges in molecular and cell biology» (Київ, 2015), II Міжнародній науковій конференції «Мікробіологія та імунологія – перспективи розвитку в XXI столітті» (Київ, 2016), XI Міжнародній конференції молодих учених «Біологія: від молекули до біосфери» (Харків, 2016), XIII Міжнародній науковій конференції студентів і аспірантів «Молодь і поступ біології» (Львів, 2017), Міжнародній конференції Європейської Організації Молекулярної Біології «Advances in Stem Cells and Regenerative Medicine» (Гейдельберг, Німеччина, 2017), VIII Міжнародній науковій конференції "Психофізіологічні та вісцеральні функції в нормі і патології" (Київ, 2017).

**Публікації.** За матеріалами дисертації опубліковано 13 робіт, з них 5 статей у фахових наукових виданнях (з них 2 – у виданнях, що входять до міжнародної бази даних SCOPUS; 3 – у виданнях, що входять до міжнародної бази даних Copernicus), 8 тез у матеріалах міжнародних та вітчизняних конгресів і конференцій.

**Структура і обсяг і дисертації.** Дисертаційна робота складається зі вступу, огляду літератури, опису матеріалів та методів дослідження, трьох розділів результатів дослідження та їх обговорення, висновків та списку використаних літературних джерел. Загальний обсяг дисертації складає 169 сторінок, основну

частину роботи викладено на 121 сторінках. Робота ілюстрована 4 таблицями та 43 рисунками. Перелік використаних літературних джерел включає 249 найменувань, з них кирилицею – 3, латиницею – 246.

## ОСНОВНИЙ ЗМІСТ РОБОТИ

### Матеріали та методи досліджень

В експериментальних дослідженнях використовувалися миші віком 2-5 місяців (молоді) та 18-24 місяці (старі), ліній СВА/Са, С57Bl/6 та B6.GFP (C57Bl/6-Tg(CAG-EGFP)10sb/J). Усі маніпуляції з тваринами проводили у відповідності до вимог комітету з біоетики Навчально-наукового центру «Інститут біології та медицини» Київського національного університету імені Тараса Шевченка (протокол №1 від 20 лютого 2017 року) та з урахуванням «Загальних принципів експериментів на тваринах», прийнятих I–III Національними конгресами з біоетики (Київ, 2001–2007 рр.).

Клітини кісткового мозку отримували промиванням кістковомозкових порожнин стегна та гомілки, та використовували в подальшому для диференціювання макрофагів та виділення нейтрофілів кісткового мозку. Макрофаги кісткового мозку диференціювалися з кістковомозкових попередників в культурі *in vitro* в присутності макрофагального колонієстимулюючого фактора. Кістковомозкові нейтрофіли виділяли центрифугуванням клітин кісткового мозку у градієнті щільності перколу. Альвеолярні та перитонеальні макрофаги отримували промиванням легенів та перитонеальної порожнини мишей фосфатним буферним розчином Дульбекко. Для збагачення селезінки макрофагами моноцитарного походження та аналізу вікових змін спленічних нейтрофілів в умовах присутності корпускулярного антигену в циркуляції мишей лінії СВА/Са за 4 доби до експерименту імунізували еритроцитами барана внутрішньочеревинно в дозі  $2 \times 10^8$  клітин на мишу (0,3мл 3% завису еритроцитів вівці у фізіологічному розчині). Для отримання макрофагів селезінки орган гомогенізували у гомогенізаторі Даунса. Макрофаги мають здатність адгезувати до різних субстратів. Тому, досліджувані популяції макрофагів отримували шляхом адгезії до пластикової поверхні

Рівень продукції внутрішньоклітинних реактивних форм кисню (РФК) досліджуваними популяціями фагоцитів оцінювали методом проточної цитофлуориметрії. Визначення фагоцитарної активності макрофагів та нейтрофілів проводили методом проточної цитометрії, що базується на оцінці мічених FITC бактерій *Staphylococcus aureus*, поглинутих фагоцитами. Визначали фагоцитарне число (частка фагоцитуючих клітин, ФЧ) та фагоцитарний індекс (інтенсивність флуоресценції, ФІ). При оцінці внутрішньоклітинної продукції РФК та фагоцитарної активності методом проточної цитометрії моноцити та нейтрофіли селезінки диференціювали шляхом гейтування.

Для оцінки аргіназної активності макрофагів проводили реакцію гідролізу L-аргініну у клітинних лізатах. Концентрацію сечовини вимірювали спектрофотометрично. Значення оптичної густини переводили у мікрограми сечовини, використовуючи калібрувальну криву, побудовану з використанням стандартних розчинів сечовини відомої концентрації.

Для визначення рівня експресії фенотипового маркера CD206 клітини інкубували з антитілами (анти-CD206, мічені Alexa Fluor 647, «BD Biosciences», Канада) протягом 30 хвилин при температурі 4°C у темряві. По закінченню інкубації зразки фіксували та аналізували на проточному цитофлуориметрі FACS Aria («Becton Dickinson», США).

Перитонеальні та кістковомозкові макрофаги мишей лінії C57Bl/6, співкультивували з тММСК, отриманими від сингенних молодих тварин. тММСК були люб'язно надані завідувачем лабораторії імунології Державної Установи «Інститут генетичної та регенеративної медицини Національної академії медичних наук України», д.м.н, проф. І.С.Нікольським. Співвідношення макрофагів до тММСК було 10:1. На 8 добу співкультивування аналізували аргіназну активність у клітинних лізатах та експресію фенотипового маркера CD206.

Для індукції неонатальної толерантності до білка GFP, мишеням лінії C57Bl/6 3-денного віку обох статей внутрішньочеревно одноразово вводили  $5 \times 10^7$  GFP-позитивних спленоцитів. По досягненню тваринами 1,5-місячного віку перевіряли успішність індукції толерантності трансплантуванням шкіри вух трансгенних B6.GFP дорослих мишей-самиць.

Для дослідження міграції макрофагів моноцитарного походження старих тварин та їх впливу на Т-лімфоцити вторинних лімфоїдних органів молодих тварин використовували модель гетерохронного парабіозу згідно методу Bunster et al. (1933). Для цього хірургічно поєднували мишей вихідної лінії (C57Bl/6), яких у подальшому аналізували, та трансгенних B6.GFP тварин, які виступали донорами мічених клітин. Тривалість співіснування парабіотичних пар складала 6 тижнів. Тварин було розподілено на наступні парабіотичні групи:

1. Ізохронні (одного віку) парабіотичні пари (n=4), які слугували контролем.
2. Гетерохронні (тварини старого та молодого віку) парабіотичні пари (n=4), у яких GFP-позитивними парабіонтами були старі миші.

Після закінчення строку парабіотичного співіснування проводили оцінку експресії фенотипових маркерів GFP-позитивними макрофагами, що мігрували у вторинні лімфоїдні органи мишей вихідної лінії від трансгенного партнера по парабіотичній парі, а також Т-лімфоцитами мишей вихідної та трансгенної ліній. Для визначення рівня експресії фенотипових маркерів суспензії клітин інкубувалися з наступними антитілами: анти-CD4 (PE-Cy7), анти-CD25 (PE-Cy5, клон PC61,5), анти-CD44 (PerCP-Cy5.5) («eBioscience», США), анти-FoxP3 (PE, клон 3G3, «Abcam», Велика Британія), анти-CD11b (Alexa Fluor 405, «Novus Biologicals», США). Зразки фіксували та аналізували на проточному цитофлуориметрі.

Статистичний аналіз результатів проводили за допомогою t-критерію Стьюдента. Наведено середні значення (M) та стандартна помилка середнього (SE). Нормальність розподілу даних у групах перевіряли за допомогою W-критерію Шапіро-Уїлка. Статистично достовірною вважалася різниця між порівнюваними показниками за  $p < 0,05$ .

### **Результати досліджень та їх обговорення**

**Зміни функціонального профілю макрофагів моноцитарного походження з віком.** Макрофаги, що диференціюються з моноцитів, відіграють

важливу роль у розвитку як локальної, так і системної імунної відповіді. Завданням цієї частини роботи було порівняльне дослідження функціонального профілю макрофагів, диференційованих з моноцитів кісткового мозку мишей різного віку.

Аргіназна активність макрофагів моноцитарного походження, отриманих від старих мишей, була нижчою на 40% порівняно з макрофагами молодих тварин ( $p < 0,05$ ) (рис. 1). Отримані результати вказують на прозапальний зсув метаболізму аргініну цих клітин з віком.

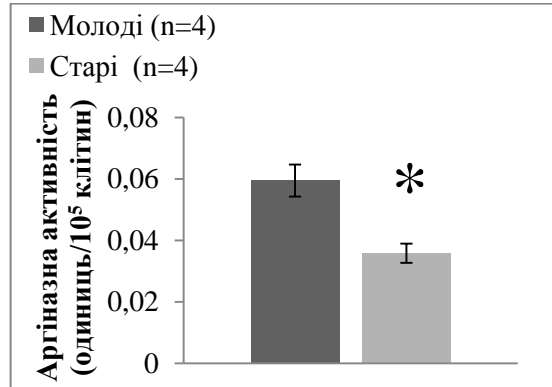


Рис. 1. Аргіназна активність макрофагів моноцитарного походження, отриманих від мишей різного віку. Примітка. \* -  $p < 0,05$  порівняно з групою молодих тварин.

Нами не було виявлено вікових змін відсотку клітин, що продукували РФК, у популяції макрофагів моноцитарного походження (табл.1). Проте, інтенсивність продукції РФК була вищою у 3,9 раза у макрофагів, отриманих від старих мишей ( $p < 0,05$ ).

Таблиця 1

**Відсоток продукуючих клітин та інтенсивність продукції реактивних форм кисню фагоцитами, отриманими від мишей різного віку**

Популяція фагоцитів	Відсоток клітин, що продукували РФК (M±m)		Інтенсивність продукції РФК (M±m)	
	Молоді (n=5)	Старі (n=5)	Молоді (n=5)	Старі (n=5)
Макрофаги моноцитарного походження	94±3,52	97,04±0,37	572±227	2220±298*
Перитонеальні макрофаги	38,67±5,84	41,52±3,18	5206±469	3650±425*
Альвеолярні макрофаги	18,45±3,95	3,1±1,73*	5899±620	10333±2330
Мононуклеари селезінки	26,72±5,11	57,63±9,46*	191±16	293±34*
Кістковомозкові нейтрофіли	51,37±2,12	32,80±3,14*	25935±3055	21241±4055
Гранулоцити селезінки	53,97±8,86	78,32±15,75	322±49	483±29*

Примітка. \* -  $p < 0,05$  порівняно з групою молодих тварин.

Високий рівень продукції РФК є однією з ознак класично активованих макрофагів (M1), що разом з достовірно нижчою аргіназною активністю може свідчити про більш виразну прозапальну метаболічну спрямованість макрофагів, що диференціювалися з моноцитів старих мишей, порівняно з молодими тваринами.

Не спостерігалось статистично значимих змін фагоцитарної активності макрофагів моноцитарного походження, отриманих від старих мишей (рис. 2). Показники ФЧ та ФІ у тварин різного віку були практично однаковими. Отримані нами дані узгоджуються з даними літератури стосовно відсутності вікових порушень ефективності фагоцитозу кістковомозкових моноцитів та макрофагів (Linehan et al., 2014).

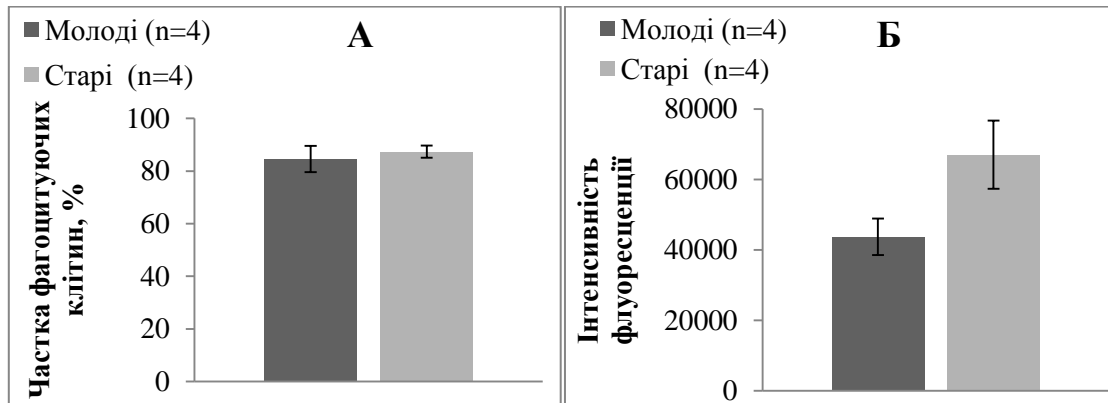


Рис. 2. Фагоцитарне число (А) та фагоцитарний індекс (Б) макрофагів моноцитарного походження, отриманих від мишей різного віку.

CD206 – це рецептор, що розпізнає залишки моносахаридів в молекулах білків, експресованих на поверхні деяких мікроорганізмів, відіграючи, таким чином, важливу роль в імунному захисті організму (Ohgidani et al., 2017). Частка клітин, що експресують CD206, у популяції кістковомозкових макрофагів старих мишей була вища на 38% порівняно з відповідним показником клітин молодих тварин (рис. 3).

Отримані нами результати узгоджуються з даними іншої дослідницької групи (Gibon et al., 2016), котра також виявила вищу експресію поверхневих маркерів активації в популяції інтактних кістковомозкових макрофагів старих тварин і розглядає такі зміни фенотипового профілю клітин цієї популяції як ознаку їх преактивованого стану.

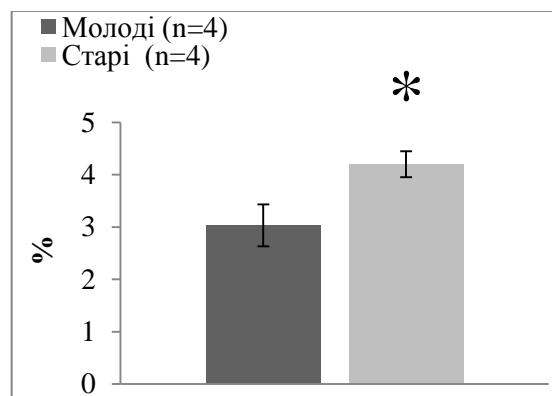


Рис. 3. Відсоток макрофагів моноцитарного походження, отриманих від мишей різного віку, що експресували CD206. Примітка. \* -  $p < 0,05$  порівняно з групою молодих тварин.

Таким чином, макрофаги, що диференціювалися з моноцитів старих мишей, мали ознаки прозапального зсуву метаболічного профілю порівняно з відповідними клітинами молодих тварин. Прозапальна функціональна поляризація макрофагів моноцитарного походження може бути однією з основних причин явища інфламейджингу, котре спостерігається у осіб похилого віку.

#### **Функціональний профіль тканинних макрофагів старих мишей.**

Більшість тканинних макрофагів мають ембріональне походження і значно відрізняються між собою за транскриптомом та метаболічним профілем залежно від локалізації (Gordon et al., 2017). Тому наступним завданням було порівняння функціонального профілю тканинних макрофагів різної локалізації, отриманих від молодих та старих мишей.

На відміну від макрофагів моноцитарного походження, у перитонеальних та альвеолярних макрофагів, отриманих від старих мишей, зареєстровано вищу, порівняно з відповідними клітинами молодих тварин, аргіназну активність на 33% та 19% відповідно (рис. 4).

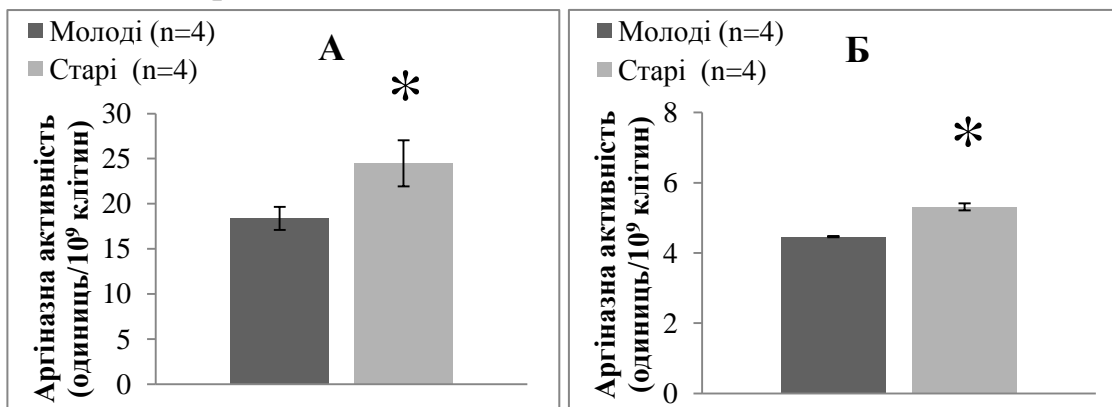


Рис. 4. Аргіназна активність перитонеальних (А) та альвеолярних (Б) макрофагів, отриманих від мишей різного віку. Примітка. \* -  $p < 0,05$  порівняно з групою молодих тварин.

Ми не спостерігали достовірних вікових змін відсотку перитонеальних макрофагів, що продукували РФК. Разом з тим, зареєстровано нижчу інтенсивність продукції РФК перитонеальними макрофагами, отриманими від старих тварин, на 30% порівняно з аналогічними клітинами молодих мишей ( $p < 0,05$ ). Відсоток альвеолярних макрофагів, що продукували РФК, знижувався з віком і становив  $(18,45 \pm 3,95) \%$  та  $(3,1 \pm 1,73) \%$  у молодих та старих тварин, відповідно ( $p < 0,05$ ). При цьому достовірна різниця у рівні синтезу внутрішньоклітинних РФК альвеолярними макрофагами старих і молодих тварин була відсутня (табл. 1).

Посилений оксидативний метаболізм є ознакою прозапальної активації фагоцитів. Відповідно, виявлене нами зниження продукції РФК тканинними макрофагами, отриманими від старих мишей, узгоджується з вищенаведеними даними стосовно вищої аргіназної активності цих клітин, і свідчить про їх протизапальну метаболічну спрямованість.

За результатами наших досліджень, спостерігалось достовірне зниження фагоцитарного числа перитонеальних та альвеолярних макрофагів, отриманих у старих мишей, порівняно з молодими тваринами ( $p < 0,05$ ) (рис. 5А,В). При цьому,

показник ФІ у тварин різного віку був практично однаковим в обох досліджуваних популяціях фагоцитів (рис. 5Б,Г). Отримані нами дані узгоджується з результатами інших авторів, які виявили зниження фагоцитарної активності перитонеальних та альвеолярних макрофагів мишей лінії C57Bl/6 з віком (Wong et al., 2017).

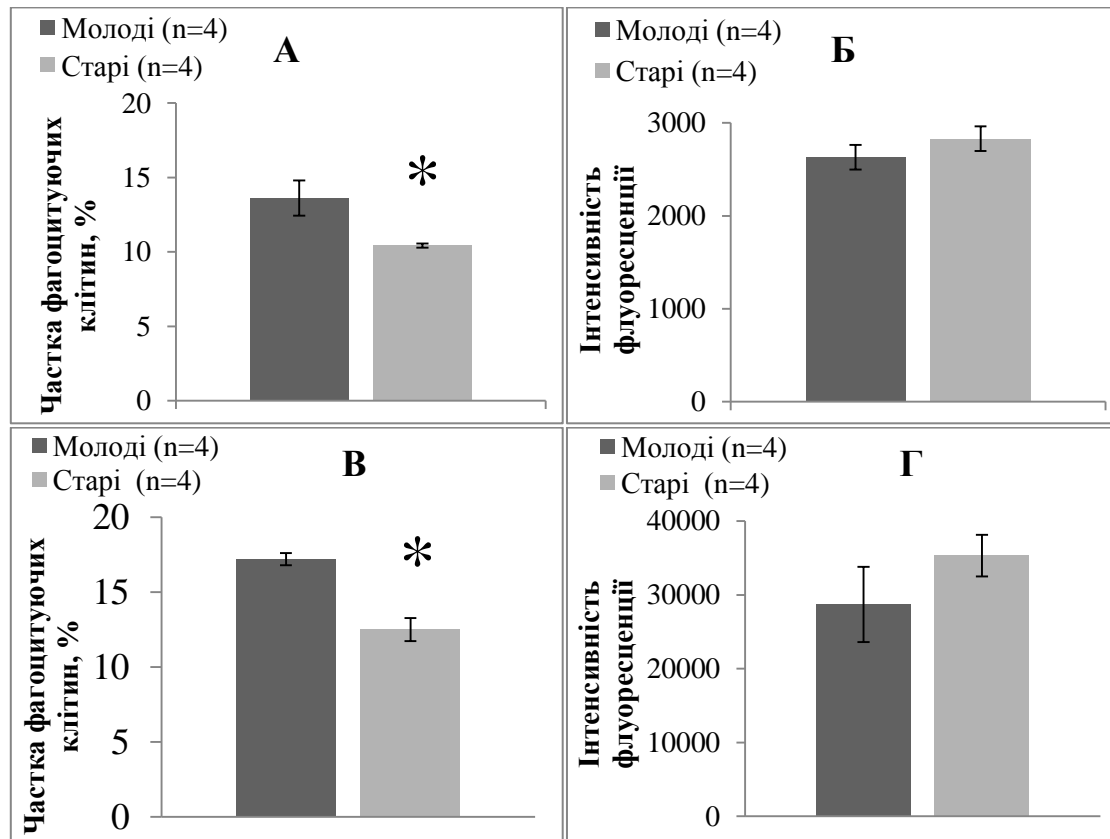


Рис. 5. Фагоцитарне число (А, В) та фагоцитарний індекс (Б, Г) перитонеальних (А, Б), та альвеолярних (В, Г) макрофагів, отриманих від мишей різного віку. Примітка. \* -  $p < 0,05$  порівняно з групою молодих тварин.

Резюмуючи отримані результати можна зробити висновок про те, що тканинні макрофаги ембріонального походження з віком набувають ознак протизапальної метаболічної поляризації порівняно з клітинами молодих тварин. Такий метаболічний зсув тканинних фагоцитів спричиняє послаблення їх патрульної функції і створює основи для зниження локальної імунної реактивності в цілому і, як наслідок, для розвитку онкологічної патології та підвищення чутливості до інфекційних захворювань.

**Зміни функціонального профілю макрофагів селезінки старих мишей після імунізації корпускулярним антигеном.** Селезінка є вторинним лімфоїдним органом, у якому генерується імунна відповідь на системно циркулюючі антигени. З огляду на це ми вважали за доцільне провести порівняльну оцінку метаболічного профілю спленічних макрофагів у тварин різного віку за умов антигенного навантаження.

Аргіназна активність макрофагів селезінки старих мишей була нижчою на 16% порівняно з клітинами молодих тварин ( $p < 0,05$ ) (рис. 6).

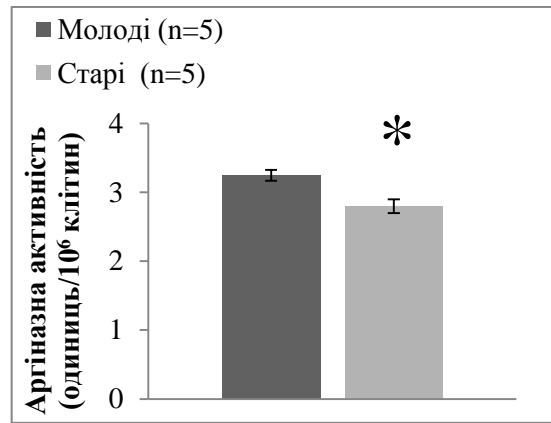


Рис. 6. Аргіназна активність макрофагів селезінки, отриманих від мишей різного віку. Примітка. \* -  $p < 0,05$  порівняно з групою молодих тварин.

Рівень продукції РФК був у 1,5 рази вищим у мононуклеарних фагоцитів селезінки старих тварин порівняно з молодими ( $p < 0,05$ ). Також у старих мишей спостерігалось зростання частки мононуклеарних клітин селезінки, які продукували РФК, у 2,2 рази ( $p < 0,05$ ) (табл.1).

Таким чином, в умовах антигенного навантаження прозапальна активація макрофагів селезінки більш виразна у старих тварин, що проявляється достовірно нижчим рівнем аргіназної активності цих клітин та більш високою продукцією ними РФК порівняно з аналогічними показниками молодих тварин.

**Зміни фенотипово-функціонального профілю кістковомозкових нейтрофілів з віком у мишей.** Нейтрофіли кісткового мозку є новим предметом активних досліджень у зв'язку з виявленням феномену їх медулярного депонування і кліренсу цих клітин медулярними макрофагами. Висловлюється припущення, що у кістковому мозку в умовах гомеостазу можуть накопичуватися як щойно диференційовані молоді, так і старіючі нейтрофіли (Krugger et al., 2015).

За результатами наших досліджень спостерігалось зниження частки нейтрофілів, що продукували РФК, у популяції клітин, отриманих від старих тварин, у 1,5 рази порівняно з відповідними клітинами молодих мишей ( $p < 0,05$ ). Не виявлено вікових змін рівня продукції РФК нейтрофілами (табл.1). Фагоцитарна активність нейтрофілів кісткового мозку старих тварин також вірогідно не відрізнялася від аналогічного показника молодих мишей (рис. 7).

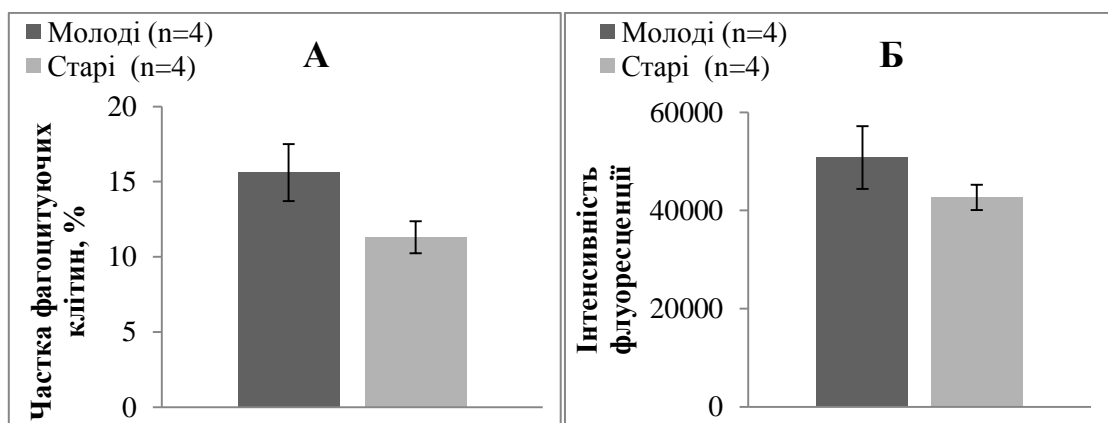


Рис. 7. Фагоцитарне число (А) та фагоцитарний індекс (Б) кістковомозкових нейтрофілів, отриманих від мишей різного віку.

Отже, кістковомозкові нейтрофіли старих мишей виявляли ознаки протизапального зсуву метаболізму, що проявлялося нижчою продукцією РФК цими клітинами. Це може вказувати на накопичення у кістковому мозку старих тварин відпрацьованих нейтрофілів. Відомо, що порушення процесів кліренсу апоптیزованих нейтрофілів веде до підвищення продукції реактивних форм кисню мононуклеарними фагоцитами кісткового мозку, що узгоджується з отриманими нами даними про посилення оксидативного метаболізму макрофагами, які диференціювалися з кістковомозкових попередників старих мишей (табл.1).

**Зміни фенотипово-функціонального профілю гранулоцитів селезінки старих імунізованих мишей.** Як зазначено вище, селезінка є регіонарним організованим лімфоїдним утвором, який депонує антигени з циркуляторного русла, і осередком формування імунної відповіді на ці антигени. З віком концентрація імуногенів у циркуляції збільшується. Завданням цієї частини роботи була порівняльна оцінка функціонального стану нейтрофілів селезінки у тварин різного віку в умовах присутності корпускулярного антигену в циркуляції.

За результатами наших досліджень інтенсивність продукції РФК гранулоцитами селезінки старих імунізованих тварин перевищувала аналогічний показник у молодих мишей у 1,5 рази ( $p < 0,05$ ). При цьому, вірогідних вікових змін частки гранулоцитів, що продукували РФК, не було виявлено (табл.1).

Для поліморфноядерних фагоцитів, на відміну від мононуклеарних клітин, посилення фагоцитозу є свідченням їх прозапальної активації (Selders et al., 2017). Фагоцитарна активність гранулоцитів селезінки в умовах присутності корпускулярного антигену достовірно не відрізнялася у тварин різного віку (рис. 8Б). Однак, слід відмітити збільшену частку фагоцитуючих гранулоцитів у популяції селезінкових поліморфноядерних фагоцитів ( $p < 0,05$ ) (рис. 8А).

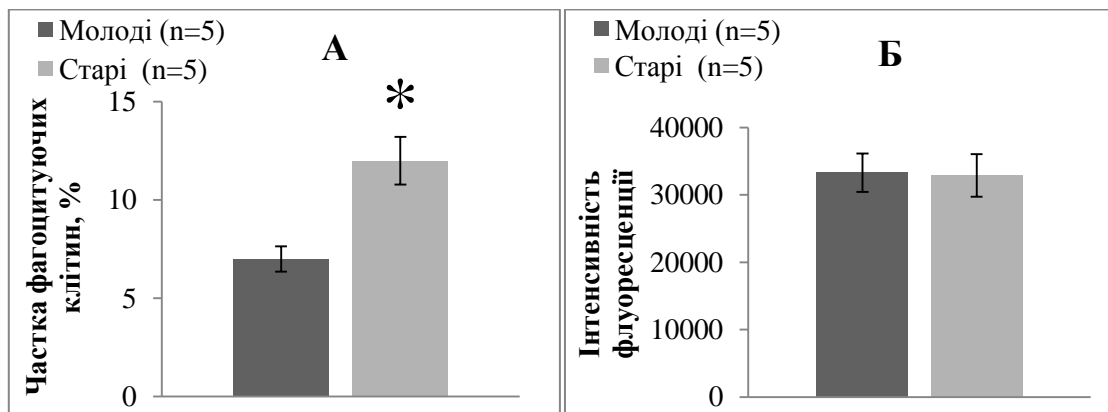


Рис. 8. Фагоцитарне число (А) та фагоцитарний індекс (Б) гранулоцитів селезінки, отриманих від мишей різного віку. Примітка. \* -  $p < 0,05$  порівняно з групою молодих тварин.

Таким чином, в умовах системного антигенного навантаження прозапальний метаболічний зсув спленічних нейтрофілів більш виразний у старих тварин, порівняно з молодими, що свідчить про односпрямованість вікових змін спленічних фагоцитів різних популяцій.

**Фенотиповий профіль макрофагів старих мишей та Т-клітин молодих тварин у вторинних лімфоїдних органах молодих партнерів по гетерохронному парабіозу.** Гетерохронний парабіоз – це експериментальна модель, яка дозволяє оцінити вплив клітинних та гуморальних факторів, що знаходяться в крові старих тварин, на показники імунної реактивності молодих мишей. Завданням цієї частини роботи було дослідження впливу макрофагів старих тварин, що мігрували у тканинну нішу вторинних лімфоїдних органів (лімфовузлів та селезінки) на фенотиповий профіль Т-клітин молодих тварин, котрі потрапляють у ці тканинні ніші як наївні, щойно диференційовані, функціонально незрілі клітини. Для дослідження міграції клітин ми хірургічно поєднували тварин ліній C57Bl/6 та B6.GFP. Каріоцити мишей лінії B6.GFP експресують ген зеленого флуоресцентного білка, що дозволяє відслідковувати такі клітини за допомогою флуоресцентних методів дослідження.

Відсоток макрофагів старих трансгенних тварин, що мігрували у лімфовузлі молодих гетерохронних парабіонтів вихідної лінії, в 1,8 ( $p < 0,05$ ) раза перевищував аналогічний показник у молодих ізохронних парабіонтів, у лімфовузлі яких мігрували макрофаги молодих трансгенних тварин (табл.2).

Таблиця 2

**Відсоток GFP-позитивних макрофагів та GFP-негативних Т-лімфоцитів з фенотипом регуляторних клітин у вторинних лімфоїдних органах молодих парабіонтів вихідної лінії**

Орган	Популяція клітин	Відсоток клітин (M±m)	
		Ізохронні парабіонти (n=5)	Гетерохронні парабіонти (n=5)
Лімфовузли	GFP+CD11b+	5,5±1,1	9,7±1,04*
	GFP-CD4+CD25+FoxP3+	3,82±1,11	10,2±0,9*
	GFP-CD4+CD44+FoxP3+	4,93±1,43	13,67±1,44*
Селезінка	GFP+CD11b+	15,46±0,83	22,3±0,64*
	GFP-CD4+CD25+FoxP3+	24±2,9	19±1,45
	GFP-CD4+CD44+FoxP3+	34,3±5,19	14±3,9*

Примітка. \* -  $p < 0,05$  порівняно з групою ізохронних парабіонтів.

Відомо, що у крові людей похилого віку та вторинних лімфоїдних органах старих мишей різних ліній збільшується кількість регуляторних Т-лімфоцитів (Hou et al, 2017). Тому, доцільно було дослідити кількісні характеристики цих клітин у вторинних лімфоїдних органах молодих парабіотичних партнерів за умов міграції у ці організовані лімфоїдні утвори мононуклеарних фагоцитів старих тварин. Фенотиповими маркерами, що використовуються для характеристики регуляторних Т-клітин, є транскрипційний фактор FoxP3, CD25 та CD44.

Як видно з таблиці 2, у молодих партнерів гетерохронних парабіотичних пар, лімфовузлі яких характеризувалися підвищеною кількістю макрофагів трансгенних старих тварин, спостерігалось підвищення відсотку GFP<sup>-</sup>CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>FoxP3<sup>+</sup>- та GFP<sup>-</sup>

CD4<sup>+</sup>CD44<sup>+</sup>FoxP3<sup>+</sup>-позитивних Т-лімфоцитів у 2,6 та 2,8 раза, відповідно, порівняно з молодими ізохронними парабіонтами.

Підвищення кількості макрофагів, що мігрували від старої тварини, може пояснюватися збільшенням експресії хемокінових рецепторів цими клітинами при старінні, і, відповідно, більш активною міграцією моноцитів у тканини молодого організму. Міграція у лімфовузлі молоді тварини макрофагів старої супроводжується зміною фенотипового профілю Т-клітин її лімфовузлів, імовірно, спричиненою дією цитокінів та інших біологічно активних медіаторів макрофагів старого організму. Ці зміни можуть викликати подальше порушення протипухлинного та антиінфекційного адаптивного імунного захисту організму (Jagger, 2014).

Нами виявлено достовірне підвищення відсотку макрофагів, що мігрували у селезінку молодих гетерохронних парабіонтів вихідної лінії від старих трансгенних тварин, що збігається з даними, отриманими нами при дослідженні лімфовузлів (табл.2).

Однак, на відміну від лімфовузлів, у селезінках молодих гетерохронних парабіонтів вихідної лінії зареєстровано зниження відсотку Т-лімфоцитів з фенотипом регуляторних клітин (табл.2). Зниження кількості регуляторних клітин може сприяти розвитку системних запальних процесів при старінні, що узгоджується з теорією інфламейджингу.

Таким чином, на моделі гетерохронного парабіозу показано посилення міграції макрофагів старих тварин у вторинні лімфоїдні органи у порівнянні з клітинами молодих тварин. Міграція мононуклеарних фагоцитів старих тварин у вторинні лімфоїдні органи супроводжувалася кількісними змінами частки регуляторних Т-лімфоцитів, що може розглядатися як один з механізмів вікових порушень функціонування Т-клітинної ланки адаптивної імунної реактивності.

**Модуляція фенотипово-функціонального профілю макрофагів моноцитарного походження, отриманих від старих мишей, при співкультивуванні з тММСК молодих тварин.** Відомо, що при співкультивуванні з ММСК макрофаги набувають протизапального поляризаційного статусу, що може бути корисним для лікування вікових захворювань, зумовлених хронічним запальним процесом (Takizawa et al., 2017). Разом з тим, віковий аспект використання цього типу клітинної терапії, а також вплив ММСК на макрофаги різного онтогенетичного походження досліджені недостатньо.

Співкультивування з тММСК спричиняло різкі зміни спрямованості метаболізму аргініну – основного метаболічного маркера функціональної поляризації фагоцитів. У кістковомозкових макрофагів, отриманих від молодих та старих мишей, при співкультивуванні з сингенними тММСК спостерігалось зростання аргіназної активності у 78 та 131 разів, відповідно, порівняно з контрольними клітинами ( $p < 0,001$ ) (табл.3).

**Аргіназна активність макрофагів моноцитарного походження та перитонеальних макрофагів, отриманих від мишей різного віку, після співкультивування з сингенними мультипотентними мезенхімними стромальними клітинами тимусу *in vitro***

Показники	Аргіназна активність (одиниць/10 <sup>9</sup> клітин)			
	Макрофаги молодих мишей (n=4)	Макрофаги молодих мишей+тММСК (n=4)	Макрофаги старих мишей (n=4)	Макрофаги, старих мишей+тММСК (n=4)
Макрофаги моноцитарного походження	0,059±0,005	4,65±0,17**	0,036±0,003*	4,74±0,26 <sup>#</sup>
Перитонеальні макрофаги	18,38±1,29	121,53±8,53**	24,48±2,55*	202,75±49,12 <sup>#</sup>

Примітки: \* -  $p < 0,05$  порівняно з контрольними макрофагами молодих мишей, \*\* -  $p < 0,001$  порівняно з контрольними макрофагами молодих мишей, # -  $p < 0,05$  порівняно з контрольними макрофагами старих мишей.

Отримані нами дані узгоджуються з результатами досліджень інших авторів, які продемонстрували індукцію протизапальної активації макрофагів під дією ММСК. Показано, що у мишей, макрофаги яких не експресували аргіназу, розвивався значний гранулематозний запальний процес. Більше того, макрофаги, отримані від таких мишей, були не здатні інгібувати проліферацію Т-лімфоцитів *in vitro* (Rodriguez, 2017). Тому така сильна тММСК-опосередкована стимуляція аргіназної активності може мати позитивний клінічний ефект в контексті хронічного запалення, асоційованого з віком.

Співкультивування макрофагів моноцитарного походження із сингенними тММСК викликало підвищення експресії фенотипового маркера CD206 у 6 разів у макрофагів молодих мишей та у 3 рази у фагоцитів старих тварин порівняно з відповідними контрольними клітинами ( $p > 0,05$ ) (рис. 9).

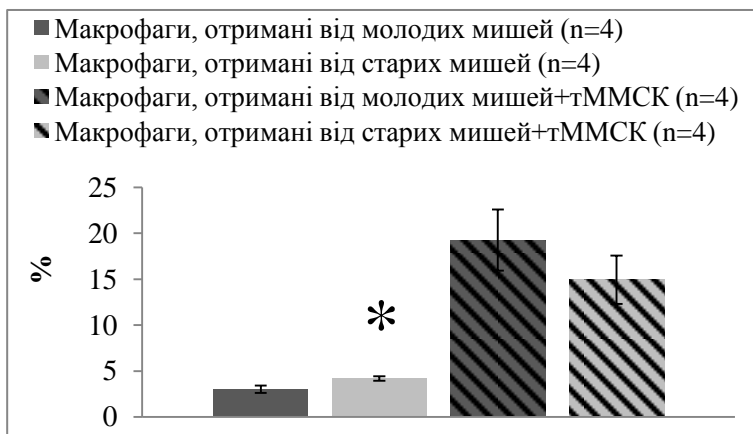


Рис. 9. Відсоток макрофагів моноцитарного походження, отриманих від мишей різного віку, що експресували CD206 після співкультивування з сингенними тММСК. Примітка. \* -  $p < 0,05$  порівняно з контрольними макрофагами молодих тварин.

Як зазначалося вище, посилення експресії CD206 у поєднанні з посиленням метаболізму аргініну аргіназою розглядається як ознака протизапальної функціональної поляризації фагоцитів. У той час, як посилення експресії цього фенотипового маркера у відсутності змін метаболізму аргініну може бути лише

ознакою функціонального дозрівання незрілих фагоцитів. Таким чином, контактне співкультивування макрофагів моноцитарного походження з тММСК викликало протизапальну функціональну поляризацію цих клітин.

Нами виявлено підвищення аргіназної активності перитонеальних макрофагів молодих та старих мишей у 6,5 ( $p < 0,001$ ) та 8 разів ( $p < 0,05$ ), відповідно, при співкультивуванні з тММСК (табл.3). Ці дані узгоджуються з результатами досліджень іншої наукової групи, яка також виявила протизапальну активацію перитонеальних макрофагів мишей лінії C57Bl/6 при співкультивуванні з ММСК жирової тканини людини (Hu, 2016).

Таким чином, більш виразний протизапальний модуляторний вплив на метаболізм аргініну зареєстровано нами по відношенню до макрофагів кістковомозкового походження і у старих тварин, що дозволяє припустити більший потенціал застосування препаратів тММСК у випадку системних (а не локальних тканинних) запальних процесів, особливо з віком.

### **ВИСНОВКИ**

У дисертації наведено теоретичне узагальнення та представлено вирішення одного з важливих питань імунogerонтології – з'ясування характеру змін функціонального профілю фагоцитів різного походження, їх впливу на фенотиповий профіль лімфоцитів вторинних лімфоїдних органів, чутливості до модуляторної дії сингенних мультипотентних мезенхімних стромальних клітин з віком.

1. У макрофагів моноцитарного походження старих мишей зареєстровано прозапальну поляризацію метаболізму аргініну: зниження аргіназної активності на 16% у макрофагів селезінки та на 40% у макрофагів кісткового мозку, порівняно з відповідними клітинами молодих тварин. Макрофаги ембріонального походження старих мишей характеризувалися зростанням аргіназної активності альвеолярних та перитонеальних макрофагів на 19% та 33% порівняно з клітинами молодих тварин, відповідно.
2. Встановлено достовірно вищий рівень продукції реактивних форм кисню макрофагами кісткового мозку та селезінки старих мишей у 3,9 та 1,5 рази, відповідно, порівняно з клітинами молодих тварин. У альвеолярних макрофагів старих мишей відсоток клітин, що продукували РФК, нижчий у 6 разів порівняно з клітинами молодих тварин. Рівень продукції РФК перитонеальними макрофагами старих мишей на 30% нижчий, ніж у молодих тварин.
3. У гранулоцитів селезінки старих тварин виявлено у 1,5 рази вищі рівні продукції реактивних форм кисню порівняно з клітинами молодих мишей.
4. У макрофагів ембріонального походження старих мишей зареєстровано достовірне зниження фагоцитарного числа: на 27% у альвеолярних макрофагів та на 23% у перитонеальних макрофагів, порівняно з клітинами молодих тварин. Показники фагоцитарного індексу старих та молодих тварин не відрізнялися.
5. На моделі гетерохронного парабіозу виявлено посилення міграційної здатності фагоцитів старих тварин. Присутність фагоцитів старих тварин у вторинних лімфоїдних органах молодих гетерохронних парабіонтів асоціюється зі збільшенням кількості Т-лімфоцитів з фенотипом регуляторних клітин у лімфовузлах, та зменшенням кількості цих клітин у селезінці.

6. Співкультивування макрофагів моноцитарного походження із сингенними тММСК супроводжується зростанням експресії фенотипового маркера альтернативної активації CD206: у 6 разів у макрофагів молодих мишей та у 3 рази у фагоцитів старих тварин порівняно з контрольними тваринами відповідної вікової категорії.
7. тММСК в умовах контактного співкультивування спричиняють протизапальний зсув метаболізму аргініну макрофагами моноцитарного та ембріонального походження зі зростанням аргіназної активності макрофагів моноцитарного походження молодих та старих мишей у 78 та 131 рази; аргіназної активності перитонеальних макрофагів - у 6,5 та 8 разів відповідно.

## **СПИСОК ОПУБЛІКОВАНИХ ПРАЦЬ ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ**

### **Статті у наукових фахових виданнях**

1. Довгий РС., Шитіков ДВ., Пішель ІМ., Опейда ЄВ., Сківка ЛМ. Функціональний стан та метаболічна поляризація макрофагів селезінки старих імунованих мишей. Проблемы старения и долголетия. 2015; 24 (2): 144-52. *(Здобувачем проведено біохімічні та спектрофотометричні методи оцінки метаболічної поляризації макрофагів, проаналізовано літературні джерела та узагальнені результати).*
2. Dovhyi R., Pishel I., Butenko G., Skivka L, Induction of neonatal tolerance to GFP-labeled karyocytes in C57/B6 mice. Journal of Immunological Methods. 2017; 447: 92-4. *(Здобувачем проведено експериментальні дослідження за темою статті, проаналізовано літературні джерела та узагальнені результати).*
3. Dovhyi RS., Nikolsky IS., Skivka LM. The effect of thymic mesenchymal stromal cells on arginase activity and nitric oxide produced by macrophages of young and aged mice. The Ukrainian Biochemical Journal. 2017; 3: 25-30. *(Здобувачем проведено експериментальні дослідження за темою статті, проаналізовано літературні джерела та узагальнені результати).*
4. Dovhyi RS., Nikolsky IS., Skivka LM. Age-related changes of arginase activity and nitric oxide level in phagocytes and their modulation by thymic mesenchymal stromal cells. Біологічні студії / Studia Biologica. 2017; 11 (2): 13-22. *(Здобувачем проведено експериментальні дослідження за темою статті, проаналізовано літературні джерела та узагальнені результати).*
5. Довгий РС., Сківка ЛМ. Функціональний стан альвеолярних макрофагів та нейтрофілів кісткового мозку мишей різного віку. Вісник проблем біології та медицини. 2017; 4. 1 (139): 79-84.
6. Dovgiy R., Shitikov D., Pishel I., Opeida E., Skivka L. Functional state and metabolic polarization of splenic macrophages from old immunized mice // Міжнародна конференція молодих вчених 2015 “Today’s challenges in molecular and cell biology”, 21-25 вересня 2015 р.: матер. конфер. – Київ, 2015. – С. 170.
7. Dovgiy R., Shitikov D., Pishel I., Opeida E., Usok V. Age-related changes in metabolic polarization of splenic macrophages obtained from immunized mice // II Міжнародна наукова конференція «Мікробіологія та імунологія – перспективи розвитку в XXI столітті», 14-15 квітня 2016 р.: матер. конфер. – Київ, 2016. – с. 126-127.

8. Довгий Р.С. Індукція неонатальної імунологічної толерантності до білка GFP у мишей лінії C57/B6 // XI Міжнародна конференція молодих учених, 26 листопада -2 грудня 2016 р.: матер. конфер. – Харків, 2016. – С. 83.
9. Довгий Р.С. Противовоспалительная активация макрофагов мышей разного возраста при кокультивировании с тимическими мезенхимальными стволовыми клетками // XII Международная научная конференция студентов и молодых ученых «Наука и образование – 2017», 14 апреля 2017 г.: матер. конфер. – Астана, Казахстан, 2017. – с. 994 – 999.
10. Dovgii R.S., Nikolsky I.S. Arginine metabolism of macrophages from mice of different age upon coculture with mesenchymal stromal cells // XIII Міжнародна наукова конференція студентів і аспірантів «Молодь і поступ біології», 25-27 квітня 2017 р.: матер. конфер. – Львів, 2017. – С. 209.
11. Довгий Р.С., Сківка Л.М. Роль мікрооточення вторинних лімфоїдних органів у формуванні активаційного статусу макрофагів при старінні (пілотне дослідження) // V міжнародна науково-практична конференція «Сучасні проблеми біології, екології та хімії», 26-28 квітня 2017 р.: матер. конфер. – Запоріжжя, 2017. – с. 156 – 157.
12. Dovhyi R., Nikolsky I., Skivka L. Anti-inflammatory activation of macrophages from mice of different age cocultured with thymic mesenchymal stromal cells // EMBO Conference: Advances in Stem Cells and Regenerative Medicine, 23 – 26 May 2017: матер. конфер. – Heidelberg, Germany, 2017. – P. 112.
13. Довгий Р.С., Сківка Л.М. Вікові особливості поляризації метаболізму аргініну кістковомозковими та перитонеальними макрофагами при співкультивуванні з тимічними мезенхімними стовбуровими клітинами // Психофізіологічні та вісцеральні функції в нормі і патології: VIII Міжнар. Наук. Конф., присвячена 175-річчю кафедри фізіології та анатомії людини та тварин Київського національного університету імені Тараса Шевченка, 17-20 жовтня 2017 р.: матер. конфер. – Київ, 2017. – С. 126.

## АНОТАЦІЯ

**Довгий Р.С. Функціональна поляризація фагоцитів та її корекція у тварин різних вікових груп.** – Рукопис.

Дисертація на здобуття наукового ступеня кандидата біологічних наук за спеціальністю 03.00.09 – імунологія. – Київський національний університет імені Тараса Шевченка МОН України. – Київ, 2018.

Дисертація присвячена дослідженню вікових особливостей фенотипово-функціонального профілю макрофагів різної локалізації та онтогенезу, а також нейтрофілів у мишей, та впливу мезенхімних стромальних клітин на метаболізм фагоцитів.

Вперше виявлено та охарактеризовано особливості змін метаболічного профілю фагоцитів різної локалізації та походження з віком у мишей. Встановлено, що макрофагам моноцитарного походження старих тварин властивий прозапальний зсув метаболізму, у той час як макрофагам ембріонального походження притаманна протизапальна метаболічна спрямованість з посиленням аргіназної активності та зниженням оксидативного метаболізму. Розширено існуючі уявлення стосовно

впливу макрофагів лімфоїдних органів на вікові зміни Т-лімфоцитів. На моделі гетерохронного парабіозу показано, що макрофаги старих тварин характеризуються посиленою міграцією у вторинні лімфоїдні органи молодих тварин, що супроводжується збільшенням частки Т-лімфоцитів з фенотипом регуляторних клітин у лімфоузлах та зменшенням відсотку цих клітин у селезінці.

В умовах *in vitro* продемонстровано можливість протизапальної активації метаболізму макрофагів різної локалізації та онтогенетичного походження, отриманих від старих мишей, при співкультивуванні з мезенхімними стромальними клітинами тимусу (тММСК) молодих тварин. При цьому виявлено достовірно більш виразний модуляторний ефект тММСК на макрофаги моноцитарного походження, отримані від старих мишей, і не виявлено вікових відмінностей модуляторного впливу тММСК на макрофаги ембріонального походження.

**Ключові слова:** фагоцити, метаболічна поляризація, старіння, мультипотентні мезенхімні стромальні клітини, гетерохронний парабіоз.

### АННОТАЦИЯ

**Довгий Р.С. Функциональная поляризация фагоцитов и ее коррекция у животных разных возрастных групп.** – Рукопись.

Диссертация на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.00.09 – иммунология. – Киевский национальный университет имени Тараса Шевченко МОН Украины. – Киев, 2018.

Диссертация посвящена исследованию возрастных особенностей фенотипического и функционального профиля макрофагов различной локализации и онтогенеза, а также нейтрофилов у мышей, и влиянию мезенхимальных стромальных клеток на метаболизм фагоцитов.

Установлено, что макрофагам моноцитарного происхождения старых животных свойственны провоспалительный сдвиг метаболизма, в то время как макрофагам эмбрионального происхождения свойственна противовоспалительная метаболическая направленность с усилением аргиназной активности и снижением оксидативного метаболизма. На модели гетерохронного парабиоза показано, что макрофаги старых животных характеризуются усиленной миграцией во вторичные лимфоидные органы молодых животных, что сопровождалось увеличением доли Т-лимфоцитов с фенотипом регуляторных клеток в лимфоузлах и уменьшением процента этих клеток в селезенке.

В условиях *in vitro* продемонстрирована возможность противовоспалительной активации метаболизма макрофагов различной локализации и онтогенетического происхождения, полученных от старых мышей, при кокультивировании с мультипотентными мезенхимальными стромальными клетками тимуса (тММСК) молодых животных. При этом обнаружено достоверно более выраженный модуляторный эффект тММСК на макрофаги моноцитарного происхождения, полученные от старых мышей, и не обнаружено возрастных отличий модуляторного влияния тММСК на макрофаги эмбрионального происхождения.

**Ключевые слова:** фагоциты, метаболическая поляризация, старение, мультипотентные мезенхимальные стромальные клетки, гетерохронный парабиоз.

## SUMMARY

**Dovhyi R.S. Functional polarization of phagocytes and its correction in animals of different age groups.** – The manuscript.

Thesis for PhD degree in specialty 03.00.09 – Immunology. – Taras Shevchenko National University of Kyiv, Ministry of Education and Science of Ukraine, Kyiv, 2018.

It is known that the vast majority of tissue-resident macrophages have embryonic origin. Preliminary research shows that macrophages of embryonic and monocytic origin change differently with aging. Many pathological states are associated with the inappropriate metabolic profile of macrophages. Recent studies showed that multipotent mesenchymal stromal cells (MMSC) are promising candidates in the treatment of immune-mediated disorders due to their ability to cause anti-inflammatory metabolic skew of leukocytes, including macrophages. However, the capability of MMSC to modulate metabolic state of macrophages of different origin from aged organism remains largely unexplored.

The aim of the present study was the investigation of phenotypic and functional profile of phagocytes and its correction in mice of different ages.

Age-related changes in the metabolic profile of murine phagocytes of different localization and ontogenetic origin were discovered and characterized for the first time. Macrophages of the monocytic origin (bone marrow-derived and splenic macrophages), obtained from aged mice were characterized by pro-inflammatory (M1) skew of arginine metabolism, while macrophages of embryonic origin (peritoneal and alveolar macrophages) exhibited anti-inflammatory skew of arginine metabolism (M2) accompanied by the decrease of oxidative metabolism.

Current data concerning the effect of macrophages in lymphoid organ niche on age-related changes of T-lymphocytes were expanded exploiting heterochronic parabiosis model. Macrophages of aged mice were characterized by significantly higher migration rate into spleen and lymph nodes of the young animals. Increase in the macrophage fraction in the lymph nodes was associated with a higher number of T-lymphocytes with regulatory phenotype in this organ. However, migration of macrophages from aged animals into the spleen of young mice was accompanied by the decrease of regulatory T cells number.

New data on the modulatory effect of MMSC on the metabolic profile of macrophages was obtained. The possibility of anti-inflammatory activation of metabolism in macrophages of different localization and ontogenetic origin obtained from old mice was demonstrated *in vitro* in coculture with thymic MMSC of young animals. In case of macrophages of monocytic origin, there was more profound effect of thymic MMSC on cells obtained from aged mice as compared to young. There was no age-dependence of MSC modulatory effect on macrophages of embryonic origin.

Our results experimentally substantiate the feasibility of the use of MMSC cell therapy for anti-inflammatory metabolic polarization of tissue macrophages especially in aged persons. In addition, the protocol of neonatal tolerance induction to GFP-labeled caryocytes was developed. It can be used in the studies of cell migration and homing.

**Keywords:** phagocyte, metabolic polarization, aging, multipotent mesenchymal stromal cells, heterochronic parabiosis.



Підписано до друку 03.05.2018 р. Формат 60 x 84/16.

Папір офсетний. Друк цифровий.

Обсяг 0,9 ум.-друк. арк. Наклад 100 прим. Зам. № П-2018-440

---

Надруковано у ЦОП «Глобус» ФОП Кравченко Я.О.

Свідоцтво № ДК 6078 від 12.03.2018 р.

02094, м. Київ, вул. Мініна, буд. 12.

Тел. (044) 561-95-31, (067) 506-57-55, (050) 57-06-555.