

Міністерство освіти і науки України
Київський національний університет імені Тараса Шевченка
Міністерство освіти і науки України
Київський національний університет імені Тараса Шевченка

Кваліфікаційна наукова
праця на правах рукопису

ДОВГИЙ РОМАН СЕРГІЙОВИЧ

УДК 57.017.67: 612.017.11: 571.27

ДИСЕРТАЦІЯ

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

03.00.09 – імунологія

Подається на здобуття наукового ступеня кандидата біологічних наук

Дисертація містить результати власних досліджень. Використання ідей,
результатів і текстів інших авторів мають посилання на відповідне джерело

_____ Довгий Р.С.

Науковий керівник Сківка Лариса Михайлівна доктор біологічних наук,
професор.

Київ – 2018

АНОТАЦІЯ

Довгий Р.С. Функціональна поляризація фагоцитів та її корекція у тварин різних вікових груп. – Кваліфікаційна наукова праця на правах рукопису.

Дисертація на здобуття наукового ступеня кандидата біологічних наук (доктора філософії) за спеціальністю 03.00.09 – імунологія. – ННЦ «Інститут біології та медицини», Київський національний університет імені Тараса Шевченка, Київ, 2018.

Старіння супроводжується зниженням імунної реактивності організму, механізми якого наразі активно досліджуються, зважаючи на те, що, згідно World Population Ageing Report 2017, чисельність людей похилого віку стрімко зростає у всіх країнах світу і досягає максимальних показників у європейських державах. Наслідком зниження імунної реактивності з віком є підвищення захворюваності, у першу чергу, на інфекційні хвороби та онкологічну патологію. Виключну роль в ініціюванні реакцій антиінфекційного та протипухлинного імунітету відіграють клітинні чинники вродженого імунітету, які є першою лінією імунного захисту організму. Саме з цієї причини дослідження механізмів старіння системи вродженого імунітету та пошук засобів відновлення цієї ланки імунної системи є актуальною задачею сучасної імунології.

Моно- та поліморфноядерні фагоцити – це ключові ефекторні клітини вродженого імунітету, котрі виконують патрульну функцію в циркуляції та у всіх без виключення тканинах і органах. Від їх функціонального стану і метаболічної спрямованості залежить характер і ефективність адаптивної імунної відповіді, а також імунна реактивність організму в цілому. Фагоцити різних популяцій характеризуються надзвичайною пластичністю метаболізму в залежності від стимулів, що обумовлюють їхню активацію. Загальноприйнятою є концепція активації макрофагів, що передбачає поляризацію цих клітин у 2 протилежні активаційні стани: прозапальні, або класично активовані (M1),

залучені в реакції антиінфекційного та протипухлинного імунітету, та протизапальні, або альтернативно активовані (M2), котрі відіграють ключову роль у процесах репарації та регенерації. Кожен з цих поляризаційних станів передбачає активацію метаболічних реакцій, необхідних для підтримки гомеостазу організму.

Дослідження останніх років значно збагатили наші знання стосовно походження тканинних макрофагів. Виявлено, що більшість тканинних макрофагів мають ембріональне походження. Вони є довгоживучими клітинами, здатними до проліферації, і не потребують надходження моноцитів в тканини для підтримки своєї кількості на сталому рівні. Відомо, що функціональний стан фагоцитів змінюється при старінні. Однак, характер метаболічних змін цих клітин, залежно від їх походження та локалізації, залишається практично недослідженим.

Нейтрофіли, подібно до макрофагів, теж володіють значною функціональною пластичністю. Крім того, описано наявність резидентних тканинних популяцій поліморфноядерних фагоцитів. Разом з тим, вікові зміни нейтрофілів різної локалізації є мало вивченими.

Порушення клітинної ніші вторинних лімфоїдних органів, що містить у тому числі й фагоцити, розглядається як одна з вірогідних причин розвитку дисфункції Т-лімфоцитів при старінні. Однак, характер вікових змін фагоцитів у мікрооточенні Т-клітин організованих лімфоїдних утворів практично недосліджений.

Важливою ознакою вікових змін імунної реактивності є також явище «інфламейджингу» (хронічного запального процесу) котрий, на думку багатьох вчених, лежить в основі патогенезу серцево-судинних захворювань, метаболічного синдрому та інших вікових хвороб. Фагоцити, як відомо, відіграють ключову роль у розвитку цього процесу. З огляду вище зазначене активно розробляються терапевтичні підходи для маніпуляції поляризаційним статусом фагоцитів при різних захворюваннях, у тому числі асоційованих з віком. Одним з таких терапевтичних підходів може розглядатися клітинна

терапія з використанням мультипотентних мезенхімних стромальних клітин, які мають здатність регулювати реакції запалення. Розробка таких методів вимагає глибокого знання вікових фенотипово-функціональних особливостей фагоцитів.

Метою даної роботи було дослідити вікові особливості фенотипово-функціонального профілю фагоцитів різної локалізації та онтогенезу у мишей.

В роботі досліджувалися вікові зміни метаболізму аргініну, експресії фенотипових маркерів, фагоцитарної активності та продукції реактивних форм кисню (РФК) фагоцитами різного походження у мишей. Також проаналізовано вплив макрофагів старих мишей на Т-лімфоцити молодих тварин на моделі гетерохронного парабіозу. Досліджено здатність мультипотентних мезенхімних стромальних клітин тимусу (тММСК) молодих мишей модулювати метаболічний статус макрофагів різного походження старих тварин.

Для аналізу макрофагів моноцитарного походження використовували макрофаги, диференційовані з моноцитів кісткового мозку *in vitro* в присутності М-КСФ, та макрофаги селезінки мишей. Для дослідження макрофагів ембріонального походження використовували альвеолярні та перитонеальні макрофаги. Крім того, також аналізували вікові зміни нейтрофілів кісткового мозку та селезінки.

Макрофаги моноцитарного походження старих мишей характеризувалися прозапальним метаболічним зсувом порівняно з відповідними клітинами молодих тварин. Це проявлялося зниженням аргіназної активності на 40% у макрофагів кісткового мозку та на 16% у макрофагів селезінки, порівняно з відповідними клітинами молодих мишей. Крім того, зареєстровано достовірне зростання інтенсивності продукції РФК макрофагами селезінки та кісткового мозку старих мишей у 1,5 та 3,9 раза, відповідно, порівняно з клітинами молодих тварин. Отримані нами результати узгоджуються з даними літератури стосовно розвитку при старінні явища «інфламейджингу», та збільшення частоти виникнення системних захворювань запальної етіології, таких як атеросклероз, гломерулонефрит, діабет тощо.

У макрофагів ембріонального походження, навпаки, виявлено протизапальний зсув метаболізму при старінні. Це виражалось у підвищеній аргіназній активності перитонеальних та альвеолярних макрофагів старих мишей на 33% та 19%, відповідно, порівняно з клітинами молодих тварин. Також у фагоцитів обох досліджуваних популяцій спостерігалось послаблення інтенсивності оксидативного метаболізму. У перитонеальних макрофагів старих мишей інтенсивність продукції РФК була знижена на 30% порівняно з клітинами молодих тварин. Відсоток альвеолярних макрофагів старих мишей, що продукували РФК, був у 6 разів меншим порівняно з контрольними клітинами. На відміну від макрофагів моноцитарного походження, резидентні макрофаги ембріонального походження старих мишей характеризувалися порушеннями фагоцитарної функції, що вказує на розвиток більш значних вікових порушень цих клітин. У перитонеальних та альвеолярних макрофагів старих мишей зареєстровано достовірне зниження фагоцитарного числа на 23% та 27% відповідно, порівняно з аналогічними клітинами молодих тварин. Отримані нами дані є одним з пояснень зростання частоти виникнення злоякісних новоутворень, а також посилення чутливості до інфекційних чинників при старінні, оскільки ці процеси зумовлені послабленням патрульної функції саме резидентних тканинних макрофагів і набуттям ними протизапального активаційного статусу.

У поліморфноядерних фагоцитів різної локалізації також виявлено вікові зміни метаболічного статусу. У нейтрофілів кісткового мозку старих мишей зареєстровано протизапальну метаболічну спрямованість, що проявлялася зростанням аргіназної активності, зниженням продукції нітритів та відсотку клітин, що продукували РФК. У гранулоцитів селезінки, навпаки, спостерігалась прозапальна поляризація метаболізму при старінні, що проявлялася достовірним підвищенням інтенсивності продукції РФК у 1,5 рази порівняно з клітинами молодих мишей.

Як уже зазначалося вище, макрофаги входять до складу клітинної ніші вторинних лімфоїдних органів, і здатні регулювати Т-клітинну ланку імунітету.

Тому припускається, що вікові зміни Т-лімфоцитів можуть бути викликані порушенням функціонування макрофагів при старінні. Наступною частиною роботи було вивчення впливу макрофагів старих мишей на фенотиповий профіль Т-лімфоцитів вторинних лімфоїдних органів молодих тварин на моделі гетерохронного парабіозу. З цією метою хірургічно поєднували мишей ліній C57Bl/6 та B6.GFP, що дозволило проаналізувати міграцію GFP-позитивних лейкоцитів старих мишей лінії B6.GFP у вторинні лімфоїдні органи молодих C57Bl/6 мишей.

Зареєстровано посилення міграції мононуклеарних фагоцитів старих мишей у вторинні лімфоїдні органи молодих партнерів по парабіозу порівняно з клітинами молодих тварин. Хомінг макрофагів старих мишей у селезінку супроводжувалася формуванням прозапального профілю цих клітин, у той час як при мігруванні у лімфовузли не спостерігалось змін фенотипу макрофагів. Також при міграції мононуклеарів старих мишей у вторинні лімфоїдні органи молодих тварин виявлено зростання кількості регуляторних Т-клітин у лімфатичних вузлах та зниження їх кількості у селезінці порівняно з ізохронними парабіонтами.

Макрофаги можуть розглядатися як перспективна мішень для корекції порушень імунної системи при старінні та для профілактики і лікування вікових захворювань, обумовлених дисфункцією цих клітин. Тому, метою останнього етапу наших досліджень був порівняльний аналіз впливу сингенних тММСК молодих тварин на макрофаги моноцитарного та ембріонального походження. Для модуляції функціонального стану макрофагів було обрано контактний спосіб співкультивування з тММСК протягом 7 діб, оскільки такий термін, згідно даних літератури, потрібен для реалізації модуляторного ефекту цього клітинного препарату.

При контактній взаємодії макрофагів різного походження з тММСК спостерігалось посилення аргіназної активності, що вказує на протизапальну спрямованість модуляторного впливу цього клітинного препарату. Аргіназна активність перитонеальних макрофагів молодих та старих мишей зростала у 6,5

та 8 разів; аргіназна активність макрофагів моноцитарного походження – у 78 та 131 раза відповідно. Враховуючи більш значний вплив тММСК на метаболізм аргініну у макрофагів моноцитарного походження старих тварин, можна припустити, що цей клітинний препарат володітиме потужнішим ефектом при лікуванні системних запальних процесів при старінні. Протизапальна спрямованість ефекту тММСК підтверджується також зростанням експресії макрофагами моноцитарного походження фенотипового маркера альтернативної активації CD206 у 6 разів у макрофагів молодих мишей та у 3 рази у клітин старих тварин порівняно з відповідним контролем. Крім того, виявлено посилення оксидативного метаболізму та фагоцитарної активності макрофагів моноцитарного походження молодих тварин після співкультивування з тММСК. Враховуючи важливу роль оксидативного метаболізму та фагоцитарної активності у репаративних процесах, можна припустити більшу ефективність застосування клітинної терапії з використанням тММСК в регенеративній медицині у осіб молодого віку. Проведені дослідження експериментально обґрунтовують можливість застосування клітинної терапії з використанням тММСК для метаболічної реполяризації макрофагів різного онтогенетичного походження. Крім того, за результатами експериментів розроблено методику індукції неонатальної толерантності до GFP-позитивних каріоцитів, яка може бути використана у дослідженнях процесів міграції і хомінгу клітин імунної системи.

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

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. – ESC «Institute of Biology and Medicine», Kyiv National Taras Shevchenko University, Kyiv, 2018.

Aging is accompanied by a decrease in the immune reactivity of the organism. Mechanisms of such immunosenescence are currently being actively explored, since, according to the World Population Ageing Report 2017, the number of elderly people is rapidly increasing in all countries of the world and reaches the highest rates in European countries. Immunosenescence manifests as an increase in morbidity, primarily in infectious diseases and oncological pathology. Cellular factors of innate immunity - the first line of immune defense - play a key role in initiating anti-infective and antitumor immune responses. It is for this reason the study of mechanisms of the senescence of innate immunity as well as the search for methodology for the rejuvenation of this part of the immune system is one of the main challenges in modern immunology.

Mono- and polymorphonuclear phagocytes are the key effector cells of the innate immune system which play patrolling function in the circulation and in all tissues and organs. Their functional state and metabolic profile determine the character and effectiveness of the adaptive immune response and immune reactivity of an organism as a whole. Different populations of the phagocytes have exceptional plasticity of the metabolism, which depends on the stimuli determining their activation. Generally accepted conception of the macrophage activation suggests polarization of these cells into 2 opposite activation states: pro-inflammatory or classically activated (M1), involved into the immunity against infections and cancer, and anti-inflammatory or alternatively activated (M2), which play the key role in the reparation and regeneration. Both polarization states provide activation of the metabolic reactions which are necessary for the maintenance of the homeostasis.

Research over the last years greatly expanded our knowledge about the origin of the tissue macrophages. It has been found that the majority of the tissue macrophages have an embryonic origin. They are the long-lived cells that are able to proliferate and don't require migration of the monocytes into the tissues for the maintenance of their number at a constant level. It is well known that the functional state of the phagocytes changes upon aging. But the nature of the metabolic changes of these cells depending on their origin and location remains unresolved.

Neutrophils, similarly to macrophages, also possess considerable functional plasticity. Moreover, there is also data on the existence of the resident tissue polymorphonuclear phagocyte populations. At the same time, age-related changes of the neutrophils from the different locations are poorly studied.

Age-related abnormalities in cell niche of secondary lymphoid organs, including phagocyte metabolism alterations, are considered as one of the most likely causes of the T-lymphocyte function impairment in aging. However, the character of age-related changes in phagocytes in microenvironment of the secondary lymphoid organ T-cell is practically unexplored.

The important feature of the age-related changes in the immune reactivity is the phenomenon called “inflamm-aging” – the chronic inflammatory process, which, according to the opinion of many scientists, underlies the pathogenesis of cardiovascular diseases, metabolic syndrome, and other age-related diseases. Phagocytes are known to play the crucial role in the development of this process. Given the abovementioned, the development of therapeutic approaches to manipulate the polarization state of phagocytes for the treatment of different pathological states, including those associated with aging is warranted. One of such approaches may be a cell therapy with the use of multipotent mesenchymal stromal cells, which have the ability to regulate inflammatory reactions. Development of such methods requires deep knowledge of the age-related phenotypic and functional features of phagocytes.

The aim of this work was to investigate the age features of the phenotypic and functional profile of phagocytes of different localization and ontogenesis in mice.

The study was devoted to the age-related changes in arginine metabolism, expression of phenotypic markers, phagocytic activity and reactive oxygen species (ROS) production by the murine phagocytes of different origin. Also, the influence of macrophages from aged mice on the T-lymphocytes of young animals was studied using heterochronic parabiosis model. The ability of thymic multipotent mesenchymal stromal cells (tMMSC) from young mice to modulate metabolic state of macrophages of different origin from aged animals was explored.

Macrophages differentiated from bone marrow-derived monocytes *in vitro* in M-CSF-containing medium and splenic macrophages were used as monocyte-derived macrophage. Alveolar and peritoneal macrophages were used for the analysis of the yolk sac-derived macrophages. Also, age-related changes of the bone marrow-derived and splenic neutrophils were studied.

Monocyte-derived macrophages from aged mice demonstrated a pro-inflammatory metabolic shift as compared to their counterparts from young animals. This metabolic skew manifested by the decrease of arginase activity by 40% in bone marrow-derived macrophages and by 16% - in splenic macrophages as compared to corresponding cells from young mice. Moreover, statistically significant increase in ROS production by 1.5 and 3.9 times was registered in the splenic and bone marrow-derived macrophages, respectively, as compared to the cells from young animals. These results are in agreement with “inflammaging” phenomenon and increasing incidence of systemic inflammatory diseases, such as atherosclerosis, glomerulonephritis, diabetes etc., upon aging.

On the contrary, there was an anti-inflammatory metabolic skew in macrophages of the embryonic origin upon aging. It was confirmed by the increase of arginase activity in the peritoneal and alveolar macrophages from aged mice by 33% and 19%, respectively, as compared to the cells from young animals. Also, oxidative metabolism intensity was down-regulated in both studied phagocyte populations. In the peritoneal macrophages from old mice, ROS production intensity was lowered by 30% as compared to the cells from young animals. The fraction of ROS-produced alveolar macrophages in aged mice was decreased by 6 times as compared to their counterparts from young mice. Unlike monocyte-derived macrophages, resident tissue yolk sac-derived macrophages from aged mice had impaired phagocytic function, indicating the development of more pronounced age-related changes of these cells. We found a statistically significant decrease in the fraction of phagocytizing peritoneal and alveolar macrophages from old mice by 23% and 27%, respectively, as compared to corresponding cells from young animals. These data may explain enhanced cancer incidence and heightened susceptibility to infections

upon aging because these pathologic processes are caused by impairment of the patrolling function and acquisition of anti-inflammatory activation state by the tissue-resident macrophages.

Polymorphonuclear phagocytes of different location also had age-related changes in metabolic state. There was an anti-inflammatory metabolic shift in bone marrow neutrophils from old mice manifested by enhanced arginase activity, down-regulated nitric oxide production and lowered fraction of ROS-producing cells. Conversely, splenic granulocytes were characterized by the pro-inflammatory metabolic polarization upon aging, manifested by a statistically significant increase in ROS production by 1.5 times as compared to cells from young mice.

As previously mentioned, cell niche of the secondary lymphoid organs contains macrophages which may regulate T cell-mediated immunity. Thus it has been assumed that age-related changes of T lymphocytes may be caused by impaired functioning of macrophages upon aging. The next part of the study was to investigate the influence of macrophages from aged mice on the phenotypic profile of T lymphocytes in the secondary lymphoid organs using a heterochronic parabiosis model. For this purpose, C57Bl/6 and B6.GFP mice were surgically joined allowing the analysis of GFP-positive leukocyte migration from old B6.GFP mice to the secondary lymphoid organs of the young C57Bl/6 mice.

We registered enhanced migration of mononuclear phagocytes from old mice into the secondary lymphoid organs of the young parabiotic partners as compared to the cells of young animals in isochronic pairs. Macrophages from aged mice in spleen of young partners were characterized by the pro-inflammatory phenotype, unlike macrophages migrating into the lymph nodes. In addition, migration of mononuclear phagocytes from old animals to the spleen of young parabiotic partner was associated with the decrease of regulatory T cell fraction. Whereas, homing of phagocytes from old mice in the tissue niche of lymph nodes of young parabiotic partners was accompanied by the increase in the regulatory T cell fraction, as compared to isochronic parabionts.

Macrophages can be considered as a prospective target for the treatment of pathological states caused by abnormalities of these cell functions. Hence, comparative analysis of the effect of syngeneic thymic tMMSC from young animals on the functional profile of monocyte- and yolk sac-derived macrophages was the aim of the last part of our study. Direct-contact co-culture with tMMSC for 7 days was chosen for these experiments. This exposure time, according to the literature data, is necessary for tMMSC to exert modulatory effect on phagocytes.

Direct-contact co-culture of macrophages of different origin with tMMSC resulted in dramatically enhanced arginase activity. It indicates anti-inflammatory effect of this cellular preparation. Arginase activity of the peritoneal macrophages from young and old mice increased by 6.5 and 8 times; arginase activity of the monocyte-derived macrophages – by 78 and 131 times, respectively. Considering the more pronounced effect of tMMSC on the arginine metabolism of monocyte-derived macrophages from aged mice, it can be assumed, that cell therapy with the use of tMMSC might be more effective in aged persons. Anti-inflammatory effect of tMMSC is also confirmed by the increase of the expression of CD206 - phenotypic marker of alternative phagocyte activation - by 6 times in macrophages from young mice and by 3 times in cells from old animals as compared to corresponding controls. In addition, enhanced oxidative metabolism and phagocytic activity were registered in monocyte-derived macrophages from young mice after the co-culture with tMMSC. Considering the important role of the oxidative metabolism and phagocytic function in the reparative processes, we can assume a higher efficiency of tMMSC in the regenerative therapy in younger patients. Conducted research experimentally substantiates the feasibility of the use of tMMSC cell therapy for the metabolic repolarization in macrophages of different origin. Besides, the protocol of neonatal tolerance induction to GFP-labeled caryocytes was developed. It can be used in the studies of immune cell migration and homing.

Key words: phagocytes, arginine metabolism, aging, mesenchymal stromal cells, heterochronic parabiosis.

Список публікацій здобувача за темою дисертації

1. 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.
2. 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.
3. 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.
4. Довгий РС., Шитіков ДВ., Пішель ІМ., Опейда ЄВ., Сківка ЛМ. Функціональний стан та метаболічна поляризація макрофагів селезінки старих імунізованих мишей. *Проблемы старения и долголетия*. 2015; 24 (2): 144-52.
5. 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.

ЗМІСТ

СПИСОК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ.....	17
ВСТУП.....	19
РОЗДІЛ 1. Огляд літератури	26
1.1. Походження, функції, метаболічна поляризація та імунорегуляторні властивості макрофагів.....	26
1.2. Фенотипово-функціональні зміни фагоцитів у структурі патогенезу вікової патології та їх корекція.....	33
1.3. Застосування мультипотентних мезенхімних стромальних клітин у лікуванні імунозалежної патології.	46
1.3.1. Характеристика та імунomodulatory властивості мультипотентних мезенхімних стромальних клітин	46
1.3.2. Використання мультипотентних мезенхімних стромальних клітин у клітинній терапії.....	49
РОЗДІЛ 2. Матеріали і методи досліджень	53
2.1. Дослідні тварини	53
2.2. Виділення фагоцитів	53
2.2.1. Диференціювання макрофагів з клітин кісткового мозку в культурі.....	53
2.2.2. Виділення альвеолярних макрофагів	55
2.2.3. Виділення перитонеальних макрофагів.....	56
2.2.4. Виділення макрофагів та гранулоцитів селезінки.	57
2.2.5. Виділення кістковомозкових нейтрофілів.....	57
2.3. Аналіз життєздатності клітин.....	58
2.4. Дослідження внутрішньоклітинної продукції реактивних форм кисню.....	58
2.5. Дослідження фагоцитарної активності.	59
2.6. Дослідження аргіназної активності.....	60
2.7. Дослідження продукції нітритів (реакція Гріса).....	60

2.8. Дослідження експресії фенотипових маркерів фагоцитів.....	61
2.9. Схема дослідження впливу мультипотентних мезенхімних стромальних клітин тимусу на метаболічний профіль макрофагів <i>in vitro</i>	61
2.10. Формування неонатальної толерантності до GFP ⁺ лейкоцитів.	63
2.11. Модель гетерохронного парабіозу.....	63
2.12. Схема дослідження впливу макрофагів старих тварин на фенотиповий профіль Т-лімфоцитів лімфоїдних органів молодих гетерохронних парабіонтів <i>in vivo</i>	65
2.13. Виділення лімфоїдних органів та отримання клітин імунної системи парабіонтів для аналізу.....	66
2.14. Дослідження експресії фенотипових маркерів макрофагів та Т-лімфоцитів лімфоїдних органів парабіонтів.....	67
2.15. Статистичний аналіз результатів.....	67
РОЗДІЛ 3. Вікові зміни фенотипово-функціонального профілю макрофагів та нейтрофілів різної локалізації.....	68
3.1. Зміни функціонального профілю макрофагів моноцитарного походження з віком.....	68
3.2. Функціональний профіль тканинних макрофагів старих мишей.....	73
3.2.1. Зміни функціонального профілю перитонеальних макрофагів старих мишей.....	74
3.2.2. Зміни функціонального профілю альвеолярних макрофагів старих мишей.....	77
3.3. Зміни функціонального профілю макрофагів селезінки старих мишей після імунізації корпускулярним антигеном.....	82
3.4. Зміни фенотипово-функціонального профілю кістковомозкових нейтрофілів з віком у мишей.....	84
3.5. Зміни фенотипово-функціонального профілю гранулоцитів селезінки старих імунізованих мишей.....	87
3.6. Висновки до розділу 3.....	90
РОЗДІЛ 4. Зміни фенотипового профілю Т-лімфоцитів вторинних лімфоїдних органів молодих мишей під впливом макрофагів старих тварин на моделі гетерохронного парабіозу.....	92

4.1. Фенотиповий профіль макрофагів старих мишей та Т-клітин молодих тварин у лімфовузлах молодих партнерів по гетерохронному парабіозу	95
4.2. Фенотиповий профіль макрофагів старих мишей та Т-клітин молодих тварин у селезінках молодих партнерів по гетерохронному парабіозу	102
4.3. Висновки до розділу 4	106
РОЗДІЛ 5. Вплив мультипотентних мезенхімних стромальних клітин тимусу на метаболічний профіль тканинних макрофагів та макрофагів моноцитарного походження, отриманих від мишей різного віку	107
5.1. Модуляція фенотипово-функціонального профілю макрофагів моноцитарного походження, отриманих від старих мишей, при співкультивуванні з мультипотентними мезенхімними стромальними клітинами тимусу молодих тварин.	108
5.2. Зміни метаболізму аргініну перитонеальних макрофагів, отриманих від старих мишей, при співкультивуванні з мультипотентними мезенхімними стромальними клітинами тимусу молодих тварин	116
5.3. Висновки до розділу 3	119
ОБГОВОРЕННЯ РЕЗУЛЬТАТІВ	120
ВИСНОВКИ	137
СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ	139
ДОДАТОК 1	167

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ

ВЛО – вторинні лімфоїдні органи

Г-КСФ – колонієстимулюючий фактор гранулоцитів

ДК – дендритні клітини

ДХФ – 2'7'-дихлордигідро-флюоресцеїн-диацетат

ЕДТА – етилендіамінтетраоцтова кислота

ЕТС – ембріональна теляча сироватка

ІФН γ – інтерферон гамма

КПЗ – клітини перитонеального змиву

ЛВ – лімфовузли

ЛПС – ліпополісахарид

мРНК – матрична рибонуклеїнова кислота

М-КСФ – колонієстимулюючий фактор макрофагів

ММСК – мультипотентні мезенхімні стромальні клітини

ПМФ – перитонеальні макрофаги

РТПГ – реакція трансплантат проти господаря

РФК – реактивні форми кисню

ТКР – Т-клітинний рецептор

ТФР- β – трансформуючий фактор росту β

тММСК – мультипотентні мезенхімні стромальні клітини тимусу

Тх – Т-хелпер

ФБР – фосфатний буферний розчин

ФІ – фагоцитарний індекс

ФМА – форбол-12-міристан-13-ацетат

ФНП- α – фактор некрозу пухлини- α

ФР – фізіологічний розчин

ФЧ – фагоцитарне число

С/ЕВР β – ССАТ-enhancer-binding protein – ССАТ-енхансер-зв'язуючий білок

- CCL – chemokine (C-C motif) ligand – хемокін (C-C мотив) ліганд
- CD – cluster of differentiation – кластер диференціації
- CTLA-4 – cytotoxic T-lymphocyte associated protein 4 – білок, асоційований з цитотоксичними Т-лімфоцитами
- CXCL – chemokine (C-X-C motif) ligand – хемокін (C-X-C мотив) ліганд
- CXCR – CXC chemokine receptor – CXC хемокіновий рецептор
- DPBS – Dulbecco's phosphate-buffered saline – фосфатний буфер Дюльбеко
- FITC – fluorescein isothiocyanate – флюоресцеїна ізотіоціанат
- GFP – green fluorescent protein – зелений флуоресцентний білок
- IL – interleukin – інтерлейкін
- iNOS – inducible nitric oxide synthase – індукцйбельна синтаза оксиду азоту
- HIF-1 α – hypoxia-inducible factor-1 α – індукований гіпоксією фактор-1 α
- HLA - Human leukocyte antigen - людський лейкоцитарний антиген
- MAPK – Mitogen-activated protein kinase – міоген-активована протеїнкіназа
- NADP – Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate – Нікотинамідаденіндинуклеотидфосфат
- NET – neutrophil extracellular traps – позаклітинні пастки нейтрофілів
- NO – nitric oxide – оксид азоту
- PD1 – programmed cell death protein 1 - рецептор програмованої загибелі клітин
- PE – Phycoerythrin - фікоеритрин
- TLR – toll-like receptor - toll-подібні рецептори
- TSG-6 – Tumor necrosis factor-inducible gene 6 protein – білок фактор некрозу пухлини- α -індукцйбельного гену 6

ВСТУП

Актуальність теми. Старіння супроводжується порушенням функціонування усіх систем організму, у тому числі й імунної системи [1]. Це зумовлює підвищення частоти виникнення злоякісних новоутворень та аутоімунних хвороб з віком, а також підвищення захворюваності та смертності від інфекцій [2,3]. Вікові зміни імунної реактивності асоційовані також із явищем «інфламейджингу» (від англ. inflammaging) - розвитком хронічного запального процесу (з підвищенням рівня чинників запалення: інтерлейкіну-6, С-реактивного білка та фактора некрозу пухлин- α), котрий вважають однією з основних причин серцево-судинних захворювань, метаболічного синдрому та інших вікових хвороб [4]. 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 макрофагам [5]. Вони 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 [6]. Відомо, що Т-клітинна ланка імунітету порушується з віком [7,8]. Оскільки Т-лімфоцити є важливим елементом захисної системи організму, порушення їхніх функцій зумовлює розвиток численних вікових захворювань [3,9]. Враховуючи здатність вродженої імунної системи, зокрема тканинних макрофагів, ініціювати та регулювати адаптивну імунну відповідь [10], припускається, що саме макрофаги старого організму можуть викликати розвиток вікових змін Т-лімфоцитів.

Макрофаги характеризуються здатністю до набуття широкого спектру функціональних станів в залежності від стимулів, що обумовлюють їхню активацію. Загальноприйнятою є концепція активації, що передбачає поляризацію макрофагів у 2 протилежні активаційні стани: прозапальні, або

класично активовані (M1), та протизапальні, або альтернативно активовані (M2) макрофаги [11]. Кожен з цих поляризаційних станів передбачає активацію метаболічних реакцій, необхідних для підтримки гомеостазу організму. Центральним регулятором активації макрофагів 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 проліферації клітини, обумовлюючи, таким чином, репаративну функцію протизапальних (M2) макрофагів [12].

Чимало патологічних станів різної органної локалізації пов'язані з тим чи іншим метаболічним зсувом макрофагів, який не відповідає фізіологічним потребам певної тканини [13]. З огляду на це активно розробляються терапевтичні підходи для маніпуляції поляризаційним статусом макрофагів при різних захворюваннях [14-16]. Одним з таких терапевтичних підходів може розглядатися клітинна терапія з використанням мультипотентних мезенхімних стромальних клітин. Ці клітини 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 макрофаги [17-19]. Розробка таких методів вимагає глибокого знання вікових фенотипово-функціональних особливостей цих клітин. Результати деяких дослідницьких груп вказують на порушення активації макрофагів при старінні [20]. Однак ці дані є нечисленними та суперечливими, тому характеристика активаційного статусу макрофагів старого організму та можливість його модулювання вимагають подальшого вивчення.

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 [21]. Виявлено, що в окремих

тканинах з віком відбувається прогресивне заміщення макрофагів ембріонального походження на макрофаги, які диференціюються з циркулюючих моноцитів [22]. Крім того, показано, що у макрофагів ембріонального походження спостерігається порушення фагоцитарної функції з віком, в той час як у макрофагів моноцитарного походження таких змін не виявлено [23]. Це свідчить про можливу роль онтогенезу у розвитку вікових порушень цих клітин. Натомість, особливості функціонального профілю макрофагів різної локалізації та онтогенезу при старінні залишаються практично недослідженими.

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 профіль 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 співкультування 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*, співкультування 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 Scopus), 8 тез у матеріалах міжнародних та вітчизняних конгресів і конференцій.

Структура і обсяг дисертації. Дисертаційна робота складається зі вступу, огляду літератури, опису матеріалів та методів дослідження, трьох розділів результатів дослідження та їх обговорення, висновків, списку використаних літературних джерел та додатку 1. Загальний обсяг дисертації складає 168 сторінок, основну частину роботи викладено на 120 сторінках. Робота ілюстрована 10 таблицями та 35 рисунками. Перелік використаних літературних джерел включає 249 найменувань, з них кирилицею – 3, латиницею – 246.

РОЗДІЛ 1

ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ

1.1. Походження, функції, метаболічна поляризація та імунорегуляторні властивості макрофагів

Макрофаги та нейтрофіли відіграють важливу роль в імунному захисті організму. Нейтрофіли є найбільш поширеним типом професійних фагоцитів, що складають більше половини усіх лейкоцитів крові [24,25]. Вони разом з еозинофілами та базофілами входять до групи «поліморфоядерних гранулоцитів», завдяки наявності великої кількості внутрішньоклітинних гранул, що містять ферменти для перетравлення поглинутих часточок, та сегментованого ядра. Ці клітини відіграють основну роль на ранніх стадіях інфекції, та мають короткий термін виживаності (24-48 годин). Після фагоцитозу, нейтрофіли стимулюють рекрутинг макрофагів, які, в свою чергу, стимулюють міграцію додаткових поліморфонуклеарів, формуючи координовану імунну відповідь. Макрофаги – це мононуклеарні фагоцити, які забезпечують кліренс мертвих нейтрофілів за рахунок фагоцитозу, та виконують безліч інших важливих гомеостатичних функцій організму [6]. Цей підрозділ присвячено походженню та функціям фагоцитів у нормі, а також їх здатності регулювати адаптивну імунну відповідь.

Тканинні макрофаги є гетерогенними клітинами, які населяють практично усі тканини організму, і складають приблизно 10-15% від усього пулу клітин в умовах норми. Їхня кількість може зростати у відповідь на прозапальні стимули [26]. Макрофаги різних тканин мають різні назви, такі як остеокласти (кістка), клітини мікроглії (мозок), гістіоцити (сполучна тканина), клітини Лангерганса (шкіра) та ін. Незважаючи на їхню здатність набувати специфічних морфологічних і функціональних фенотипів у різних умовах

мікрооточення, деякі функції макрофагів є спільними для всіх тканин. До них належать функція нагляду за тканинним гомеостазом (розпізнавання і видалення пошкоджених або старіючих клітин шляхом фагоцитозу) та захисна функція (ініціація, розвиток та резолюція запалення). Останні дослідження продемонстрували, що тканинні макрофаги багатьох органів, таких як печінка (клітини Купфера), епідерміс (клітини Лангерганса) та мозок (мікроглія) диференціюються з попередників, що надходять з жовткового мішка або зародкової печінки, тобто мають ембріональне походження [27-29].

У мишей описано дві головні фази ембріонального гематопоезу: 1. примітивний гематопоез, який відбувається у жовтковому мішку, результатом якого є утворення макрофагів без моноцитарного попередника; 2. дефінітивний гематопоез, який відбувається у зародковій печінці, яка попередньо заселяється гематопоетичними попередниками, що походять з жовткового мішка, і в подальшому гематопоетичними стовбуровими клітинами, що мігрують з ендотелію ділянки ембріональної мезодерми під назвою аорта-гонади-мезонефрос [30]. Відносна кількість попередників жовткового мішка в пулі циркулюючих гематопоетичних прогеніторних клітин, що заселяють зародкову печінку, і в подальшому поповнюють макрофаги периферичних органів, залишається невідомою. Вважається, що макрофаги, що походять з жовткового мішка та зародкової печінки, відрізняються між собою. Протягом ембріогенезу, зародкова печінка стає осередком дефінітивного гематопоезу, в ході якого утворюють усі основні гематопоетичні типи клітин, в тому числі й циркулюючі моноцити. Ці моноцити заселяють більшість периферійних тканин (зокрема легені, дерміс, печінку), за винятком мозку, і дають початок тканинним макрофагам, які співіснують з макрофагами, що походять з попередників жовткового мішка, або можуть їх замінювати. Після народження, при формуванні кісток, гематопоез переходить з зародкової печінки у кістковий мозок. Попередники моноцитів крові походять з кісткового мозку, а моноцити крові постійно замінюють резидентні макрофаги різних органів, таких як кишечник та дерміс шкіри [31-33]. Крім таких тканинних макрофагів моноцитарного

походження тканини можуть також містити макрофаги моноцитарного походження, які розвиваються з моноцитів, що мігрують в тканини при запаленні, яке супроводжує інфекційні процеси або пошкодження тканин [26,34].

Макрофаги, що пренатально заселяють тканини, в подальшому проліферують для забезпечення тканини, що росте, новими клітинами. Така здатність до самооновлення була нещодавно зафіксована у мікрогліальних клітин, перитонеальних, плевральних та альвеолярних макрофагів, макрофагів жирової тканини та серця [35]. Крім того, тканинні макрофаги ембріонального походження можуть замінюватися макрофагами моноцитарного походження після гострого запального процесу [26] або при старінні [36].

Процес утворення нейтрофілів має назву гранулопоез. Короткий строк виживаності та важлива роль цих клітин у захисті організму обумовлюють необхідність їхньої постійної продукції у кістковому мозку. Важливу роль у цьому процесі відіграє колонієстимулюючий фактор гранулоцитів (Г-КСФ). Цей цитокін стимулює експресію мієлоїдними прогеніторами транскрипційних факторів PU.1 та C/EBP β , які забезпечують зсув диференціювання цих клітин в бік гранулоцитів. Крім того, Г-КСФ регулює вивільнення нейтрофілів в кров із кістковомозкового резервуару цих клітин [37]. Цей ростовий фактор забезпечує мобілізацію нейтрофілів у кров за рахунок інгібування вісі CXCR4-CXCL12, яка відповідає за утримання лейкоцитів у кістковому мозку. Крім цього, Г-КСФ забезпечує мобілізацію нейтрофілів завдяки індукції секреції CXCL1 мегакаріоцитами та ендотеліоцитами [38]. Цей хемокін зв'язується з рецептором CXCR2, що експресується у великій кількості на поверхні нейтрофілів, забезпечуючи хемотаксис цих клітин.

Кістковий мозок не є виключним місцем утворення нейтрофілів. Показано наявність пулу цих клітин в легеневій мікроvasкулатурі, який може мобілізуватися у циркуляцію при інгібуванні CXCR4 [39]. Крім того, гематопоетичні прогеніторні клітини, наявні у циркуляції здорових мишей, можуть накопичуватися в інфікованих тканинах, і диференціюватися у зрілі та

функціональні нейтрофіли [40]. Ці додаткові джерела надходження нейтрофілів можуть прискорювати розвиток імунної відповіді на інфекційний процес.

На початку 90-х років було описано 2 протилежні типи функціональної активації макрофагів: класично активовані макрофаги, які утворювалися *in vitro* при інкубації клітин з ІФН γ та / або ЛПС, та альтернативно активовані макрофаги, які індукувалися в присутності ІЛ-4 та / або ІЛ-13. Пізніше було запропоновано М1-М2 термінологію, яка полягала у відмінному метаболізмі амінокислоти аргініну між макрофагами С57В1/6 та Balb/c мишей, що корелював з відмінностями між Тх1 та Тх2 імунною відповіддю у цих ліній. Пізніше М2 макрофаги були розділені на окремі субтипи – М2а, М2b та М2с, в залежності від факторів, які викликають їхню активацію [11,41].

Відомо, що метаболізм не лише забезпечує клітини імунної системи енергією, але і регулює їхній фенотип та функції [42]. Критичним регулятором активації макрофагів є метаболізм аргініну. М1 макрофаги за допомогою NO-синтази 2 метаболізують аргінін в оксид азоту та цитрулін. Цитотоксичні властивості оксиду азоту забезпечують М1 макрофаги здатністю елімінувати внутрішньоклітинні патогени та пухлинні клітини. Надлишковий синтез оксиду азоту може призводити до небажаного пошкодження тканин та розбалансованої імунної відповіді. Підвищення експресії аргінази є способом обмеження доступності аргініну та регуляції продукції оксиду азоту. Окрім того, що доступність аргініну може контролювати трансляцію мРНК NO-синтази, поліаміни, які є кінцевим продуктом метаболізму аргініну аргіназою, обмежують ефекторні функції макрофагів у відповідь на стимуляцію агоністами TLR, та пригнічують експресію транспортера аргініну CAT-2В та синтез оксиду азоту макрофагами [43]. Відповідно, поліаміни також пригнічують *Helicobacter pylori*-індуковану продукцію оксиду азоту макрофагами за рахунок впливу на трансляцію NO-синтази. При цьому, інгібування орнітин-декарбоксилази – ферменту, що забезпечує утворення поліамінів у аргіназному метаболічному шляху – призводить до зростання експресії NO-синтази та нітрит-залежної елімінації бактерій [12].

В гранульомах, що утворюються при туберкульозі, М2 макрофаги, що експресують аргіназу, локалізуються на периферії гранульоми, в той час як М1 макрофаги, які продукують оксид азоту, знаходяться в центрі. Це забезпечує організоване мікрооточення всередині гранульоми, яке відмежовує прозапальні NO-продукуючі та протизапальні аргіназоекспресуючі макрофаги для обмеження розвитку патології [44]. На додачу до своєї ролі в регуляції активності NO-синтази за рахунок конкурування за аргінін, аргіназа також регулює проліферацію Т-лімфоцитів, відіграючи, таким чином, значну роль у контролі мікобактеріальної інфекції незалежно від NOS-супресії [45].

Макрофаги, що експресують аргіназу, є критичними для загоєння ран. Це підтверджується дослідженнями по фармакологічному інгібуванню аргінази та на мишах, нокаутних по макрофагальній аргіназі. Зниження експресії аргінази макрофагами призводить до посилення інфільтрації тканини NOS-експресуючими клітинами, зменшення накопичення матриксу та гальмування процесу загоєння [46].

Аргіназа макрофагів блокує запалення та фіброз по завершенню інфекційного процесу. Делеція аргінази 1 макрофагів асоційована з підвищеною смертністю мишей, інфікованих *S. mansoni*. Також показано, що макрофагальна аргіназа 1 захищає від надмірного пошкодження тканини кишечника інфікованих мишей. Окрім супресії проліферації Т-лімфоцитів, аргіназа 1 підвищує кількість регуляторних Т-клітин та обмежує кількість Т-хелперів 17 типу. Дефіцит аргінази 1 макрофагів призводить до розвитку ІЛ-12/ІЛ-23p40-залежної патології кишечника, пов'язаної з нейтрофілами [47].

Макрофагальна аргіназа 1 також напряму контролює розвиток паразитарних інфекцій. В експериментах на мишах, інфікованих *Heligmosomoides polygyrus*, показано, що CD4⁺ Т-лімфоцити пам'яті секретують ІЛ-4, стимулюючи таким чином накопичення М2 макрофагів, які порушують рухливість та життєдіяльність личинок цього паразита за допомогою механізмів, опосередкованих активністю аргінази 1. Також, антитіла проти *H. polygyrus* та личинки цього паразита індукують експресію аргінази 1

макрофагами незалежно від сигналінгу рецептора $IL-4R\alpha$, а орнітин, що утворюється в результаті активності аргінази, напряду пригнічує рухливість личинок [48].

Для виконання своїх функцій нейтрофіли використовують три основні процеси: утворення РФК, вивільнення гранул та нетоз. Перш за все вони є професійними фагоцитами, здатними секретувати літичні ферменти та РФК для знешкодження патогенних мікроорганізмів. Гранулоцити виділяють РФК та протимікробні агенти для знищення бактерій, які знаходяться навколо них, або за рахунок нетозу, який полягає у вивільненні ДНК, що містить протимікробні речовини. Гранули нейтрофілів містять ряд компонентів, які забезпечують прота протизапальну дію, а саме знешкодження патогенів протеазами, а також забезпечення репрограмування позаклітинного матриксу, ангіогенезу та регенерації тканин за рахунок секреції матриксних металопротеаз та інших подібних факторів [49]. Нетоз сприяє захопленню та знищенню патогенів за рахунок забезпечення їх контакту з протимікробними агентами [50].

Нещодавніми дослідженнями показано, що нейтрофілам теж властива функціональна пластичність. Виявлено, що нейтрофіли, подібно до макрофагів, здатні набувати прозапального N1 та протизапального N2 фенотипу. Cuartero et al продемонстрували наявність N2 нейтрофілів у мозковій тканині після інсульту [51]. Виявлено, що при інфаркті міокарда у серці відбувається поступова реполяризація нейтрофілів з фенотипом N1 у N2 нейтрофіли [52]. Ці дослідження свідчать про те, що N2 нейтрофіли, подібно до макрофагів з фенотипом M2, також приймають участь у резолюції запалення та репарації тканин.

Макрофаги є важливими регуляторами імунної відповіді за рахунок процесингу та презентації антигенів Т-лімфоцитам [53]. Точний механізм, за допомогою якого макрофаги індукують активацію, проліферацію та диференціювання Т-клітин, є не до кінця з'ясованим. Вважається, що дендритні клітини є більш потужними антиген-презентуючими клітинами, і взаємодіють з Т-лімфоцитами в організованій лімфоїдній тканині. Макрофаги, навпаки,

функціонують як антигенпрезентуючі клітини у периферійних нелімфоїдних тканинах. Показано, що макрофаги стимулюють CD4⁺ Т-лімфоцити до диференціювання у Т-хелпери 1 типу за рахунок синтезу ІЛ-12 [54].

Макрофаги можуть також здатні супресувати активацію та проліферацію Т-лімфоцитів як за рахунок синтезу ІЛ-10 та ТФР-β макрофагами з фенотипом M2, так і за допомогою прямого клітинного контакту. Добре вивченими є механізми пригнічення Т-клітин за рахунок зв'язування інгібіторних рецепторів PD1 та CTLA-4, що експресуються лімфоцитами, з відповідними лігандами на поверхні макрофагів [55]. Порушення функціонування цих інгібіторних шляхів підвищує ризик виникнення аутоімунних захворювань.

Вважається, що макрофаги в умовах фізіологічної норми переважно пригнічують імунні реакції. Виявлено, що такі макрофаги індукують анергію алогенних Т-лімфоцитів, частково за рахунок індукції регуляторних Т-лімфоцитів. Це може пояснюватися низькою експресією костимуляторних молекул CD80 та CD86 макрофагами у стані спокою [56]. При деяких інфекційних процесах, особливо при філяріїдозах та грибкових інфекціях, патогени блокують протективну імунну відповідь за рахунок індукції макрофагів та дендритних клітин, що супресують активацію Т-лімфоцитів. Цей механізм опосередкований продукцією макрофагами ТФР-β та ІЛ-10 з одночасним пригніченням секреції ними ІЛ-6 [57].

В умовах гіпоксії, макрофаги пригнічують проліферацію Т-клітин завдяки синтезу HIF-1α. Для інгібування активації Т-лімфоцитів потрібна більша кількість макрофагів з нокаутом по гену HIF-1α, порівняно з макрофагами дикого типу. HIF-1α може підвищувати продукцію оксиду азоту, який напряму супресує проліферацію Т-клітин [58]. В умовах гіпоксії, яка призводить до зростання у середовищі реактивних форм, продукованих макрофагами, спостерігається диференціювання Т-лімфоцитів у Т-хелпери 17 типу. Вважається, що в основі цього феномену лежить HIF-1α-опосередкована

протеасомна деградація транскрипційного фактору Foxp3 та посилення експресії IL-17 завдяки транскрипційним факторам ROR γ t та Stat3 [59].

1.2. Фенотипово-функціональні зміни фагоцитів у структурі патогенезу вікової патології та їх корекція

Старіння це комплексний процес, який значною мірою впливає на імунну систему. Це відображається у послабленні резистентності до інфекцій, зниженні ефективності вакцинації, підвищенні частоти виникнення злоякісних новоутворень, аутоімунних захворювань та хронічних хвороб, які характеризуються прозапальним статусом, таких як атеросклероз та сахарний діабет [3].

T-клітинна ланка імунної системи зазнає значних змін при старінні. З віком кількість наївних T-лімфоцитів в організмі знижується, що пов'язують, головним чином, з інволюцією тимусу [60]. Паралельно також спостерігається зниження експресії коstimуляторної молекули CD28 T-лімфоцитами, що узгоджується зі зменшенням пулу наївних клітин та збільшенням кількості високо диференційованих T-клітин. Подібні зміни також спостерігаються з експресією рецептора CD27, кількість якого на поверхні клітин знижується при диференціюванні T-лімфоцитів. Відповідно, CD27⁻CD28⁻ T-клітини являють собою високо диференційовані ефекторні T-лімфоцити. Ці клітини характеризуються обмеженою проліферативною активністю, однак вони є резистентними до апоптозу, що пояснює їхнє накопичення при старінні [61].

При старінні не спостерігається зниження концентрації IL-7, який є ключовим цитокіном, що забезпечує гомеостазичну проліферацію наївних T-лімфоцитів. Разом з тим, його доступність знижується у зв'язку з порушенням архітектури лімфовузлів [62]. Оскільки при цьому погіршується виживаність наївних клітин, окремі наївні CD8⁺ або CD4⁺ лімфоцити змінюють свій фенотип і перетворюються на T-клітини «віртуальної пам'яті», які виконують різноманітні функції, але поступово втрачають здатність підтримувати свою

кількість при мікробній інфекції [63]. Показано, що популяція Т-лімфоцитів центральної пам'яті у мишей віком 18-22 місяці переважно складається з таких Т-клітин віртуальної пам'яті, причому ці клітини також демонструють обмежений репертуар Т-клітинного рецептора (ТКР) [64]. Тому, при старінні спостерігається зменшення кількості наївних лімфоцитів і накопичення кількості клітин пам'яті, які демонструють обмежений репертуар ТКР і, ймовірно, менш здатні до проліферації та імунологічного захисту.

Перші дослідження вікових змін Т-лімфоцитів продемонстрували зниження проліферації та продукції ІЛ-12 Т-лімфоцитами у відповідь на мітогени та стимуляцію ТКР [65]. Проте ці дослідження не розрізняли наївні Т-клітини та Т-лімфоцити пам'яті, тому результати можуть бути пояснені нижчою кількістю наївних клітин і великою кількістю погано проліферуючих клітин пам'яті в суспензіях клітин крові, селезінки та лімфовузлів (ЛВ) старих донорів порівняно з молодими. Це підтверджується в експериментах з сортованими популяціями клітин, де рідко виявляються яскраво виражені вікові дефекти. Показано, що послаблення проліферативної активності та сигналіngu ТКР наївних CD4⁺ Т-лімфоцитів, отриманих у пацієнтів похилого віку, було пов'язане зі зменшенням експресії miR-181 з віком [66]. Ця мікроРНК в нормі репресує фосфатазу DUSP4, що зумовлює послаблення сигналіngu ТКР53. Експерименти з мононуклеарами цільної периферичної крові і очищеною популяцією наївних CD8⁺ Т-лімфоцитів свідчать про те, що проліферативні дефекти, які розвиваються з віком, спостерігаються лише в змішаних популяціях клітин, тоді як в очищених популяціях наївних CD8⁺ Т-клітин не виявлено значних порушень [65].

Показано, що CD4⁺ Т-лімфоцити, отримані від старих мишей, характеризуються порушеннями сигналіngu ТКР при утворенні імунного синапсу і дистальному поширенню сигналу, а також цитокінового сигналіngu і регуляції життєвого циклу [67,68]. Проте, автори цих досліджень досліджували загальну популяцію лімфоцитів, і вважали їх наївними у зв'язку з відсутністю впливу антигену і не верифікували їхній фактичний фенотип. У зв'язку з

відкриттям популяції Т-клітин віртуальної пам'яті, які накопичуються у старих мишей, можна припустити, що основні вікові порушення виникають саме у клітин цієї популяції, а не у наївних Т-лімфоцитів [64].

При внутрішньоклітинному інфікуванні наївних Т-лімфоцитів старих мишей спостерігаються порушення їхньої проліферації та диференціювання *in vivo*, що проявляється зниженням експресії Т-bet – головного регулятора Тх-1 клітин, та ефektorних молекул, таких як ФНП, ІФН- γ , гранзима В та інших. Виявлено зменшення як у частоті і кількості клітин, що експресували ці молекули, так і у кількості кожної молекули на клітину [69]. У той час як при інфекції у молодих мишей активуються гетерогенні імунні реакції за участі багатьох клонів Т-лімфоцитів, що відрізняються у окремих особин молодого віку, у старих тварин відбувається мобілізація дуже обмеженого репертуару лімфоцитів, який на 70-80% складається з 2-4 клонів, які при цьому часто є однаковими у різних старих особин [65].

Залишається незрозумілим, чи є вищенаведені вікові зміни внутрішніми змінами Т-клітин, або ж порушення тканинного мікрооточення, в тому числі зменшення захоплення та презентації антигенів [70-71], субоптимальні хемотаксисні сигнали [72] та архітектурні зміни ВЛО також, або навіть в більшій мірі, обумовлюють ці вікові дефекти [62,73,74]. Можливо, що деякі із вищенаведених вікових порушень обумовлені епігенетичними змінами, які, як відомо, проявляються при старінні [75-77]. Дійсно, показано що багато наївних Т-лімфоцитів та Т-клітин пам'яті набувають більш диференційованого епігенетичного фенотипу з віком [66], що підтверджується даними, отриманими в клінічних дослідженнях та експериментах з мишами стосовно перетворення Т-лімфоцитів в клітини з фенотипом клітин пам'яті при старінні [64,78].

Виявлено вікові порушення сигналінгу у популяціях ефektorних Т-клітин пам'яті, а саме блокування мітоген-активованої протеїнкінази р38, в якому важливу роль відіграють сестрини [79]. Однак невідомо, наскільки такі зміни можна назвати "віковими дефектами". Персистуючі інфекції, особливо цитомегаловірусна інфекція, викликають значне збільшення кількості

ефекторних Т-клітин пам'яті, які можуть складати до 50% загального пулу Т-лімфоцитів пам'яті. З гомеостатичної точки зору, організму вигідно мати цитотоксичні, цитокін-продукуючі клітини, які контролюватимуть інфекцію за наступної реактивації вірусу. Тому, такі вікові зміни можна розглядати швидше як корисну адаптацію, а не дефект старіння. З цієї точки зору, корегування проліферативного «дефекту» у високо диференційованих ефекторних Т-лімфоцитів пам'яті може призвести до небажаних наслідків для гомеостазу імунної системи [65].

При старінні також спостерігається підвищення кількості регуляторних Т-лімфоцитів, які відіграють важливу роль в регуляції імунної відповіді та контролі запалення. У старих мишей виявлено збільшення відсотку регуляторних CD4⁺ Т-лімфоцитів у вторинних лімфоїдних органах. При цьому, у циркуляції таких змін не виявлено. Ці результати узгоджуються з даними клінічних досліджень, які вказують на зростання кількості регуляторних Т-клітин у крові та зразках шкіри осіб похилого віку [80]. Окрім підвищення кількості регуляторних Т-лімфоцитів, виявлено, що CD4⁺CD25⁻ Т-клітини старих мишей стають гіпореактивними та набувають імуносупресивних властивостей, що проявляється їхньою здатністю пригнічувати CD4⁺CD25⁻ Т-лімфоцити молодих тварин [81].

Виявлено, що ВЛО, а саме ЛВ і, меншою мірою, селезінка, зазнають значних змін при старінні. Розмір ЛВ зменшується при старінні. Відповідно, лімфаденопатія, спричинена набряком ЛВ, що однією з ключових клінічних ознак інфекції, не спостерігається при старінні 33 [82]. Дослідження останніх 20 років стало показали, що ЛВ представляють собою не тільки місце ініціації багатьох імунних відповідей, але й відіграють важливу роль у підтримці функціонування наївних лімфоцитів [83]. В межах ЛВ, стромальні елементи, такі як, наприклад, ендотеліальні клітини, є відповідальними за розвиток лімфоїдних і кровоносних судин, які, в свою чергу, контролюють циркуляцію антигенів і продукцію численних трофічних факторів, що підтримують функціонування сусідніх клітин. Інші клітини, такі як фібробластні ретикулярні

клітини, забезпечують тривимірну структуру ЛВ, формуючи канали, що забезпечують міграцію клітин, зокрема Т-лімфоцитів. Також ЛВ містять фолікулярні дендритні клітини, які містять розчинні антигени в "депо" формі та презентують їх В-клітинам, а також лімфоїдні клітини вродженого імунітету, які відіграють важливу роль в підтримці функціонування ЛВ [82].

Показано, що кількість фіброblastних ретикулярних клітин і лімфоїдних ендотеліальних клітин зменшується при старінні, хоча інша група вчених не спостерігала таких змін [62,84]. Що ще більш важливо, структурні дослідження виявили глибокі втрати архітектури різних ЛВ, що проявлялися розмиттям границі Т клітинних і В клітинних зон. Хоча загальний зміст мРНК ІЛ-7 не зменшується при старінні, проліферація Т-клітин у відповідь на ІЛ-7 знижується, причому цей ефект усувався при екзогенному введенні комплексів ІЛ-7 та антитіл до ІЛ-7 [62]. Цікаво, що в дослідженнях на моделі гетерохронного парабіозу ЛВ старих тварин не збільшувалися в розмірах в присутності клітинних та гуморальних факторів молодого організму. Навпаки, спостерігалось зменшення ЛВ молодих мишей до розміру ЛВ старих тварин, причому найбільш виражений ефект зареєстровано у стромальних клітин старих тварин. Цей ефект був повністю оборотним після хірургічного роз'єднання парабіонтів, що переконливо свідчить про те, що стара кров містить циркулюючі клітини або фактори, що несприятливо впливають на клітинність ЛВ [85]. Виявлено, що у ЛВ старого організму наявні фіброзні зміни, що може негативно впливати на гомеостаз та імунну відповідь у ЛВ [82]. Показано, що інфікування шкіри вірусом лихоманки західного Нілу призводить до менш вираженого набрякання ЛВ старого організму порівняно з ЛВ молодого [72]. Це пов'язано з поганим рекрутуванням Т-клітин і В-клітин до уражених ЛВ, а також порушенням їхньої міграції в межах ЛВ в ході первинної імунної відповіді. Частково цей дефект обумовлений порушеннями самих Т і В-клітин, хоча дослідження показали, що в значній мірі це обумовлено віковими змінами самих ЛВ [72].

Клінічні дослідження продемонстрували порушення Т-клітинного імунітету шкіри при старінні. У відповідь на убіквітарні антигени таких збудників, як вірус вітряної віспи, кандиди та мікобактерій, у пацієнтів похилого віку спостерігається порушення формування гіперчутливості сповільненого типу, незважаючи на виражену імунну відповідь Т-лімфоцитів крові на ці ж антигени. Дослідження показали, що антиген-специфічні Т-клітини не можуть мігрувати у шкіру через дефекти локальної продукції ФНП тканинними макрофагами. Однак, макрофаги зберігають потенціал для секреції ФНП, що свідчить про те, що цей дефект також є результатом локального порушення регуляції імунітету. Отже, вищенаведені дані свідчать про те, що структурні зміни у ВЛО, зокрема в ЛВ, можуть відігравати ключову роль в погіршенні виживаності і функціонування лімфоцитів, і вимагають інтенсивного вивчення механізмів корекції цієї проблеми [65].

Старіння впливає на обидві ланки імунної системи [86]. Найбільш добре вивченими є зміни клітинного імунітету. Хоча зміни цієї ланки вважаються найважливішими при старінні, з'являється все більше даних, які свідчать про те, що клітини вродженої імунної системи також змінюються при старінні [87].

Функціонування природних кілерів та дендритних клітин, які знаходяться на перехресті вродженого та адаптивного імунітету, також порушується з віком [88,89]. Природні кілери зазнають глибоких фенотипових змін при старінні, що проявляється зниженням їхньої цитотоксичної активності проти клітин, інфікованих вірусами та пухлинними клітинами. Секреція цитокінів і хемокінів цими клітинами також порушується з віком. Це, у свою чергу, підвищує сприйнятливість до інфекцій і раку у людей похилого віку. Найважливішою функцією дендритних клітин є презентація антигенів CD4⁺ або CD8⁺ Т-клітинам. Ця функція також пригнічується при старінні, що призводить до зниження ефективності функціонування таких "субоптимально" активованих Т-клітин. Крім того, при старінні у дендритних клітин знижується поглинання антигенів та, відповідно, дозрівання цих клітин *in vivo*, що проявляється пригніченням міграції та експресії коstimуляторних молекул і ключових

цитокінів, необхідних для стимуляції Т-клітин [65]. Також було описано пригнічення перехресної презентації антигенів [70,71], що відіграє важливу роль у тих випадках, коли мікроорганізми уникають прямої антиген презентації [90]. Подібно до макрофагів, дендритні клітини старого організму також характеризуються зниженою чутливістю до лігандів вродженої імунної системи на рівні транскриптому та секреції цитокінів. Як у макрофагів, так і у дендритних клітин незрозуміло, чи пов'язано це з погіршенням функціонування патерн-розпізнавальних рецепторів [91]. Таким чином, вікові зміни клітин вродженої імунної системи також опосередковано призводять до погіршення ранньої активації адаптивної імунної системи.

При старінні погіршується також функціонування фагоцитів. З віком порушується секреція цитокінів у відповідь на стимуляцію TLR рецепторів на поверхні макрофагів. Різними дослідними групами було показано, що перитонеальні макрофаги та макрофаги селезінки старих мишей при стимуляції лігандами TLR рецепторів секретують значно менше ФНП- α , IL-6, IL-1 β та IL-12 порівняно з макрофагами молодих тварин. Разом з тим, з віком спостерігається зростання продукції IL-10 макрофагами селезінки мишей. Аналіз транскриптому виявив, що експресія генів, що відповідають за імунну відповідь та сигнальну трансдукцію, була знижена у ЛПС-стимульованих макрофагів старих мишей [92]. Також автори цієї роботи зареєстрували підвищення секреції простагландину E₂ цими клітинами з віком. Voehter et al не виявили вікових змін експресії TLR4 на поверхні макрофагів, тому було висловлено припущення, що причиною виявлених змін секреції цитокінів при старінні є порушений внутрішньоклітинний сигналінг, а саме зниження ЛПС-індукованого фосфорилування білка p38 та MAPK кіназ [93].

Показано, що макрофаги старих мишей при стимуляції ІФНу експресують вдвічі менше молекул головного комплексу гістосумісності II порівняно з відповідними клітинами молодих тварин, що може призводити до порушення презентації антигенів цими клітинами при старінні. Дослідженнями на щурах продемонстровано, що продукція супероксид-аніону макрофагами

при стимуляції ІФН γ знижується на 75% у старих тварин порівняно з молодими. Також спостерігається зниження фосфорилування транскрипційного фактора STAT-1 α у макрофагів старих мишей при стимуляції ІФН γ , що підтверджує наявність вікових змін внутрішньоклітинного сигналіну цих клітин [92,94].

Здатність макрофагів фагоцитувати апоптичні клітини знижується з віком, що показано в клінічних дослідженнях та дослідах на мишах, і може сприяти розвитку інфламейджингу [65]. Також описано дефектну відповідь фагоцитів старого організму при розпізнаванні патоген-асоційованих молекулярних патернів, що проявляється пригніченням фосфорилування активаційних ферментів, а також гальмуванням секреції цитокінів та фагоцитарної активності [91,95].

Mahbub et al виявили зниження експресії M1 та M2 маркерів у адгезованих спленоцитів старих мишей, що вказує на відсутність зсуву фенотипу цих клітин з віком [96]. Проте, інші дослідні групи виявили M2 поляризацію макрофагів при старінні. На мишиній моделі макулодистрофії, асоційованої з віком, виявлено, що макрофаги старих мишей набували проангіогенного M2 фенотипу. У цих клітин спостерігалася підвищена секреція ІЛ-10 та зниження продукції ІЛ-12 та ФНП- α [97].

Поліморфоядерні фагоцити також зазнають значних порушень з віком. При старінні спостерігається порушення хемотаксису нейтрофілів [98]. Sapey et al. виявили погіршення спрямованості міграції нейтрофілів у відповідь на різноманітні запальні стимули при відсутності порушень хемокінезу. Автори виявили, що причиною цього була конститутивна активація фосфоінозитол 3-кінази. Інгібування цього ферменту відновлювало спрямований хемотаксис [99]. У старих мишей при інтратрахеальному введенні *P. aeruginosa* спостерігалася накопичення нейтрофілів у паренхімі легенів, в той час як у молодих мишей нейтрофіли переважно мігрували у альвеолярний простір, що забезпечувало більш ефективну боротьбу з інфекційним процесом. Дослідження також виявили зменшення кількості нейтрофілів в осередку

інфекції *S. aureus* у старих мишей. При цьому, порушення рекрутування нейтрофілів не могло бути зумовлене порушенням локальної секреції хемокінів, так як у старих мишей, навпаки, було зареєстровано підвищений рівень цих молекул. Також в одному з вищезгаданих досліджень, паралельно з погіршенням хемотаксису спостерігалось підвищення експресії хемокінового рецептора CXCR2 на циркулюючих нейтрофілах старих тварин. Автори припускають, що порушення рекрутування може пояснюватися дефектним сигналінгом вищезгаданого рецептора хемокінів [100,101].

Старіння супроводжується також погіршенням кліренсу патогенів нейтрофілами. Дані літератури вказують на порушення фагоцитозу та продукції реактивних форм кисню (РФК) нейтрофілами з віком [102]. Механізми, які обумовлюють ці дефекти, є не до кінця з'ясованими, однак нещодавно було показано погіршення накопичення глюкози нейтрофілами, отриманими від старих пацієнтів, у відповідь на стимуляцію TLR1 та TLR4 рецепторів на поверхні цих клітин. Тому, порушення біоенергетичних процесів може бути причиною погіршення загального функціонального статусу нейтрофілів з віком [103].

Нейтрофіли старих мишей продукують менше позаклітинних «пасток» (NET – Neutrophil Extracellular Traps) при стимуляції ФМА або *S. aureus*. У старих мишей при інфікуванні шкіри *S. aureus* спостерігається менша частота нетозу порівняно з молодими тваринами, внаслідок чого відбувається посилена дисемінація інфекції у кровоносне русло та віддалені органи [104]. Причиною порушення нетозу при старінні може бути зниження з віком активності ферменту NADPH, який, як відомо, відіграє важливу роль у цьому процесі [105].

При старінні зростає частота виникнення ряду захворювань, таких як атеросклероз, рак, діабет II типу та ін., які входять в групу захворювань, асоційованих з віком [106]. Важливу роль в патогенезі названих захворювань відіграють порушення фагоцитів.

Старіння характеризується наявністю хронічного стерильного запального процесу, відомого під назвою інфламейджинг (inflammation + aging), який супроводжується зростанням у крові людей похилого віку рівня медіаторів запалення [107]. Численні дані вказують на зв'язок цього феномену з багатьма віковими захворюваннями, такими як хвороба Альцгеймера, атеросклероз, діабет II типу та рак [108]. Причини цього процесу достеменно невідомі. Припускається, що з віком зростає утворення клітинного дебрису, разом з порушенням процесів його кліренсу. Це призводить до постійної стимуляції макрофагів, однією з функцій котрих, як відомо, є кліренс апоптотичних тілець та клітинного дебрису; і активації інфламасоми, що в подальшому зумовлює розвиток інфламейджингу [109].

Ожиріння та подальший розвиток резистентності до інсуліну є однією з головних причин розвитку метаболічного синдрому та діабету 2 типу. Вісцеральна жирова тканина містить значну популяцію клітин імунної системи, які, взаємодіючи з адипоцитами та іншими клітинами, здійснюють значний вплив на функціонування цієї тканини. При наборі ваги тіла кількість макрофагів у вісцеральній жировій тканині зростає [110]. В нормі макрофаги цієї тканини мають M2 фенотип, і є необхідними для підтримання ліпідного гомеостазу. Вони забезпечують кліренс мертвих адипоцитів та сприяють адипогенезу [111]. При ожирінні у вісцеральній жировій тканині зростає кількість M1 макрофагів, які викликають розвиток інсулінової резистентності.

При старінні спостерігається зсув активаційного статусу макрофагів вісцеральної жирової тканини у бік прозапального M1 фенотипу у мишей [112]. Відповідно, такі клітини характеризуються вищим рівнем експресії прозапальних цитокінів порівняно з молодими тваринами. Ці зміни є причиною запалення жирової тканини, що, в свою чергу, може сприяти розвитку системного запального процесу у старому організмі [113]. Також показано рекрутування нейтрофілів у жирову тканину на початкових стадіях розвитку ожиріння у мишей. Блокування експресії рецептора лейкотрієну B4 або хемокінового рецептора CXCR2, які забезпечують міграцію нейтрофілів при

гострому запаленні, пригнічує запальний процес у жировій тканині та запобігає розвитку резистентності до інсуліну [114]. Ряд досліджень вказують на важливу роль нейтрофілів у накопиченні макрофагів жирової тканини. Такі дані отримані в експериментах на мишах з генетичним дефектом експресії окремих ферментів гранулоцитів, таких як кателіцидин, мієлопероксидаза та еластаза нейтрофілів [115]. Дефіцит експресії еластази нейтрофілів та її терапевтичне інгібування пригнічувало накопичення нейтрофілів та M1 макрофагів у жировій тканині [116].

Атеросклероз – це хронічне запальне захворювання, викликане накопиченням ліпідів у стінці артерій. Показано наявність відносно великої кількості прозапальних M1 макрофагів у атеросклеротичних бляшках, які активно приймають участь у поглинанні та накопиченні ліпопротеїнів, утворюючи так звані «пінисті» клітини [117]. Разом з тим, у більш стабільних регіонах цих утворень виявлено альтернативно активовані макрофаги, які є більш резистентними до утворення «пінистих» клітин. Тому, наявність протилежно поляризованих фагоцитів може свідчити про прогресування або регрес атеросклеротичної бляшки [118].

Також в атеросклеротичних бляшках на усіх стадіях захворювання виявлено наявність нейтрофілів. Показано, що бляшки мишей з нейтропенією містять меншу кількість макрофагів порівняно з контрольними тваринами. В подальшому було продемонстровано, що кателіцидин та катепсин G, синтезовані нейтрофілами, стимулюють міграцію моноцитів у атеросклеротичні ураження. Крім того, нейтрофіли також можуть стимулювати синтез прозапальних цитокінів макрофагами та плазмацитоїдними дендритними клітинами [119]. На пізніх стадіях захворювання, нетоз нейтрофілів призводить до ерозії ендотелію та утворення артеріального тромба [116].

Показано, що «інфламейджинг» відіграє важливу роль у процесі розвитку саркопенії (вікової атрофії м'язів). Дослідження продемонстрували, що високий рівень IL-6 та С-реактивного білка асоційований з підвищенням

вірогідності втрати м'язової маси та сили [120]. Також виявлено, що високий рівень ФНП- α підвищує катаболізм м'язів. Крім того, прозапальні цитокіни можуть пригнічувати анаболічний ефект інсуліноподібного фактора росту-1 за рахунок розвитку резистентності до гормону росту, що призводить до зниження рівнів інсуліноподібного фактора росту-1 як в циркуляції, так і в м'язовій тканині [120]. Зв'язок між запаленням, силою та м'язовою масою обумовлений впливом запалення на гомеостатичний баланс між синтезом та катаболізмом білка [121]. Гістологічні дослідження показали, що високий рівень сироваткового С-реактивного білка, ймовірно, пов'язаний зі зниженням білкового синтезу та зростанням катаболізму білків [122]. Виявлено, що запалення може пригнічувати дію інсуліну, модифікувати секрецію гормонів і трансдукцію сигналу від гормональних рецепторів, погіршувати функціонування ендотелію, а також викликати зміни мікроциркуляції, сприяючи розвитку м'язової слабкості, погіршенню витривалості, порушенню метаболізму та рухової функції центральної нервової системи [120,123].

Припускається, що запалення є передумовою виникнення нейрофібрилярних клубків, амілоїдних бляшок та нейродегенерації – ознак хвороби Альцгеймера [124]. Більш того, ІЛ-6 приймає участь у інших патофізіологічних процесах нервової системи, таких як демієлінізація, яка сприяє змінам білої речовини мозку, та нейродегенерація [125]. Підвищений рівень ІЛ-6 також пов'язаний зі зменшенням об'єму гіпокампа [120]. Високий рівень С-реактивного білка і ІЛ-6 в сироватці крові і ФНП- α в плазмі крові асоційовані зі зменшенням загального об'єму мозку. Крім того, високий рівень С-реактивного білка в сироватці крові також пов'язаний з маркерами погіршення функціонування нейронів і зниження метаболізму в мозковій тканині, вказуючи на те, що С-реактивний білок приймає участь у пригніченні когнітивної функції [126].

Запалення може також опосередковано сприяти розвитку хвороби Альцгеймера, сприяючи появі інших факторів ризику деменції. Наприклад, підвищений рівень ІЛ-6 впливає на метаболізм ліпідів та продукцію

тригліцеридів, стимулюючи гіпоталамо-гіпофізарно-надниркову вісь, яка пов'язана з ожирінням, гіпертонією та інсуліновою резистентністю; всі ці фактори асоційовані з підвищеним ризиком деменції. Крім того, підвищений рівень запалення також пов'язаний з серцево-судинними захворюваннями, які також є фактором ризику появи деменції. Припускається, що мікроглія змінюється з віком через інфекційний процес та гостру запальну реакцію. При цьому замість розвитку протизапальної або протективної імунної відповіді спостерігається посилення запального процесу, що сприяє розвитку нейродегенеративних змін [120].

Хронічні запальні процеси, що спостерігаються при старінні, також зумовлюють підвищення частоти виникнення злоякісних новоутворень з віком. Припускається, що розвиток пухлини розпочинається в осередках хронічного запалення, де прозапальні M1 макрофаги сприяють неопластичній трансформації тканини. Коли пухлина уже сформована, вона секретує фактори, що викликають поляризацію макрофагів, рекрутованих в пухлину, в імуносупресивний M2 фенотип. Пухлиноасоційовані макрофаги також продукують хемокіни CCL22, CCL17 та CCL18, що сприяють міграції регуляторних Т-лімфоцитів. Крім того, ці фагоцити сприяють лімфангіогенезу, неоваскуляризації та метастазуванню пухлини завдяки секреції різноманітних цитокінів та хемокінів [127,128].

При дослідженні ролі нейтрофілів у патогенезі пухлинних захворювань були отримані суперечливі результати. Одні автори вказували на пропухлинні властивості нейтрофілів [129], інші, навпаки, демонстрували їхню участь у протипухлинному захисті [130]. Fridlender et al. вперше ввели концепцію N1/N2 поляризації пухлиноасоційованих нейтрофілів, подібну до такої у макрофагів. Вони також продемонстрували *in vivo*, що нейтрофіли під впливом ТФРβ, який продукується клітинами мікрооточення пухлини, набувають пухлиностимулюючого N2 фенотипу [131].

Важлива роль макрофагів та нейтрофілів у функціонуванні організму, та наявність значних порушень цих клітин при старінні та численних патологіях,

асоційованих з віком, обумовлює необхідність пошуку стратегій корекції їхнього функціонального статусу. В наступному підрозділі розглядаються імуномодуляторні властивості мультипотентних мезенхімних стромальних клітин (ММСК), які є перспективними кандидатами для терапії порушень фагоцитів.

1.3. Застосування мультипотентних мезенхімних стромальних клітин у лікуванні імунозалежної патології

Стовбурові клітини є перспективним засобом у лікуванні багатьох захворювань. Разом з тим, можливість клінічного застосування ембріональних та індукованих плюрипотентних стовбурових клітин значно обмежена їхньою здатністю до утворення тератом, проблемами аlogenного відторгнення та етичними питаннями. Терапевтичне використання ММСК позбавлене етичних проблем. Ці клітини не експресують молекул головного комплексу гістосумісності та костимуляторних молекул, а також не здатні формувати тератоми [132]. Завдяки цьому, ММСК є ідеальним кандидатом для застосування в клітинній терапії.

1.3.1. Характеристика та імуномодуляторні властивості мультипотентних мезенхімних стромальних клітин

ММСК вперше були виділені з кісткового мозку Фріденштейном та колегами у 1970 році [133]. Вони є нечисленною популяцією клітин кісткового мозку (1 на 10 000 ядерних клітин). В подальшому, ММСК були виявлені у практично всіх тканинах. Морфологічно ММСК подібні до фібробластів. Хоча не відомо специфічного фенотипового маркера ММСК, ці клітини все ж експресують певні патерни поверхневих маркерів. Завдяки їхній здатності до самооновлення, ММСК можуть пасуватися багато разів без значних змін своїх властивостей. ММСК володіють здатністю до самооновлення та мультилінійного диференціювання *in vitro* та *in vivo*. При наявності відповідних

умов ММСК можуть диференціюватися в клітини мезенхімної лінії та формувати кісткову, хрящову та жирову тканини. Крім того, вони також володіють обмеженим потенціалом до диференціювання *in vivo* в окремі типи клітин, які в нормі походять з ендодерми та ектодерми, забезпечуючи репарацію тканин [134].

Виявлено, що *in vivo* ММСК знаходяться поблизу кровоносних судин, подібно до перицитів. Перицити в культурі подібні до ММСК в плані морфології, експресії поверхневих клітинних маркерів, а також здатності до диференціювання в остеобласти, хондроцити та адипоцити [135]. Однак, не всі перицити володіють унікальними властивостями ММСК, так само як і не всі ММСК є перицитами. Ключовою відмінністю є те, що перицити розміщуються виключно в базальній мембрані капілярів та посткапілярів, в той час як ММСК можна отримати з інтерстиціальної тканини та тканин, що оточують артерії та вени. Крім того, ММСК та перицити розрізняються за функціями [136].

ММСК здатні взаємодіяти з різними клітинами вродженого та адаптивного імунітету. Ця взаємодія опосередкована прямим контактом клітин імунної системи з ММСК, а також секретом ММСК, який складається з різноманітних ростових та імуномодуляторних факторів, зокрема трансформуючого фактора росту- β , фактора росту гепатоцитів, оксиду азоту, індоламін 2,3-діоксигенази, IL-10, IL-6, інгібуючого фактора лейкоцитів, IL-1Ra, галектинів, TSG-6, HLA-G, гемоксигенази та простагландину E2 [137].

Перші дані стосовно імунорегуляторних властивостей ММСК отримані експериментах з використанням змішаної культури лімфоцитів. Показано, що проліферація Т-клітин пригнічується при додаванні ММСК в змішану культуру лімфоцитів [138]. В подальшому було показано супресію проліферативної активності також у інших моделях. Вважається, що такий ефект ММСК опосередкований секрецією ними трансформуючого фактора росту- β та фактора росту гепатоцитів, що призводить до зниження експресії цикліну D2 та підвищення експресії p27^{kip1} Т-лімфоцитами і, відповідно, зупинки клітинного циклу на стадії G1. Крім того, ММСК здатні індукувати апоптоз активованих Т-

лімфоцитів, за рахунок конверсії триптофану в кінуренін та за допомогою Fas/FasL-залежного шляху [139].

В значній мірі невирішеною залишається проблема ефективності застосування ММСК при відсутності їхнього довгострокового приживлення, особливо в тканинах не мезодермального походження [140]. Враховуючи вищесказане, можна припустити наявність в організмі клітин, що опосередковують терапевтичний вплив ММСК.

Нещодавні дослідження показали, що такими клітинами можуть бути макрофаги. Показано, що макрофаги фагоцитують мертві ММСК, набуваючи при цьому протизапального статусу [141,142]. Ці спостереження можуть допомогти прояснити вищезгадане питання механізмів довготривалого ефекту ММСК. Внутрішньовенно введені ММСК спочатку накопичуються у кровоносних судинах легенів. Незважаючи на свою короткоживучість, ММСК в цій тканинній ніші у перспективі матимуть контакт з великою кількістю циркулюючих моноцитів. Крім того, показано, що ММСК виявляються у віддалених органах та сайтах запалення уже через декілька годин після введення [143]. Важливою властивістю клітин вродженої імунної системи є швидкість їхньої активації, тому цілком вірогідним є те, що ММСК можуть провзаємодіяти з великою кількістю моноцитів, макрофагів та інших фагоцитів до того, як будуть еліміновані [140].

Численними дослідженнями *in vitro* показано, що співкультивування ММСК та макрофагів викликає їхню M2 активацію, яка характеризується посиленою секрецією IL-10, підвищеною фагоцитарною активністю та зниженою експресією головного комплексу гістосумісності II та коstimуляторної молекули CD86 [144]. Результати цих досліджень також були підтверджені *in vivo*. При сепсисі застосування ММСК кісткового мозку покращувало функціонування органів та знижувало смертність мишей лінії C57Bl/6, причому при деплеції макрофагів або порушенні сигналіну IL-10 такого ефекту ММСК не спостерігалось. На моделі загоєння ран виявлено, що ММСК взаємодіють з резидентними макрофагами, пригнічуючи секрецію ними

ФНП- α та IL-6, та стимулюючи вивільнення IL-10 для послаблення локального запального процесу [145]. Подібні ефекти ММСК спостерігалися при інших запальних захворюваннях, таких як перитоніт, ішемія-реперфузія нирки, гостре ураження печінки, атеросклероз, ендотоксемія, діабет другого типу, астма та артрит. ММСК також посилюють міграцію макрофагів в ушкоджені ділянки, сприяючи регенерації тканин [146].

1.3.2. Використання мультипотентних мезенхімних стромальних клітин у клітинній терапії

На сьогоднішній день проводиться багато доклінічних та клінічних досліджень клітинної терапії з використанням ММСК у лікуванні різноманітних захворювань. ММСК демонструють значний терапевтичний потенціал у забезпеченні репарації та регенерації пошкоджених тканин багатьох органів, таких як серце, мозок, печінка, легені, нирки та шкіра [134]. Найбільш виражений терапевтичний ефект цих клітин обумовлений їхніми імунорегуляторними властивостями. ММСК здатні чинити контактний та дистантний вплив на клітини вродженої та адаптивної імунної системи. Це обумовлює їхню ефективність у лікуванні запальних та аутоімунних захворювань [147], частота появи яких, як відомо, зростає з віком.

Показано ефективність ММСК, що вводилися інтраназальним шляхом, у лікуванні хвороби Паркінсона у щурів [148]. Через 4,5 місяці після застосування, ММСК виявлялися у різних регіонах мозку, зокрема у гіпокампі, мозочку, стовбурі та корі мозку, що свідчить про їхню здатність виживати після трансплантації та проліферувати *in vivo*. Крім того було виявлено, що такий спосіб застосування підвищував рівень тирозин гідроксилази та знижував рівень токсину 6-гідроксидофаміну у пошкоджених ділянках іпсілатерального смугастого тіла та чорної речовини [149].

Проведено також ряд доклінічних досліджень терапії хвороби Альцгеймера за допомогою ММСК. Виявлено, що ММСК жирової тканини модулюють запальний процес, викликаючи альтернативну активацію клітин

мікроглії, що проявлялося підвищенням експресії ферментів, які руйнують β -амілоїд, та зниженням секреції прозапальних цитокінів [150]. ММСК пуповинної крові активують регуляторні Т-лімфоцити, які, в свою чергу, регулюють активацію мікроглії та підвищують виживаність нейронів на моделі хвороби Альцгеймера мишей. Нещодавно було виявлено, що ММСК посилюють аутофагію, завдяки чому відбувається кліренс амілоїдних бляшок та підвищується виживаність нейронів *in vitro* та *in vivo* [151].

Здатність ММСК регулювати імунну відповідь обумовлює можливість їхнього застосування при аутоімунних захворюваннях. ММСК сприяють покращенню перебігу ревматоїдного артриту, змодельованого у DBA/1 мишей, за рахунок активації регуляторних Т-клітин та супресії продукції прозапальних цитокінів [152]. Крім того, ММСК здатні диференціюватися в інсулін-продукуючі клітини, та здійснювати імуномодуляторний ефект при аутоімунному діабеті 1 типу. Виявлено, що кістковомозкові ММСК людини можуть диференціюватися в ендокринні клітини підшлункової залози *in vitro* та *in vivo*. Подібні властивості також були виявлені у ММСК пуповинної крові [153]. Unsal et al продемонстрували, що при одночасній трансплантації ММСК та клітин острівців Лангерганса щурам зі стрептозотоцин-індукованим діабетом підвищувалася виживаність трансплантованих острівців [154].

ММСК здатні диференціюватися в кардіоміоцити при серцево-судинних захворюваннях. Показано, що ММСК пуповинної крові ідентифікувалися протягом декількох тижнів після їх трансплантації мишам з гострим інфарктом міокарда [155]. Виявлено високу ефективність одночасної трансплантації ММСК пуповинної крові та фібронектин-іммобілізованих полікапролактонових нанофібрил на моделі інфаркту міокарда у мишей [156].

На мишиних моделях хронічної та гострої астми, системне застосування ММСК викликало зниження рівня алерген-специфічних антитіл IgE та цитокінів Тх2 типу IL-4, IL-5 та IL-13 в бронхіальній рідині, та пригнічувало запалення верхніх дихальних шляхів і патологічне ремоделювання тканин. При цьому також спостерігалось зниження рівня оксиду азоту в сироватці крові

тварин [157]. Застосування ММСК на експериментальних моделях променевого проктиту, імунної тромбоцитопенічної пурпури та аутоімунного енцефаломієліту попереджувало виникнення запальних інфільтратів, синтез прозапальних цитокінів, а також стимулювало виділення протизапальних цитокінів. Також значний імуносупресивний ефект реєструвався при застосуванні цих клітин для лікування тваринних моделей артриту, системного червоного вовчаку, реакції трансплантат проти господаря (РТПГ) та розсіяного склерозу [158,159]. Введення як алогенних, так і ксеногенних ММСК пуповинної крові людини значно затримувало розвиток протеїнурії, сприяло реконструкції ніші остеобластів кісткового мозку та інгібувало розвиток мультиорганної дисфункції при системному червоному вовчаку. Трансплантація ММСК також здійснювала протективний ефект при інших імунних захворюваннях, таких як аутоімунний тиреоїдит, міастенія, втрата слуху та первинний біліарний цироз печінки [159].

У клінічному дослідженні терапевтичного впливу ММСК на перебіг гострої (10 пацієнтів) та хронічної РТПГ (8 пацієнтів) повна відповідь на лікування була отримана у 1 пацієнта з гострою РТПГ та у 1 пацієнта з хронічною РТПГ; часткова відповідь спостерігалася у 6 пацієнтів з гострою РТПГ та у 3 пацієнтів з хронічною РТПГ. Не спостерігалось виражених побічних ефектів при терапії ММСК [160]. Ефективність алогенних ММСК кісткового мозку також була продемонстрована у інших клінічних дослідженнях РТПГ [161,162].

Також проводилися клінічні дослідження I/II фази по застосуванню ММСК у лікуванні пацієнтів з розсіяним склерозом. Показано, що трансплантація аутологічних ММСК пацієнтам з вторинним прогресуючим розсіяним склерозом покращувала візуальну активність та не мала серйозних побічних ефектів [163].

Позитивні терапевтичні ефекти застосування ММСК також спостерігалися у пацієнтів, хворих на системний червоний вовчак, діабет, хворобу Крона, виразковий коліт та остеоартрит [164-166]. Perico et al.,

виявили, що претрансплантаційне застосування аутологічних ММСК попереджувало розвиток дисфункції трансплантата нирки [167]. Трансплантація ММСК підвищувала рівень альбуміну, знижувала рівень білірубіну сироватки крові, а також покращувала показник по шкалі MELD у пацієнтів, хворих на печінкову недостатність [168].

Незважаючи на вищенаведені дані стосовно ефективності терапевтичного застосування ММСК, віковий аспект впливу цих клітин на макрофаги є малодослідженим.

РОЗДІЛ 2

МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ

2.1. Дослідні тварини

В експериментальних дослідженнях використовувалися миші віком 2-5 місяців (молоді) та 18-24 місяці (старі), ліній CBA/Ca, C57Bl/6 та B6.GFP (C57Bl/6-Tg(CAG-EGFP)1Osb/J), розведення віваріїв Київського національного університету імені Тараса Шевченка та ДУ «Інститут геронтології імені Д. Ф. Чеботарьова НАМН України» (табл.2.1). 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.) і узгоджених з положеннями директиви Ради Європейського Союзу 86/609/ЕС «Про зближення законів, постанов та адміністративних положень держав ЄС з питань захисту тварин, що використовуються для експериментів та інших наукових цілей» від 24 листопада 1986 р. Евтаназію тварин проводили шляхом цервікальної дислокації

2.2. Виділення фагоцитів

2.2.1. Диференціювання макрофагів з клітин кісткового мозку в культурі

Для отримання клітин кісткового мозку, у мишей лінії C57Bl/6 стерильно виділяли стегно та гомілку, очищали від м'язів та сполучної тканини,

Таблиця 2.1

Дослідні тварини

Лінія мишей	Вік	Кількість	Досліди
C57Bl/6	2-3 місяці	7	Визначення функціонального профілю тканинних макрофагів
	2-5 місяців	6	Дослідження на моделі гетерохронного парабіозу
	2-4 місяці	6	Дослідження впливу тММСК на метаболічний профіль макрофагів різного походження
	18-23 місяці	7	Визначення функціонального профілю тканинних макрофагів
	18-24 місяці	6	Дослідження на моделі гетерохронного парабіозу
	19-24 місяці	6	Дослідження впливу тММСК на метаболічний профіль макрофагів різного походження
CBA/Ca	4-5 місяців	5	Визначення функціонального профілю макрофагів та нейтрофілів селезінки
	3 місяці	5	Порівняння метаболізму аргініну альвеолярних та перитонеальних макрофагів
	23-24 місяці	5	Визначення функціонального профілю макрофагів та нейтрофілів селезінки
B6.GFP	2-5 місяців	6	Дослідження на моделі гетерохронного парабіозу
	3-5 місяців	5	Індукція неонатальної толерантності
	18-24 місяці	6	Дослідження на моделі гетерохронного парабіозу

обробляли 70% етиловим спиртом, і промивали 3 рази фосфатним буферним розчином Дульбекко («Sigma», США). Обережно відрізали епіфізи, кістковомозкову порожнину промивали 5мл середовища RPMI («HyClone», США). Аспірат фільтрували через нейлоновий фільтр (70мкм). Клітини використовували в подальшому для диференціювання макрофагів та виділення нейтрофілів кісткового мозку.

Резидентні макрофаги та ММСК, які містяться в суспензії кісткового мозку, елімінували за допомогою адгезії протягом 4 годин у CO₂ інкубаторі («Thermo Scientific», США) при 37 °C в атмосфері з 5% CO₂. Неадгезовані клітини ресуспендували, підраховували в камері Ньюбауера, і вносили у лунки 48-луночного планшета («SPL Life Sciences», Південна Корея). Клітини культивували у середовищі RPMI-1640 з додаванням 20% ембріональної телячої сироватки, 2мМ L-Glu, 100IU/мл та М-КСФ (10нг/мл, «PeproTech», Велика Британія) (далі – повне середовище) у CO₂ інкубаторі («Thermo Scientific», США) при 37 °C в атмосфері з 5% CO₂. Зміну культурального середовища проводили кожні 2-3 дні.

Для дослідження експресії фенотипових маркерів, фагоцитарної активності та продукції реактивних форм кисню, макрофаги кістковомозкового походження знімали з культурального пластику за допомогою суміші розчинів 0,05% трипсину та 0,02% ЕДТА («Біотестмед», Україна) у співвідношенні 1:3, рН 7,4 («Sigma», США).

2.2.2. Виділення альвеолярних макрофагів

Для отримання альвеолярних макрофагів, у мишей лінії C57Bl/6 стерильно виділяли легені *en bloc* (разом з трахеєю), залишки крові відмивали охолодженим фосфатним буферним розчином (ФБР). Легені тричі промивали 1 мл DPBS з 1мМ ЕДТА за допомогою інсулінового шприца. Отриманий бронхоальвеолярний лаваж центрифугували при 400g протягом 10 хвилин. Супернатант видаляли, альвеолярні макрофаги відмивали DPBS, ресуспендували, підраховували в камері Ньюбауера. По 2×10^5 клітин на одну

пробу вносили в лунки 96-луночного планшета, а також використовували для оцінки продукції РФК та фагоцитарної активності [169]. Клітини культивували протягом доби в повному середовищі у CO₂ інкубаторі («Thermo Scientific», США) при 37°C в атмосфері з 5% CO₂. Аналізували аргіназну активність та рівень продукції нітритів.

2.2.3. Виділення перитонеальних макрофагів

Резидентні перитонеальні макрофаги отримувалися стерильно без попереднього стимулювання з черевної порожнини мишей згідно протоколу Zhang et al. (2008) [170]. Клітини перитонеального змиву (КПЗ) одержували без попереднього стимулювання з черевної порожнини мишей. Для цього у черевну порожнину тварин вводили 5 мл холодного розчину DPBS (рН 7,2–7,4) з 50Д/мл гепарину і проводили масаж передньої стінки черевної порожнини протягом 10хв. Потім відбирали суспензію КПЗ, що утворилася, і ще двічі промивали черевну порожнину свіжими порціями холодного розчину DPBS. Отримані КПЗ двічі відмивали від гепарину (400g, 10хв), суспендували в 1 мл середовища RPMI 1640 з додаванням 10% ембріональної телячої сироватки чи у безбарвному сольовому розчині Хенкса («Sigma», США) (в залежності від вимог подальшої постановки конкретної методики). Підраховували кількість життєздатних КПЗ. Для отримання перитонеальних МФ (ПМФ) суспензію КПЗ розливали аліквотами по 3,5мл у пластикові чашки Петрі діаметром 6см та інкубували протягом 45хв у термостаті при 37°C. Суспензію неадгезованих КПЗ зливали та двічі обережно промивали чашки Петрі теплим розчином Хенкса. Далі вносили розчин Хенкса з 0,02% ЕДТА і ставили чашки Петрі на лід (10–15хв). Після цього змивали з дна фракцію адгезованих клітин, переважно представлених ПМФ. Суспензію ПМФ осаджували шляхом центрифугування (400g, 10хв) і суспендували у поживному середовищі чи ФБР. Підраховували кількість життєздатних КПЗ шляхом їх фарбування трипановим синім і доводили концентрацію до 1×10^6 /мл. Клітини висівали по 2×10^5 клітин в лунки 96-луночного планшета. Для оцінки аргіназної активності та рівня продукції

нітритів, а також впливу тММСК на ці показники, клітини культивували протягом тижня в повному середовищі (див.2.2.1) у CO₂ інкубаторі («Thermo Scientific», США) при 37°C в атмосфері з 5% CO₂. Зміну культурального середовища проводили кожні 2-3 дні.

2.2.4. Виділення макрофагів та гранулоцитів селезінки

Для збагачення селезінки макрофагами моноцитарного походження тварин імунізували еритроцитами барана внутрішньочеревинно в дозі 2×10^8 клітин на мишу (0,3мл 3% завису еритроцитів барана у фізіологічному розчині). Селезінку мишей лінії СВА/Са видаляли в асептичних умовах і поміщували у стерильне середовище RPMI-1640 («Sigma-Aldrich», США) з додаванням 10% ЕТС («Hyclone», США). Для отримання суспензії спленоцитів селезінку гомогенізували у гомогенізаторі Даунса з додаванням 4мл середовища RPMI-1640. Концентрацію клітин підраховували у камері Ньюбауера. Стандартизовану клітинну суспензію клітин селезінки (20млн/мл) використовували для аналізу спрямованості метаболізму аргініну та для цитофлуориметричної оцінки внутрішньоклітинної продукції реактивних форм кисню (РФК) і фагоцитарної активності, де моноцити та гранулоцити диференціювали шляхом гейтування. Для оцінки рівня продукції нітритів та аргіназної активності отримували фракцію прилипаючих клітин, переважну більшість із яких складають макрофаги [171]. У лунки 24-лункових планшетів вносили 5×10^6 клітин суспензії спленоцитів. Інкубували в повному середовищі (див.2.2.1) при 37°C в атмосфері з 5% CO₂ протягом ночі.

2.2.5. Виділення кістковомозкових нейтрофілів

Клітини кісткового мозку виділяли, як зазначено у 2.2.1. Нейтрофіли виділяли центрифугуванням клітин кісткового мозку у градієнті щільності перколу. Суспензію клітин кісткового мозку нашаровували на 62% розчин перколу («Sigma», США) у співвідношенні 1:1. Центрифугували при 1200g

протягом 30 хвилин. Після закінчення центрифугування нейтрофіли збирали з-під шару 62% перколу, і відмивали DPBS [172]. Отримані клітини ресуспендували, підраховували в камері Ньюбауера, по 1×10^6 клітин вносили в лунки 96-луночного планшета, а також використовували для оцінки продукції РФК та фагоцитарної активності. Планшет інкубували в повному середовищі RPMI-1640 при 37°C в атмосфері з 5% CO_2 протягом ночі. Аналізували аргіназну активність та рівень продукції нітритів.

2.3. Аналіз життєздатності клітин

Оцінку життєздатності клітин проводили в розчині Тюрка («Merck», Німеччина) за допомогою камери Ньюбауера. Використовували суспензію клітин, яка містила не менше 90% живих клітин.

2.4. Дослідження внутрішньоклітинної продукції реактивних форм кисню

Рівень продукції внутрішньоклітинних РФК оцінювали методом проточної цитофлюориметрії. В основі методу лежить перетворення внутрішньоклітинними естеразами барвника 2'7'-дихлордигідро-флюоресцеїн-діацетату (ДХФ) (carboxy-H₂DCFDA, «Invitrogen», США) на нефлюоресціюючу мембранонепроникну похідну карбокси-H₂DCF [173]. Внутрішньоклітинні РФК окиснюють карбокси-H₂DCF до флюоресцентної похідної carboxy-DCF. Для проведення досліджень 70мкл суспензії клітин та 4мкл 20мМ ДХФ вносили у пробірки для цитофлюориметра (Falcon, «Becton Dickinson», США) та інкубували зразки протягом 30хв у CO_2 -інкубаторі за температури 37°C . Протягом цього часу ацетоксиметильні або ацетатні групи барвника гідролізувалися клітинними естеразами, внаслідок чого утворювалася більш чутлива до окиснення похідна (3-5хв), яка окислювалася під впливом внутрішньоклітинних РФК. Після інкубації зразки тричі відмивали ФБР та

фіксували у 0,4% формаліні для подальшої оцінки на цитофлюориметрі (довжина хвилі збудження 488нм, довжина хвилі випромінювання 525нм).

2.5. Дослідження фагоцитарної активності

Фагоцитарну активність досліджували за відомою методикою з незначними модифікаціями [174]. Клітини *S. aureus* Cowan I, з колекції мікроорганізмів кафедри мікробіології та імунології, культивували на м'ясо-пептонному агарі. Мікробні клітини інактивували нагріванням і мітили флюоресцеїн ізотіоціанатом (FITC) («Sigma», США). 70 мкл суспензії фагоцитів з концентрацією 2×10^6 /мл додавали у пробірки для проточного цитофлюориметра (Falcon, «Becton Dickinson», США). У кожену пробірку додавали 5мкл суспензії мічених клітин *S. aureus* в концентрації 1×10^7 /мл. У пробу негативного контролю замість бактерій вносили ФБР у такому ж об'ємі. Проби інкубували за температури 37°C упродовж 30хв, після чого для зупинки процесу фагоцитозу клітини фіксували у ФБР з додаванням 0,02% EDTA і 0,04% параформальдегіду. Флюоресценцію клітин, що фагоцитували бактерії, оцінювали на проточному цитофлюориметрі. Результати представляли як відсоток фагоцитуючих клітин (фагоцитарне число) і фагоцитарний індекс (ФІ), який визначали за формулою:

$$[\text{Gmean}_{\text{pos}} / \text{P}_{\text{pos}}] - [\text{Gmean}_{\text{neg}} / \text{P}_{\text{neg}}], \quad (2.1)$$

де P_{pos} – відсоток позитивних (флюоресціюючих) клітин у дослідній пробі, $\text{Gmean}_{\text{pos}}$ – середня флюоресценція позитивних клітин у дослідній пробі, P_{neg} – відсоток позитивних клітин у пробі негативного контролю, $\text{Gmean}_{\text{neg}}$ – середня флюоресценція негативного контролю.

2.6. Дослідження аргіназної активності

Для оцінки аргіназної активності в клітинних лізатах використовували методику Classen et al. [175]. До досліджуваної популяції клітин послідовно додавали 100мкл 0,1% Triton X-100 («Sigma-Aldrich», США), 100мкл 50ммоль Tris-HCl (pH 7,5; «Sigma-Aldrich», США), що містив 10ммоль $MnCl_2$. Суміш нагрівали при $56^{\circ}C$ протягом 7хв для активації аргіназної активності. Реакцію гідролізу L-аргініну проводили шляхом інкубації суміші, що містила попередньо активовану аргіназу, зі 100мкл L-аргініну (0,5моль; pH 9,7; «Sigma-Aldrich», США) при $37^{\circ}C$ протягом 2год. Для зупинення реакції до зразків додавали 800 мкл суміші кислот ($H_2SO_4 : H_3PO_4 : H_2O = 1 : 3 : 7$). Колориметричне виявлення сечовини відбувалося за рахунок додавання до суміші α -ізонітропропіофенону (40мкл, 6% в етанолі, «Sigma-Aldrich», США) та інкубації при $95^{\circ}C$ 30хв, а потім при $4^{\circ}C$ упродовж 30хв. Концентрацію сечовини вимірювали спектрофотометрично при $\lambda = 540nm$. Значення оптичної густини переводили у мікрограми сечовини, використовуючи калібрувальну криву, побудовану по стандартним розчинам сечовини відомої концентрації. Аналізували дані, використовуючи наступну формулу:

$$\frac{мкг \text{ сечовини} \times 50 (\text{фактор розведення})}{60 (\text{молекулярна вага сечовини}) \times t (\text{хв інкубації з аргініном})} = \text{одиниць активності аргінази на } 10^6 \text{ клітин} \quad (2.2)$$

1 одиниця – кількість ферменту, потрібного для гідролізу 1 мікромоля аргініну за 1 хвилину.

2.7. Дослідження продукції нітритів (реакція Гріса)

Рівень продукції нітритів вимірювали у супернатанті фагоцитів за допомогою реакції Гріса [175]. Для приготування реактиву Гріса змішували однакові об'єми 2% сульфаніламід у 10% фосфорній кислоті і 0,2% нафтилетилендіамінгідрохлориду («Sigma-Aldrich», США). 100мкл реактиву

Гріса додавали до 100мкл середовища культивування клітин. Суміш інкубували протягом 30хв за кімнатної температури в темряві. Облік результатів проводили спектрофотометричним методом на планшетному фотометрі Ascent («Labsystems», Фінляндія) при довжині хвилі 540нм. Рівень нітритів визначали за допомогою калібрувальної кривої, побудованої з використанням стандартних розчинів нітриту натрію. Проби ставили у чотирьох повторах для кожного варіанту досліду. Значення ділили на кількість живих клітин у зразку. Рівень нітритів представляли для 10^6 клітин.

2.8. Дослідження експресії фенотипових маркерів фагоцитів

Для визначення рівня експресії фенотипових маркерів макрофагів використовувалися наступні антитіла: анти-CD11b (FITC, клон 5C6, «Bio-Rad Laboratories», США), анти-CD206 (Alexa Fluor 647) («BD Biosciences», Канада). Клітини інкубувалися з антитілами протягом 30 хвилин при температурі 4°C у темряві. По закінченню інкубації зразки фіксували у ФБР з додаванням 0.02% EDTA і 0.04% параформальдегіду і аналізували за допомогою проточного цитофлуориметра.

2.9. Схема дослідження впливу мультипотентних мезенхімних стромальних клітин тимусу на метаболічний профіль макрофагів *in vitro*

Перитонеальні та кістковомозкові макрофаги, отримані від мишей лінії C57BL/6, співкультивували з мультипотентними мезенхімними стромальними клітинами тимусу (тММСК), отриманими від сингенних молодих мишей, у 48-лунковому планшеті («SPL Life Sciences», Південна Корея). 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 МСК було 10:1.

Сумісне культивування проводили протягом тижня за схемою, наведеною на рис. 2.1:

1. тММСК (Контроль).
2. Макрофаги, отримані від молодих мишей (Контроль).
3. Макрофаги, отримані від старих мишей (Контроль).
4. Макрофаги, отримані від молодих мишей, та тММСК (Дослід).
5. Макрофаги, отримані від старих мишей, та тММСК (Дослід).

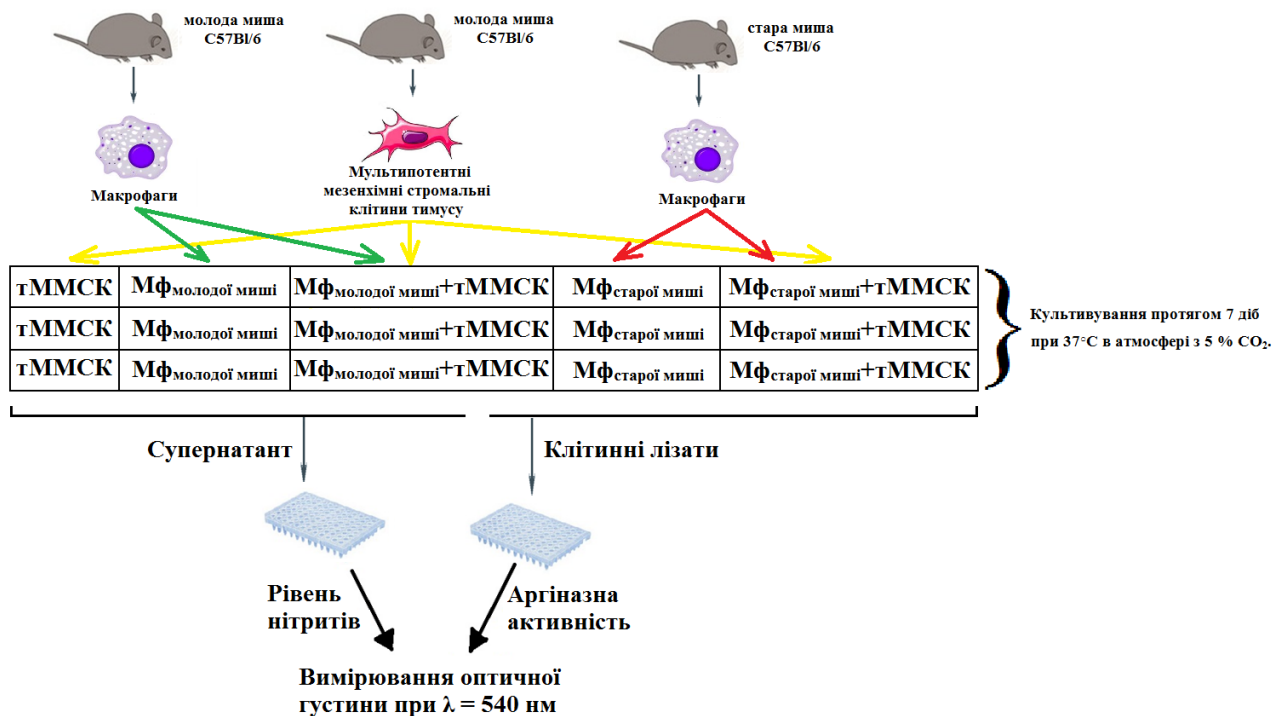


Рис.2.1. Схема дослідження впливу мультипотентних мезенхімних стромальних клітин тимусу на метаболічний профіль макрофагів *in vitro*.

На 8 добу співкультивування аналізували рівень нітритів у супернатанті та аргіназну активність у клітинних лізатах усіх дослідних та контрольних лунок планшета. Загалом було проведено по 3 серії експерименту на кожен досліджуваний тип макрофагів.

2.10. Формування неонатальної толерантності до GFP⁺ лейкоцитів

Після евтаназії шляхом цервікальної дислокації у трансгенних B6.GFP мишей-самиць стерильно видаляли селезінку та гомогенізували у гомогенізаторі Даунса. Суспензію спленоцитів фільтрували через нейлоновий фільтр з діаметром пор 70мкм, підраховували у камері Ньюбауера, центрифугували при 300g протягом 10 хвилин, та ресуспендували у ФР у концентрації 1×10^9 клітин/мл для подальших ін'єкцій. Для індукції неонатальної толерантності до білка GFP, мишенятм лінії C57Bl/6 3-денного віку обох статей внутрішньочеревно одноразово вводили 5×10^7 GFP-позитивних спленоцитів в 50мкл ФР, використовуючи 3/10сс інсуліновий шприц з голкою 31G («Pic Solution», Італія). Контрольні мишенята отримували внутрішньочеревну ін'єкцію ФР у такому ж об'ємі.

Через 6 тижнів трансплантати шкіри вух трансгенних B6.GFP мишей-самиць пересаджували на спину C57Bl/6 мишей, яким індукували толерантність, та контрольних тварин, по 2 трансплантати на кожну мишу, згідно методики Garrud and Cahalan (2008) [176]. Трансплантації проводилися під авертиновим наркозом. Трансплантати шкіри оглядалися кожен день протягом перших двох тижнів, та щонайменше 2 рази на тиждень протягом ще чотирьох тижнів, їхня цілісність перевірялася за допомогою УФ-світла. Відторгнення реєструвалося при 90% некрозу тканини.

2.11. Модель гетерохронного парабіозу

Для дослідження міграції макрофагів моноцитарного походження старих тварин та їх впливу на Т-лімфоцити вторинних лімфоїдних органів молодих тварин використовували модель гетерохронного парабіозу. Для цього хірургічно поєднували мишей вихідної лінії (C57Bl/6), яких у подальшому аналізували, та трансгенних B6.GFP тварин, які виступали донорами мічених клітин (рис.2.2). Парабіотичні операції здійснювали згідно методу Bunster et al. з незначними модифікаціями [177].

Операції здійснювали під авертиновим наркозом в дозі 250мкг/г тіла мишей. Після настання анестезії шерсть в місці оперування збривали електричною бритвою, операційне поле знезаражували спиртовим розчином йоду. Робили надріз шкіри від ліктьового суглоба вздовж бічної поверхні тіла до колінного суглоба. Надріз робився вздовж лівого боку у одного парабіонта, і вздовж правого у іншого. Парабіонтів у супінованій позиції поміщали поряд, надрізами один до одного. Хірургічними нитками з'єднували шкіру вентральної сторони тіла мишей вздовж усього надрізу. Парабіонтів поміщали у проновану позицію. Обережно, намагаючись не пошкодити внутрішні органи, робили невеликий надріз (~1см) з відповідного боку перитонеальної порожнини кожної миші, трохи нижче грудної клітки. Розрізи перитонеальної порожнини обох тварин щільно поєднувалися нитками з хірургічного шовку. Надрізи шкіри з дорзального боку з'єднували так само, як і з вентрального. По завершенню операційне поле знезаражували спиртовим розчином йоду.

Протягом тижня парабіонти отримували ін'єкції антибіотика внутрішньом'язево в дозі 50 мкг/г ваги тіла миші. Тривалість співіснування парабіотичних пар складала 6 тижнів.



Рис.2.2. Гетерохронна парабіотична пара.

2.12. Схема дослідження впливу макрофагів старих тварин на фенотиповий профіль Т-лімфоцитів лімфоїдних органів молодих гетерохронних парабіонтів *in vivo*

Для дослідження впливу макрофагів старих тварин на фенотиповий профіль Т-лімфоцитів молодих мишей на моделі гетерохронного парабіозу тварин було розподілено на наступні парабіотичні групи:

Ізохронні (одного віку) парабіотичні пари (n=5), які слугували контролем.

Гетерохронні (тварини старого та молодого віку) парабіотичні пари (n=5), у яких B6.GFP парабіонтами були старі миші.

Після закінчення строку парабіотичного співіснування проводилася евтаназія тварин. У мишей дикої лінії отримували вторинні лімфоїдні органи, гомогенізували їх (як описано у підрозділі 2.13), та фарбували отримані суспензії флюоресцентно міченими антитілами до фенотипових маркерів макрофагів та Т-лімфоцитів для оцінки методом проточної цитометрії (як описано у підрозділі 2.14). Аналізували GFP-позитивні макрофаги, що мігрували у вторинні лімфоїдні органи мишей вихідної лінії від трансгенного партнера по парабіотичній парі, а також GFP-негативні Т-лімфоцити мишей вихідної лінії, які перебували у мікрооточенні макрофагів, що аналізувалися (рис.2.3).

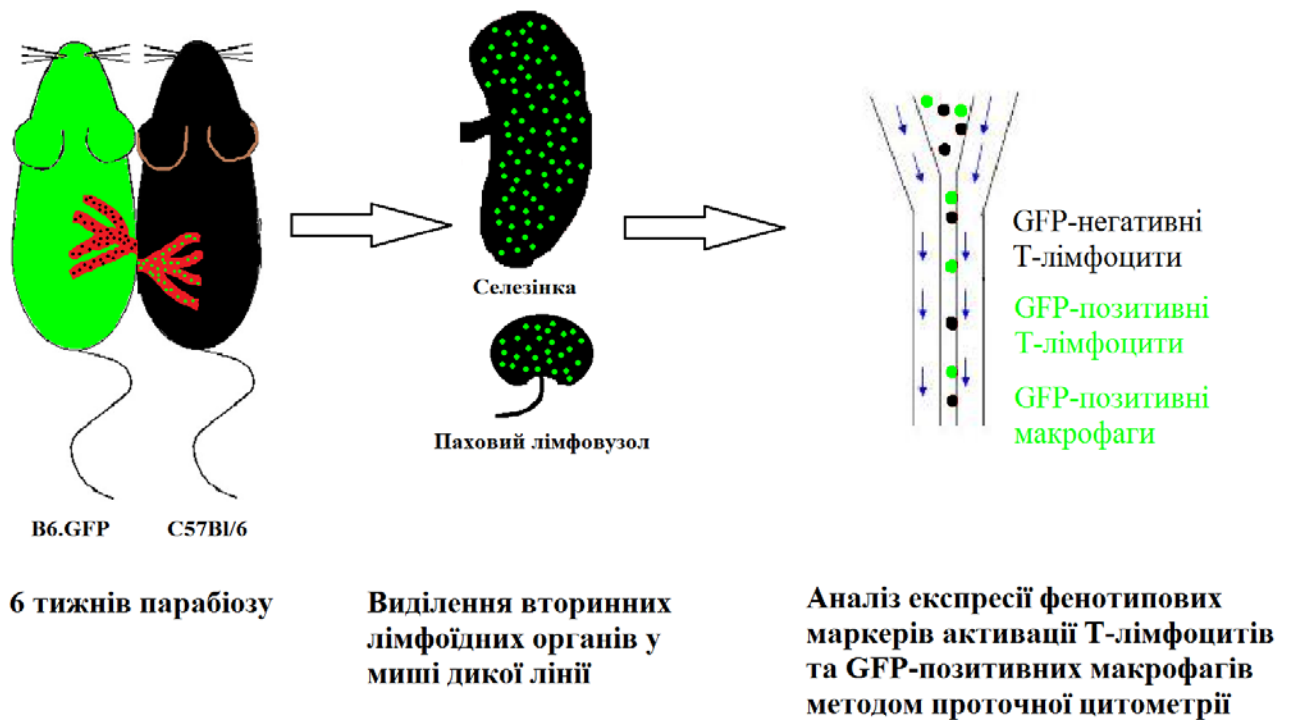


Рис.2.3. Схема дослідження впливу макрофагів на фенотиповий профіль Т-лімфоцитів на моделі гетерохронного парабіозу.

2.13. Виділення лімфоїдних органів та отримання клітин імунної системи парабіонтів для аналізу

У парабіонтів вихідної лінії видаляли селезінки та пахові лімфовузли, та гомогенізували їх у гомогенізаторі Даунса у 2мл ФБР. Отриманий гомогенат лімфовузлів фільтрували через нейлоновий фільтр з діаметром пор 70 мкм для отримання однорідної суспензії клітин. Гомогенат селезінки розводили у 4мл ФБР, після чого нашаровували на 3мл фіколу («Sigma», США). Центрифугували протягом 25 хвилин при 800g. Відбирали верхній шар рідини з кільцем мононуклеарів, після чого відмивали клітини центрифугуванням у ФБР протягом 8 хвилин при 300g. Відбирали супернатант, осад ресуспендували у 1мл ФБР.

2.14. Дослідження експресії фенотипових маркерів макрофагів та Т-лімфоцитів лімфоїдних органів парабіонтів

Для визначення рівня експресії фенотипових маркерів використовували наступні антитіла: 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), анти-iNOS (Alexa Fluor 647) та анти-CD206 (Cy7) («Bioss», США). Суспензії клітин вторинних лімфоїдних органів ресуспендували у ФБР з додаванням 2% ЕТС до концентрації 2×10^7 клітин/мл. Зразки інкубували з антитілами протягом 30 хвилин при температурі 4°C у темряві. Після закінчення інкубації клітини відмивали ФБР та фіксували 1% розчином параформальдегіду в ФБР. При використанні антитіл до FoxP3 та iNOS проводили пермеабілізацію мембрани клітин за допомогою 0,5% розчину Tween 20 у ФБР. Зразки аналізували на проточному цитофлуориметрі FACS Aria («Becton Dickinson», США).

2.15. Статистичний аналіз результатів

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. Показники вірогідності помилки першого роду менше 5% ($p < 0,05$) вважалися статистично достовірними.

РОЗДІЛ 3

ВІКОВІ ЗМІНИ ФЕНОТИПОВО-ФУНКЦІОНАЛЬНОГО ПРОФІЛЮ МАКРОФАГІВ ТА НЕЙТРОФІЛІВ РІЗНОЇ ЛОКАЛІЗАЦІЇ

Макрофаги та нейтрофіли є важливими клітинами вродженої імунної системи. Вони є функціонально дуже подібними між собою, і, крім захисної, виконують безліч гомеостатичних функцій організму. Вважається, що макрофаги в процесі еволюції набули роль акцесорних клітин, які підтримують належне функціонування клітин паренхіми різних тканин організму [6]. Нейтрофіли розглядаються як партнери макрофагів у підтримці гомеостазу тканин [178]. Silva et al. нещодавно запропонували мієлодну систему фагоцитів, яка, крім клітин мононуклеарно-фагоцитарної системи, включає в себе також нейтрофіли [179].

Окремі дослідження демонструють відмінності вікових порушень макрофагів різної локалізації [180]. Однак ці дані дуже нечисленні та суперечливі. Даних стосовно порівняння вікових змін нейтрофілів різної локалізації ще менше. Тому, вікові зміни фагоцитів різної локалізації потребують детальних досліджень.

3.1. Зміни функціонального профілю макрофагів моноцитарного походження з віком

Макрофаги, що диференціюються з моноцитів, відіграють важливу роль у розвитку запалення. Інфекційний процес супроводжується міграцією моноцитів у тканини з їхнім подальшим диференціюванням на макрофаги та дендритні клітини [181]. Крім того, резидентні макрофаги деяких тканин

організму є короткоживучими, і постійно диференціюються з моноцитів крові [182,183]. Завданням цієї частини роботи було порівняльне дослідження функціонального профілю макрофагів, диференційованих з моноцитів кісткового мозку мишей різного віку. Для аналізу функціонального профілю фагоцитів досліджували спрямованість метаболізму аргініну, оксидативний метаболізм, фагоцитарну активність, а також експресію фенотипових маркерів CD11b та CD206.

Аргіназна активність макрофагів моноцитарного походження, отриманих від старих мишей, була нижчою на 40% порівняно з макрофагами молодих тварин ($p < 0,05$) (рис.3.1). При цьому статистично значимої різниці у продукції оксиду азоту клітинами, отриманими від мишей різного віку, не спостерігалось [184] (табл. 3.1). Отримані результати вказують на прозапальний зсув метаболізму аргініну у макрофагів моноцитарного походження у мишей з віком.

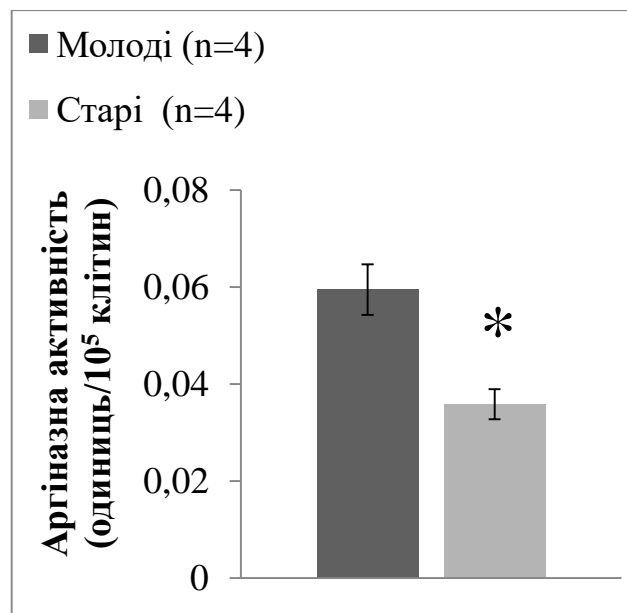


Рисунок 3.1. Аргіназна активність макрофагів моноцитарного походження, отриманих від мишей різного віку.

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

Таблиця 3.1

Продукція оксиду азоту фагоцитами, отриманими від мишей різного віку

Популяція фагоцитів	Мкмоль NO / 10 ⁶ клітин	
	Молоді миші (n=5)	Старі миші (n=5)
Макрофаги моноцитарного походження	25,56±3,84	26,67±4,36
Перитонеальні макрофаги	12,31±0,5	11,43±0,58
Альвеолярні макрофаги	22,37±1,86	17,28±1,28*
Мононуклеари селезінки	17,78±1,42	22,77±2,02*
Кістковомозкові нейтрофіли	68,53±5,66	52,46±4,07*

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 (рис.3.2). Проте, інтенсивність продукції РФК була вищою у 3,9 раза у макрофагів, отриманих від старих мишей ($p < 0,05$) (табл. 3.2).

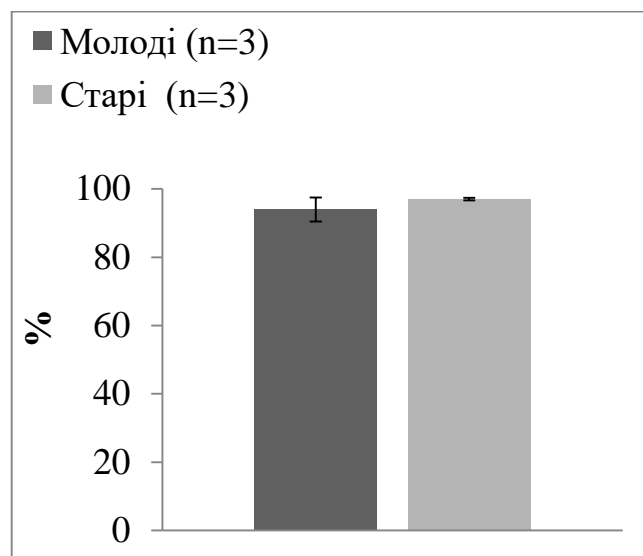


Рисунок 3.2. Відсоток макрофагів моноцитарного походження, отриманих від мишей різного віку, що продукували реактивні форми кисню.

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

Висока продукція РФК є однією з ознак класично активованих макрофагів, що разом з достовірно зниженою аргіназною активністю може

свідчити про більш виразну прозапальну поляризацію макрофагів, що диференціювалися з моноцитів старих мишей, порівняно з молодими тваринами.

Таблиця 3.2

Інтенсивність продукції реактивних форм кисню макрофагами різного походження, отриманими від мишей різного віку

Популяція фагоцитів	Інтенсивність продукції РФК (M±m)	
	Молоді (n=5)	Старі (n=5)
Макрофаги моноцитарного походження	572±227	2220±298*
Перитонеальні макрофаги	5206±469	3650±425*
Альвеолярні макрофаги	5899±620	10333±2330
Мононуклеари селезінки	191±16	293±34*

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

Не спостерігалось статистично значимих змін фагоцитарної активності макрофагів моноцитарного походження, отриманих від старих мишей (рис.3.3, табл.3.3). 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 [180].

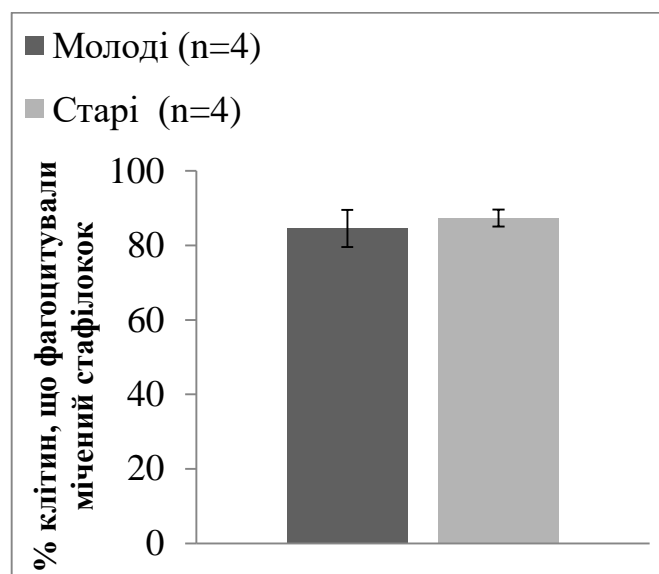


Рисунок 3.3. Фагоцитарне число макрофагів моноцитарного походження, отриманих від мишей різного віку.

Таблиця 3.3

**Фагоцитарний індекс різних популяцій макрофагів та нейтрофілів,
отриманих від мишей різного віку**

Популяція фагоцитів	Фагоцитарний індекс (M±m)	
	Молоді (n=5)	Старі (n=5)
Макрофаги моноцитарного походження	43740±5160	67040±9655
Перитонеальні макрофаги	2631,88±131,84	2830±132,1
Альвеолярні макрофаги	28700±5100	35317±2800
Мононуклеари селезінки	16555±800	18353±490
Кістковомозкові нейтрофіли	50790±6400	42657±2600
Гранулоцити селезінки	33288±2855	32890±3160

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

Експресія фенотипового маркера CD11b макрофагами моноцитарного походження також не змінювалася з віком (рис.3.4). CD11b – це білок, що входить до складу рецептора комплементу CR3, і, відповідно, є важливим для виконання клітиною різноманітних імунних функцій, у тому числі фагоцитарної. Тому, відсутність вікових змін експресії цього фенотипового маркера узгоджується з відсутністю порушень фагоцитарної функції макрофагів моноцитарного походження. Частка клітин, що експресують CD206, у популяції кістковомозкових макрофагів старих мишей була підвищена на 38% порівняно з відповідним показником клітин молодих тварин. Отримані нами результати узгоджуються з даними іншої дослідницької групи [20], котра також виявила підвищення експресії поверхневих маркерів активації в популяції інтактних кістковомозкових макрофагів старих тварин і розглядає такі зміни фенотипового профілю клітин цієї популяції як ознаку їх преактивованого стану.

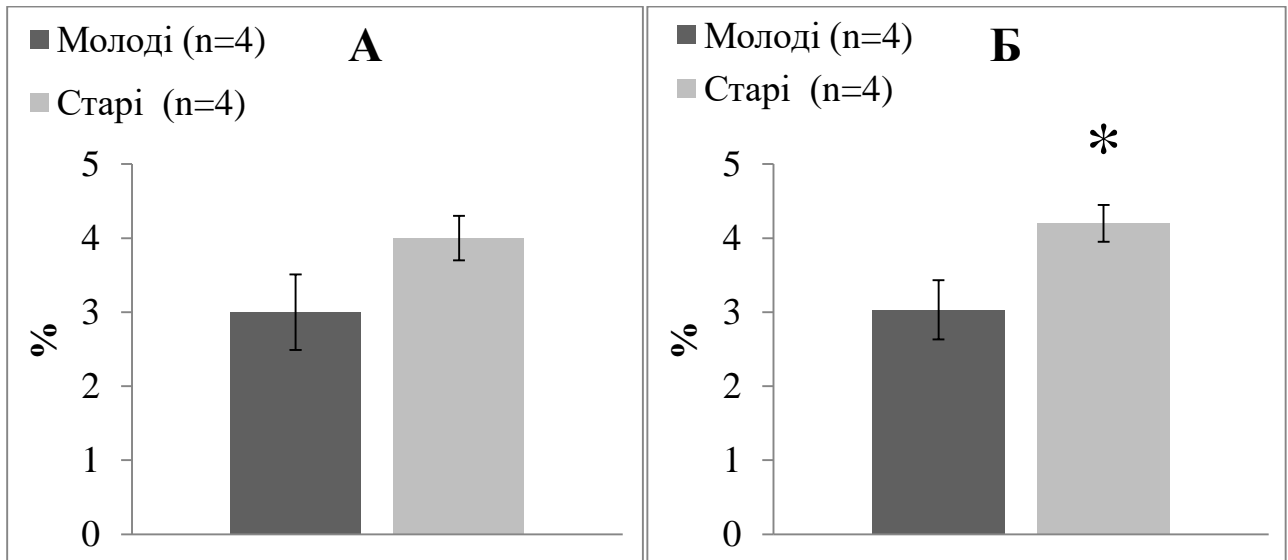


Рисунок 3.4. Відсоток макрофагів моноцитарного походження, отриманих від мишей різного віку, що експресували CD11b (А) та CD206 (Б). Примітка: * - $p < 0,05$ порівняно з групою молодих тварин.

Таким чином, макрофаги, що диференціювалися з моноцитів старих мишей, мали ознаки прозапального зсуву метаболічного профілю порівняно з відповідними клітинами молодих тварин. Це проявлялося достовірним посиленням оксидативного метаболізму одночасно зі зниженням аргіназної активності. Разом з тим, не спостерігалось вірогідних вікових змін фагоцитозу та експресії фенотипових маркерів цими клітинами, що свідчить про відсутність значних функціональних порушень цієї ланки вродженої імунної системи при старінні.

3.2. Функціональний профіль тканинних макрофагів старих мишей

Більшість тканинних макрофагів мають ембріональне походження і в нормі не потребують трансміграції моноцитів з кісткового мозку в тканини для підтримання своєї кількості [185]. Відомо, що тканинні макрофаги різної локалізації мають значні відмінності транскриптому та метаболічного профілю [186]. Тому, наступним завданням було порівняння функціонального профілю

тканинних макрофагів різної локалізації, отриманих від молодих та старих мишей.

3.2.1. Зміни функціонального профілю перитонеальних макрофагів старих мишей

Перитонеальна порожнина – це черевна порожнина ссавців, яка містить печінку, селезінку, переважну частину шлунково-кишкового тракту та інші органи. Відомо, що в нормі переважну більшість макрофагів перитонеальної порожнини становлять «великі перитонеальні макрофаги», які мають ембріональне походження [187].

На відміну від макрофагів моноцитарного походження, у перитонеальних макрофагів, отриманих від старих мишей, спостерігалось зростання аргіназної активності на 33% порівняно з відповідними клітинами молодих тварин (рис.3.5). Подібно до кістковомозкових макрофагів, не виявлено статистично достовірних вікових змін у продукції оксиду азоту цими клітинами (табл. 3.1) [188].

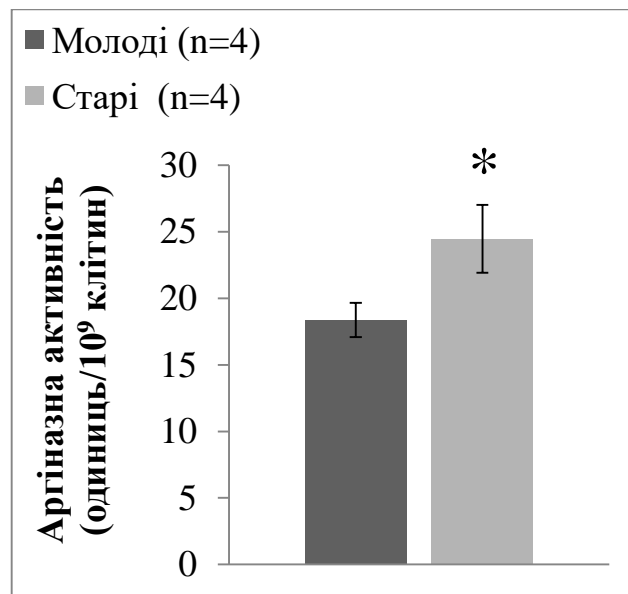


Рисунок 3.5. Аргіназна активність перитонеальних макрофагів, отриманих від мишей різного віку.

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

Отримані нами дані узгоджуються з даними інших авторів стосовно протизапальної поляризації метаболізму аргініну перитонеальних макрофагів, отриманих від старих тварин [189,190]. Однак у наведених експериментах було продемонстровано відсутність змін аргіназної активності та зниження продукції оксиду азоту нестимульованими та стимульованими наївними макрофагами перитонеальної порожнини. Наведені відмінності можуть пояснюватися відмінною лінією тварин, використаною у наших дослідженнях.

Ми не спостерігали достовірних вікових змін відсотку перитонеальних макрофагів, що продукували РФК (рис.3.6). Разом з тим, зареєстровано зниження інтенсивності продукції РФК фагоцитами, отриманими від старих тварин, на 30% порівняно з аналогічними клітинами молодих мишей ($p < 0,05$) (табл. 3.2). Посилений оксидативний метаболізм є ознакою прозапальної активації фагоцитів. Відповідно, виявлене нами зниження продукції РФК перитонеальними макрофагами, отриманими від старих мишей, узгоджується з вищенаведеними даними стосовно підвищення аргіназної активності цих клітин, і свідчить про їх протизапальну метаболічну поляризацію.

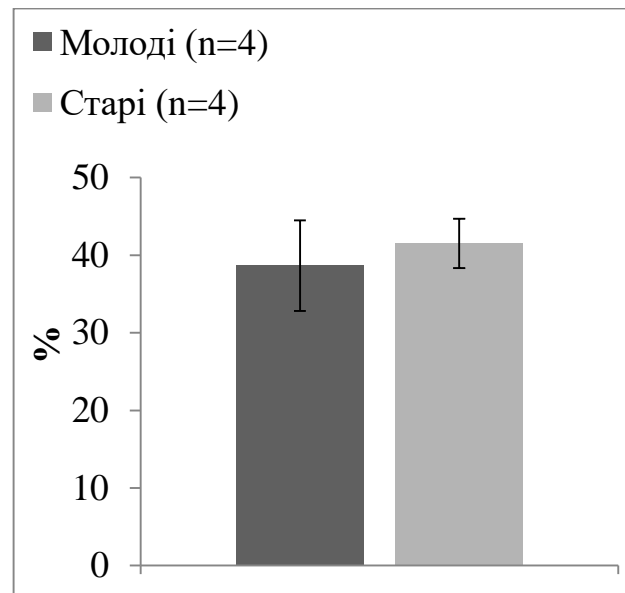


Рисунок 3.6. Відсоток перитонеальних макрофагів, отриманих від мишей різного віку, що продукували реактивні форми кисню.

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

Дані літератури стосовно вікових змін продукції РФК перитонеальними макрофагами нечисленні та суперечливі. Деякі дослідницькі групи вказують на посилення оксидативного метаболізму цієї популяції фагоцитів при старінні [191]. Інші дослідники, навпаки, демонструють зниження продукції РФК перитонеальними макрофагами з віком [192]. Причиною розбіжностей у результатах різних досліджень може бути використання відмінних ліній тварин. Крім того, застосування різноманітних агентів для посилення міграції фагоцитів у перитонеальну порожнину призводить до накопичення клітин, які відрізняються від резидентних перитонеальних макрофагів за своїм походженням та метаболічним статусом [193].

Фагоцитарне число перитонеальних макрофагів, отриманих у молодих та старих мишей, складало $(13,62 \pm 1,2)$ та $(10,43 \pm 0,14)\%$, відповідно ($p < 0,05$) (рис.3.7). При цьому, показник ФІ у тварин різного віку був практично однаковим (табл.3.3).

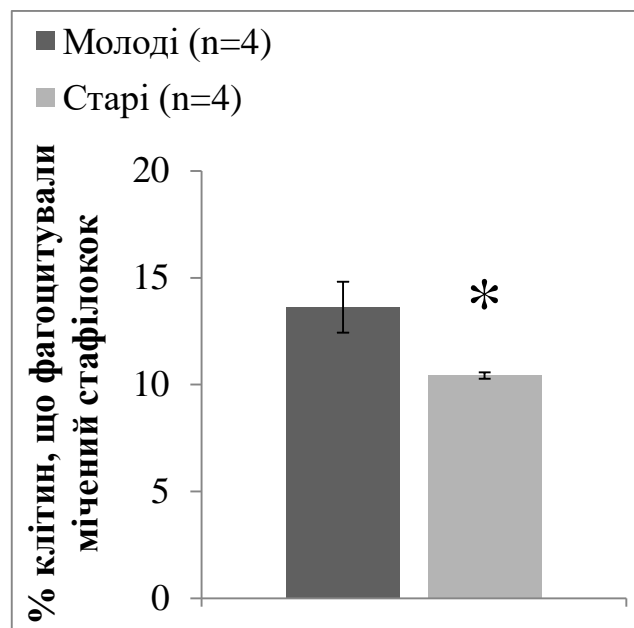


Рисунок 3.7. Фагоцитарне число перитонеальних макрофагів, отриманих від мишей різного віку.

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

Отримані нами дані узгоджується з результатами інших авторів, які виявили зниження фагоцитарної активності перитонеальних макрофагів мишей лінії C57Bl/6 з віком [180].

3.2.2. Зміни функціонального профілю альвеолярних макрофагів старих мишей

Легеневі інфекції вносять значний вклад у смертність населення похилого віку [194]. Важливу роль в імунному захисті легень відіграють альвеолярні макрофаги, локалізовані зручним чином для захоплення та знешкодження чужорідних часточок та хвороботворних мікроорганізмів. Вважається, що альвеолярні макрофаги, так само як і перитонеальні, походять з ембріональних попередників [195].

Аргіназна активність альвеолярних макрофагів старих тварин перевищувала аналогічний показник у молодих мишей на 19% ($p < 0,05$) (рис.3.8А). Продукція нітритів альвеолярними макрофагами старих мишей була нижчою на 29% порівняно з молодими тваринами ($p < 0,05$) (табл. 3.1) [188]

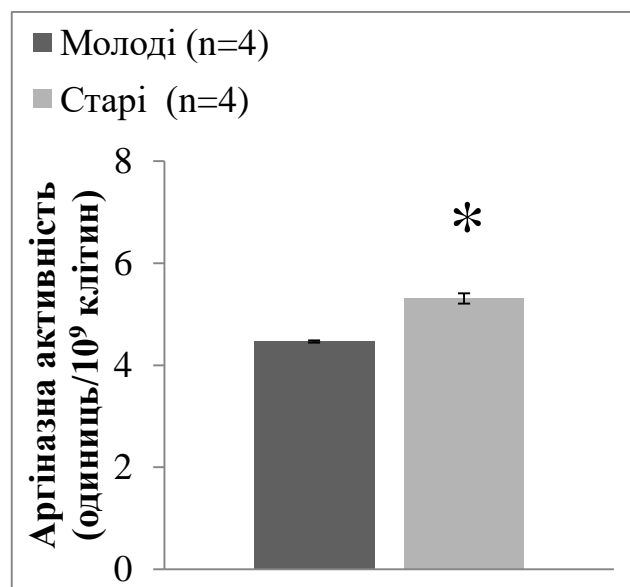


Рисунок 3.8. Аргіназна активність альвеолярних макрофагів, отриманих від мишей різного віку.

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

Відсоток клітин, що продукували РФК, у альвеолярних макрофагів, отриманих у молодих та старих тварин, становив $(18,45 \pm 3,95) \%$ та $(3,1 \pm 1,73) \%$, відповідно ($p < 0,05$) (рис. 3.9). Достовірна різниця у рівні синтезу внутрішньоклітинних РФК клітинами старих і молодих тварин була відсутня (табл. 3.2) [196]. Дані стосовно вікових змін продукції РФК альвеолярними макрофагами мишей у літературі відсутні. Однак, Tasat et al. (2003) виявлено зниження відсотку альвеолярних мононуклеарних фагоцитів, що продукують РФК, у старих щурів [197]. Це дозволяє зробити припущення про зниження оксидативного метаболізму на рівні популяції резидентних альвеолярних макрофагів з віком, котре не є видоспецифічним.

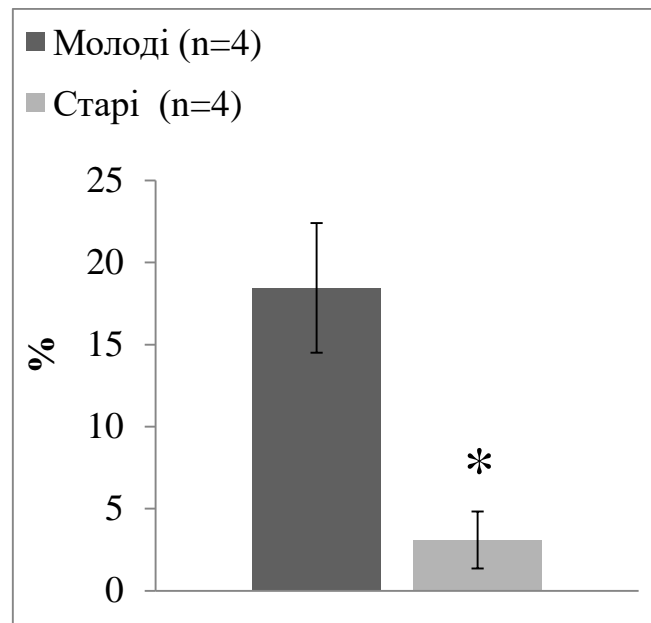


Рисунок 3.9. Відсоток альвеолярних макрофагів, отриманих від мишей різного віку, що продукували реактивні форми кисню.

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

За результатами наших досліджень, частка фагоцитуючих альвеолярних макрофагів молодих та старих тварин складала $(17,2 \pm 0,4) \%$ та $(12,5 \pm 0,76) \%$, відповідно ($p < 0,05$) (рис. 3.10). Разом з тим, не спостерігалось достовірної різниці фагоцитарного індексу цих клітин (табл.3.3) [196]. Wong et al. (2017) виявили у старих мишей цієї ж лінії достовірно нижчий відсоток альвеолярних

макрофагів, що фагоцитували апоптизовані нейтрофіли та мічені часточки, порівняно з молодими тваринами [198]. Ці дані підтверджують результати наших експериментів. Крім того, у вищенаведеному дослідженні також виявлено зниження експресії скавенджер рецептора CD204 у альвеолярних макрофагів з віком. Відомо, що цей рецептор здатен розпізнавати бактеріальні ліганди [199], і порушення його експресії при старінні може бути однією з причин зниження фагоцитарного числа альвеолярних макрофагів старих тварин у нашому експерименті.

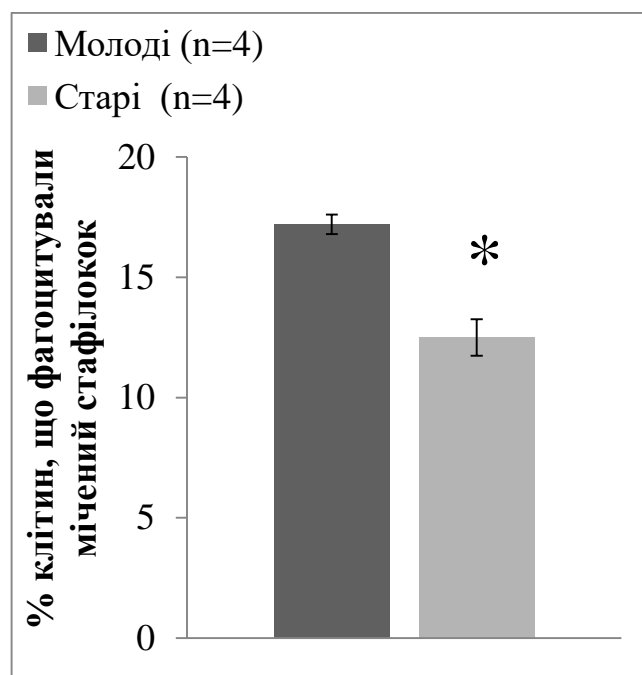


Рисунок 3.10. Фагоцитарне число альвеолярних макрофагів, отриманих від мишей різного віку.

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. Це проявляється посиленням аргіназної активності та зниженням продукції РФК. Крім того, спостерігається зниження відсотку клітин, що фагоцитували мічений стафілокок, що вказує на наявність більш значних

функціональних порушень тканинних макрофагів порівняно з макрофагами моноцитарного походження, які можуть бути обумовлені впливом тканинного мікрооточення старого організму.

Як видно з рисунків 3.5 та 3.8, у мишей лінії C57Bl/6 перитонеальні макрофаги характеризуються протизапальним зсувом метаболізму порівняно з альвеолярними. Це виражається достовірно вищою аргіназною активністю у перитонеальних макрофагів порівняно з альвеолярними, та вірогідно вищим рівнем продукції нітритів альвеолярними макрофагами порівняно з перитонеальними, незалежно від віку тварин. Аналогічну ситуацію ми спостерігали у тканинних макрофагів мишей лінії CBA/Ca (рис. 3.11), що вказує на відсутність принципової різниці метаболічного стану макрофагів різної локалізації, отриманих від тварин досліджуваних нами ліній. Більше того, Hu et al. (2000) порівняли здатність альвеолярних та перитонеальних макрофагів мишей фагоцитувати *in vitro* апоптичні тимоцити, і виявили, що альвеолярні макрофаги характеризувалися достовірно нижчим відсотком фагоцитуючих клітин та фагоцитарним індексом порівняно з перитонеальними [200]. Ця сама група вчених перевірила отримані *in vitro* результати також *in vivo*, вводячи апоптичні тимоцити інтратрахеально та внутрішньочеревно здоровим мишам. При цьому також спостерігалось достовірно нижче поглинання апоптичних тимоцитів альвеолярними макрофагами порівняно з перитонеальними. Варто підкреслити, що при використанні в експерименті полістиренових латексних часточок не виявлено відмінностей між досліджуваними популяціями фагоцитів. Відомо, що фагоцитоз апоптизованих клітин є ознакою їх альтернативної поляризації. Відповідно, послаблення цієї функції у альвеолярних макрофагів свідчить про їхню прозапальну поляризацію порівняно з перитонеальними, підтверджуючи, таким чином, отримані нами результати. Крім того, дані стосовно дефектного фагоцитозу апоптичних часточок альвеолярними макрофагами були підтверджені на клітинах, отриманих від семи різних інбредних ліній тварин, що вказує на те,

що метаболічний статус тканинних макрофагів різної локалізації не залежить від лінії мишей.

Згідно даних літератури, альвеолярні макрофаги коней мають вищий рівень експресії генів TGFB1 та лектину MRC1, що, на противагу отриманим нами результатам, свідчить про їхню протизапальну поляризацію порівняно з перитонеальними макрофагами, що характеризувалися гібридним активаційним профілем [201]. Автори даного дослідження також наводять дані інших дослідників, які вказують на подібність виявлених ними результатів з даними, отриманими при дослідженні макрофагів людини. Разом з тим, автори акцентують увагу на відмінності активаційного статусу альвеолярних та перитонеальних макрофагів людини та коней від аналогічних популяцій макрофагів, отриманих від мишей. Дане дослідження опосередковано підтверджує отримані нами результати.

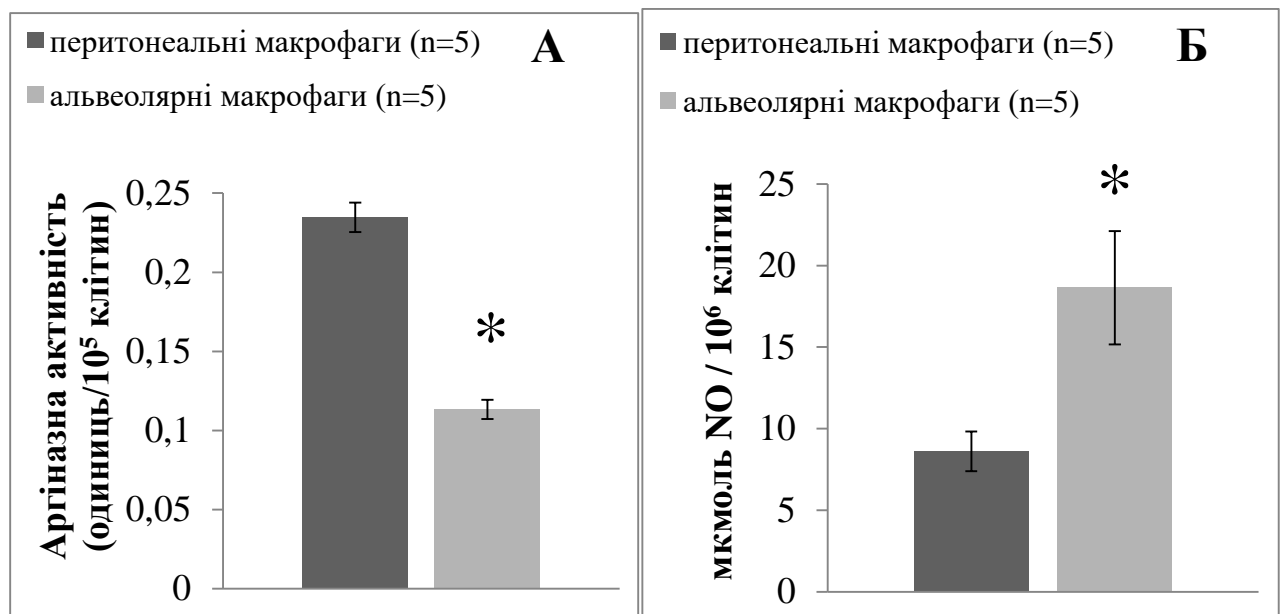


Рисунок 3.11. Аргіназна активність (А) та продукція оксиду азоту (Б) перитонеальними та альвеолярними макрофагами молодих мишей лінії СВА/Са.

Примітка: * - $p < 0,05$ порівняно з перитонеальними макрофагами.

3.3. Зміни функціонального профілю макрофагів селезінки старих мишей після імунізації корпускулярним антигеном

Селезінка – це вторинний лімфоїдний орган, що забезпечує елімінацію та розвиток імунної відповіді на антигени, які потрапляють в циркуляцію. У селезінці міститься щонайменше чотири субпопуляції макрофагів. Макрофаги червоної пульпи мають ембріональне походження. Вважається, що макрофаги маргінальної зони та металофільні макрофаги походять з моноцитів крові дорослого організму [202]. Відомо, що селезінка є одним з головних органів, у яких відбувається екстрамедулярний гемопоез [203]. Цей процес забезпечує продукцію фагоцитів та антигенпрезентувальних клітин при інфекції та запаленні. Тому, для збагачення селезінки макрофагами моноцитарного походження, ми попередньо імунізували дослідних мишей еритроцитами барана.

Аргіназна активність макрофагів селезінки старих мишей була нижчою на 16% порівняно з клітинами молодих тварин ($p < 0,05$) (рис.3.12). Рівень продукції нітритів макрофагами селезінки підвищувався у старих мишей порівняно з молодими на 28% ($p < 0,05$) (табл. 3.1) [204].

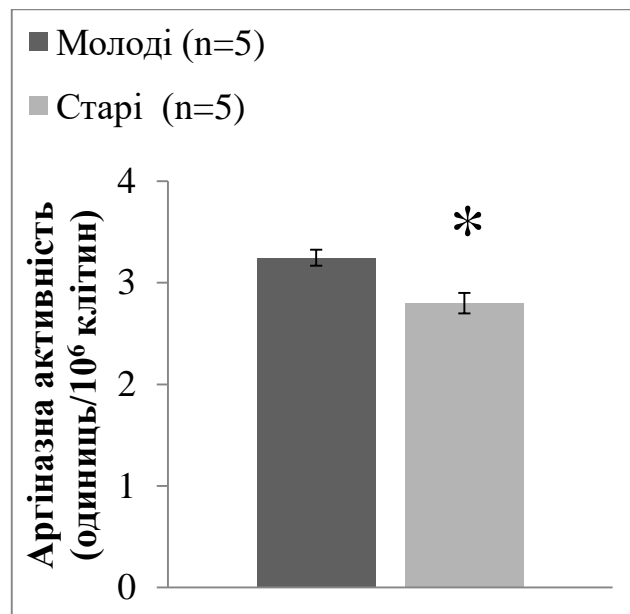


Рисунок 3.12. Аргіназна активність макрофагів селезінки, отриманих від мишей різного віку.

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 ($p < 0,05$) (табл. 3.2). Також у старих мишей спостерігалось зростання частки мононуклеарних клітин селезінки, які продукували РФК у 2,2 рази ($p < 0,05$) (рис.3.13) [204].

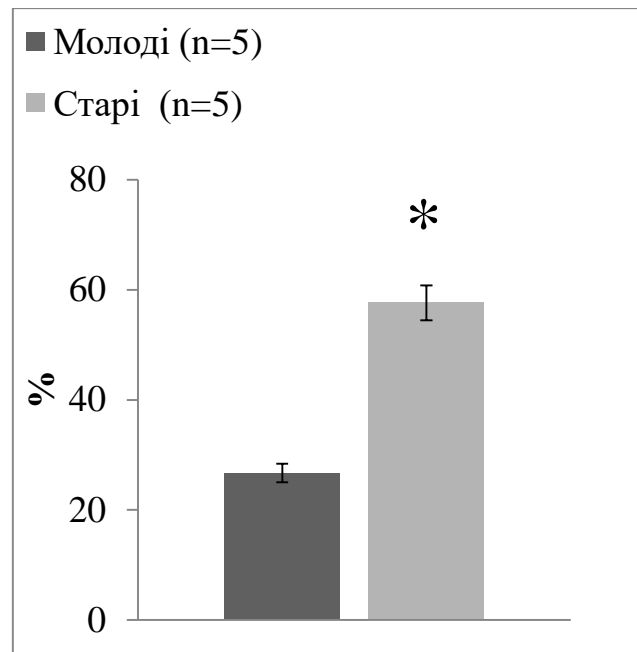


Рисунок 3.13. Відсоток мононуклеарів селезінки, отриманих від мишей різного віку, що продукували реактивні форми кисню.

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

Достовірних змін фагоцитарного числа мононуклеарних фагоцитів селезінки старих мишей у порівнянні з молодими не спостерігалось (рис.3.14). Виявлено недостовірну тенденцію до підвищення цього показника у старих тварин. Фагоцитарний індекс мононуклеарних спленоцитів також достовірно не відрізнявся у старих мишей порівняно з молодими (табл.3.3) [204].

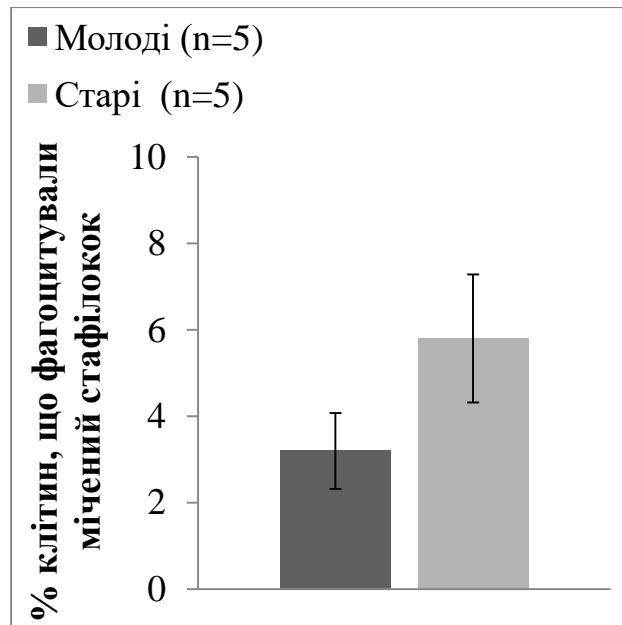


Рисунок 3.14. Фагоцитарне число мононуклеарів селезінки, отриманих від мишей різного віку.

Таким чином, в умовах імунізації старих мишей корпускулярним ксеногенним антигеном спостерігається прозапальна поляризація макрофагів селезінки, більш виразна у випадку старих тварин, яка проявляється достовірно нижчим рівнем аргіназної активності цих клітин, більш високою продукцією РФК мононуклеарними фагоцитами селезінки, а також підвищенням продукції NO. Отримані нами результати узгоджуються з даними про прозапальну активацію стимульованих макрофагів селезінки старих мишей порівняно з клітинами молодих тварин, що супроводжувалася, зокрема, підвищеною продукцією оксиду азоту цими клітинами [190].

3.4. Зміни фенотипово-функціонального профілю кістковомозкових нейтрофілів з віком у мишей

Кістковий мозок є осередком диференціювання нейтрофілів. Крім того, нейтрофіли кісткового мозку є новим предметом активних досліджень у зв'язку з виявленням феномену їх медулярного депонування і кліренсу цих клітин медулярними макрофагами [205,206]. Автори виявленого феномену

висловлюють припущення, що у кістковому мозку в умовах гомеостазу можуть накопичуватися як щойно диференційовані молоді, так і старіючі нейтрофіли.

Аргіназна активність нейтрофілів кісткового мозку старих тварин була достовірно вищою порівняно з клітинами молодих мишей на 17% ($p < 0,05$) (рис.3.15). Спостерігалось зниження продукції нітритів нейтрофілами кісткового мозку старих мишей на 31% порівняно з молодими тваринами ($p < 0,05$) (табл. 3.1) [188].

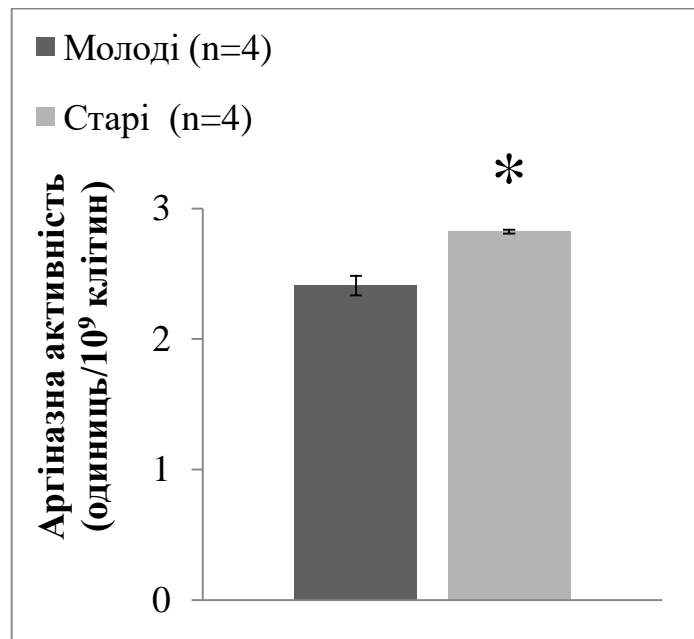


Рисунок 3.15. Аргіназна активність кістковомозкових нейтрофілів, отриманих від мишей різного віку.

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

Також спостерігалось зниження відсотку нейтрофілів, що продукували РФК, отриманих від старих тварин, у 1,5 рази порівняно з відповідними клітинами молодих мишей ($p < 0,05$) (рис. 3.16). Не виявлено вікових змін рівня продукції РФК нейтрофілами (табл. 3.4) [196].

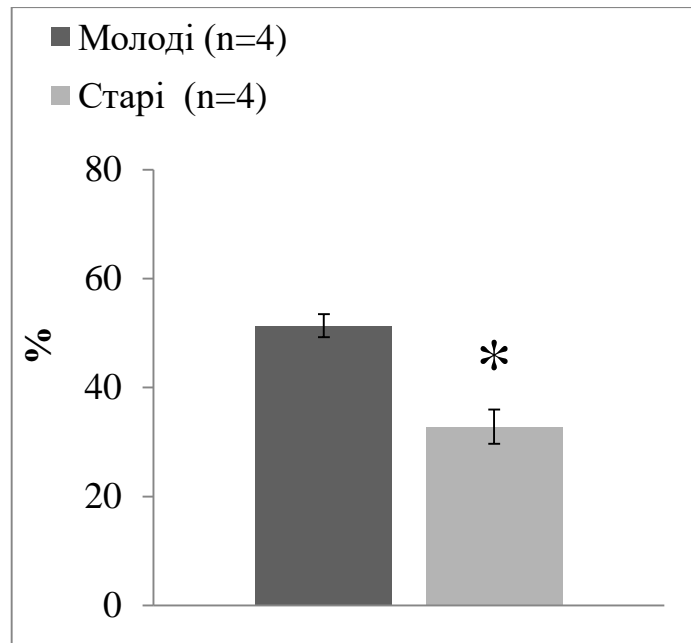


Рисунок 3.16. Відсоток кістковомозкових нейтрофілів, отриманих від мишей різного віку, що продукували реактивні форми кисню.

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

Таблиця 3.4

Інтенсивність продукції реактивних форм кисню нейтрофілами різної локалізації, отриманими від мишей різного віку

Популяція фагоцитів	Інтенсивність продукції РФК ($M \pm m$)	
	Молоді (n=5)	Старі (n=5)
Кістковомозкові нейтрофіли	25935±3055	21241±4055
Гранулоцити селезінки	322±49	483±29*

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

За результатами наших досліджень не виявлено змін фагоцитарної активності нейтрофілів кісткового мозку старих тварин з віком (рис.3.17, табл.3.3) [196].

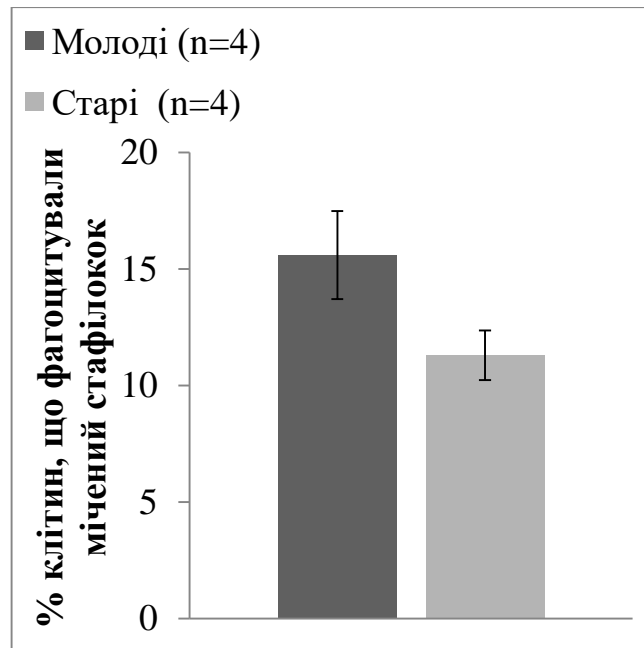


Рисунок 3.17. Фагоцитарне число кістковомозкових нейтрофілів, отриманих від мишей різного віку.

Отже, кістковомозкові нейтрофіли старих мишей характеризувалися протизапальною поляризацією метаболізму, що проявлялася підвищенням аргіназної активності та зниженням продукції оксиду азоту та РФК. Це може вказувати на накопичення у кістковому мозку старих тварин відпрацьованих нейтрофілів. Однією з імовірних причин цього явища може бути порушення з віком процесів ефероцитозу макрофагами кісткового мозку. Відомо, що порушення процесів кліренсу апоптизованих нейтрофілів веде до підвищення продукції реактивних форм кисню [207]. Це узгоджується з отриманими нами даними про підвищення продукції реактивних форм кисню макрофагами, що диференціювалися з моноцитів старих мишей (табл. 3.2).

3.5. Зміни фенотипово-функціонального профілю гранулоцитів селезінки старих імунізованих мишей

Останні дані літератури спростовують попередні уявлення стосовно запрограмованості ефektorних функцій нейтрофілів, демонструючи їхню

значну пластичність при міграції в периферійні тканини [208]. Крім того, у селезінці виявлено наявність резидентних популяцій нейтрофілів, які відіграють важливу роль у захисті організму від інкапсульованих бактерій [209]. 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. Однією з причин цього явища є бактеріємія, спричинена віковими порушеннями кишкового бар'єру [210]. 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 ($p < 0,05$) (табл. 3.4). При цьому, вірогідних вікових змін частки гранулоцитів, що продукували РФК, не було виявлено (рис.3.18) [204].

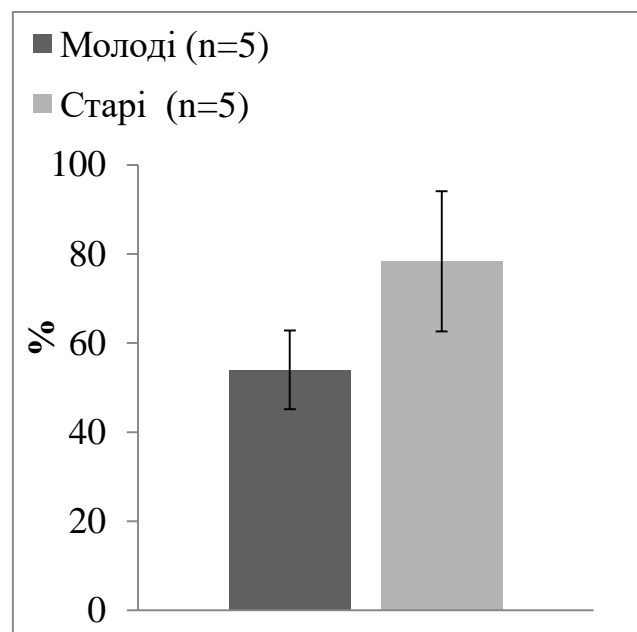


Рисунок 3.18. Відсоток гранулоцитів селезінки, отриманих від мишей різного віку, що продукували реактивні форми кисню.

Більшість даних, представлених у науковій літературі стосовно вікових змін нейтрофілів, отримані з використанням циркулюючих клітин молодих та старих донорів. Результати досліджень змін оксидативного метаболізму цих клітин при старінні доволі суперечливі. Окремі автори вказують на збільшення з віком продукції РФК нейтрофілами периферичної крові людини [211]. Деякі дослідницькі групи наводять докази відсутності змін [212], або навіть зниження утворення РФК циркулюючими нейтрофілами людини при старінні [213].

Посилення фагоцитозу має різне значення для моно- і поліморфноядерних фагоцитів. Для мононуклеарних фагоцитів, таких як макрофаги, посилення фагоцитозу може бути свідченням альтернативної поляризації їх функцій, асоційованої з ефероцитозом. Для поліморфноядерних фагоцитів посилення фагоцитозу – ознака прозапальної активації. Фагоцитарна активність гранулоцитів селезінки в умовах присутності корпускулярного антигену достовірно не відрізнялася у тварин різного віку (табл.3.3). Однак, слід відмітити збільшену частку фагоцитуючих гранулоцитів у популяції селезінкових поліморфноядерних фагоцитів ($p < 0,05$) (рис.3.19).

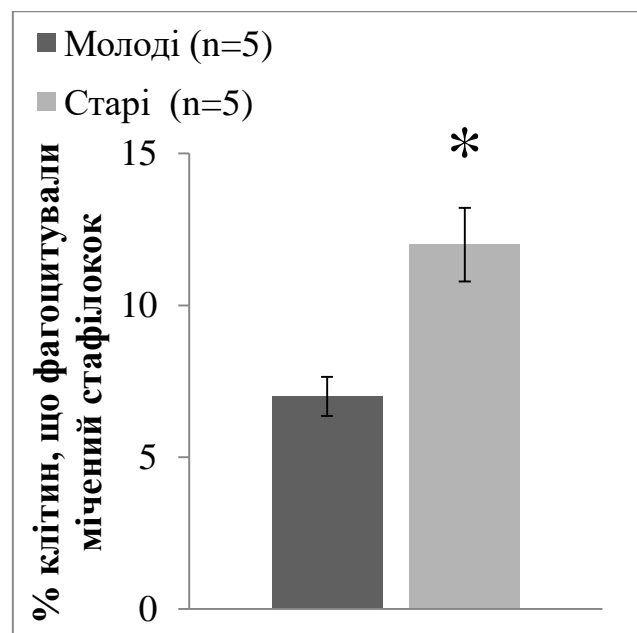


Рисунок 3.19. Фагоцитарне число гранулоцитів селезінки, отриманих від мишей різного віку.

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

У літературі опубліковано лише незначну кількість результатів дослідження вікових змін функцій нейтрофілів. Переважно ці результати стосуються вивчення вікових особливостей циркулюючих нейтрофілів людини і вказують на порушення фагоцитозу цих клітин при старінні [102]. Разом з тим, показано відсутність порушень фагоцитарної функції циркулюючих нейтрофілів мишей з віком [214], що узгоджується з нашими даними, отриманими на нейтрофілах кісткового мозку та селезінки старих тварин.

Підсумовуючи результати досліджень можна зробити висновок, що вікові зміни функціонального профілю фагоцитів залежать від їхньої локалізації та походження. У фагоцитів, що походять з кісткового мозку, отриманих від старих мишей, спостерігаються ознаки прозапального зсуву метаболізму, у порівнянні з аналогічними клітинами молодих тварин. Резидентні тканинні фагоцити ембріонального походження старих тварин характеризувалися протизапальним метаболічним зсувом, порівняно з їх аналогами у молодих тварин.

3.6. Висновки до розділу 3

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.

РОЗДІЛ 4

ЗМІНИ ФЕНОТИПОВОГО ПРОФІЛЮ Т-ЛІМФОЦИТІВ ВТОРИННИХ ЛІМФОЇДНИХ ОРГАНІВ МОЛОДИХ МИШЕЙ ПІД ВПЛИВОМ МАКРОФАГІВ СТАРИХ ТВАРИН НА МОДЕЛІ ГЕТЕРОХРОННОГО ПАРАБІОЗУ

Т-лімфоцити зазнають значних функціональних порушень при старінні. Однак механізми виникнення дисфункції цих клітин з віком є недостатньо вивченими. Показано, що співкультивування Т-клітин селезінки старих мишей з макрофагами селезінки сингенних молодих тварин відновлює їхню проліферативну активність [7]. Це вказує на те, що макрофаги, які знаходяться в тканинах вторинних лімфоїдних органів старих тварин, можуть бути одним з чинників, що обумовлюють розвиток вікових порушень Т-лімфоцитів. Тому, наступним етапом наших досліджень було вивчення впливу макрофагів старих мишей на фенотиповий профіль Т-лімфоцитів вторинних лімфоїдних органів молодих тварин на моделі гетерохронного парабіозу.

Гетерохронний парабіоз – це експериментальна модель, яка полягає у хірургічному з'єднанні шкіри та черевної стінки молодої та старої тварини. В результаті утворюються анастомози кровоносних капілярів двох тварин, і, відповідно, формується спільне кровоносне русло [177]. Це дозволяє оцінити вплив клітинних та гуморальних факторів, що знаходяться в крові старих тварин, на досліджувані показники молодих мишей. Для дослідження міграції клітин ми хірургічно поєднували тварин ліній C57Bl/6 та B6.GFP. Остання лінія тварин утворена на базі лінії C57Bl/6. Каріоцити мишей цієї лінії експресують ген зеленого флуоресцентного білка (англ. green fluorescent protein, або GFP), що дозволяє відслідковувати такі клітини за допомогою флуоресцентних методів, зокрема проточної цитометрії.

По ходу роботи ми стикнулися з загибеллю тварин у парабіотичних парах. Аналіз літератури виявив, що GFP-позитивні клітини можуть активувати реакції трансплантаційного імунітету [215]. Зазвичай внутрішньовенне введення лейкемічних клітин дикого типу викликає розвиток лейкемії та загибель мишей лінії Balb/c, в той час як при інфузії лейкемічних клітин, трансдукованих білком eGFP, такого не спостерігалось. Крім того, введення eGFP-позитивних лейкемічних клітин голим мишам (nude mice), які характеризуються вродженим дефектом Т-клітинної імунної відповіді, призводило до їх загибелі. Показано, що Т-клітинна цитотоксичність проти мічених eGFP лейкемічних клітин була втричі вищою порівняно з імунною відповіддю проти лейкемічних клітин дикого типу. Імуногенність білка GFP була підтверджена в експериментах з використанням різних клітин, мічених цим білком, таких як гепатоцити, гематопоетичні стовбурові клітини, а також у різних видів тварин, зокрема щурів, собак та макак [216]. Вживаність GFP-позитивних клітин можна продовжити за рахунок різноманітних імунологічних маніпуляцій, таких як використання імуносупресантів (циклоспорин та такролімус), деплеція лімфоїдних клітин, імуномодуляція за допомогою стовбурових клітин та обмеження активації імунної системи антиген-презентуючими клітинами [215].

Гетерохронний парабіоз є високоінвазивною моделлю з високим ризиком періопераційної та постопераційної смертності. Після операції парабіонти отримують курс антибіотиків для попередження розвитку інфекційного процесу. Тому, застосування імуносупресантів є небажаним через ризик інфекції. У зв'язку з цим, перед нами постало завдання сформувати толерантність у мишей дикої лінії до GFP-позитивних каріоцитів.

Серед різних протоколів індукції імунологічної толерантності, індукція неонатальної толерантності є одним з найбільш технічно простих та дешевих методів. Billingham et al. (1953) вперше провели такий експеримент. Вони вводили новонародженим мишенятам лімфоїдні клітини мишей лінії, відмінної по антигенам МНС. Успішність індукції толерантності пізніше була

підтверджена приживленням трансплантатів у експериментальних мишей. Механізми цього феномену залишилися не до кінця дослідженими. Для його пояснення було запропоновано ряд гіпотез та моделей. Згідно «пасивної» моделі, при внутрішньовенному введенні алогенних спленоцитів, вони мігрують та приживлюються в тимусі, та сприяють елімінації антиген-специфічних тимоцитів донора в процесі негативної селекції. «Активна» модель припускала наявність «супресорних Т-клітин», але в подальшому це припущення було відкинуто з відкриттям регуляторних Т-лімфоцитів. Точна роль регуляторних Т-клітин у формуванні неонатальної толерантності залишається нез'ясованою. Домінування Th-2 імунної відповіді в неонатальному періоді, а також субпопуляція Т-хелперів 17 вважаються важливими факторами, що забезпечують індукцію неонатальної імунологічної толерантності [217].

GFP є мінорним антигеном гістосумісності. Тому, за основу нами було взято модель індукції неонатальної імунологічної толерантності до мінорних антигенів гістосумісності H-Y [218].

Імунологічну толерантність індукували у 3-х денних мишей лінії C57Bl/6. По досягненню ними 1,5-місячного віку перевіряли успішність індукції толерантності трансплантуванням шкіри вух трансгенних GFP-позитивних мишей-самиць (рис.4.1).

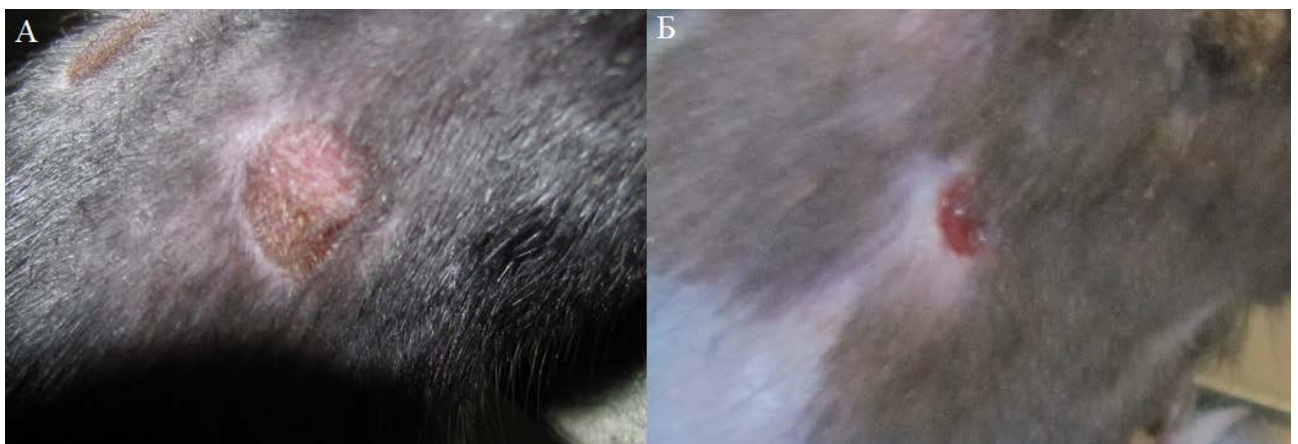


Рисунок 4.1. Репрезентативні фотографії GFP-позитивних трансплантатів шкіри у експериментальних (А, 6 тижнів після операції) та контрольних (Б, 10 день після операції) C57Bl/6 мишей.

Фрагменти шкіри трансгенних тварин залишалися інтактними через 6 тижнів після трансплантації у всіх мишей лінії C57Bl/6, у яких індукували розвиток неонатальної імунологічної толерантності. При цьому спостерігалось відторгнення аналогічних трансплантатів у контрольних мишей протягом перших двох тижнів після операції. Це проявлялось розвитком запалення та утворенням рубця на місці трансплантата [219].

Таким чином, проведені операції по індукції неонатальної імунологічної толерантності до білка GFP дозволили нам досягти відсутності загибелі тварин у парабіотичних парах і провести експерименти для реалізації поставленої задачі дисертаційного дослідження.

4.1. Фенотиповий профіль макрофагів старих мишей та Т-клітин молодих тварин у лімфовузлах молодих партнерів по гетерохронному парабіозу

Лімфовузли – це вторинні лімфоїдні органи, які забезпечують імунну відповідь до антигенів, що знаходяться в тканинах організму. Мікроархітектура лімфовузлів сприяє контакту клітин вродженої та адаптивної імунної системи, в тому числі й макрофагів та Т-лімфоцитів, що, в свою чергу, забезпечує генерацію адаптивної імунної відповіді [220]. Модель гетерохронного парабіозу дозволила нам вивчити вплив макрофагів старого трансгенного організму, які мігрували у тканинну нішу вторинних лімфоїдних органів молодих тварин вихідної лінії упродовж парабіотичного співіснування, на новоутворені наївні Т-лімфоцити молодшої тварини, котрі після диференціювання у тимусі щоденно потрапляють у вторинні лімфоїдні органи у кількості $\approx 2 \times 10^6$.

Відсоток макрофагів старих трансгенних тварин, що мігрували у лімфовузли молодих гетерохронних парабіонтів вихідної лінії, в 1,8 ($p < 0,05$) рази перевищував аналогічний показник у молодих ізохронних парабіонтів, у лімфовузли яких мігрували макрофаги молодих трансгенних тварин (рис.4.2.). Відомо, що вихід моноцитів з кісткового мозку і їхня міграція у тканини

опосередкована експресією ними CCR2 – рецептора, який зв’язується з хемокіном CCL2. Spinetti et al. (2004) виявили достовірне зростання експресії хемокіну CCR2 клітинами аорти старих тварин порівняно з молодими [221]. Посилення експресії з віком у мишей ще одного хемокінового рецептору – CCR7 – описано в роботі дослідницької групи, очолюваної Donnini [222]. Автори цих досліджень проводили комплексне вивчення диференційованих з попередників кісткового мозку *in vitro* зрілих і незрілих антигенпрезентувальних клітин молодих і старих мишей. В результаті цих досліджень виявлено зниження здатності антигенпрезентувальних клітин старих тварин індукувати диференціювання цитотоксичних Т-лімфоцитів одночасно з посиленням їх міграторної активності. Автори вважають посилення міграторної активності компенсаторною реакцією, зумовленою послабленням антигенпрезентувальної здатності цих клітин. Отже, 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.

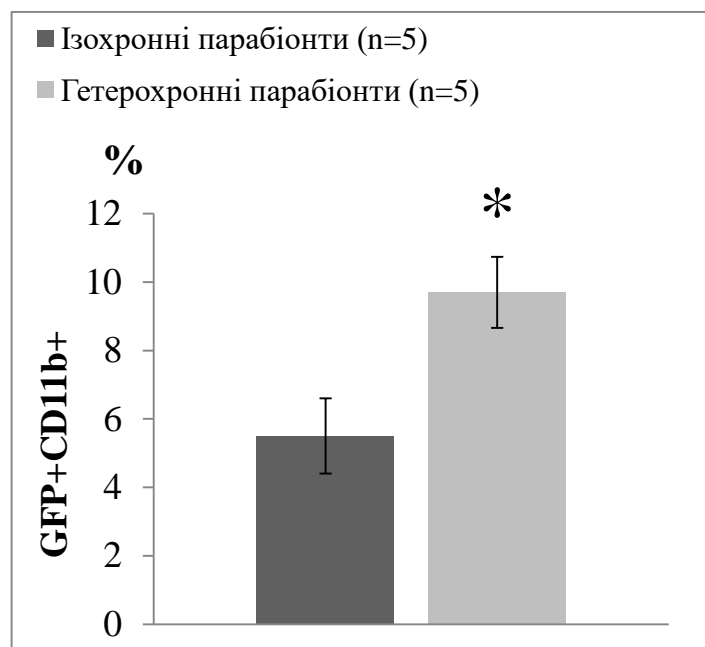


Рисунок 4.2. Відсоток GFP-позитивних макрофагів старих тварин у лімфовузлах молодих парабіонтів вихідної лінії.

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

За результатами наших досліджень не виявлено достовірних відмінностей відсотку iNOS та CD206-позитивних макрофагів у популяції мононоуклеарних фагоцитів, що мігрували у лімфовузли гетерохронних та ізохронних парабіонтів вихідної лінії від трансгенних партнерів по парабіозу (рис.4.3). Як було зазначено раніше, з віком спостерігається зростання експресії фенотипових маркерів активації макрофагів, яке вважається ознакою преактивованого стану цих клітин [20]. Відсутність таких змін у даному експерименті може бути обумовлена особливостями схеми дослідження. У наших експериментах у тканинну нішу лімфоїдних органів мігрували циркулюючі моноцити трансгенних молодих і старих тварин, оскільки відомо, що тканинні макрофаги характеризуються обмеженою здатністю до міграції [223]. Диференціювання моноцитів у тканинах визначається тканинним мікрооточенням. Імовірно, тканинне мікрооточення лімфовузлів молодих тварин зумовило відсутність вікових змін фенотипово-функціонального профілю макрофагів, диференційованих з моноцитів старих тварин.

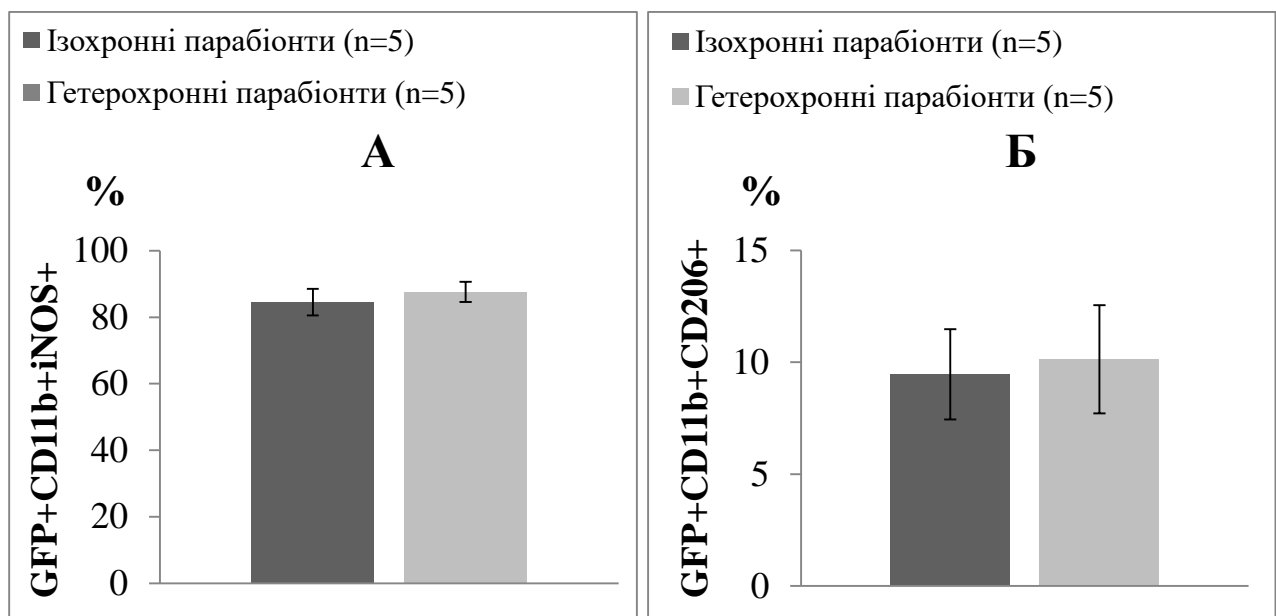


Рисунок 4.3. Частка GFP-позитивних макрофагів, що експресували активаційні маркери iNOS (А) та CD206 (Б) у лімфовузлах парабіонтів вихідної лінії.

Нами не виявлено достовірних змін частки GFP-CD4⁺ Т-лімфоцитів у лімфовузлах молодих гетерохронних парабіонтів вихідної лінії порівняно з молодими ізохронними парабіонтами (рис.4.4). Отримані дані свідчать про відсутність впливу макрофагів старих тварин, що заселили тканинну нішу лімфовузлів молодих тварин на міграцію і хомінг Т-лімфоцитів, що розвиваються у цих вторинних лімфоїдних органах.

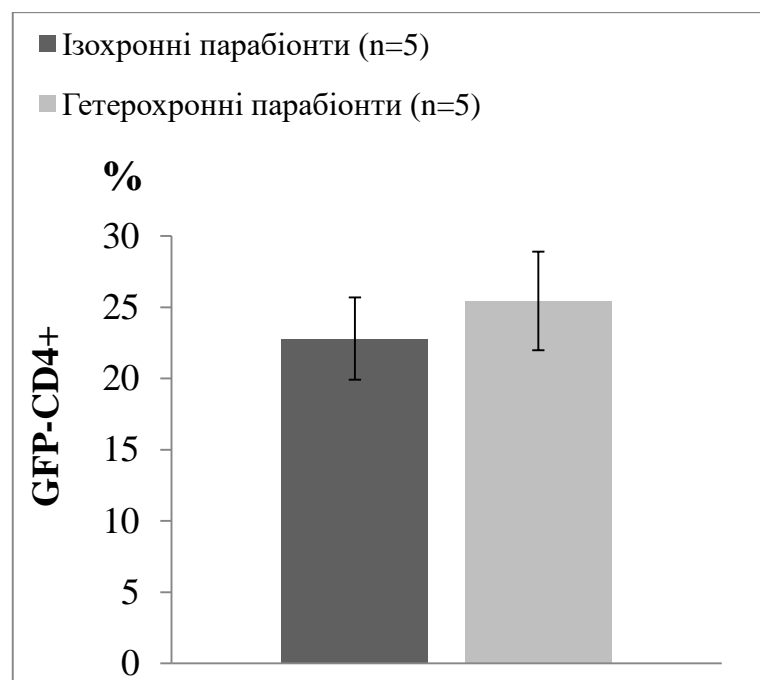


Рисунок 4.4. Відсоток GFP-негативних Т-лімфоцитів старих тварин у лімфовузлах молодих парабіонтів вихідної лінії.

Натомість, частка GFP⁺CD4⁺ Т-лімфоцитів, що мігрували у лімфовузли молодих гетерохронних парабіонтів вихідної лінії порівняно з молодими ізохронними парабіонтами, була зниженою майже вдвічі (рис.4.5). З літератури відоме зниження з віком міграції Т-лімфоцитів в організовані лімфоїдні утвори слизових оболонок, такі як Пейєрові бляшки тощо [224,225]. Результати наших досліджень є свідченням того, що феномен зниження міграції Т-лімфоцитів з віком стосується й інших вторинних лімфоїдних органів, принаймні у мишей.

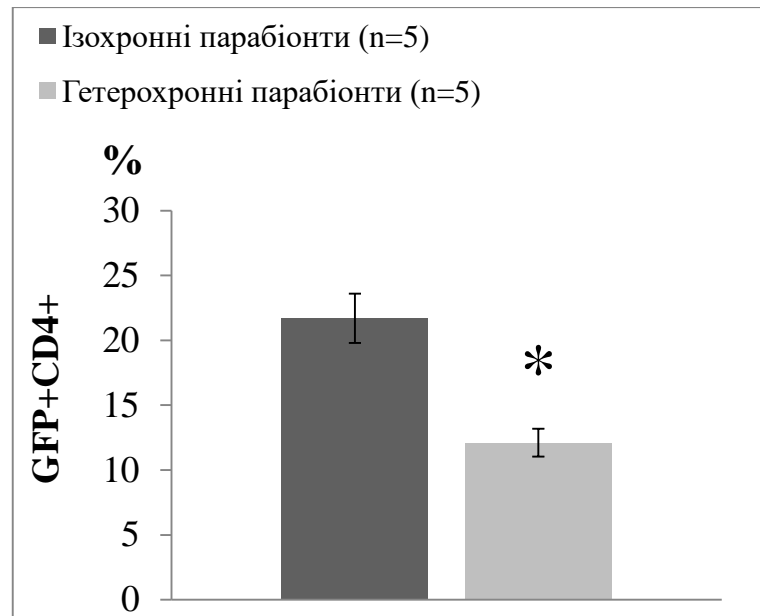


Рисунок 4.5. Відсоток GFP-позитивних Т-лімфоцитів у лімфовузлах парабіонтих вихідної лінії.

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

В літературі присутні дані щодо зміни популяційного складу Т-лімфоцитів з віком [61]. Порушення кількісного співвідношення Т-лімфоцитів різних популяцій є однією з причин розвитку вікової патології, зумовленої зниженням адаптивної імунної реактивності організму. Особливе значення для ініціювання і контролю адаптивних імунних реакцій мають регуляторні Т-клітини. Показано, що вони є важливими для підтримки імунологічної толерантності та контролю аутоімунних реакцій [226]. Підвищена, порівняно з фізіологічною нормою, кількість цих клітин асоціюється з послабленням захисних реакцій клітинного адаптивного імунітету, котрі супроводжують розвиток онкологічної патології, тяжкий перебіг та хронізацію вірусних інфекційних захворювань [227]. З огляду на вище зазначене ми вважали за доцільне дослідити кількісні характеристики цих клітин у лімфовузлах молодих парабіотичних партнерів за умов міграції у ці організовані лімфоїдні утвори мононуклеарних фагоцитів старих тварин. Ключовим фенотиповим маркером, який використовується для характеристики цих клітин, є транскрипційний фактор FoxP3 (англ. forkhead box P3) [226]. Крім того, в комплексі з ним також використовуються такі маркери як CD25 та CD44 [228].

Як видно з рисунку 4.6, у молодих партнерів гетерохронних парабіотичних пар, лімфовузли яких характеризувалися підвищеною кількістю макрофагів трансгенних старих тварин, спостерігалось підвищення відсотку GFP-CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺- та GFP-CD4⁺CD44⁺FoxP3⁺-позитивних Т-лімфоцитів у 2,6 та 2,8 раза, відповідно, порівняно з молодими ізохронними парабіонтами. Відомо, що експресія фенотипового маркера CD44 регуляторними Т-лімфоцитами позитивно корелює з їхньою імуносупресивною активністю [228]. Отримані дані свідчать про те, що міграція у лімфовузли молодої тварини макрофагів старої супроводжується зміною фенотипового профілю Т-клітин її лімфовузлів, імовірно, спричиненою дією цитокінів та інших біологічно активних медіаторів макрофагів старого організму. Це узгоджується з даними різних наукових груп, які продемонстрували накопичення регуляторних Т-лімфоцитів у крові людей та вторинних лімфоїдних органах старих C57Bl/6 та Balb/c мишей [229,230]. Ці зміни можуть викликати подальше порушення протипухлинного та антиінфекційного адаптивного імунного захисту організму [81].

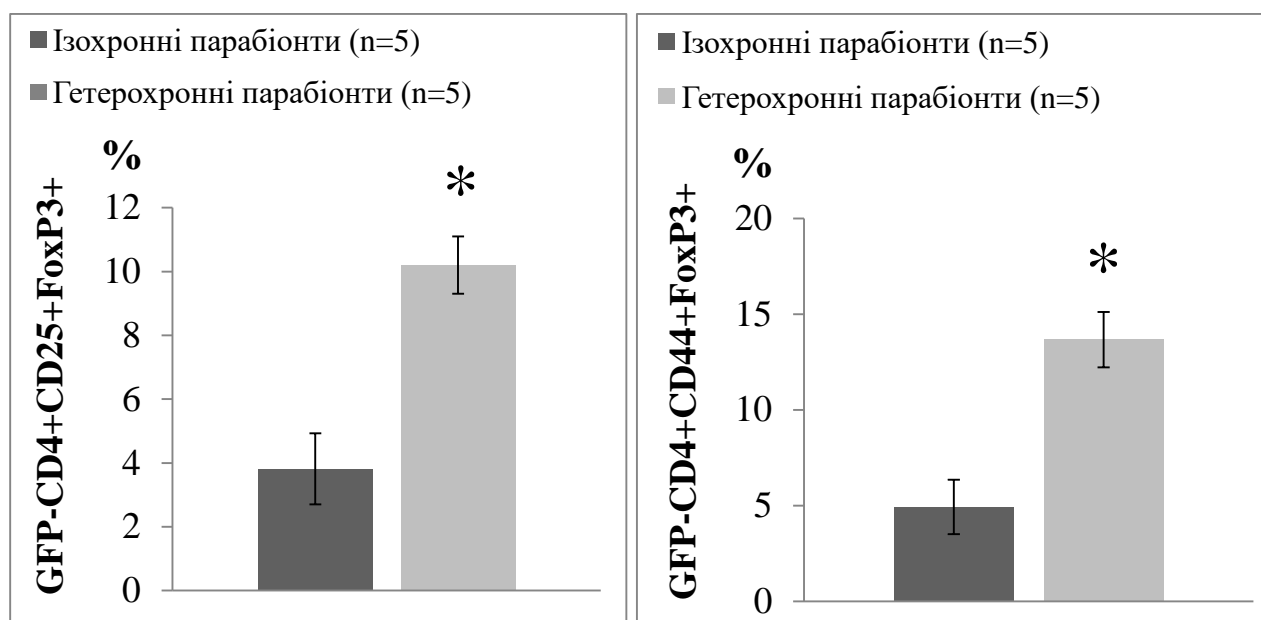


Рисунок 4.6. Відсоток GFP-негативних Т-лімфоцитів з фенотипом регуляторних клітин у лімфовузлах парабіонтів вихідної лінії.

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

Крім того, ми виявили тенденцію до зростання відсотку Т-лімфоцитів з фенотипом регуляторних клітин, що мігрували у лімфовузли гетерохронних парабіонтів вихідної лінії, порівняно з ізохронними парабіонтами (рис.4.7). Посилення міграції Т-лімфоцитів старих тварин, міграторна активність яких знижена, у лімфовузли молодих партнерів по парабіозу може бути спричинена підвищеним синтезом Т-клітинних хемокінів клітинами-організаторами вторинних лімфоїдних органів, у число яких входять і макрофаги [231]. Зважаючи на те, що міграція регуляторних Т-клітин вимагає експресії цитокінів, відмінних від таких, що забезпечують хомінг ефektorних Т-клітин [232] не виключено, що присутність макрофагів старого організму у лімфовузлах молодих партнерів по парабіозу сприяє селективному рекрутингу саме регуляторних Т-лімфоцитів.

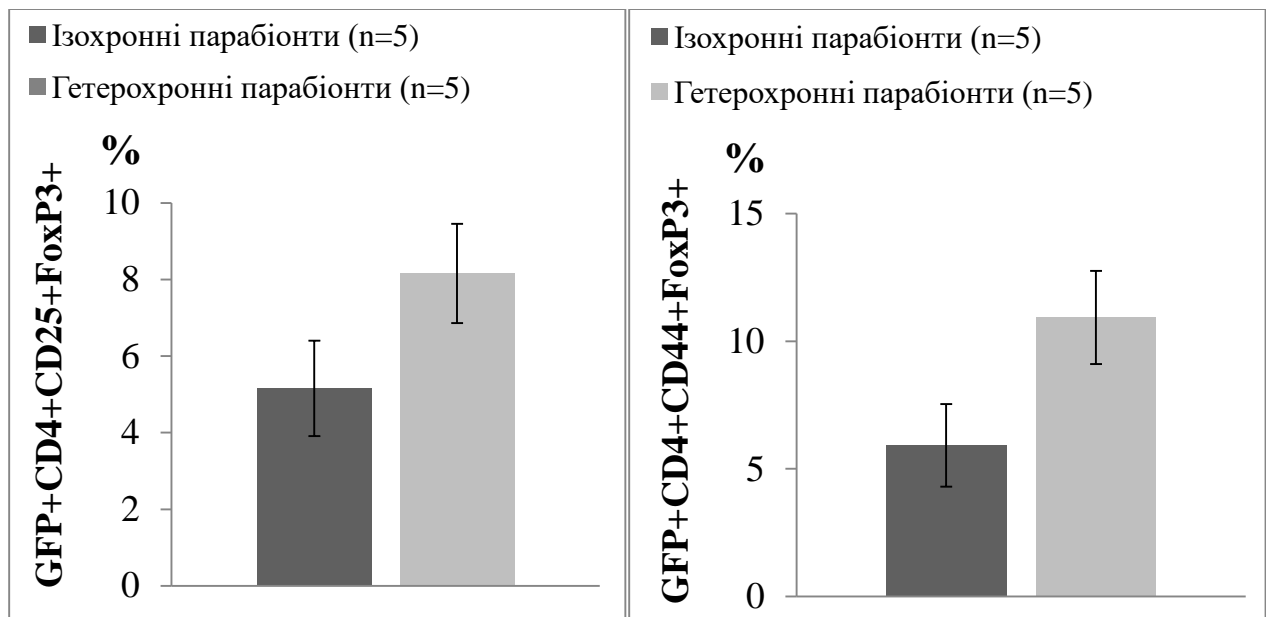


Рисунок 4.7. Відсоток GFP-позитивних Т-лімфоцитів з фенотипом регуляторних клітин у лімфовузлах парабіонтів вихідної лінії.

Таким чином, ми виявили зростання міграції макрофагів старих мишей у лімфовузли старих тварин з віком, що супроводжувалося збільшенням відсотку

T-лімфоцитів з фенотипом регуляторних клітин, причому як тих, що належали молодому організму, так і тих, що мігрували від старого.

4.2. Фенотиповий профіль макрофагів старих мишей та T-клітин молодих тварин у селезінках молодих партнерів по гетерохронному парабіозу

Селезінка є вторинним лімфоїдним органом, який складається з червоної та білої пульпи. Біла пульпа по своїй структурі нагадує будову лімфовузлів, і, відповідно, також виконує функцію контакту різних популяцій лейкоцитів. Однак, як уже зазначалося раніше, селезінка відповідає за моніторинг та імунну відповідь на антигени, які потрапляють в кров, забезпечуючи захист організму на системному рівні.

Нами виявлено достовірне підвищення відсотку макрофагів, що мігрували у селезінку молодих гетерохронних парабіонтів вихідної лінії від старих трансгенних тварин (табл.4.1), що збігається з даними, отриманими нами при дослідженні лімфовузлів (рис.4.2).

Таблиця 4.1

Відсоток GFP-позитивних макрофагів у селезінках молодих парабіонтів вихідної лінії

Популяція клітин	Відсоток клітин (M±m)	
	Ізохронні парабіонти (n=5)	Гетерохронні парабіонти (n=5)
GFP+CD11b+	15,46±0,83	22,3±0,64*
GFP+CD11b+iNOS+	92,85±1,73	72,25±11,55
GFP+CD11b+CD206+	7,37±0,88	2,4±0,46*

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

У популяції мононуклеарних фагоцитів старих тварин, що мігрували у селезінку молодого партнера по парабіозу, спостерігалася недостовірною тенденція до зниження відсотку iNOS- та статистично вірогідне зниження частки CD206-позитивних клітин ($p < 0,05$) (табл.4.1). Результати порівняльного дослідження функціонального профілю макрофагів різного походження і локалізації у мишей різних вікових груп, представлені у розділі 3, показали, що макрофаги моноцитарного походження характеризуються прозапальним метаболічним зсувом. Макрофаги селезінки, значна частина яких також має моноцитарне походження, також характеризуються прозапальним метаболічним зсувом. Імовірно саме завдяки цим двом феноменам диференціювання моноцитів, що мігрували від старого парабіотичного партнера, у селезінці молоді тварини супроводжувалося прозапальним зсувом їхнього метаболізму.

За результатами наших досліджень не виявлено достовірних змін частки GFP-CD4⁺ Т-лімфоцитів у селезінках гетерохронних парабіонтів вихідної лінії порівняно з ізохронними (табл.4.2).

Таблиця 4.2

Відсоток GFP-негативних Т-лімфоцитів з фенотипом регуляторних клітин у селезінках молодих парабіонтів вихідної лінії

Популяція клітин	Відсоток клітин (M±m)	
	Ізохронні парабіонти (n=5)	Гетерохронні парабіонти (n=5)
GFP-CD4 ⁺	15,33±2,91	15,75±3,14
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.

Як і у випадку лімфовузлів, ми виявили зниження відсотку GFP-позитивних Т-лімфоцитів, що мігрували у селезінку гетерохронних молодих парабіонтів вихідної лінії від старих трансгенних партнерів ($p < 0,05$) (табл.4.3). Це відображає зниження міграторної здатності Т-лімфоцитів з віком, незалежно від місця їх хомінгу у вторинних лімфоїдних органах.

Нами зареєстровано зниження відсотку Т-лімфоцитів з фенотипом регуляторних клітин у селезінках молодих гетерохронних парабіонтів вихідної лінії порівняно з ізохронними ($p < 0,05$) (табл.4.2).

Таблиця 4.3

Відсоток GFP-позитивних Т-лімфоцитів з фенотипом регуляторних клітин у селезінках молодих парабіонтів вихідної лінії

Популяція клітин	Відсоток клітин (M±m)	
	Ізохронні парабіонти (n=5)	Гетерохронні парабіонти (n=5)
GFP+CD4+	16,05±1,37	9,6±0,93*
GFP+CD4+CD25+FоxP3+	21,6±1,74	11,4±1,45*
GFP+CD4+CD44+FоxP3+	26,46±1,73	13,2±1,05*

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

Pishel et al., 2012 також продемонстрували відсутність змін частки CD4⁺CD25⁺FоxP3⁺ регуляторних Т-лімфоцитів у селезінці гетерохронних парабіонтів навіть після 12 тижнів парабіозу [233]. Відомо, що існує 2 популяції регуляторних Т-лімфоцитів: природні, які утворюються в тимусі, та індукцйбельні, які утворюються на периферії з наївних FоxP3-негативних Т-лімфоцитів. Більше того, виявлено, що з віком відбувається накопичення саме природних регуляторних Т-лімфоцитів, в той час як кількість індукцйбельних регуляторних Т-клітин знижується [81]. Отримані нами дані можуть свідчити про те, що при старінні спочатку знижується кількість індукцйбельних

регуляторних Т-лімфоцитів, що узгоджується з нашими результатами (табл.4.2), а потім відбувається накопичення природних регуляторних Т-клітин. Зниження кількості регуляторних Т-лімфоцитів при старінні може сприяти розвитку системних запальних процесів при старінні, що узгоджується з теорією інфламейджингу. Разом з тим, враховуючи одночасне накопичення регуляторних Т-лімфоцитів і наявність хронічного запалення при старінні, необхідні подальші дослідження порушень цієї популяції Т-клітин.

Також спостерігалось достовірне зниження відсотку Т-лімфоцитів з фенотипом регуляторних клітин, які мігрували у селезінку гетерохронних парабіонтів вихідної лінії від старих тварин ($p < 0,05$) (табл.4.3). Причиною цього явища може бути відмінний склад цитокінів і хемокінів, продукований макрофагами про- та протизапального метаболічного профілю [223]. У випадку відсутності прозапального зсуву метаболізму аргініну у макрофагів у складі тканинної ніші вторинного лімфоїдного органу, як це спостерігалось у лімфовузлах молодих гетерохронних парабіонтів, ми спостерігали посилення хомінгу регуляторних Т-клітин. Виразний прозапальний зсув метаболізму аргініну і зниження експресії маркера альтернативної поляризації фагоцитів у макрофагів селезінки вказують на їх прозапальну функціональну поляризацію. Відомо, що зміна функціональної поляризації фагоцитів супроводжується і зміною профілю продукованих ними хемокінів. Імовірно, саме відсутність синтезу хемокінів, відповідальних за рекрутинг регуляторних Т-клітин стала причиною зниження їх міграції у селезінку молодих гетерохронних парабіонтів.

Таким чином, на моделі гетерохронного прабіозу показано посилення міграції макрофагів старих тварин у вторинні лімфоїдні органи у порівнянні з клітинами молодих тварин. Хомінг мононуклеарних фагоцитів старого організму у вторинних лімфоїдних органах молоді тварини по-різному позначався на їх фенотипі, залежно від локалізації. Оселення у лімфовузлах не викликало змін фенотипового профілю фагоцитів старої тварини. У той час як хомінг у селезінці супроводжувався формуванням прозапального профілю цих клітин. Міграція мононуклеарних фагоцитів старих тварин у вторинні

лімфоїдні органи молодих мишей супроводжувалася змінами частки регуляторних Т-клітин. Однак, характер зміни кількісних показників регуляторних Т-клітин відрізнявся для вторинних лімфоїдних органів, відповідальних за генерацію адаптивної імунної відповіді на антигени тканин (лімфовузли) і для селезінки, відповідальної за ініціювання адаптивної імунної відповіді на антигени, присутні у циркуляторному руслі. У випадку лімфовузлів, трансгенні фагоцити яких не змінювали достовірно функціональний профіль, зареєстровано збільшення частки регуляторних Т-клітин. У випадку селезінки, трансгенні фагоцити якої зареєструвалися прозапальним функціональним профілем, зареєстровано зниження частки регуляторних Т-клітин.

4.3. Висновок до розділу 4

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.

РОЗДІЛ 5

ВПЛИВ МУЛЬТИПОТЕНТНИХ МЕЗЕНХІМНИХ СТРОМАЛЬНИХ КЛІТИН ТИМУСУ НА МЕТАБОЛІЧНИЙ ПРОФІЛЬ ТКАНИННИХ МАКРОФАГІВ ТА МАКРОФАГІВ МОНОЦИТАРНОГО ПОХОДЖЕННЯ, ОТРИМАНИХ ВІД МИШЕЙ РІЗНОГО ВІКУ

Результати, отримані нами на попередніх етапах роботи, вказують на те, що з віком відбувається порушення функціонального стану макрофагів, яке асоціюється зі змінами фенотипу Т-лімфоцитів у складі тканинної ніші вторинних лімфоїдних органів. Зростаюча кількість літературних даних переконливо свідчить на користь того, що макрофаги можуть розглядатися як перспективна мішень для корекції порушень імунної системи при старінні та для профілактики і лікування вікових захворювань, в основі патогенезу яких лежить дисфункція цих клітин [113].

Як зазначено вище, велику групу патологічних станів, пов'язаних з віком складають запальні захворювання, в основі патогенезу яких лежить феномен інфламейджингу [108]. Профілактика і лікування цих патологічних станів нерозривно пов'язані з гальмуванням запалення. Зважаючи на те, що мононуклеарні фагоцити є одними основних ефektorних клітин як асептичних, так і інфекційних запальних процесів, корекція запальної метаболічної поляризації цих клітин розглядається як перспективний методичний підхід профілактики і лікування вікової патології. Одним з найбільш сучасних методів протизапальної регенеративної терапії є застосування мультипотентних мезенхімних стромальних клітин. Використання цього методичного підходу демонструє значні успіхи у лікуванні серцево-судинної патології, аутоімунних захворювань та нейродегенеративних хвороб [147,159]. Зростає кількість

публікацій стосовно співкультивування макрофагів та ММСК. Показано, що при цьому макрофаги набувають протизапального поляризаційного статусу, що може бути корисним для лікування вікових захворювань, зумовлених хронічним запальним процесом. Разом з тим, віковий аспект використання цього типу клітинної терапії, а також вплив ММСК на макрофаги різного онтогенетичного походження досліджені недостатньо. Зважаючи на вище зазначене завданням цієї частини роботи був порівняльний аналіз впливу сингенних тММСК молодих тварин на макрофаги моноцитарного (диференційовані з попередників з кісткового мозку) та ембріонального (перитонеальні макрофаги) походження. Вибір клітин тимусного походження був обумовлений необхідністю отримання популяції клітин, максимально збагаченої ММСК. При цьому отримувані в культурі ММСК кісткового мозку мишей зазвичай контаміновані резидентними кістковомозковими макрофагами [234].

5.1. Модуляція фенотипово-функціонального профілю макрофагів моноцитарного походження, отриманих від старих мишей, при співкультивуванні з мультипотентними мезенхімними стромальними клітинами тимусу молодих тварин

Згідно результатів попереднього етапу дослідження, макрофаги моноцитарного походження старих мишей характеризувалися прозапальним зсувом метаболізму у порівнянні з їх аналогами, отриманими від молодих тварин. Це може бути однією з причин формування хронічного системного запального процесу, який спостерігається при старінні і складає основу багатьох вікових захворювань запальної етіології. Для реалізації поставленого завдання ми обрали контактний спосіб співкультивування фагоцитів з тММСК. Згідно літературних даних реалізація імуномодуляторної дії ММСК в умовах *in vitro* відбувається впродовж 7 діб [235]. Для диференціювання моноцитів

кісткового мозку в макрофаги в культуру клітин додавався ростовий фактор макрофагів М-КСФ. Оцінювали 4 популяції клітин: макрофаги молодих та старих мишей (контроль), а також клітини молодих та старих тварин, що співкультивувалися з тММСК (дослід). Для оцінки впливу тММСК на функціональний профіль фагоцитів аналізували спрямованість метаболізму аргініну, оксидативний метаболізм, фагоцитарну активність та експресію фенотипових маркерів CD11b та CD206 досліджуваними клітинами.

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.5.1) [184]. Це узгоджується 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* [236]. Тому така сильна тММСК-опосередкована стимуляція аргіназної активності може мати позитивний клінічний ефект в контексті хронічного запалення, асоційованого з віком.

Нами не було виявлено статистично значимої різниці у продукції оксиду азоту макрофагами моноцитарного походження, що співкультивувалися з сингенними тММСК, незалежно від віку тварин-донорів моноцитів (табл.5.1) [184]. Відомо, що аргіназний та NO-синтазний метаболічні шляхи здатні інгібувати один одного за рахунок метаболітів, що утворюються в результаті розпаду аргініну [237]. Тому відсутність змін продукції нітритів може пояснюватися потужною активацією аргінази.

Таблиця 5.1.

Аргіназна активність та продукція оксиду азоту макрофагами моноцитарного походження, отриманими від мишей різного віку, після співкультивування з сингенними мультипотентними мезенхімними стромальними клітинами тимусу *in vitro*.

Показники	Варіанти дослідів			
	Макрофаги молодих мишей (n=4)	Макрофаги молодих мишей+тММСК (n=4)	Макрофаги старих мишей (n=4)	Макрофаги, старих мишей+тММСК (n=4)
Аргіназна активність, одиниць/10 ⁵ клітин (M±m)	0,059±0,005	4,65±0,17**	0,036±0,003*	4,74±0,26 [#]
Продукція оксиду азоту, мкмоль NO/10 ⁶ клітин (M±m)	25,56±3,84	25±5,36	26,67±4,36	27,78±7,35

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

Співкультивування з тММСК викликало також статистично вірогідні зміни оксидативного метаболізму макрофагів моноцитарного походження. Спостерігалася тенденція до підвищення відсотку кістковомозкових макрофагів, що продукували РФК, незалежно від віку тварин (рис.5.1).

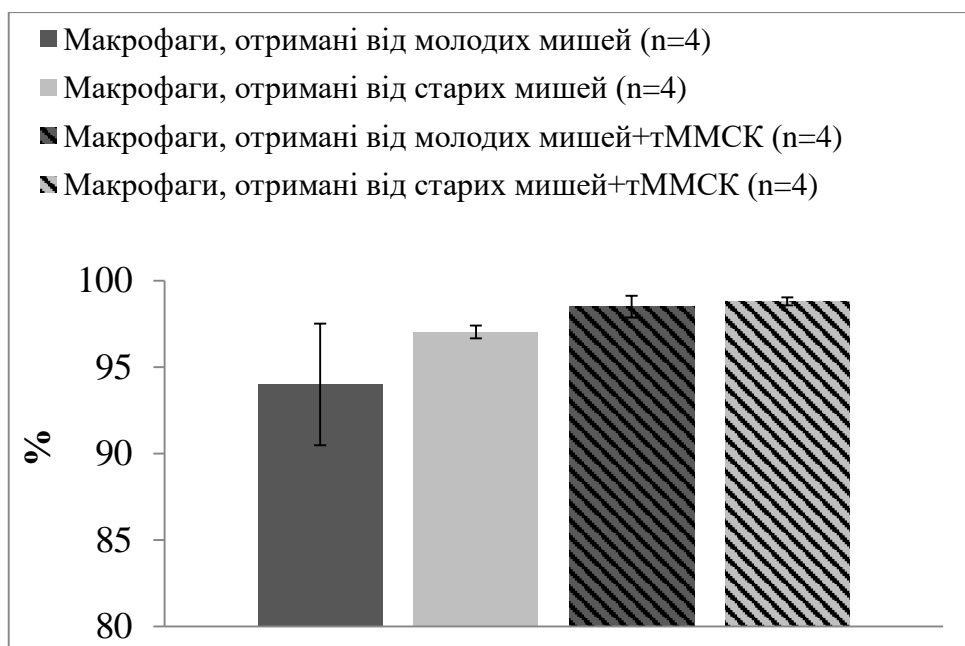


Рисунок 5.1. Відносна кількість макрофагів моноцитарного походження, отриманих від мишей різного віку, що продукували реактивні форми кисню після співкультивування з сингенними тММСК *in vitro*.

Ми виявили зростання інтенсивності продукції РФК кістковомозковими макрофагами молодих мишей, що співкультивувалися з тММСК, у 3,5 рази порівняно з контрольними клітинами ($p < 0,05$). Це узгоджується з даними Vasandan et al (2016), котрі виявили підвищення продукції РФК макрофагами, диференційованими з моноцитів периферичної крові людини, при співкультивуванні з ММСК кісткового мозку [238]. Ці дані вказують на здатність ММСК одночасно з протизапальною поляризацією метаболізму також потенціювати протимікробну активність макрофагів. Разом з тим, не спостерігалось подібного ефекту тММСК на макрофаги моноцитарного походження, отримані від старих тварин (рис.5.2). Це, ймовірно, пов'язано з підвищеним базальним рівнем продукції РФК досліджуваними клітинами старих мишей порівняно з молодими.

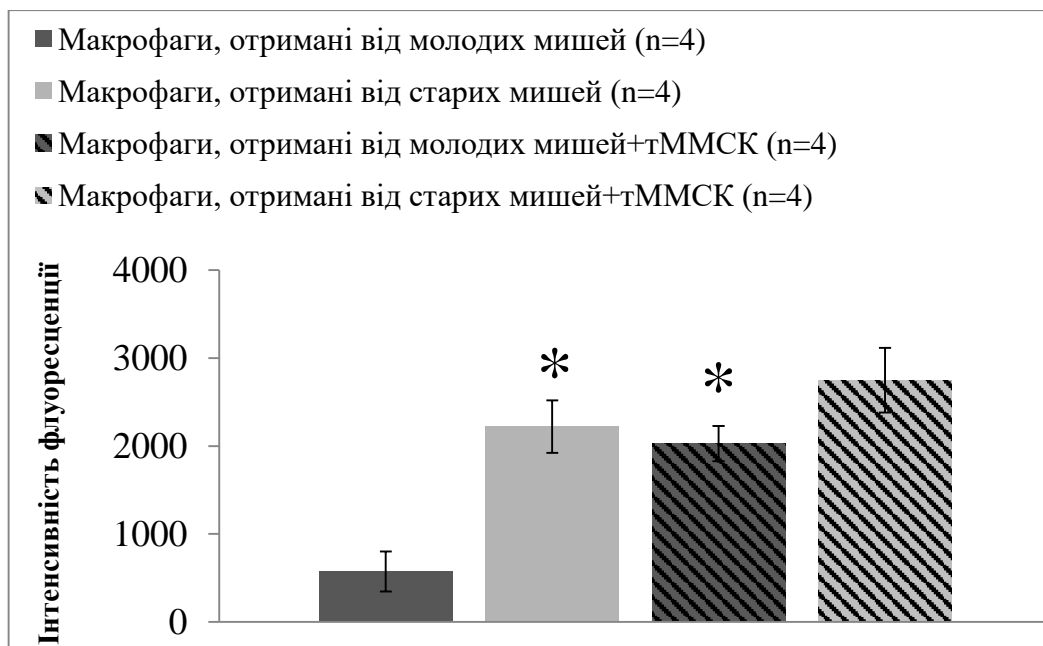


Рисунок 5.2. Інтенсивність продукції реактивних форм кисню макрофагами моноцитарного походження, отриманими від мишей різного віку, після співкультивування з сингенними тММСК *in vitro*.

Примітка: * - $p < 0,05$ порівняно з контрольними макрофагами молодих тварин.

Фагоцитарна активність – один з ключових елементів функціонування макрофагів – найменшою мірою зазнавала змін після співкультивування з тММСК. Кількість фагоцитуючих клітин, отриманих як від молодих, так і від старих тварин залишалася після співкультивування на рівні контрольних значень. Фагоцитарний індекс клітин молодих тварин незначно зростав після співкультивування (табл.5.2). Однак відмінності між показниками контрольних і дослідних проб були статистично невірними. ФІ клітин старих тварин залишався після впливу сингенних тММСК на рівні значень необроблених клітин Отримані нами дані узгоджуються з результатами вищезгаданої роботи Vasandan et al (2016), які також не виявили впливу ММСК на фагоцитарну активність макрофагів моноцитарного походження [238].

Таблиця 5.2.

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

Показники	Варіанти дослідів			
	Макрофаги молодих мишей (n=4)	Макрофаги молодих мишей+тММСК (n=4)	Макрофаги старих мишей (n=4)	Макрофаги, старих мишей+тММСК (n=4)
Фагоцитарне число (M±m)	84,58±4,98	81,65±7,81	87,35±2,31	86,05±4,28
Фагоцитарний індекс (M±m)	43740±5160	47030±5025	67040±9655	37493±570

Співкультивування з сингенними тММСК не викликало статистично вірогідних змін експресії досліджуваних фенотипових маркерів у пулі макрофагів моноцитарного походження. Зокрема, неспостерігалось вірогідних змін експресії фенотипового маркера CD11b у пробах макрофагів, отриманих від молодих мишей мишей (рис.5.3). Спостерігалась лише недостовірною тенденція до підвищення цього показника у групі співкультивування макрофагів старих тварин. Це узгоджується з відсутністю змін фагоцитарної активності кістковомозкових макрофагів мишей різного віку при співкультивуванні з тММСК (табл.5.2).

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.5.4).

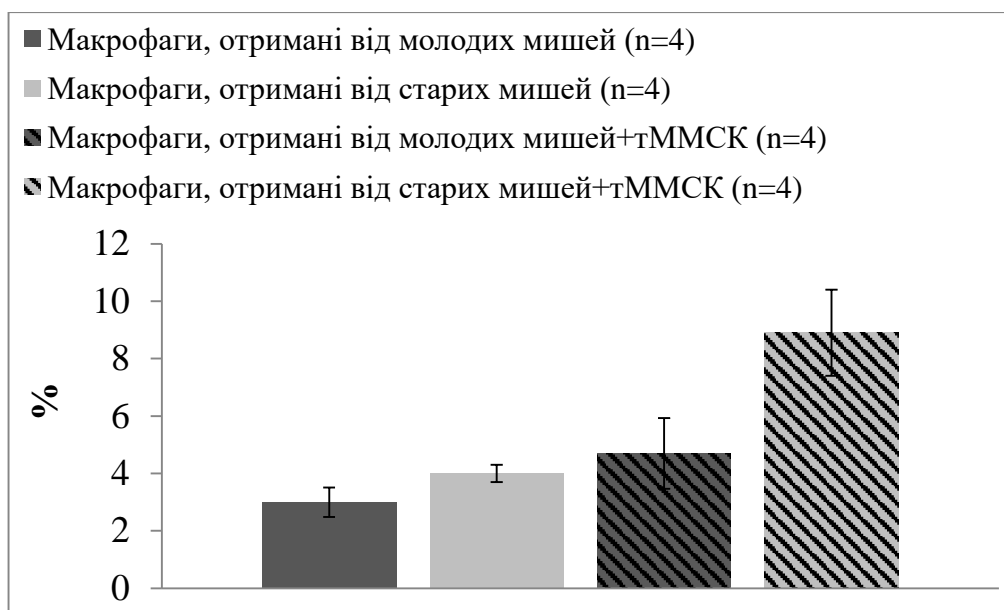


Рисунок 5.3. Відсоток макрофагів моноцитарного походження, отриманих від мишей різного віку, що експресували CD11b після співкультивування з сингенними тММСК *in vitro*.

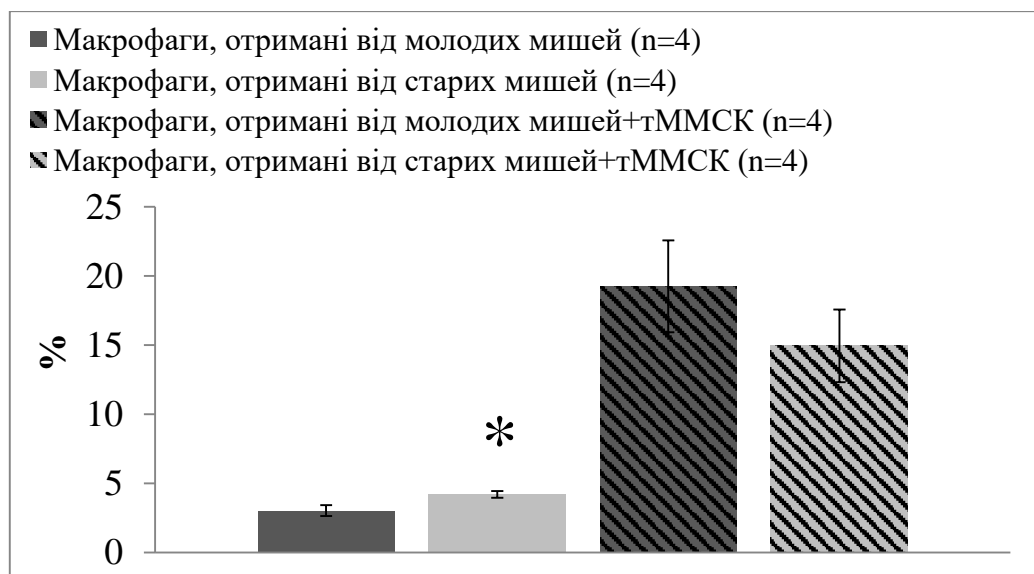


Рисунок 5.4. Відсоток макрофагів моноцитарного походження, отриманих від мишей різного віку, що експресували CD206 після співкультивування з сингенними тММСК.

Примітка: * - $p < 0,05$ порівняно з контрольними макрофагами молодих тварин.

Аналогічні результати були отримані Kim et al. у 2009 р. у дослідження з використанням макрофагів, диференційованих з периферичної крові, та ММСК

кісткового мозку здорових донорів. Автори продемонстрували підвищення експресії CD206 та IL-10, а також зниження експресії IL-12 та ФНП- α [239]. 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.

Отже, контактне співкультивування тММСК з макрофагами моноцитарного походження викликало протизапальну функціональну поляризацію цих клітин. Однак, характер впливу тММСК на фагоцити мишей різного віку дещо відрізнявся. Як у молодих, так і у старих тварин співкультивування з тММСК спричиняло різкий зсув метаболізму аргініну у бік посилення аргіназної активності, більш виразний у випадку старих тварин, що імовірно, зумовлювалося значно зниженим базальним рівнем цього показника. Зміна спрямованості метаболізму аргініну має важливе значення для гальмування запальних процесів. З огляду на більш виразний модулювальний ефект на цю функцію фагоцитів у старих тварин можна припустити більш високу ефективність застосування клітинної терапії з використанням тММСК для профілактики і лікування запальної патології у осіб похилого віку. На додачу до посилення аргіназної активності, співкультивування з тММСК спричиняло посилення оксидативного метаболізму макрофагів моноцитарного походження. Оксидативний метаболізм фагоцитів – ефекторний механізм киснезалежного антимікробного захисту і важливий компонент участі цих клітин у репаративних процесах [240]. Більш виразний вплив на це метаболічні процеси ми зареєстрували у молодих тварин. Це дозволяє припустити більшу ефективність застосування клітинної терапії з використанням тММСК в регенеративній медицині у осіб молодого віку. Додатково на користь цього припущення свідчить здатність тММСК посилювати фагоцитарну активність макрофагів молодих тварин і відсутність цього ефекту по відношенню до клітин старих тварин.

5.2. Зміни метаболізму аргініну перитонеальних макрофагів, отриманих від старих мишей, при співкультивуванні з мультипотентними мезенхімними стромальними клітинами тимусу молодих тварин

На попередньому етапі досліджень ми продемонстрували, що тканинні макрофаги, зокрема і перитонеальні, з віком набувають протизапального метаболічного статусу. Зважаючи на те, що перитонеальні макрофаги репрезентують популяцію резидентних фагоцитів тканин, протизапальний зсув їх метаболізму може зумовлювати погіршення імунної резистентності організму і, відповідно, підвищення частоти інфекційних захворювань при старінні. Тому, наступним завданням було перевірити здатність мультипотентних мезенхімних стромальних клітин, отриманих від молодих тварин, модулювати метаболічну поляризацію перитонеальних макрофагів старих мишей.

Нами виявлено підвищення аргіназої активності перитонеальних макрофагів молодих та старих мишей у 6,5 ($p < 0,001$) та 8 разів ($p < 0,05$), відповідно, при співкультивуванні з тММСК (рис.5.5) [188]. Ці дані узгоджуються з результатами досліджень іншої наукової групи, яка також виявила протизапальну активацію перитонеальних макрофагів мишей лінії C57Bl при співкультивуванні з людськими ММСК жирової тканини [241].

При співкультивуванні з сингенними тММСК спостерігалось підвищення продукції нітритів перитонеальними макрофагами, отриманими від молодих та старих тварин, в 1,7 ($p < 0,05$) та 2 рази ($p < 0,01$), відповідно (рис.5.6) [188]. Крім цитотоксичних властивостей, оксид азоту також відіграє важливу роль у регуляції розвитку, диференціювання та функціонування Т-лімфоцитів. Показано, що низькі рівні NO у мікрооточенні цих клітин стимулюють їх диференціювання та виживання, в той час як високі рівні пригнічують їхню проліферативну активність [242]. Тому, можна припустити, що стимуляція продукції оксиду азоту може бути одним із механізмів імуносупресивного впливу тММСК.

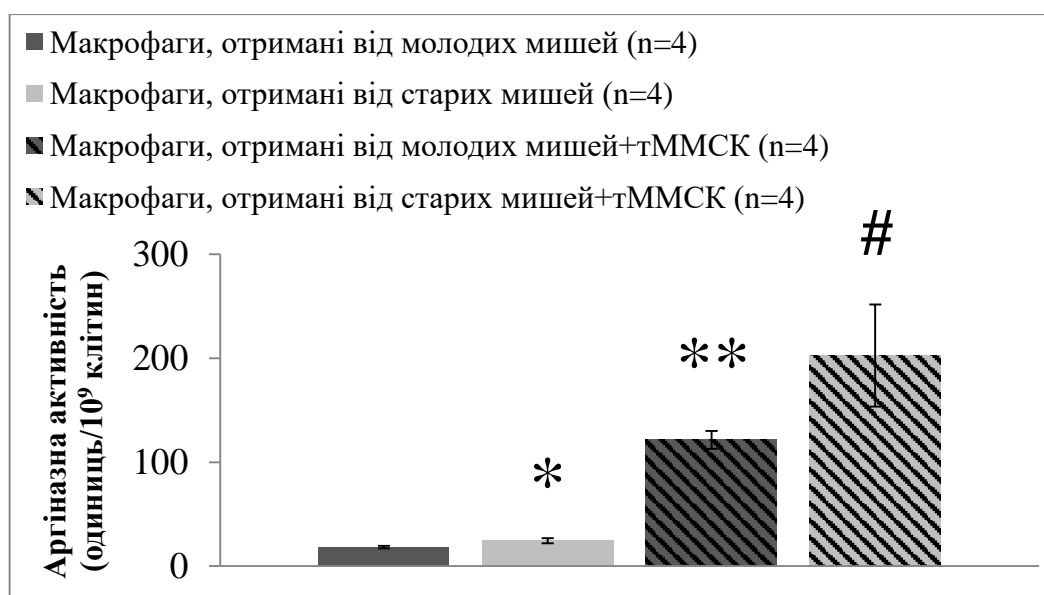


Рисунок 5.5. Аргіназна активність перитонеальних макрофагів, отриманих від мишей різного віку, після співкультивування з сингенними тММСК *in vitro*.

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

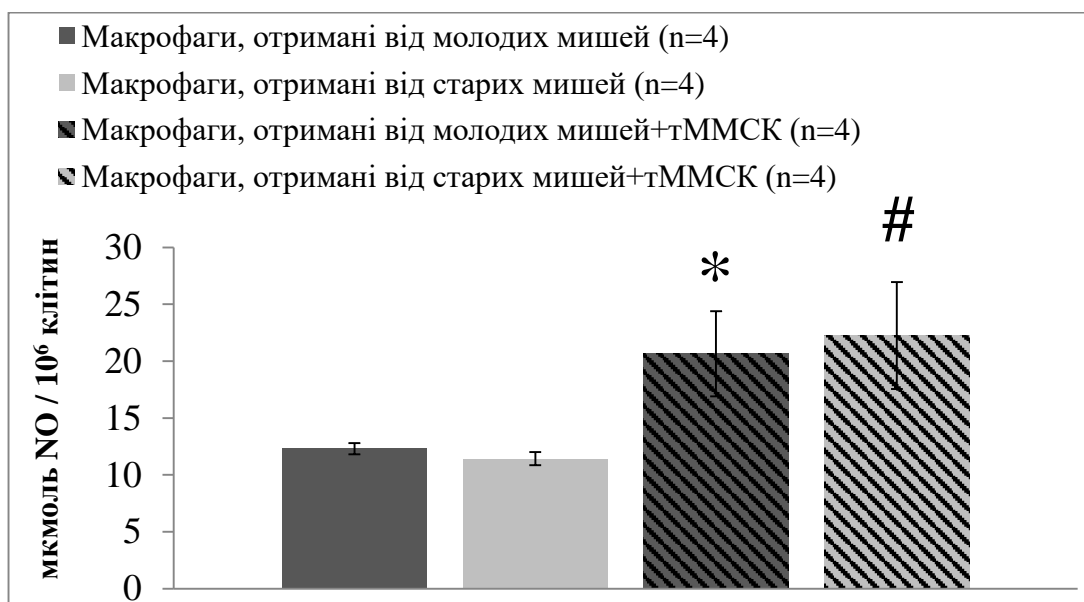


Рисунок 5.6. Продукція оксиду азоту перитонеальними макрофагами, отриманими від мишей різного віку, після співкультивування з сингенними тММСК *in vitro*.

Примітка: * - $p < 0,05$ порівняно з контрольними макрофагами молодих мишей, # - $p < 0,01$ порівняно з контрольними макрофагами старих тварин.

Показано, що співкультивування з ММСК кісткового мозку здатне підвищувати продукцію оксиду азоту макрофагами, диференційованими з моноцитів периферичної крові людини, інфікованими *Salmonella enterica* [238]. Підвищення продукції NO перитонеальними макрофагами після співкультивування з тММСК може бути свідченням їх здатності стимулювати протимікробну активність резидентних тканинних фагоцитів ембріонального походження.

Таким чином, контактний вплив тММСК на моноклеарні фагоцити різного походження має наслідком зсув метаболізму аргініну у бік посилення активності аргінази, що свідчить про протизапальний характер імуномодулювальної дії цього клітинного препарату. Більш виразний модулювальний 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.

Слід також відмітити, що контактна взаємодія макрофагів ембріонального походження, котрі є клітинами-вартовими практично всіх тканин, з тММСК спричиняла помірне посилення синтезу реактивних форм азоту. Це вказує на здатність тММСК чинити супресивний вплив на розвиток реакцій адаптивного імунітету одночасно зі здатністю посилювати цитотоксичну активність фагоцитів ембріонального походження. Безперечний інтерес представляє дослідження характеру хомінгу ММСК при системному введенні як у здоровому організмі, так і в організмі з системним і локальним тканинним запальними процесами, що дозволить охарактеризувати вплив тканинного мікрооточення на реалізацію імуномодуляторного потенціалу цього клітинного препарату.

5.3. Висновки до розділу 5

1. 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.
2. 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.

ОБГОВОРЕННЯ РЕЗУЛЬТАТІВ

Макрофаги відіграють важливу роль у забезпеченні імунної резистентності і контролі імунної реактивності організму [5]. Вони населяють усі тканини 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 [6]. Дослідження останніх років спростували концепцію походження усіх фагоцитів організму з моноцитів крові [243]. Було показано, що більшість тканинних макрофагів походять з ембріональних попередників, є довгоживучими клітинами, і здатні проліферувати, підтримуючи свою кількість на сталому рівні. Відомо, що з віком порушується функціонування фагоцитів, однак ці зміни є недостатньо вивченими [92,98].

Численними дослідженнями продемонстровано наявність функціональних порушень Т-лімфоцитів при старінні [9]. Однією з причин розвитку дисфункції цих клітин при старінні можуть бути вікові порушення клітинної ніші вторинних лімфоїдних органів, яка містить в тому числі й фагоцити. Вікові зміни імунної реактивності асоційовані також із явищем «інфламейджингу» – розвитком хронічного запального процесу, котрий вважають однією з основних причин серцево-судинних захворювань, метаболічного синдрому та інших вікових хвороб [108]. Відомо, що фагоцити відіграють ключову роль у розвитку цього процесу. Перспективним засобом для терапії цього феномену може бути застосування ММСК, які відомі своїми імуносупресорними властивостями, і здатні модулювати активаційний статус макрофагів, викликаючи протизапальний зсув їхнього метаболізму [244].

Враховуючи вищесказане, метою даної роботи було дослідження фенотипово-функціонального профілю фагоцитів та його корекції у мишей різних вікових груп.

В роботі проаналізовано вікові зміни функціонального профілю фагоцитів різного походження у мишей, а саме метаболізму аргініну, фагоцитарної активності та продукції РФК. Крім того, досліджувався вплив макрофагів на вікові зміни Т-лімфоцитів на моделі гетерохронного парабіозу. Також проаналізовано здатність тММСК молодих мишей модулювати метаболічний статус макрофагів різного походження старих тварин.

Відомо, що фагоцити різного походження та локалізації по різному змінюються при старінні [180]. Разом з тим, це питання є мало дослідженим. В якості макрофагів моноцитарного походження ми використовували макрофаги, диференційовані *in vitro* з моноцитів кісткового мозку в присутності М-КСФ, а також макрофаги селезінки мишей, імунізованих корпускулярним антигеном, оскільки такі макрофаги згідно даних літератури теж містять переважно клітини моноцитарного походження. Для аналізу макрофагів ембріонального походження використовувалися альвеолярні та перитонеальні макрофаги. Крім того, також досліджувалися нейтрофіли кісткового мозку та селезінки.

Макрофаги здатні регулювати Т-клітинну ланку імунітету, яка, як відомо, зазнає значних порушень при старінні [10,53]. Тому припускається, що вікові зміни макрофагів можуть лежати в основі розвитку порушень функціонування Т-лімфоцитів при старінні. Для дослідження впливу макрофагів старого організму на Т-лімфоцити молодих тварин нами було використано модель гетерохронного парабіозу. Ми хірургічно поєднували мишей ліній C57Bl/6 та B6.GFP. Це дозволило нам аналізувати GFP-мічені каріоцити старих B6.GFP тварин у вторинних лімфоїдних органах молодих C57Bl/6 мишей.

Зростаюча кількість літературних даних переконливо свідчить на користь того, що макрофаги можуть розглядатися як перспективна мішень для корекції порушень імунної системи при старінні та для профілактики і лікування вікових захворювань, в основі патогенезу яких лежить дисфункція цих клітин [92]. Для модуляції функціонального стану макрофагів ми обрали контактний спосіб співкультивування цих клітин з тММСК протягом 7 діб,

оскільки такий строк, згідно даних літератури, є необхідним для реалізації терапевтичного потенціалу цього клітинного препарату.

Макрофаги, що диференціюються з моноцитів, відіграють важливу роль у розвитку запалення. Інфекційний процес супроводжується міграцією моноцитів у тканини з їхнім подальшим диференціюванням на макрофаги та дендритні клітини [181]. Крім того, резидентні макрофаги деяких тканин організму є короткоживучими, і постійно диференціюються з моноцитів крові [182,183]. Однак більшість тканинних макрофагів мають ембріональне походження і в нормі не потребують трансміграції моноцитів з кісткового мозку в тканини для підтримання своєї кількості [185]. Відомо, що тканинні макрофаги різної локалізації мають значні відмінності транскриптому та метаболічного профілю [186]. Завданням першого етапу роботи було порівняльне дослідження функціонального профілю макрофагів моноцитарного та ембріонального походження, отриманих від мишей різного віку.

Нами встановлено що аргіназна активність макрофагів моноцитарного походження старих мишей була достовірно нижчою порівняно з макрофагами молодих тварин. Разом з тим, не виявлено статистично вірогідних відмінностей у продукції оксиду азоту клітинами, отриманими від мишей різного віку [184]. Це свідчить про те, що з віком спостерігається прозапальний зсув метаболізму аргініну у макрофагів моноцитарного походження у мишей.

Частка популяції макрофагів моноцитарного походження, що продукували РФК, не змінювалася у мишей з віком. Однак інтенсивність продукції РФК макрофагами старих мишей достовірна зростала порівняно з клітинами молодих тварин, що разом зі зниженою аргінасною активністю вказує на прозапальну поляризацію макрофагів моноцитарного походження старих мишей.

Ми не виявили вірогідних відмінностей у фагоцитарній активності макрофагів моноцитарного походження, отриманих від мишей різного віку, що підтверджує дані іншої дослідної групи про відсутність вікових порушень ефективності фагоцитозу кістковомозкових моноцитів та макрофагів [180].

Відсоток макрофагів, моноцитарного походження, що експресували фенотиповий маркер CD11b, не відрізнявся у тварин різного віку. Враховуючи роль цього білка в процесі фагоцитозу, це узгоджується з виявленою нами відсутністю порушень фагоцитарної функції цих клітин. Експресія фенотипового маркера альтернативної активації макрофагів CD206 достовірна зростала популяції кістковомозкових макрофагів старих мишей порівняно з клітинами молодих тварин. Gibon et al. також виявили зростання експресії поверхневих маркерів активації нестимульованими кістковомозковими макрофагами старих тварин. Автори пояснили ці спостереження наявністю преактивованого стану досліджуваної популяції фагоцитів старих тварин [20].

Перитонеальні макрофаги старих мишей, які, згідно даних літератури мають ембріональне походження [187], навпаки, характеризувалися достовірно вищою аргіназою активністю у порівнянні з відповідними клітинами молодих тварин [188]. Разом з тим, подібно до макрофагів моноцитарного походження, не виявлено змін продукції оксиду азоту перитонеальними макрофагами з віком. Ці дані співпадають з результатами досліджень інших авторів, які, однак, спостерігали протизапальну поляризацію цих клітин за рахунок зниження продукції оксиду азоту [189,190]. Наведені відмінності вірогідно обумовлені відмінною лінією тварин, використаною у наших дослідженнях.

Ми виявили достовірне зменшення інтенсивності продукції РФК перитонеальними макрофагами старих тварин порівняно з клітинами молодих мишей. Разом з тим, відсоток клітин, що продукували РФК, не змінювався з віком. Отримані нами результати узгоджуються з вищенаведеними даними стосовно підвищення аргіназної активності перитонеальних макрофагів старих мишей, і свідчить про їх протизапальну метаболічну поляризацію. Однак у літературі наявні протилежні дані стосовно вікових змін оксидативного метаболізму цієї популяції фагоцитів [191,192], що може пояснюватися використанням відмінних ліній мишей, а також застосуванням ірритантів, здатних посилювати міграцію фагоцитів моноцитарного походження у перитонеальну порожнину [193]. Також ми виявили достовірне зниження

фагоцитарного числа перитонеальних макрофагів, отриманих від старих тварин, що узгоджується з результатами інших авторів стосовно зниження фагоцитарної активності перитонеальних макрофагів мишей лінії C57Bl/6 з віком [180]. Показник фагоцитарного індексу у тварин різного віку був практично однаковим.

Згідно даних літератури альвеолярні макрофаги, так само як і перитонеальні, походять з ембріональних попередників [195]. Нами виявлено достовірно вищий рівень аргіназної активності та меншу продукцію нітритів альвеолярними макрофагами старих мишей порівняно з молодими тваринами [188]. Відсоток клітин, що продукували РФК, у альвеолярних макрофагів старих мишей був достовірно нижчим порівняно з молодими тваринами, в той час як відмінностей у рівні синтезу РФК клітинами мишей різного віку не було виявлено [196]. В літературі є дані стосовно зниження відсотку альвеолярних мононуклеарних фагоцитів, що продукують РФК, у старих щурів [197]. Це дозволяє зробити припущення, що зниження оксидативного метаболізму на рівні популяції резидентних альвеолярних макрофагів з віком не є видоспецифічним.

Частка альвеолярних макрофагів, що фагоцитували мічений стафілокок, була достовірно нижчою у старих мишей порівняно з молодими. При цьому не було виявлено достовірної різниці фагоцитарного індексу цих клітин [196]. В літературі наявні дані, які вказують на зниження відсотку альвеолярних макрофагів старих мишей цієї ж лінії, що фагоцитували апоптисовані нейтрофіли та мічені часточки, що підтверджує результати наших експериментів. Крім того, к цьому ж експерименті виявлено зниження експресії скавенджер рецептора CD204 альвеолярними макрофагами старих тварин, який, як відомо, здатен розпізнавати бактеріальні ліганди [199]. Тому, зменшення його експресії з віком може бути однією з причин зниження фагоцитарного числа альвеолярних макрофагів старих тварин у нашому експерименті.

Відомо, що макрофаги маргінальної зони та металофільні макрофаги селезінки походять з моноцитів крові дорослого організму [202]. Крім того, селезінка є одним з головних органів, у яких відбувається екстрамедулярний гемопоез – біологічний процес, що забезпечує продукцію фагоцитів та антигенпрезентувальних клітин при інфекції та запаленні. Для збагачення селезінки макрофагами моноцитарного походження, ми попередньо імунізували дослідних мишей еритроцитами барана.

Ми виявили достовірно нижчий рівень аргіназної активності та більшу продукцію нітритів макрофагами селезінки старих мишей порівняно з молодими тваринами. Відсоток клітин, що продукували РФК, та середній рівень їх продукції на клітину були достовірно вищими у мононуклеарів селезінки старих мишей порівняно з молодими. Нами не виявлено значних змін фагоцитарного числа та фагоцитарного індексу мононуклеарних фагоцитів селезінки старих мишей порівняно з молодими. Спостерігалася лише недостовірна тенденція до зростання фагоцитарного числа мононуклеарів селезінки у старих тварин [204].

Таким чином, в умовах імунізації старих мишей корпускулярним ксеногенним антигеном спостерігається прозапальна поляризація макрофагів селезінки, більш виразна у випадку старих тварин, яка проявляється достовірно нижчим рівнем аргіназної активності цих клітин, більш високою продукцією РФК мононуклеарними фагоцитами селезінки, а також підвищенням продукції NO. Отримані нами дані узгоджуються з результатами іншої дослідної групи, яка теж спостерігала прозапальну активацію стимульованих макрофагів селезінки старих мишей порівняно з клітинами молодих тварин [190].

Нейтрофіли кісткового мозку активно досліджуються у зв'язку з виявленням феномену їх медулярного депонування і кліренсу цих клітин медулярними макрофагами [205,206]. Автори феномену висловлюють припущення, що у кістковому мозку можуть накопичуватися як щойно диференційовані молоді, так і старіючі нейтрофіли.

Аргіназна активність нейтрофілів кісткового мозку старих тварин була достовірно вищою порівняно з клітинами молодих мишей. При цьому, продукція нітритів поліморфонуклеарами старих мишей була вірогідно нижчою порівняно з молодими тваринами [188].

За результатами наших досліджень, частка нейтрофілів кісткового мозку старих мишей, що продукували РФК, була достовірно нижчою порівняно з клітинами молодих тварин. Разом з тим, середній рівень продукції РФК не відрізнявся у поліморфоядерних фагоцитів кісткового мозку мишей різного віку. Ми не виявили вікових порушень фагоцитарної активності нейтрофілів кісткового мозку старих тварин [196].

Таким чином, кістковомозкові нейтрофіли старих мишей характеризувалися протизапальною поляризацією метаболізму, що проявлялася підвищенням аргіназної активності та зниженням продукції оксиду азоту та РФК. Це може свідчити про накопичення у кістковому мозку старих мишей відпрацьованих нейтрофілів, ймовірною причиною чого може бути порушення з віком процесів ефероцитозу макрофагами кісткового мозку. Порушення кліренсу апоптизованих нейтрофілів веде до зростання продукції реактивних форм кисню [207], що узгоджується з отриманими нами даними про підвищення продукції реактивних форм кисню макрофагами, диференційованими з моноцитів старих мишей.

У селезінці виявлено наявність резидентних популяцій нейтрофілів, які відіграють важливу роль у захисті організму від інкапсульованих бактерій [209]. 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. Однією з причин цього явища є бактеріємія, спричинена віковими порушеннями кишкового бар'єру [210].

Показник інтенсивності продукції РФК був достовірно вищим у гранулоцитів селезінки старих імунізованих мишей порівняно з молодими тваринами. При цьому ми не спостерігали достовірних вікових змін відсотку гранулоцитів селезінки, що продукували РФК [204].

Процес фагоцитозу виконує відмінні функції у моно- і поліморфноядерних фагоцитів. У мононуклеарних фагоцитів, таких як макрофаги, фагоцитоз необхідний для кліренсу апоптичних тілець. Тому посилення фагоцитозу може бути свідченням альтернативної поляризації їх функцій. Посилення фагоцитозу поліморфноядерних фагоцитів є ознакою прозапальної активації. Ми не виявили відмінностей фагоцитарної активності гранулоцитів селезінки мишей різного віку в умовах присутності корпускулярного антигену. Однак, відсоток фагоцитуючих селезінкових поліморфноядерних фагоцитів був достовірно вищим у старих тварин [204]. Експериментами інших авторів показано відсутність порушень фагоцитарної функції циркулюючих нейтрофілів мишей з віком [214], що узгоджується з нашими даними, отриманими на нейтрофілах кісткового мозку та селезінки старих тварин.

У підсумку, вікові зміни функціонального профілю фагоцитів залежать від їхньої локалізації та походження. Моноцити здатні проникати в уражені тканини з подальшим диференціюванням у фагоцити, забезпечуючи, таким чином, системний захист організму від інфекційних агентів. Фагоцити моноцитарного походження старих мишей характеризуються прозапальним метаболічним зсувом порівняно з їх аналогами у молодих тварин. Це узгоджується з даними літератури стосовно розвитку в старіючому організмі системного запалення, відомого під назвою «інфламейджинг», та зростання частоти ряду системних захворювань, таких як атеросклероз, діабет, гломерулонефрит та ін [245,246].

У резидентних тканинних фагоцитів ембріонального походження старих мишей, навпаки, виявлено протизапальний зсув метаболізму у порівнянні з аналогічними клітинами молодих тварин. Це пояснює підвищення з віком

частоти виникнення злоякісних новоутворень, атопічного дерматиту та фіброзу, оскільки ці процеси обумовлені неналежним функціонуванням саме резидентних тканинних макрофагів і набуттям ними протизапального активаційного статусу [128,247-248].

Наступним етапом наших досліджень було вивчення впливу макрофагів старих мишей на фенотиповий профіль Т-лімфоцитів вторинних лімфоїдних органів молодих тварин на моделі гетерохронного парабіозу.

Лімфатичні вузли – це вторинні лімфоїдні органи, що забезпечують імунну відповідь до антигенів, що знаходяться в тканинах організму. Мікроархітектура лімфовузлів сприяє контакту клітин вродженої та адаптивної імунної системи, в тому числі й макрофагів та Т-лімфоцитів, що, в свою чергу, забезпечує генерацію адаптивної імунної відповіді [220]. Кількість макрофагів, що мігрували у лімфовузли молодих гетерохронних парабіонтів вихідної лінії від старих трансгенних мишей, достовірно зростала порівняно з цим показником молодих ізохронних парабіонтів, у лімфовузли котрих мігрували клітини молодих трансгенних тварин. Відомо, що у моноцитів відповідальною за вихід з кісткового мозку і міграцію в тканини є експресія ними CCR2 – рецептора, що зв'язується з хемокіном CCL2. Spinetti et al. (2004) описали вірогідне підвищення експресії хемокіну CCR2 клітинами аорти старих тварин порівняно з молодими [221]. Крім того, в літературі наявні дані стосовно посилення експресії у мишей з віком ще одного хемокінового рецептору – CCR7 [222]. Відповідно, зростання міграційної активності макрофагів старих тварин може пояснюватися збільшенням експресії хемокінових рецепторів цими клітинами, і, відповідно, активнішою міграцією моноцитів у тканини молодого організму.

Нами не виявлено достовірних відмінностей відсотку iNOS та CD206-позитивних клітин у популяції мононоуклеарних фагоцитів, що мігрували у лімфовузли гетерохронних та ізохронних мишей вихідної лінії від трансгенних парабіонтів. Як ми уже писали раніше, у старих мишей спостерігається зростання експресії фенотипових маркерів активації макрофагів, що може

вказувати на преактивований стан цих клітин [20]. Відсутність цього феномену у даному експерименті може пояснюватися впливом тканинного мікрооточення лімфовузлів молодих мишей на диференціювання моноцитів, що мігрували від старих трансгенних тварин.

Відсоток GFP⁻CD4⁺ Т-лімфоцитів у лімфовузлах молодих гетерохронних парабіонтів вихідної лінії достовірно не змінювався порівняно з молодими ізохронними парабіонтами. Тому можна зробити висновок, що макрофаги старих тварин, що заселили тканинну нішу лімфовузлів молодих тварин, не впливають на міграцію і хомінг Т-лімфоцитів у ці вторинні лімфоїдні органи. При цьому, значно знижувалася частка GFP⁺CD4⁺ Т-лімфоцитів, що мігрували у лімфовузли молодих гетерохронних парабіонтів вихідної лінії, порівняно з молодими ізохронними парабіонтами. Відомо, що при старінні гальмується міграція Т-лімфоцитів в лімфоїдні утвори слизових оболонок [224,225]. Отже, результати нашого експерименту підтверджують і доповнюють наявні в літературі дані.

При старінні порушується співвідношення Т-лімфоцитів різних популяцій, що зумовлює порушення функціонування адаптивної імунної відповіді та, відповідно, призводить до розвитку вікової патології. Важливу роль в контролі адаптивних імунних реакцій відіграють регуляторні Т-лімфоцити, які забезпечують підтримання імунологічної толерантності та попереджують розвиток аутоімунних реакцій [226]. Надлишкове зростання кількості цих клітин зумовлює послаблення захисних функцій клітинного адаптивного імунітету, і може призводити до розвитку онкологічної патології та хронізації вірусних інфекційних захворювань [227]. Відомо, що макрофаги здатні індукувати розвиток регуляторних Т-лімфоцитів [249]. Для характеристики регуляторних Т-лімфоцитів використовуються маркери FoxP3, CD25 та CD44 [226,228].

Ми виявили зростання відсотку GFP⁻CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺- та GFP⁻CD4⁺CD44⁺FoxP3⁺-позитивних Т-лімфоцитів у лімфовузлах молодих гетерохронних парабіонтів порівняно з ізохронними. Це асоціювалося з раніше

описаною нами більшою кількістю макрофагів старих трансгенних тварин у лімфатичних вузлах гетерохронних партнерів порівняно з ізохронними парабіонтами вихідної лінії. Результати наших досліджень вказують на те, що міграція макрофагів старої тварини у лімфовузли молоді супроводжується зміною фенотипу Т-лімфоцитів, що знаходяться у її лімфовузлах, і, вірогідно, обумовлена впливом секретому макрофагів старого організму. Це узгоджується з даними літератури про збільшення кількості регуляторних Т-клітин у крові людей похилого віку та вторинних лімфоїдних органах старих мишей. Виявлені зміни можуть призводити до подальшого порушення імунної відповіді [81].

Спостерігалось тенденційне зростання відсотку Т-лімфоцитів з фенотипом регуляторних клітин, що мігрували у лімфовузли гетерохронних парабіонтів вихідної лінії, порівняно з ізохронними парабіонтами. Така активізація міграції Т-лімфоцитів старих тварин може пояснюватися посиленням синтезом Т-клітинних хемокінів клітинами мікрооточення вторинних лімфоїдних органів, до яких також належать і макрофаги [231]. Враховуючи те, що міграція регуляторних та ефektorних Т-клітин опосередковується різними хемокінами [232], можна припустити, що макрофаги старого організму сприяли селективному рекрутуванню саме регуляторних Т-лімфоцитів.

Селезінка є вторинним лімфоїдним органом, який за своєю будовою є подібним до будови лімфовузлів, і також забезпечує контакт різних популяцій лейкоцитів. Однак селезінка є відповідальною за імунну відповідь на антигени, що потрапляють в кров, забезпечуючи захист організму на системному рівні. Подібно до результатів, отриманих при дослідженні лімфовузлів, відсоток макрофагів, що мігрували у селезінку молодих гетерохронних парабіонтів вихідної лінії від старих трансгенних тварин, був достовірно вищим порівняно з молодими ізохронними парабіонтами.

У популяції мононуклеарних фагоцитів старих тварин, що мігрували у селезінку молодого партнера по парабіозу, спостерігалась недостовірна тенденція до зниження відсотку iNOS- та статистично вірогідне зниження

частки CD206-позитивних клітин. Як видно з результатів порівняльного дослідження функціонального профілю макрофагів різного походження і локалізації у мишей різного віку, макрофаги моноцитарного походження старих тварин характеризуються прозапальним метаболічним зсувом. Макрофаги селезінки, значна частина яких також має моноцитарне походження [202], теж характеризуються прозапальним метаболічним зсувом. Тому можна припустити, що саме тому диференціювання моноцитів, що мігрували від старого трансгенного парабіонта, у селезінці молоді тварини супроводжувалося прозапальним зсувом їхнього метаболізму.

Відсоток GFP-CD4⁺ Т-лімфоцитів достовірно не відрізнявся у селезінках гетерохронних та ізохронних парабіонтів вихідної лінії. Подібно до результатів, отриманих при дослідженні лімфовузлів, частка GFP-позитивних Т-лімфоцитів, що мігрували у селезінку гетерохронних молодих парабіонтів вихідної лінії від старих трансгенних партнерів, достовірно знижувалася, що свідчить про вікове порушення хомінгу Т-лімфоцитів в цілому, незалежно від типу вторинних лімфоїдних органів, у які відбувалася міграція цих клітин.

Ми спостерігали тенденцію до зниження відсотку Т-лімфоцитів з фенотипом регуляторних клітин у селезінках молодих гетерохронних парабіонтів вихідної лінії порівняно з ізохронними. Також виявлено вірогідне зниження частки Т-лімфоцитів з фенотипом регуляторних клітин, що мігрували у селезінку гетерохронних парабіонтів вихідної лінії від старих тварин. Це може пояснюватися тим, що макрофаги про- та протизапального метаболічного профілю продукують різний спектр цитокінів і хемокінів [223]. Ми спостерігали посилення хомінгу регуляторних Т-клітин при відсутності прозапального зсуву метаболізму аргініну у макрофагів, що знаходилися у складі тканинної ніші вторинного лімфоїдного органу, як нами було виявлено у лімфовузлах молодих гетерохронних парабіонтів. Виражений прозапальний зсув метаболізму аргініну у макрофагів селезінки, що супроводжувався зменшенням експресії маркеру альтернативної поляризації фагоцитів, вказують на їх прозапальний функціональний статус. Показано, що зміна функціональної

поляризації фагоцитів призводить до зміни профілю продукованих ними хемокінів. Тому можна припустити, що саме відсутність синтезу хемокінів, що відповідальні за рекрутинг регуляторних Т-клітин, зумовила зниження їх міграції у селезінку молодих гетерохронних парабіонтів.

Підсумовуючи результати даного етапу досліджень, для макрофагів старих тварин характерним було посилення міграції у вторинні лімфоїдні органи молодих мишей порівняно з клітинами молодих тварин. Міграція мононуклеарних фагоцитів старих тварин у селезінку супроводжувалася формуванням прозапального профілю цих клітин, в той час як при мігруванні у лімфовузли не спостерігалось змін фенотипу цих клітин. Хомінг мононуклеарів старих мишей у вторинні лімфоїдні органи молодих тварин також супроводжувався зміною кількості Т-лімфоцитів з фенотипом регуляторних клітин. При цьому спостерігалось зростання кількості регуляторних Т-клітин у лімфатичних вузлах, та їх зменшення у селезінці молодих гетерохронних парабіонтів порівняно з ізохронними.

Метою останньої частини роботи був порівняльний аналіз впливу сингенних тММСК молодих тварин на макрофаги моноцитарного та ембріонального походження.

Ми виявили виражене підвищення аргіназної активності макрофагів моноцитарного походження молодих та старих мишей після співкультивування з сингенними тММСК у 78 та 131 разів, відповідно, порівняно з контрольними клітинами [184]. Отримані нами дані узгоджуються з даними літератури щодо стимуляції протизапальної активації макрофагів під впливом тММСК [244]. Показано, що дефект експресії аргінази макрофагами призводить до порушення їхніх імуносупресорних властивостей, що супроводжується розвитком гранулематозного процесу *in vivo* та порушення інгібування проліферації Т-лімфоцитів *in vitro* [236]. Тому, виражена тММСК-опосередкована стимуляція аргіназної активності є доречною в контексті хронічного запалення, що спостерігається при старінні.

Разом з тим, співкультивувалися з сингенними тММСК не здійснювало впливу на продукцію оксиду азоту макрофагами, що диференціювалися з моноцитів мишей різного віку [184]. Відсутність змін продукції нітритів може пояснюватися потужною активацією аргіназного метаболічного шляху, метаболіти якого здатні інгібувати продукцію оксиду азоту [237].

Співкультивування з тММСК викликало також статистично вірогідні зміни оксидативного метаболізму макрофагів моноцитарного походження. Виявлено тенденцію до збільшення кількості кістковомозкових макрофагів молодих та старих мишей, що продукували РФК. Також ми спостерігали достовірне підвищення інтенсивності продукції РФК кістковомозковими макрофагами молодих мишей, що співкультивувалися з тММСК, порівняно з контрольними клітинами. Це вказує на здатність тММСК разом з протизапальною поляризацією метаболізму також стимулювати механізми протимікробного захисту макрофагів. Не виявлено подібного ефекту тММСК на макрофаги моноцитарного походження, отримані від старих тварин що, вірогідно, пояснюється вищим базальним рівнем продукції РФК досліджуваними клітинами старих мишей порівняно з молодими.

Фагоцитарна активність макрофагів зазнавала найменш виразних змін після співкультивуванні з тММСК. Кількість фагоцитуючих клітин, отриманих від мишей різного віку, залишалася на рівні контрольних значень. При співкультивуванні з тММСК спостерігалася статистично недостовірною тенденція до збільшення фагоцитарного індексу клітин молодих тварин. Фагоцитарний індекс клітин старих мишей після впливу сингенних тММСК не відрізнявся від значень контрольних клітин. Ці результати співпадають з даними іншої дослідної групи, яка теж не спостерігала впливу ММСК на фагоцитарну активність макрофагів моноцитарного походження [238].

Нами не виявлено змін експресії досліджуваних фенотипових маркерів макрофагами моноцитарного походження при співкультивуванні з сингенними тММСК. Спостерігалася недостовірною тенденція до підвищення експресії фенотипового маркера CD11b у групі співкультивування макрофагів старих

тварин, і відсутність змін цього показника в групі співкультивування макрофагів молодих мишей, що узгоджується з відсутністю змін фагоцитарної активності цієї популяції макрофагів мишей різного віку при співкультивуванні з тММСК. Також нами виявлено тенденцію до зростання експресії фенотипового маркера CD206 у макрофагів мишей різного віку, порівняно з відповідними контрольними клітинами. Подібні результати також були отримані іншими авторами у дослідженнях з використанням макрофагів, диференційованих з периферичної крові, та тММСК кісткового мозку здорових донорів, де було показано зростання експресії CD206 та IL-10, а також зменшення експресії IL-12 та ФНП- α [239]. Таким чином, враховуючи одночасне зростання експресії CD206 та посилення метаболізму аргініну аргіназою розглядається, можна зробити висновок про набуття макрофагами моноцитарного походження протизапальної функціональної поляризації при співкультивуванні з тММСК.

Таким чином, контактне співкультивування тММСК з макрофагами моноцитарного походження викликало протизапальну функціональну поляризацію цих клітин, що проявлялося значним зсувом метаболізму аргініну у бік посилення аргіназної активності, більш вираженим у старих мишей, вірогідно через знижений базальний рівень цього показника. З огляду на це, можна припустити більшу ефективність терапії з використанням тММСК для профілактики і лікування запальної патології у осіб похилого віку. Крім того, співкультивування з тММСК спричиняло посилення оксидативного метаболізму макрофагів моноцитарного походження, більш виразне у молодих тварин. Також тММСК посилювали фагоцитарну активність макрофагів молодих мишей. Оксидативний метаболізм і фагоцитарна активність відіграють важливу роль у репаративних процесах, що дозволяє припустити більшу ефективність застосування клітинної терапії з використанням тММСК в регенеративній медицині у осіб молодого віку.

Наступним завданням було перевірити здатність мультипотентних мезенхімних стромальних клітин, отриманих від молодих тварин, модулювати

метаболичну поляризацію перитонеальних макрофагів старих мишей. Після співкультивування з тММСК, ми спостерігали достовірне підвищення аргіназної активності перитонеальних макрофагів молодих та старих мишей у 6,5 та 8 разів, відповідно [188]. Отримані нами результати підтверджуються результатами досліджень інших авторів, які так само виявили протизапальну активацію перитонеальних макрофагів мишей лінії C57B1 при співкультивуванні з людськими ММСК жирової тканини [241].

На відміну від макрофагів моноцитарного походження, продукція нітритів перитонеальними макрофагами, отриманими від мишей різного віку, достовірно зростала при співкультивуванні з сингенними тММСК [188]. Відомо, що оксид азоту, крім цитотоксичної дії, також приймає участь у регуляції розвитку, диференціювання та функціонування Т-лімфоцитів. Низькі рівні NO у мікрооточенні цих клітин стимулюють їх диференціювання та виживання, в той час як високі рівні пригнічують їхню проліферативну активність [242]. Це дозволяє зробити припущення, що посилення продукції оксиду азоту може додатковим механізмом імуносупресивного впливу тММСК. Vasandan et al., виявили, що співкультивування з ММСК кісткового мозку викликає посилення продукції оксиду азоту макрофагами, диференційованими з моноцитів периферичної крові людини, інфікованими *Salmonella enterica* [238]. Тому, зростання продукції NO перитонеальними макрофагами при співкультивуванні з ММСК може вказувати на здатність цих клітин потенціювати протимікробну активність резидентних тканинних фагоцитів ембріонального походження.

У підсумку, контактна взаємодія тММСК з макрофагами різного походження викликає посилення аргіназної активності, що вказує на протизапальну дію цього клітинного препарату. Більш значний вплив тММСК на метаболізм аргініну виявлено по відношенню до макрофагів моноцитарного походження старих тварин, порівняно з відповідними клітинами молодих мишей та резидентними тканинними фагоцитами. Можна припустити, що цей клітинний препарат володітиме потужнішим ефектом при лікуванні системних

запальних процесів при старінні. Також після співкультивування з тММСК спостерігалось посилення синтезу оксиду азоту макрофагами ембріонального походження, що свідчить про здатність цього клітинного препарату разом з імуносупресорною дією також стимулювати протимікробну активність фагоцитів.

ВИСНОВКИ

У дисертації наведено теоретичне узагальнення та представлено вирішення одного з важливих питань імуногеронтології – 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 ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Davalli P., Mitic T., Caporali A., Lauriola A., D'Arca D. ROS, Cell Senescence, and novel molecular mechanisms in aging and age-related diseases. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*. 2016; 2016: 3565127.
2. Simon AK., Hollander GA., McMichael A. Evolution of the immune system in humans from infancy to old age. *Proceedings. Biological Sciences*. 2015; 282 (1821): 20143085.
3. Weyand CM., Goronzy JJ. Aging of the immune system. Mechanisms and therapeutic targets. *Annals of the American Thoracic Society*. 2016; 13 (Suppl. 5): S422–8.
4. Franceschi C., Salvioli S., Garagnani P., de Eguileor M., Monti D., Capri M. Immunobiography and the heterogeneity of immune responses in the elderly: a focus on inflammaging and trained immunity. *Frontiers in Immunology*. 2017; 8: 982.
5. Guha I. Naskar D., Sen M. Macrophage as a mediator of immune response: sustenance of immune homeostasis. *Macrophage*. 2015; 2: e709.
6. Okabe Y., Medzhitov R. Tissue biology perspective on macrophages. *Nature Immunology*. 2016; 17 (1): 9–17.
7. Шитіков ДВ. Механізми розвитку вікових змін Т-клітинної ланки імунної системи на моделі гетерохронного парабіозу та розробка способу їх корекції [дисертація]. Київ: Київський національний університет імені Тараса Шевченка; 2015. 147 с.
8. Bektas A., Schurman SH., Sen R., Ferrucci L. Human T cell immunosenescence and inflammation in aging. *Journal of Leukocyte Biology*. 2017; 102 (4): 977–88.
9. Goronzy JJ., Weyand CM. Successful and maladaptive T cell aging. *Immunity*. 2017; 46 (3): 364–78.

10. Roberts CA. The interplay between monocytes/macrophages and CD4+ T cell subsets in rheumatoid arthritis. *Frontiers in Immunology*. 2015; 6: 571.
11. Murray PJ. Macrophage polarization. *Annual Review of Physiology*. 2017; 79: 541-66.
12. Rodriguez PC., Ochoa AC., Al-Khami AA. Arginine metabolism in myeloid cells shapes innate and adaptive immunity. *Frontiers in Immunology*. 2017; 8: 93.
13. Sica A., Erreni M., Allavena P., Porta C. Macrophage polarization in pathology. *Cellular and Molecular Life Sciences: CMLS*. 2015; 72 (21): 4111-26.
14. Tacke F. Targeting hepatic macrophages to treat liver diseases. *Journal of Hepatology*. 2017; 66 (6): 1300-12.
15. van den Bosch TP., Kannegieter NM., Hesselink DA., Baan CC., Rowshani AT. Targeting the monocyte–macrophage lineage in solid organ transplantation. *Frontiers in Immunology*. 2017; 8: 153.
16. Mantovani A., Marchesi F., Malesci A., Laghi L., Allavena P. Tumour-associated macrophages as treatment targets in oncology. *Nature Reviews. Clinical Oncology*. 2017; 14 (7): 399-416.
17. Yao B., Huang S., Gao D., Xie J., Liu N., Fu X. Age-associated changes in regenerative capabilities of mesenchymal stem cell: impact on chronic wounds repair. *International Wound Journal*. 2016; 13 (6): 1252-9.
18. Suksuphew S., Noisa P. Neural stem cells could serve as a therapeutic material for age-related neurodegenerative diseases. *World Journal of Stem Cells*. 2015; 7 (2): 502-11.
19. Yarygin KN., Lupatov AY., Kholodenko IV. Cell-based therapies of liver diseases: age-related challenges. *Clinical Interventions in Aging*. 2015; 10: 1909-24.
20. Gibon E., Loi F., Cordova LA., Pajarinen J., Lin T., Lu L., et al. Aging affects bone marrow macrophage polarization: relevance to bone healing. *Regenerative Engineering and Translational Medicine*. 2016; 2 (2): 98-104.

21. Ginhoux F., Williams M. Tissue-resident macrophage ontogeny and homeostasis. *Immunity*. 2016; 44 (3): 439-49.
22. Swirski FK., Robbins CS., Nahrendorf M. Development and function of arterial and cardiac macrophages. *Trends in Immunology*. 2016; 37 (1): 32-40.
23. Albright JM., Dunn RC., Shults JA., Boe DM., Afshar M., Kovacs EJ. Advanced age alters monocyte and macrophage responses. *Antioxidants & Redox Signaling*. 2016; 25 (15): 805-15.
24. Malech HL., DeLeo FR., Quinn MT. The role of neutrophils in the immune system: an overview. *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)*. 2014; 1124: 3-10.
25. Amulic B., Cazalet C., Hayes GL., Metzler KD., Zychlinsky A. Neutrophil function: from mechanisms to disease. *Annual Review of Immunology*. 2012; 30: 459-89.
26. Italiani P., Boraschi D. From monocytes to M1/M2 macrophages: phenotypical vs. functional differentiation. *Frontiers in Immunology*. 2014; 5: 514.
27. Schulz C., Gomez Perdiguero E., Chorro L., Szabo-Rogers H., Cagnard N., Kierdorf K., et al. A lineage of myeloid cells independent of Myb and hematopoietic stem cells. *Science*. 2012; 336 (6077): 86-90.
28. Yona S., Kim KW., Wolf Y., Mildner A., Varol D., Breker M., et al. Fate mapping reveals origins and dynamics of monocytes and tissue macrophages under homeostasis. *Immunity*. 2013; 38 (1): 79-91.
29. Gomez Perdiguero E., Geissmann F. Myb-independent macrophages: a family of cells that develops with their tissue of residence and is involved in its homeostasis. *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology*. 2013; 78: 91-100.
30. Golub R., Cumano A. Embryonic hematopoiesis. *Blood Cells, Molecules & Diseases*. 2013; 51 (4): 226-31.
31. Tamoutounour S., Williams M., Montanana Sanchis F., Liu H., Terhorst D., Malosse C., et al. Origins and functional specialization of macrophages and of

- conventional and monocyte-derived dendritic cells in mouse skin. *Immunity*. 2013; 39 (15): 925-38.
- 32.Zigmond E., Jung S. Intestinal macrophages: well educated exceptions from the rule. *Trends in Immunology*. 2013; 34 (4): 162-8.
- 33.Bain CC., Bravo-Blas A., Scott CL., Perdiguero EG., Geissmann F., Henri S., et al. Constant replenishment from circulating monocytes maintains the macrophage pool in the intestine of adult mice. *Nature Immunology*. 2014; 15 (10): 929-37.
- 34.Davies LC., Rosas M., Jenkins SJ., Liao CT., Scurr MJ., Brombacher F., et al. Distinct bone marrow-derived and tissue-resident macrophage lineages proliferate at key stages during inflammation. *Nature Communications*. 2013; 4: 1886.
- 35.Gentek R., Molawi K., Sieweke MH. Tissue macrophage identity and self-renewal. *Immunol. Rev.* 2014; 262 (1): 56-73.
- 36.Molawi K., Wolf Y., Kandalla PK., Favret J., Hagemeyer N., Frenzel K., et al. Progressive replacement of embryo-derived cardiac macrophages with age. *The Journal of Experimental Medicine*. 2014; 211 (11): 2151-8.
- 37.Eash KJ., Greenbaum AM., Gopalan PK., Link DC. CXCR2 and CXCR4 antagonistically regulate neutrophil trafficking from murine bone marrow. *The Journal of Clinical Investigation*. 2010; 120 (7): 2423-31.
- 38.Kohler A., De Filippo K., Hasenberg M., van den Brandt C., Nye E., Hosking MP., et al. G-CSF-mediated thrombopoietin release triggers neutrophil motility and mobilization from bone marrow via induction of Cxcr2 ligands. *Blood*. 2011; 117 (16): 4349-57.
- 39.Devi S., Wang Y., Chew WK., Lima R., A-Gonzalez N., Mattar CN., et al. Neutrophil mobilization via plerixafor-mediated CXCR4 inhibition arises from lung demargination and blockade of neutrophil homing to the bone marrow. *The Journal of Experimental Medicine*. 2013; 210 (11): 2321-36.
- 40.Granick JL., Falahee PC., Dahmubed D., Borjesson DL., Miller LS., Simon SI. *Staphylococcus aureus* recognition by hematopoietic stem and progenitor cells

- via TLR2/MyD88/PGE2 stimulates granulopoiesis in wounds. *Blood*. 2013; 122 (10): 1770-8.
41. Murray PJ., Allen JE., Biswas SK., Fisher EA., Gilroy DW., Goerdts S., et al. Macrophage activation and polarization: nomenclature and experimental guidelines. *Immunity*. 2014; 41 (1): 14-20.
42. O'Neill LA., Kishton RJ., Rathmell J. A guide to immunometabolism for immunologists. *Nature Reviews. Immunology*. 2016; 16 (9). 553-65.
43. Rath M., Muller I., Kropf P., Closs EI., Munder M. Metabolism via arginase or nitric oxide synthase: two competing arginine pathways in macrophages. *Frontiers in Immunology*. 2014; 5: 532.
44. Mattila JT., Ojo OO., Kepka-Lenhart D., Marino S., Kim JH., Eum SY., et al. Microenvironments in tuberculous granulomas are delineated by distinct populations of macrophage subsets and expression of nitric oxide synthase and arginase isoforms. *Journal of Immunology (Baltimore, MD.: 1950)*. 2013; 191 (2): 773-84.
45. Duque-Correa MA., Kuhl AA., Rodriguez PC., Zedler U., Schommer-Leitner S., Rao M., et al. Macrophage arginase-1 controls bacterial growth and pathology in hypoxic tuberculosis granulomas. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. – 2014; 111: E.4024-32.
46. Campbell L., Saville CR., Murray PJ., Cruickshank SM., Hardman MJ. Local arginase 1 activity is required for cutaneous wound healing. *The Journal of Investigative Dermatology*. 2013; 133 (10): 2461-70.
47. Herbert DR., Orekov T., Roloson A., Ilies M., Perkins C., O'Brien W., et al. Arginase I suppresses IL12/IL-23p40-driven intestinal inflammation during acute schistosomiasis. *Journal of Immunology (Baltimore, MD. : 1950)*. 2010; 184 (11): 6438-46.
48. Esser-von Bieren J., Mosconi I., Guillet R., Piersgilli A., Volpe B., Chen F., et al. Antibodies trap tissue migrating helminth larvae and prevent tissue damage

- by driving IL-4 α -independent alternative differentiation of macrophages. *PLoS Pathogens*. 2013; 9. (11): e1003771.
- 49.Selders GS., Fetz AE., Radic MZ., Bowlin GL. An overview of the role of neutrophils in innate immunity, inflammation and host-biomaterial integration. *Regenerative Biomaterials*. 2017; 4 (1): 55-68.
- 50.Bjornsdottir H., Welin A., Michaelsson E., Osla V., Berg S., Christenson K., et al. Neutrophil NET formation is regulated from the inside by myeloperoxidase-processed reactive oxygen species. *Free Radical Biology & Medicine*. 2015; 89: 1024-35.
- 51.Cuartero MI., Ballesteros I., Moraga A., Nombela F., Vivancos J., Hamilton JA., et al. N2 neutrophils, novel players in brain inflammation after stroke: modulation by the PPAR γ agonist rosiglitazone. *Stroke*. 2013; 44 (12): 3498-08.
- 52.Ma Y., Yabluchanskiy A., Iyer RP., Cannon PL., Flynn ER., Jung M., et al. Temporal neutrophil polarization following myocardial infarction. *Cardiovascular Research*. 2016; 110 (1): 51-61.
- 53.Hilhorst M., Shirai T., Berry G., Goronzy JJ., Weyand CM. T cell–macrophage interactions and granuloma formation in vasculitis. *Frontiers in Immunology*. 2014; 5: 432.
- 54.Lee DH., Zandian M., Kuo J., Mott KR., Chen S., Arditì M., et al. Suppression of IL-12p70 formation by IL-2 or following macrophage depletion causes T-cell autoreactivity leading to CNS demyelination in HSV-1-infected mice. *PLoS Pathogens*. 2017; 13 (5): e1006401.
- 55.Huber S., Hoffmann R., Muskens F., Voehringer D. Alternatively activated macrophages inhibit T-cell proliferation by Stat6-dependent expression of PD-L2. *Blood*. 2010; 116 (17): 3311-20.
- 56.Hoves S., Krause SW., Schutz C., Halbritter D., Scholmerich J., Herfarth H., et al. Monocyte-derived human macrophages mediate anergy in allogeneic T cells and induce regulatory T cells. *Journal of Immunology (Baltimore, MD. : 1950)*. 2006; 177 (4): 2691-8.

57. Cook PC., Jones LH., Jenkins SJ., Wynn TA., Allen JE., MacDonald AS. Alternatively activated dendritic cells regulate CD4⁺ T-cell polarization in vitro and in vivo. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2012; 109 (25): 9977–9982.
58. Doedens AL., Stockmann C., Rubinstein MP., Liao D., Zhang N., DeNardo DG., et al. Macrophage expression of hypoxia-inducible factor-1 alpha suppresses T-cell function and promotes tumor progression. *Cancer Research*. 2010; 70 (19): 7465-75.
59. Dang EV., Barbi J., Yang HY., Jinasena D., Yu H., Zheng Y., et al. Control of TH17/Treg balance by hypoxia-inducible factor 1. *Cell*. 2011; 146 (5): 772-84.
60. Ferrando-Martinez S., Ruiz-Mateos E., Hernandez A., Gutierrez E., Rodriguez-Mendez Mdel M., Ordonez A., et al. Age-related deregulation of naive T cell homeostasis in elderly humans. *Age (Dordrecht, Netherlands)*. 2011; 33 (2): 197-207.
61. Castelo-Branco C., Soveral I. The immune system and aging: a review. *Gynecological Endocrinology*. 2014; 30 (1): 16-22.
62. Becklund BR., Purton JF, Ramsey C., Favre S., Vogt TK., Martin CE., et al. The aged lymphoid tissue environment fails to support naïve T cell homeostasis. *Scientific Reports*. 2016; 6: 30842.
63. Renkema KR., Li G., Wu A., Smithey MJ., Nikolich-Zugich J. Two separate defects affecting true naive or virtual memory T cell precursors combine to reduce naive T cell responses with aging. *Journal of Immunology (Baltimore, MD.: 1950)*. 2014; 192: 151–9.
64. Chiu BC., Martin BE., Stolberg VR., Chensue SW. Cutting edge: Central memory CD8 T cells in aged mice are virtual memory cells. *Journal of Immunology (Baltimore, MD.: 1950)*. 2013; 191: 5793–6.
65. Nikolich-Zugich J. The twilight of immunity: emerging concepts in aging of the immune system. *Nature Immunology*. 2018; 19 (1): 10-9.

66. Li G., Yu M., Lee WW., Tsang M., Krishnan E., Weyand CM., et al. Decline in miR-181a expression with age impairs T cell receptor sensitivity by increasing DUSP6 activity. *Nature Medicine*. 2012; 18: 1518–24.
67. Garcia GG., Miller RA. Age-related defects in the cytoskeleton signaling pathways of CD4 T cells. *Ageing Research Reviews*. 2011; 10: 26–34.
68. Tsukamoto H., Huston GE., Dibble J., Duso DK., Swain SL. Bim dictates naive CD4 T cell lifespan and the development of age-associated functional defects. *Journal of Immunology (Baltimore, MD.: 1950)*. 2010; 185: 4535–44.
69. Smithey MJ., Renkema KR., Rudd BD., Nikolich-Zugich J. Increased apoptosis, curtailed expansion and incomplete differentiation of CD8+ T cells combine to decrease clearance of *L. monocytogenes* in old mice. *European Journal of Immunology*. 2011; 41: 1352–64.
70. Zacca ER., Crespo MI., Acland RP., Roselli E., Nunez NG., Maccioni M., et al. Aging impairs the ability of conventional dendritic cells to cross-prime CD8+ T cells upon stimulation with a TLR7 ligand. *PLoS One*. 2015; 10: e0140672.
71. Chougnet CA., Thacker RI., Shehata HM., Hennies CM., Lehn MA., Lages CS., et al. Loss of phagocytic and antigen cross-presenting capacity in aging dendritic cells is associated with mitochondrial dysfunction. *Journal of Immunology (Baltimore, MD.: 1950)*. 2015; 195: 2624–32.
72. Richner JM., Gmyrek GB., Govero J., Tu Y., van der Windt GJ., Metcalf TU., et al. Age-dependent cell trafficking defects in draining lymph nodes impair adaptive immunity and control of West Nile virus infection. *PLoS Pathogens*. 2015; 11: e1005027.
73. Uhrlaub JL., Pulko V., DeFilippis VR., Broeckel R., Streblow DN., Coleman GD., et al. Dysregulated TGF- β production underlies the age-related vulnerability to chikungunya virus. *PLoS Pathogens*. 2016; 12: e1005891.
74. Li G., Smithey MJ., Rudd BD., Nikolich-Zugich J. Age-associated alterations in CD8 α + dendritic cells impair CD8 T-cell expansion in response to an intracellular bacterium. *Aging Cell*. 2012; 11: 968–77.

75. Martinez-Jimenez CP., Eling N., Chen HC., Vallejos CA., Kolodziejczyk AA., Connor F., et al. Aging increases cell-to-cell transcriptional variability upon immune stimulation. *Science*. 2017; 355 (6332): 1433–6.
76. Moskowitz DM., Zhang DW., Hu B., Le Saux S., Yanes RE., Ye Z., et al. Epigenomics of human CD8 T cell differentiation and aging. *Science Immunology*. 2017; 2(8): eaag0192.
77. Ucar D., Marquez EJ., Chung CH., Marches R., Rossi RJ., Uyar A., et al. The chromatin accessibility signature of human immune aging stems from CD8+ T cells. *The Journal of Experimental Medicine*. 2017; 214: 3123–44.
78. Pulko V., Davies JS., Martinez C., Lanteri MC., Busch MP., Diamond MS., et al. Human memory T cells with a naive phenotype accumulate with aging and respond to persistent viruses. *Nature Immunology*. 2016; 17: 966–75.
79. Lanna A., Gomes DC., Muller-Durovic B., McDonnell T., Escors D., Gilroy DW., et al. A sestrin-dependent Erk-Jnk-p38 MAPK activation complex inhibits immunity during aging. *Nature Immunology*. 2017; 18: 354–63.
80. Raynor J., Lages CS., Shehata H., Hildeman DA., Chougnet CA. Homeostasis and function of regulatory T cells in aging. *Current Opinion in Immunology*. 2012; 24 (4): 482-7.
81. Jagger A., Shimojima Y., Goronzy JJ., Weyand CM. Regulatory T cells and the immune aging process: a mini-review. *Gerontology*. 2014; 60 (2): 130-7.
82. Thompson HL., Smithey MJ., Surh CD., Nikolich-Zugich J. Functional and homeostatic impact of age-related changes in lymph node stroma. *Frontiers in Immunology*. 2017; 8: 706.
83. Brown FD., Turley SJ. Fibroblastic reticular cells: organization and regulation of the T lymphocyte life cycle. *Journal of Immunology (Baltimore, MD.: 1950)*. 2015; 194: 1389–94.
84. Turner VM., Mabbott NA. Structural and functional changes to lymph nodes in ageing mice. *Immunology*. 2017; 151: 239–47.
85. Davies JS., Thompson HL., Pulko V., Torres JP., Nikolich-Zugich J. Role of cell-intrinsic and environmental age-related changes in altered maintenance of

- murine T cells in lymphoid organs. *The journals of gerontology. Series A, Biological sciences and medical sciences*. 2017; doi: 10.1093/gerona/glx102.
86. Fulop T., Larbi A., Pawelec G. Human T cell aging and the impact of persistent viral infections. *Frontiers in Immunology*. 2013; 4: 271.
87. Fulop T., Witkowski JM., Pawelec G., Alan C., Larbi A. On the immunological theory of aging. *Interdisciplinary Topics in Gerontology*. 2014; 39: 163-76.
88. Almeida-Oliveira A., Smith-Carvalho M., Porto LC., Cardoso-Oliveira J., Ribeiro AS., Falcao RR., et al. Age-related changes in natural killer cell receptors from childhood through old age. *Human Immunology*. 2011; 72: 319–29.
89. Agrawal A., Gupta S. Impact of aging on dendritic cell functions in humans. *Ageing Research Reviews*. 2011; 10: 336–45.
90. Uhrlaub JL., Smithey MJ., Nikolich-Zugich J. Cutting edge: the aging immune system reveals the biological impact of direct antigen presentation on CD8 T cell responses. *Journal of Immunology (Baltimore, MD.: 1950)*. 2017; 199: 403–7.
91. Metcalf TU., Cubas RA., Ghneim K., Cartwright MJ., Grevenynghe JV., Richner JM., et al. Global analyses revealed age-related alterations in innate immune responses after stimulation of pathogen recognition receptors. *Aging Cell*. 2015; 14: 421–32.
92. Linehan E., Fitzgerald DC. Ageing and the immune system: focus on macrophages. *European Journal of Microbiology & Immunology*. 2015; 5 (1): 14-24.
93. Boehmer ED., Goral J., Faunce DE., Kovacs EJ. Age-dependent decrease in Toll-like receptor 4-mediated proinflammatory cytokine production and mitogen-activated protein kinase expression. *Journal of Leukocyte Biology*. 2004; 75 (2). 342-9.
94. Mahbub S. Brubaker AL., Kovacs EJ. Aging of the innate immune system: an update. *Current Immunology Reviews*. 2011; 7 (1): 104-15.

95. Metcalf TU., Wilkinson PA., Cameron MJ., Ghneim K., Chiang C., Wertheimer AM., et al. Human monocyte subsets are transcriptionally and functionally altered in aging in response to pattern recognition receptor agonists. *Journal of Immunology (Baltimore, MD.: 1950)*. 2017; 199: 1405–17.
96. Mahbub S. Deburghgraeve CR., Kovacs EJ. Advanced age impairs macrophage polarization. *Journal of Interferon & Cytokine Research*. 2012; 32: 18-26.
97. Lin JB., Tsubota K., Apte RS. A glimpse at the aging eye. *NPJ Aging and Mechanisms of Disease*. 2016; 2: 16003.
98. Tseng CW., Liu GY. Expanding roles of neutrophils in aging hosts. *Current Opinion in Immunology*. 2014; 29: 43-8.
99. Sapey E., Greenwood H., Walton G., Mann E., Love A., Aaronson N., et al. Phosphoinositide 3-kinase inhibition restores neutrophil accuracy in the elderly: toward targeted treatments for immunosenescence. *Blood*. 2014; 123 (2): 239-48.
100. Chen MM., Palmer JL., Plackett TP., Deburghgraeve CR., Kovacs EJ. Age-related differences in the neutrophil response to pulmonary pseudomonas infection. *Experimental Gerontology*. 2014; 54: 42-6.
101. Brubaker AL., Rendon JL., Ramirez L., Choudhry MA., Kovacs EJ. Reduced neutrophil chemotaxis and infiltration contributes to delayed resolution of cutaneous wound infection with advanced age. *Journal of Immunology (Baltimore, MD. : 1950)*. 2013; 190 (4): 1746-57.
102. Wessels I., Jansen J., Rink L., Uciechowski P. Immunosenescence of polymorphonuclear neutrophils. *TheScientificWorldJournal*. 2010; 10: 145-60.
103. Qian F., Guo X., Wang X., Yuan X., Chen S., Malawista SE., et al. Reduced bioenergetics and toll-like receptor 1 function in human polymorphonuclear leukocytes in aging. *Aging (Albany NY)*. 2014; 6 (2): 131-9.
104. Tseng CW., Kyme PA., Arruda A., Ramanujan VK., Tawackoli W., Liu GY. Innate immune dysfunctions in aged mice facilitate the systemic

- dissemination of methicillin-resistant *S. aureus*. *PLoS One*. 2012; 7 (7): e41454.
105. Kirchner T., Moller S., Klinger M., Solbach W., Laskay T., Behnen M. The impact of various reactive oxygen species on the formation of neutrophil extracellular traps. *Mediators of Inflammation*. 2012; 2012: 8491-536.
 106. Franceschi C., Garagnani P. Suggestions from geroscience for the genetics of age-related diseases. *PLoS Genetics*. 2016; 12 (11): e1006399.
 107. Franceschi C., Garagnani P., Vitale G., Capri M., Salvioli S. Inflammaging and 'Garb-aging'. *Trends in Endocrinology and Metabolism: TEM*. 2017; 28 (3): 199-212.
 108. Xia S., Zhang X., Zheng S., Khanabdali R., Kalionis B., Wu J., et al. An update on inflamm-aging: mechanisms, prevention, and treatment. *Journal of Immunology Research*. 2016; 2016: 8426874.
 109. Ozaki E., Campbell M., Doyle SL. Targeting the NLRP3 inflammasome in chronic inflammatory diseases: current perspectives. *Journal of Inflammation Research*. 2015; 8: 15-27.
 110. Ferrante AW. Jr. Macrophages, fat, and the emergence of immunometabolism. *The Journal of Clinical Investigation*. 2013; 123 (12): 4992-3.
 111. Lee YH., Thacker RI., Hall BE., Kong R., Granneman JG. Exploring the activated adipogenic niche: interactions of macrophages and adipocyte progenitors. *Cell Cycle (Gerogetown, Tex.)*. 2014; 13 (2): 184-90.
 112. Lumeng CN., Liu J., Geletka L., Delaney C., Delproposto J., Desai A., [et al.] Aging is associated with an increase in T cells and inflammatory macrophages in visceral adipose tissue. *Journal of Immunology (Baltimore, MD.: 1950)*. 2011; 187 (12): 6208-16.
 113. Oishi Y. Manabe I. Macrophages in age-related chronic inflammatory diseases. *NPJ Aging and Mechanisms of Disease*. 2016; 2: 16018.
 114. Spite M., Hellman J., Tang Y., Mathis SP., Kosuri M., Bhatnagar A., et al. Deficiency of the leukotriene B4 receptor, BLT-1, protects against systemic

- insulin resistance in diet-induced obesity. *Journal of Immunology* (Baltimore, MD.: 1950). 2011; 187 (4): 1942-9.
115. Mansuy-Aubert V., Zhou QL., Xie X., Gong Z., Huang JY., Khan AR., et al. Imbalance between neutrophil elastase and its inhibitor α 1-antitrypsin in obesity alters insulin sensitivity, inflammation, and energy expenditure. *Cell Metabolism*. 2013; 17 (4): 534-48.
116. Soehnlein O., Steffens S., Hidalgo A., Weber C. Neutrophils as protagonists and targets in chronic inflammation. *Nature Reviews. Immunology*. 2017; 17 (4): 248-61.
117. Cochain C., Zerneck A. Macrophages and immune cells in atherosclerosis: recent advances and novel concepts. *Basic Research in Cardiology*. 2015; 110 (4): 34.
118. Bobryshev YV., Ivanova EA., Chistiakov DA., Nikiforov NG., Orekhov AN. Macrophages and their role in atherosclerosis: pathophysiology and transcriptome analysis. *BioMed Research International*. 2016; 2016: 9582430.
119. Warnatsch A., Ioannou M., Wang Q., Papayannopoulos V. Inflammation. Neutrophil extracellular traps license macrophages for cytokine production in atherosclerosis. *Science (New York, N.Y.)*. 2015; 349 (6245): 316-20.
120. Fougere B., Boulanger E., Nourhashemi F., Guyonnet S., Cesari M. Chronic Inflammation: Accelerator of Biological Aging. *The journals of gerontology. Series A, Biological sciences and medical sciences*. 2017; 72(9): 1218-25.
121. Puthuchery ZA., Rawal J., McPhail M., et al. Acute skeletal muscle wasting in critical illness. *JAMA*. 2013; 310: 1591–600.
122. Zoico E., Corzato F., Bambace C., et al. Myosteatorsis and myofibrosis: relationship with aging, inflammation and insulin resistance. *Archives of Gerontology and Geriatrics*. 2013; 57: 411–6.

123. Ahmed T., Haboubi N. Assessment and management of nutrition in older people and its importance to health. *Clinical Interventions in Aging*. 2010; 5: 207–16.
124. Koyama A., O'Brien J., Weuve J., Blacker D., Metti AL., Yaffe K. The role of peripheral inflammatory markers in dementia and Alzheimer's disease: a meta-analysis. *The journals of gerontology. Series A, Biological sciences and medical sciences*. 2013; 68: 433–40.
125. Chi GC., Fitzpatrick AL., Sharma M., Jenny NS., Lopez OL., DeKosky ST. Inflammatory biomarkers predict domain-specific cognitive decline in older adults. *The journals of gerontology. Series A, Biological sciences and medical sciences*. 2017. 72(6): 796-803.
126. Eagan DE., Gonzales MM., Tarumi T., Tanaka H., Stautberg S., Haley AP. Elevated serum C-reactive protein relates to increased cerebral myoinositol levels in middle-aged adults. *Cardiovascular Psychiatry and Neurology*. 2012; 2012: 120540.
127. Szebeni GJ., Vizler C., Kitajka K., Puskas LG. Inflammation and cancer: extra- and intracellular determinants of tumor-associated macrophages as tumor promoters. *Mediators of Inflammation*. 2017; 2017: 9294018.
128. Jackaman C., Tomay F., Duong L., Abdol Razak NB., Pixley FJ., Metharom P., et al. Aging and cancer: the role of macrophages and neutrophils. *Ageing Research Reviews*. 2017; 36: 105-16.
129. Coffelt SB., Kersten K., Doornebal CW., Weiden J., Vrijland K., Hau CS., et al. IL-17-producing $\gamma\delta$ T cells and neutrophils conspire to promote breast cancer metastasis. *Nature*. 2015; 522 (7556): 345-8.
130. Finisguerra V., Di Conza G., Di Matteo M., Serneels J., Costa S., Thompson AA., et al. MET is required for the recruitment of anti-tumoural neutrophils. *Nature*. 2015; 522 (7556): 349-53.
131. Fridlender ZG., Sun J., Kim S., Kapoor V., Cheng G., Ling L., et al. Polarization of tumor-associated neutrophil phenotype by TGF-beta: "N1" versus "N2" TAN. *Cancer Cell*. 2009; 16 (3): 183-94.

132. Ma S., Xie N., Li W., Yuan B., Shi Y., Wang Y. Immunobiology of mesenchymal stem cells. *Cell Death and Differentiation*. 2014; 21 (2): 216–25.
133. Friedenstein AJ., Chailakhjan RK., Lalykina KS. The development of fibroblast colonies in monolayer cultures of guinea-pig bone marrow and spleen cells. *Cell and Tissue Kinetics*. 1970; 3 (4): 393-403.
134. Mo M., Wang S., Zhou Y., Li H., Wu Y. Mesenchymal stem cell subpopulations: phenotype, property and therapeutic potential. *Cellular and Molecular Life Sciences: CMLS*. 2016; 73 (17): 3311-21
135. Corselli M., Chen CW., Crisan M., Lazzari L., Peault B. Perivascular ancestors of adult multipotent stem cells. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*. 2010; 30 (6): 1104-9.
136. Crisan M., Corselli M., Chen WC., Peault B. Perivascular cells for regenerative medicine. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*. 2012; 16 (12): 2851-60.
137. Volarevic V., Gazdic M., Simovic Markovic B., Jovicic N., Djonov V., Arsenijevic N. Mesenchymal stem cell-derived factors: immuno-modulatory effects and therapeutic potential. *Biofactors*. 2017; 43 (5): 633-44.
138. Spees JL., Lee RH., Gregory CA. Mechanisms of mesenchymal stem/stromal cell function. *Stem Cell Research & Therapy*. 2016; 7 (1): 125.
139. Gazdic M., Volarevic V., Arsenijevic N., Stojkovic M. Mesenchymal stem cells: a friend or foe in immune-mediated diseases. *Stem Cell Reviews*. 2015; 11 (2): 280-7.
140. Carty F., Mahon BP., English K. The influence of macrophages on mesenchymal stromal cell therapy: passive or aggressive agents? *Clinical and Experimental Immunology*. 2017; 188 (1): 1-11.
141. Braza F., Dirou S., Forest V., Sauzeau V., Hassoun D., Chesne J., et al. Mesenchymal stem cells induce suppressive macrophages through phagocytosis in a mouse model of asthma. *Stem Cells*. 2016; 34 (7): 1836-45.
142. Luk F., de Witte SF., Korevaar SS., Roemeling-van Rhijn M., Franquesa M., Strini T., et al. Inactivated mesenchymal stem cells maintain

- immunomodulatory capacity. *Stem Cells and Development*. 2016; 25 (18): 1342-54.
143. Eggenhofer E., Luk F., Dahlke MH., Hoogduijn MJ. The life and fate of mesenchymal stem cells. *Frontiers in Immunology*. 2014; 5: 148.
144. Selleri S., Bifsha P., Civini S., Pacelli C., Dieng MM., Lemieux W., et al. Human mesenchymal stromal cell-secreted lactate induces M2-macrophage differentiation by metabolic reprogramming. *Oncotarget*. 2016; 7 (21): 30193-210.
145. Zhang QZ., Su WR., Shi SH., Wilder-Smith P., Xiang AP., Wong A., et al. Human gingiva-derived mesenchymal stem cells elicit polarization of m2 macrophages and enhance cutaneous wound healing. *Stem Cells*. 2010; 28 (10): 1856-68.
146. Li N., Hua J. Interactions between mesenchymal stem cells and the immune system. *Cellular and Molecular Life Sciences: CMLS*. 2017; 74 (13): 2345-60.
147. Ullah I., Subbarao, Rho GJ. Human mesenchymal stem cells - current trends and future prospective. *Bioscience Reports*. 2015; 35 (2): e00191.
148. Wang F., Yasuhara T., Shingo T., Kameda M., Tajiri N., Yuan WJ., et al. Intravenous administration of mesenchymal stem cells exerts therapeutic effects on parkinsonian model of rats: focusing on neuroprotective effects of stromal cell-derived factor-1alpha. *BMC Neuroscience*. 2010; 11: 52.
149. Danielyan L., Beer-Hammer S., Stolzing A., Schafer R., Siegel G., Fabian C., et al. Intranasal delivery of bone marrow-derived mesenchymal stem cells, macrophages, and microglia to the brain in mouse models of Alzheimer's and Parkinson's disease. *Cell Transplantation*. 2014; 23 (Suppl 1): S123-39.
150. Ma T., Gong K., Ao Q., Yan Y., Song B., Huang H., et al. Intracerebral transplantation of adipose-derived mesenchymal stem cells alternatively activates microglia and ameliorates neuropathological deficits in Alzheimer's disease mice. *Cell Transplantation*. 2013; 22. (Suppl 1): S113-26.

151. Shin JY., Park HJ., Kim HN., Oh SH., Bae JS., Ha HJ., et al. Mesenchymal stem cells enhance autophagy and increase β -amyloid clearance in Alzheimer disease models. *Autophagy*. 2014; 10 (1): 32-44.
152. Gonzalez MA., Gonzalez-Rey E., Rico L., Buscher D., Delgado M. Treatment of experimental arthritis by inducing immune tolerance with human adipose-derived mesenchymal stem cells. *Arthritis and Rheumatism*. 2009; 60 (4): 1006-19.
153. Prabakar KR., Domínguez-Bendala J., Molano RD., Pileggi A., Villate S., Ricordi C., et al. Generation of glucose-responsive, insulin-producing cells from human umbilical cord blood-derived mesenchymal stem cells. *Cell Transplantation*. 2012; 21 (6): 1321-39.
154. Unsal IO., Ginis Z., Pinarli FA., Albayrak A., Cakal E., Sahin M., et al. Comparison of therapeutic characteristics of islet cell transplantation simultaneous with pancreatic mesenchymal stem cell transplantation in rats with Type 1 diabetes mellitus. *Stem Cell Reviews*. 2015; 11 (3): 526-32.
155. Roura S., Bagó JR., Soler-Botija C., Pujal JM., Galvez-Monton C., Prat-Vidal C., et al. Human umbilical cord blood-derived mesenchymal stem cells promote vascular growth in vivo. *PLoS One*. 2012; 7 (11): e49447.
156. Kang BJ., Kim H., Lee SK., Kim J., Shen Y., Jung S., et al. Umbilical-cord-blood-derived mesenchymal stem cells seeded onto fibronectin-immobilized polycaprolactone nanofiber improve cardiac function. *Acta Biomaterialia*. 2014; 10 (7): 3007-17.
157. Firinci F., Karaman M., Baran Y., Bagriyanik A., Ayyildiz ZA., Kiray M., et al. Mesenchymal stem cells ameliorate the histopathological changes in a murine model of chronic asthma. *International Immunopharmacology*. 2011; 11 (8): 1120-6.
158. Oh DY., Cui P., Hosseini H., Mosse J., Toh BH., Chan J. Potently immunosuppressive 5-fluorouracil-resistant mesenchymal stromal cells completely remit an experimental autoimmune disease. *Journal of Immunology (Baltimore, MD. : 1950)*. 2012; 188 (5): 2207-17.

159. Gao F., Chiu SM., Motan DA., Zhang Z., Chen L., Ji HL., et al. Mesenchymal stem cells and immunomodulation: current status and future prospects. *Cell Death & Disease*. 2016; 7: e2062.
160. Pérez-Simon JA., López-Villar O., Andreu EJ., Rifon J., Muntion S., Diez Campelo M., et al. Mesenchymal stem cells expanded in vitro with human serum for the treatment of acute and chronic graft-versus-host disease: results of a phase I/II clinical trial. *Haematologica*. 2011; 96 (7): 1072-6.
161. Baron F., Lechanteur C., Willems E., Bruck F., Baudoux E., Seidel L., et al. Cotransplantation of mesenchymal stem cells might prevent death from graft-versus-host disease (GVHD) without abrogating graft-versus-tumor effects after HLA-mismatched allogeneic transplantation following nonmyeloablative conditioning. *Biology of Blood and Marrow Transplantation*. 2010; 16 (6): 838-47.
162. Arima N., Nakamura F., Fukunaga A., Hirata H., Machida H., Kouno S., et al. Single intra-arterial injection of mesenchymal stromal cells for treatment of steroid-refractory acute graft-versus-host disease: a pilot study. *Cytherapy*. 2010; 12 (2): 265-8.
163. Connick P., Kolappan M., Crawley C., Webber DJ., Patani R., Michell AW., et al. Autologous mesenchymal stem cells for the treatment of secondary progressive multiple sclerosis: an open-label phase 2a proof-of-concept study. *The Lancet. Neurology*. 2012; 11 (2): 150-6.
164. Wang D., Li J., Zhang Y., Zhang M., Chen J., Li X., et al. Umbilical cord mesenchymal stem cell transplantation in active and refractory systemic lupus erythematosus: a multicenter clinical study. *Arthritis Research & Therapy*. 2014; 16 (2): R79.
165. Lu D., Chen B., Liang Z., Deng W., Jiang Y., Li S., et al. Comparison of bone marrow mesenchymal stem cells with bone marrow-derived mononuclear cells for treatment of diabetic critical limb ischemia and foot ulcer: a double-blind, randomized, controlled trial. *Diabetes Research and Clinical Practice*. 2011; 92 (1): 26-36.

166. Ciccocioppo R., Bernardo ME., Sgarella A., Maccario R., Avanzini MA., Ubezio C., et al. Autologous bone marrow-derived mesenchymal stromal cells in the treatment of fistulising Crohn's disease. *Gut*. 2011; 60 (6): 788-98.
167. Perico N., Casiraghi F., Gotti E., Introna M., Todeschini M., Cavinato RA., et al. Mesenchymal stromal cells and kidney transplantation: pretransplant infusion protects from graft dysfunction while fostering immunoregulation. *Transplant International*. 2013; 26 (9): 867-78.
168. El-Ansary M., Abdel-Aziz I., Mogawer S., Abdel-Hamid S., Hammam O., Teaema S., et al. Phase II trial: undifferentiated versus differentiated autologous mesenchymal stem cells transplantation in Egyptian patients with HCV induced liver cirrhosis. *Stem Cell Reviews*. 2012; 8 (3): 972-81.
169. Goncalves R., Mosser DM. The isolation and characterization of murine macrophages. *Current Protocols in Immunology*. 2015; 111: 14.1.1–14.1.16.
170. Zhang X., Goncalves R., Mosser DM. The isolation and characterization of murine macrophages. *Current Protocols in Immunology*. 2008; 14: 14.1.
171. Inaba K., Inaba M., Deguchi M., Hagi K., Yasumizu R., Ikehara S., et al. Granulocytes, macrophages, and dendritic cells arise from a common major histocompatibility complex class II negative progenitor in mouse bone marrow. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1993; 90: 3038-42.
172. Mocsai A., Zhang H., Jakus Z., Kitaura J., Kawakami T., Lowell CA. G-protein–coupled receptor signaling in Syk-deficient neutrophils and mast cells. *Blood*. 2003; 101 (10): 4155-63.
173. Woo JM., Shin DY., Lee SJ., Joe Y., Zheng M., Yim JH., et al. Curcumin protects retinal pigment epithelial cells against oxidative stress via induction of heme oxygenase-1 expression and reduction of reactive oxygen. *Molecular Vision*. 2012; 18: 901-8.
174. Cantinieaux B., Hariga C., Courtoy P., Hupin J., Fondu P. *Staphylococcus aureus* phagocytosis. A new cytofluorometric method using

- FITC and paraformaldehyde. *Journal of Immunological Methods*. 1989; 121 (2): 203-8.
175. Reiner NE., editor. *Macrophages and dendritic cells. Methods and Protocols*. New York: Humana Press; 2009. 368 p.
176. Garrod KR., Cahalan MD. Murine skin transplantation. *Journal of Visualized Experiments*. 2008; 11: 634.
177. Bunster E., Meyer RK. An improved method of parabiosis. *The Anatomical Record*. 1933; 57 (4): 339-43.
178. Silva MT., Correia-Neves M. Neutrophils and macrophages: the main partners of phagocyte cell systems. *Frontiers in Immunology*. 2012; 3: 174.
179. Silva MT. When two is better than one: macrophages and neutrophils work in concert in innate immunity as complementary and cooperative partners of a myeloid phagocyte system. *Journal of Leukocyte Biology*. 2010; 87 (1): 93-106.
180. Linehan E., Dombrowski Y., Snoddy R., Fallon PG., Kissenpfennig A., Fitzgerald DC. Aging impairs peritoneal but not bone marrow-derived macrophage phagocytosis. *Aging Cell*. 2014; 13 (4): 699-708.
181. Shi C., Pamer EG. Monocyte recruitment during infection and inflammation. *Nature Reviews. Immunology*. 2011; 11 (11): 762-74.
182. Bain CC., Mowat AM. The monocyte-macrophage axis in the intestine. *Cellular Immunology*. 2014; 291 (1-2): 41-8.
183. Malissen B., Tamoutounour S., Henri S. The origins and functions of dendritic cells and macrophages in the skin. *Nature Reviews. Immunology*. 2014; 14 (6): 417-28.
184. 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.
185. Epelman S. Origin and functions of tissue macrophages. *Immunity*. 2014; 41 (1): 21-35.

186. Hume DA., Mabbot N., Raza S., Freeman TC. Can DCs be distinguished from macrophages by molecular signatures? *Nature immunology*. 2013; 14 (3): 187-9.
187. Cassado AA., D'Império Lima MR., Bortoluci KR. Revisiting mouse peritoneal macrophages: heterogeneity, development, and function. *Frontiers in Immunology*. 2015; 6: 225.
188. 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.
189. Cecilio CA., Costa EH., Simioni PU., Gabriel DL., Tamashiro WM. Aging alters the production of iNOS, arginase and cytokines in murine macrophages. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*. 2011; 44 (7): 671-81.
190. Kohut ML., Senchina DS., Madden KS., Martin AE., Felten DL., Moynihan JA. Age effects on macrophage function vary by tissue site, nature of stimulant, and exercise behavior. *Experimental Gerontology*. 2004; 39 (9): 1347-60.
191. Vida C., de Toda IM., Cruces J., Garrido A., Gonzales-Sanchez M., De la Fuente M. Role of macrophages in age-related oxidative stress and lipofuscin accumulation in mice. *Redox Biology*. 2017; 12: 423-37.
192. Ding A., Hwang S., Schwab R. Effect of aging on murine macrophages. Diminished response to IFN-gamma for enhanced oxidative metabolism. *Journal of Immunology (Baltimore, MD. : 1950)*. 1994; 153 (5): 2146-52.
193. Pavlou S., Wang L., Xu H., Chen M. Higher phagocytic activity of thioglycollate-elicited peritoneal macrophages is related to metabolic status of the cells. *Journal of Inflammation (London, England)*. 2017; 14: 4.
194. Manskikh VN. Aging and respiratory infections in laboratory animals. *Advances in Gerontology*. 2015; 5 (1): 39-44.

195. Garbi N., Lambrecht BN. Location, function, and ontogeny of pulmonary macrophages during the steady state. *Pflugers Archiv: European journal of physiology*. 2017; 469 (3-4): 561-72.
196. 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.
197. Tasat DR., Mancuso R., O'Connor S., Molinari B. Age-dependent change in reactive oxygen species and nitric oxide generation by rat alveolar macrophages. *Aging Cell*. 2003; 2: 159-64.
198. Wong CK., Smith CA., Sakamoto K., Kaminski N., Koff JL., Goldstein DR. Aging impairs alveolar macrophage phagocytosis and increases influenza-induced mortality in mice. *Journal of Immunology (Baltimore, MD. : 1950)*. 2017; 199 (3): 1060-8.
199. Kelley JL., Ozment TR., Li C., Schweitzer JB., Williams DL. Scavenger receptor-A (CD204): a two-edged sword in health and disease. *Critical Reviews in Immunology*. 2014; 34 (3): 241-61.
200. Hu B., Sonstein J., Christensen PJ., Punturieri A., Curtis JL. Deficient in vitro and in vivo phagocytosis of apoptotic T cells by resident murine alveolar macrophages. *Journal of Immunology (Baltimore, MD.: 1950)*. 2000; 165(4): 2124-33.
201. Karagianni AE., Kapetanovic R., Summers KM., McGorum BC., Hume DA., Pirie RS. Comparative transcriptome analysis of equine alveolar macrophages. *Equine veterinary journal*. 2017; 49(3): 375-82.
202. Bronte V., Pittet MJ. The spleen in local and systemic regulation of immunity. *Immunity*. 2013; 39 (5): 806-18.
203. Inra CN., Zhou BO., Acar M., Murphy MM., Richardson J., Zhao Z., et al. A perisinusoidal niche for extramedullary haematopoiesis in the spleen. *Nature*. 2015; 527 (7579): 466-71.
204. Довгий РС., Шитіков ДВ., Пішель ІМ., Опейда ЄВ., Сківка ЛМ. Функціональний стан та метаболічна поляризація макрофагів селезінки

- старих імунізованих мишей. Проблемы старения и долголетия. 2015; 24 (2): 144-52.
205. Rankin SM. The bone marrow: a site of neutrophil clearance. *Journal of Leukocyte Biology*. 2010; 88 (2): 241-51.
206. Strydom N., Rankin SM. Regulation of circulating neutrophil numbers under homeostasis and in disease. *Journal of Innate Immunity*. 2013; 5 (4): 304-14.
207. Yanagihashi Y., Segawa K., Maeda R., Nabeshima YI., Nagata S. Mouse macrophages show different requirements for phosphatidylserine receptor Tim4 in efferocytosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2017; 114 (33): 8800-5.
208. Margaroli C., Tirouvanziam R. Neutrophil plasticity enables the development of pathological microenvironments: implications for cystic fibrosis airway disease. *Molecular and Cellular Pediatrics*. 2016; 3 (1): 38.
209. Deniset JF., Surewaard BG., Lee WY., Kubes P. Splenic Ly6G^{high} mature and Ly6G^{int} immature neutrophils contribute to eradication of *S. pneumoniae*. *The Journal of Experimental Medicine*. 2017; 214 (5): 1333-50.
210. Su YC., Kung LC., Lee CH., Chang WH., Hung CL., Tsao CC., et al. Antimicrobial-resistant bacteremia in the elderly: risk of previous hospitalization. *International Journal of Gerontology*. 2017; 11 (1): 27-30.
211. Verschoor CP., Loukov D., Naidoo A., Puchta A., Johnstone J., Millar J., et al. Circulating TNF and mitochondrial DNA are major determinants of neutrophil phenotype in the advanced-age, frail elderly. *Molecular Immunology*. 2015; 65 (1): 148-56.
212. Sauce D., Dong Y., Campillo-Gimenez L., Casulli S., Bayard C., Autran B., et al. Reduced oxidative burst by primed neutrophils in the elderly individuals is associated with increased levels of the CD16^{bright}/CD62L^{dim} immunosuppressive subset. *The Journals of Gerontology. Series A, Biological Sciences and Medical Sciences*. 2017; 72 (2): 163-72.

213. Fulop T., Larbi A., Douziech N., Fortin C., Guerard KP., Lesur O., et al. Signal transduction and functional changes in neutrophils with aging. *Aging Cell*. 2004; 3 (4): 217-26.
214. Murciano C., Yanez A., O'Connor JE., Gozalbo D., Gil ML. Influence of aging on murine neutrophil and macrophage function against *Candida albicans*. *FEMS Immunology and Medical Microbiology*. 2008; 53 (2): 214-21.
215. Ansari AM., Ahmed AK., Matsangos AE., Lay F., Born LJ., Marti G., et al. Cellular GFP toxicity and immunogenicity: potential confounders in in vivo cell tracking experiments. *Stem Cell Reviews*. 2016; 12 (5): 553-9.
216. Maeda H., Shigoka M., Wang Y., Fu Y., Wesson RN., Lin Q. Disappearance of GFP-positive hepatocytes transplanted into the liver of syngeneic wild-type rats pretreated with retrorsine. *PloS One*. 2014; 9(5): e95880.
217. Pan H., Gazarian A., Dubernard JM., Belot A., Michallet MC., Michallet M. Transplant tolerance induction in newborn infants: mechanisms, advantages, and potential strategies. *Frontiers in Immunology*. 2016; 7: 116.
218. Inoue Y., Konieczny BT., Wagener ME., McKenzie AN., Lakkis FG. Failure to induce neonatal tolerance in mice that lack both IL-4 and IL-13 but not in those that lack IL-4 alone. *Journal of Immunology (Baltimore, MD. : 1950)*. 2001; 167 (2): 1125-8.
219. 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.
220. Matsuno K., Ueta H., Shu Z., Xue-Dong X., Sawanobori Y., Kitazawa Y., et al. The microstructure of secondary lymphoid organs that support immune cell trafficking. *Archives of Histology and Cytology*. 2010; 73 (1): 1-21.
221. Spinetti G., Wang M., Monticone R., Zhang J., Zhao D., Lakatta EG. Rat aortic MCP-1 and its receptor CCR2 increase with age and alter vascular

- smooth muscle cell function. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*. 2004; 24 (8): 1397-402.
222. Donnini A., Argentati K., Mancini R., Smorlesi A., Bartozzi B., Bernardini G., et al. Phenotype, antigen-presenting capacity, and migration of antigen-presenting cells in young and old age. *Experimental Gerontology*. 2002; 37 (8-9): 1097-112.
223. Yang J., Zhang L., Yu C., Yang XF., Wang H. Monocyte and macrophage differentiation: circulation inflammatory monocyte as biomarker for inflammatory diseases. *Biomarker Research*. 2014; 2 (1): 1.
224. Ogino T., Miura S., Komoto S., Hara Y., Hokari R., Tsuzuki Y., et al. Senescence-associated decline of lymphocyte migration in gut-associated lymphoid tissues of rat small intestine. *Mechanisms of Ageing and Development*. 2004; 125 (3): 191-9.
225. Cascabulho CM., Bani Correa C., Cotta-de-Almeida V., Henriques-Pons A. Defective T-lymphocyte migration to muscles in dystrophin-deficient mice. *The American Journal of Pathology*. 2012; 181 (2): 593-604.
226. Plitas G., Rudensky AY. Regulatory T cells: differentiation and function. *Cancer Immunology Research*. 2016; 4 (9): 721-5.
227. Rakebrandt N., Littringer K., Joller N. Regulatory T cells: balancing protection versus pathology. *Swiss Medical Weekly*. 2016; 146: w14343.
228. Liu T., Soong L., Liu G., Konig R., Chopra AK. CD44 expression positively correlates with Foxp3 expression and suppressive function of CD4+ Treg cells. *Biology Direct*. 2009; 4: 40.
229. Zhao L., Sun L., Wang H., Ma H., Liu G., Zhao Y. Changes of CD4+CD25+Foxp3+ regulatory T cells in aged Balb/c mice. *Journal of Leukocyte Biology*. 2007; 81 (6): 1386-94.
230. Lages CS., Suffia I., Velilla PA., Huang B., Warshaw G., Hilderman DA., et al. Functional regulatory T cells accumulate in aged hosts and promote chronic infectious disease reactivation. *Journal of Immunology (Baltimore, MD.: 1950)*. 2008; 181 (3): 1835-48.

231. Luther SA., Bidgol A., Hargreaves DC., Schmidt A., Xu Y., Paniyadi J., et al. Differing activities of homeostatic chemokines CCL19, CCL21, and CXCL12 in lymphocyte and dendritic cell recruitment and lymphoid neogenesis. *Journal of Immunology (Baltimore, MD.: 1950)*. 2002; 169 (1): 424-33.
232. Yi H., Zhao Y. Chemokines, chemokine receptors and CD4+CD25+ regulatory T cells. *Expert Review of Clinical Immunology*. 2007; 3 (3): 343-9.
233. Pishel I., Shytikov D., Orlova T., Peregudov A., Artyuhov I., Butenko G. Accelerated aging versus rejuvenation of the immune system in heterochronic parabiosis. *Rejuvenation Research*. 2012; 15 (2): 239-48.
234. Cai Y., Liu T., Fang F., Xiong C., Shen S. Comparisons of mouse mesenchymal stem cells in primary adherent culture of compact bone fragments and whole bone marrow. *Stem Cells International*. 2015; 2015: 708906.
235. Chen Ya., Chen Y., Yin D., Wang Y., Liu Z., An N., et al. The Sca-1+ mesenchymal stromal cells modulate macrophage commitment and function. *Turkish Journal of Biology*. 2016; 40: 473-83.
236. Barron L., Smith AM., El Kasmi KC., Qualls JE., Huang X., Cheever A., et al. Role of arginase 1 from myeloid cells in th2-dominated lung inflammation. *PLoS One*. 2013; 8 (4): e61961.
237. Shin W., Berkowitz DE., Ryoo S. Increased arginase II activity contributes to endothelial dysfunction through endothelial nitric oxide synthase uncoupling in aged mice. *Experimental & Molecular Medicine*. 2012; 44: 594-602.
238. Vasandan AB., Jahnavi S., Shashank C., Prasad P., Kumar A., Prasanna SJ. Human mesenchymal stem cells program macrophage plasticity by altering their metabolic status via a PGE2-dependent mechanism. *Scientific Reports*. 2016; 6: 38308.

239. Kim J., Hematti P. Mesenchymal stem cell-educated macrophages: a novel type of alternatively activated macrophages. *Experimental Hematology*. 2009; 37 (12): 1445-53.
240. Tan HY., Wang N., Li S., Hong M., Wang X., Feng Y. The reactive oxygen species in macrophage polarization: reflecting its dual role in progression and treatment of human diseases. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*. 2016; 2016: 2795090.
241. Hu Y., Qin C., Zheng G., Lai D., Tao H., Zhang Y., et al. Mesenchymal stem cell-educated macrophages ameliorate LPS-induced systemic response. *Mediators of Inflammation*. 2016; 2016: 3735452.
242. Bogdan C. Nitric oxide synthase in innate and adaptive immunity: an update. *Trends in Immunology*. 2015; 36 (3): 161-78.
243. Gordon S., Plüddemann A. Tissue macrophages: heterogeneity and functions. *BMC Biology*. 2017; 15 (1): 53.
244. Eggenhofer E., Hoogduijn MJ. Mesenchymal stem cell-educated macrophages. *Transplantation Research*. 2012; 1: 12.
245. Wang JC., Bennett M. Aging and atherosclerosis: mechanisms, functional consequences, and potential therapeutics for cellular senescence. *Circulation Research*. 2012; 111 (2): 245-59.
246. Kalyani RR., Egan JM. Diabetes and altered glucose metabolism with aging. *Endocrinology and Metabolism Clinics of North America*. 2013; 42 (2): 333-47.
247. Kasraie S., Werfel T. Role of macrophages in the pathogenesis of atopic dermatitis. *Mediators of Inflammation*. 2013; 2013: 942375.
248. Wang Y., Wehling-Henricks M., Samengo G., Tidball JG. Increases of M2a macrophages and fibrosis in aging muscle are influenced by bone marrow aging and negatively regulated by muscle-derived nitric oxide. *Aging Cell*. 2015; 14 (4): 678-88.
249. Schmidt A., Zhang XM., Joshi RN., Iqbal S., Wahlund C., Gabrielsson S., et al. Human macrophages induce CD4(+)Foxp3(+) regulatory T cells via

binding and re-release of TGF- β . *Immunology and Cell Biology*. 2016; 94 (8): 747-62.

СПИСОК ОПУБЛІКОВАНИХ ПРАЦЬ ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ

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.

1. 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.
2. 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.
3. 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.
4. Довгий РС., Шитіков ДВ., Пішель ІМ., Опейда ЄВ., Сківка ЛМ. Функціональний стан та метаболічна поляризація макрофагів селезінки старих імунізованих мишей. *Проблемы старения и долголетия*. 2015; 24 (2): 144-52.
5. 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.

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).