

Сазонов С.В.

МОРФОГЕНЕТИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА ЛИМФОИДНЫХ КЛЕТОК СЕЛЕЗЕНКИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫХ ЖИВОТНЫХ ПРИ СТАРЕНИИ

ГАУЗ СО «Институт медицинских клеточных технологий», г. Екатеринбург.
Российская Федерация

ФГБОУ ВО Уральский государственный медицинский
университет, г. Екатеринбург, Российская Федерация

Регуляция клеточной пролиферации в органах осуществляется с помощью сложной иерархической системы, в которой выделяют внутриклеточный, межклеточный, внутритканевой, межтканевой и организменные уровни [1]. На уровне целого организма эти процессы находятся под контролем основных его регулирующих систем: гуморальной, нервной и иммунной. До сих пор определенная роль в регуляции клеточного деления в органах и тканях отводится нервной и эндокринной системам, представляющих из себя системы регуляции функций, из которых как следствие вытекает и формообразующая регуляция, не сводимая к функциональной. В тоже время, показано, что денервация органов или изменение уровней содержания гормонов как в центральных, так и периферических эндокринных органах не отменяют развитие регенераторных процессов в тканях, а оказывают влияние только на темпы и масштабы их проявления через изменение активности метаболических процессов в клетках. Являясь важнейшей и филогенетически более древней функциональной частью иммунной системы, чем та, которая обеспечивает развитие гуморального иммунитета и образование антител, морфогенетическая функция лимфоцитов осуществляет регуляцию пролиферативных процессов в организме [2-6]. В норме лимфоидная регуляция означает своевременную стимуляцию и торможение пролиферации клеток любой ткани, обеспечивая таким образом постоянство клеточной численности и анатомической целостности всех органов и тканей в процессе физиологической и репаративной регенерации. Морфогенетическая функция лимфоидных клеток обеспечивается путем реализации двухстадийной (двухфазной) программы регуляции пролиферации и дифференцировки клеток их тканей-мишеней, являясь при этом постоянной составляющей также и иммунных реакций и обеспечивая пролиферацию иммунокомпетентных клеток как при гуморальном, так и при клеточном иммунитете. Морфогенетическая функция лимфоидных клеток имеет ряд особенностей и закономерностей своего действия. В частности, морфогенетической функции

лимфоидных клеток свойственна преимущественная органоспецифичность. Это означает, что при адоптивном переносе лимфоидных клеток они в организме реципиента обязательно влияют на пролиферацию клеток органа, гомологичного органу донора, подвергнутому или иному повреждающему воздействию (например, оперативному вмешательству) или любому другому воздействию, активирующему Т-клеточное звено иммунной системы [2, 4]. При этом следует отметить, что реакция пролиферативной активности лимфоидных клеток реципиента всегда развивается в направлении, соответствующем перенесенному сигналу. В действии активированных регенерационным процессом лимфоидных клеток так же отмечается двухфазность. Сначала действуют лимфоциты, обладающие свойством стимулировать пролиферацию клеток органа-мишени, а затем, на высоте пролиферации, появляются лимфоциты, обладающие свойством тормозить клеточное деление в указанном органе. Эти лимфоциты не препятствуют завершению митотического цикла в клетках, вступивших в него, но препятствуют вступлению в цикл деления новых клеток. Тем самым они способствуют завершению пролиферативной волны и останавливают восстановительный процесс, предотвращая гиперрегенерацию. Таким образом, лимфоциты обеспечивают и начало, и завершение регенерационного процесса [2]. Функцию стимуляции и функцию ингибирования, осуществляют разные популяции Т-лимфоцитов со свойствами Т-хелперов или Т-супрессоров [7]. Активированные лимфоциты со стимулирующими способностями индуцируют у реципиента модус ускоренной пролиферации, характерной для регенерационных процессов, однако нужно учитывать, что все описанные процессы можно отследить лишь в сингенной системе.

Эксперименты, проведенные на мышах линии MRL, лишенных Т-клеток (исследования проведены в лаборатории проф. Ellen Heber-Katz) показали практически неограниченные регенераторные способности у этой линии мышей на фоне их более быстрого старения. На фоне увеличения числа Т-лимфоцитов в крови молодых MRL-мышей с возрастом они теряют способность к полноценной регенерации и наоборот, блокируя Т-клетки в крови взрослых мышей иных линий можно добиться стимуляции регенераторных процессов.

В настоящее время установлено, что старение организма протекает на всех уровнях его организации, в том числе и на клеточном. После прохождения клетками митотического цикла, периодов роста, дифференцировки и осуществления ими специфических функций жизненный цикл заканчивается их старением, за которым, в конечном счете, наступает разрушение и гибель [8]. При этом процессы, определяющие старение, неразрывно связаны с противоположно направленным процессом — восстановлением утраченных и поврежденных структур, или клеточной регенерацией. Единство этих двух явлений, по-видимому, и определяет исход жизненного цикла клетки,

а также интерес исследователей к клеточному уровню развития возрастных изменений регенераторных процессов в организме. Степень и форма проявления восстановительной способности различных внутренних органов млекопитающих очень вариабельны, что обусловлено различиями в морфофункциональных особенностях развивающихся органов, которые и определяют исход восстановительных процессов. Проведенные под руководством член.-корр. РАН проф. А.П. Ястребова исследования позволили определить особенности состояния пролиферативных процессов в тканях различных органов при возрастной инволюции организма [1, 8]. Так было установлено, что активность процессов клеточного деления при старении организма снижается в лимфоидной ткани тимуса, лимфатических узлов, селезенки, миелиной ткани костного мозга, эпителии тонкой кишки. Все перечисленные ткани относятся к одной группе — с высокой скоростью клеточного обновления и используют на клеточном уровне один основной способ регенерации — митотическое деление. При возрастной инволюции во всех органах обнаружено снижение активности пролиферативных процессов, что связано с уменьшением величины пролиферативного пула и митотической активности клеток за счет замедления их выхода в митотический цикл [9-12]. При изучении особенностей состояния пролиферативных процессов в органах с низкой скоростью клеточного обновления (печень, легкие, почки, шитовидная железа) были обнаружены другие изменения в состоянии пролиферативных процессов. В первую очередь в этих органах, при использовании метода проточной ДНК-цитометрии, не обнаружено достоверного снижения числа ДНК-синтезирующих клеток в тканях органов старых животных. В тоже время, одновременно в органах увеличивается доля полиплоидных клеток, происходит накопление клеток в премитотическом периоде цикла, за счет чего увеличивается и пролиферативный клеточный пул. Анализ полученных результатов позволяет говорить о связи процессов синтеза ДНК в тканях старых животных не с клеточным делением, так как не обнаруживается соответствующий уровень митотической активности, а с процессами эндомитоза, что сопровождается не делением клеток, а их полиплоидизацией [9]. Таким образом, если в тканях органов с быстрым клеточным обновлением при старении организма основным механизмом инволюции является подавление активности пролиферативных процессов за счет торможения вступления клеток в митотический цикл и снижения числа клеток-предшественников, то в органах с медленным клеточным обновлением на фоне торможения процессов клеточного деления происходит стимуляция эндомитоза, что сопровождается развитием полиплоидизации клеток [11,12].

В экспериментах, проведенных проф. А.Г. Бабаевой в условиях относительного дефицита лимфоидной ткани (тимэктомия, спленэктомия, общее облучение, введение животным антилимфоцитарных сывороток), отмечается угнетение восстановительных процессов. Однако при транспланта-

щин этим животным лимфоидных клеток степень угнетения пролиферации снижается [3, 13]. В экспериментах с адаптивным переносом лимфоидных клеток выявлена способность Т-популяции живых лимфоцитов оперированных животных стимулировать процессы пролиферации в тканях одноименных органов доноров. Показано, что такими свойствами обладают в основном Т-лимфоциты селезенки, тогда как тимоциты, Т-лимфоциты костного мозга и лимфатических узлов не способны переносить «пролиферативный стимул». Экспериментальные данные показывают, что первые часы после индукции регенераторных процессов протекают на фоне признаков усиления функции Т-хелперов, а подавление или снижение числа Т-супрессоров приводит к вспышке пролиферативной активности. Вместе с тем, лимфоциты неоперированных доноров не вызывают достоверного усиления пролиферации в модели адаптивного переноса [3, 7, 13]. В нашей лаборатории ранее было показано, что морфогенетическая функция лимфоцитов проявляется не только при регенерации миелоидной, костной тканей, печени, почек, кишечника, кожи, но эти клетки могут приобретать способность к стимуляции пролиферации эритроидного ростка при действии гипоксии на организм [1, 14-20]. В тоже время получены данные, показывающие, что в результате старения организма в нем снижается как общее число Т-лимфоцитов, так и клеток, относящихся к популяции Т-хелперов [21, 22], а также значительно изменяются их свойства [23, 24]. В этой связи интерес представляет изучение изменений морфогенетических свойств этих лимфоцитов у животных в процессе их старения.

В проведенных экспериментах использована модель адаптивного переноса лимфоидных клеток селезенки нефрэктомизированных животных из разных возрастных групп [25]. Исследования выполнены на крысах-самцах линии Вистар зрелого (8-10 месяцев, массой 200-250 г) и старого (19-22 месяца, массой 400-500 г) возраста. Животные содержались в условиях лабораторного вивария на стандартном рационе питания. Животных выводили из опыта путем передозировки паров эфира в соответствии с «Международными рекомендациями по проведению медико-биологических исследований с использованием лабораторных животных». Группы животных формировались следующим образом: контрольная группа — модель адаптивного переноса спленоцитов от зрелых животных зрелым; вторая — опытная группа: модель адаптивного переноса лимфоидных клеток от старых — старым животным; третья группа — трансплантация лимфоидных клеток от старых животных — зрелым; четвертая группа — трансплантация лимфоидных клеток от зрелых животных — старым.

Учитывая, что эпителиальная ткань почечных канальцев относится в группу тканей с низким уровнем пролиферативной активности, состояние пролиферативных процессов оценивали с помощью изучения статмокинетического индекса (позволяющего накапливать митозы за определен-

ный период времени) и иммуногистохимическим определением регуляторного белка пролиферации Ki67 (выявляется в ядрах клеток в G1, S и G2 периодах митотического цикла). Морфогенетические свойства клеток селезенки нефрэктомированных животных из разных возрастных групп исследовались через 19 ч. после выполнения односторонней нефрэктомии (донорский интервал). Животных забивали, из селезенки готовили взвесь клеток в среде 199. Все манипуляции по приготовлению суспензии проводили на холоде. Полученная суспензия вводилась внутривенно реципиентам по 400×10^3 клеток на 0,2 кг массы животного. За 8 часов до забоя животные получали внутривенно однократно в дозе 2 мг/кг массы винбластин. Реципиентов забивали через 40, 48 и 56 ч после переноса спленоцитов. Почки фиксировались в формалине, на гистологических срезах производили расчет статмокинетического индекса (СКИ), значения которого выражали в %. Для проведения иммуногистохимических исследований (ИГХ) материал фиксировали в 10% нейтральном формалине не более 24 часов, затем подвергали стандартной гистологической обработке [26]. Демаскировка антигенных детерминант проводилась в микроволновке Pascal (DakoCytomation), условия: 10 мин. при 15 psi (121°C) в Target Retrieval Solution (Dako, S1699). На депарафинизированных срезах с использованием автоматической системы Universal Staining System Autosteiner Dako (Дания) проводили реакции с использованием системы визуализации EnVision+Dual Link System — HRP (Dako, K4061), антигенреактивные клетки контрастировали хромогенным субстратом (3,3-диаминобензидин в буферном растворе — DAB). DAB-позитивные клетки идентифицировали по коричневому окрашиванию их ядер. Оценку ИГХ реакции Ki-67 определяли по процентному отношению числа окрашенных ядер клеток ко всей клеточной популяции и выражали в % [27, 28].

Результаты и их обсуждение

При трансплантации лимфоидных клеток в контрольной группе (зрелые реципиенты и доноры) пик подъема статмокинетического индекса приходится на 48 часов после трансплантации спленоцитов доноров реципиентам (Таблица). В это время СКИ увеличивается в 26,8 раза ($p < 0.001$) по сравнению с предыдущим сроком. В эпителии канальцев обнаруживаются многочисленные митозы, увеличивается число клеток, ядра которых экспрессируют Ki67 (рис. 1). Через 56 часов процессы клеточного деления в почке реципиентов ослабевают, а к 72 часам уже не отличаются от уровня в почках интактных животных соответствующего возраста.

При трансплантации спленоцитов старых животных после проведения им односторонней нефрэктомии старым реципиентам, у последних, во все изученные сроки, не обнаружено достоверного изменения уровня митотической активности в эпителии почечных канальцев (рис. 2).

Таблица
 Статмокинетический индекс в эпителии канальцев почки
 у реципиентов лимфоидных клеток от доноров
 с односторонней нефрэктомией, $M \pm m, \%$,
 где M — среднее арифметическое, m — ошибка среднего

Модель адоптивного переноса	Продолжительность реципиентского интервала, ч.		
	40	48	56
Первая группа (контрольная)	0,4±0,03	10,7±1,64	1,0±0,33
Вторая группа (старые-старые)	0,3±0,04	0,7±0,28	0,6±0,30
Третья группа (старые-зрелые)	0,3±0,07	14,2±1,21	4,8±0,62
Четвертая группа (зрелые-старые)	0,4±0,03	2,8±0,51	2,2±0,45

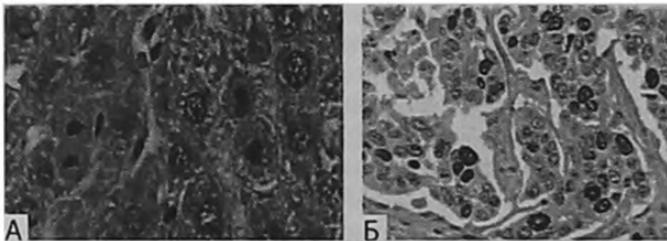


Рис. 1. Извитые канальцы коркового вещества почки крыс контрольной группы. Реципиентский интервал 48 часов. А. — Высокая митотическая активность. Окраска гематоксилином и эозином. Ув. 1200. Б. — Иммуногистохимическое исследование Ki67. Ув. 600.

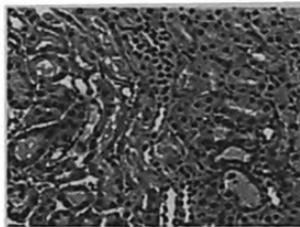


Рис. 2. Извитые канальцы коркового вещества почки крыс второй группы. Реципиентский интервал 48 часов. Низкий уровень митотической активности, значений статмокинетического индекса. Окраска гематоксилином и эозином. Ув. 200.

Трансплантация этих же спленоцитов зрелым животным сопровождается увеличением статмокинетического индекса и уровня экспрессии Ki67 (Таблица, рис. 3) в почечных канальцах в 47,3 раза ($p < 0,001$) с последующим

снижением его уровня к 56 ч. Однако и в этот срок уровень активности процессов клеточного деления в 4,8 раза превышает ($p < 0,001$) уровень соответствующего показателя в почках контрольной группы.

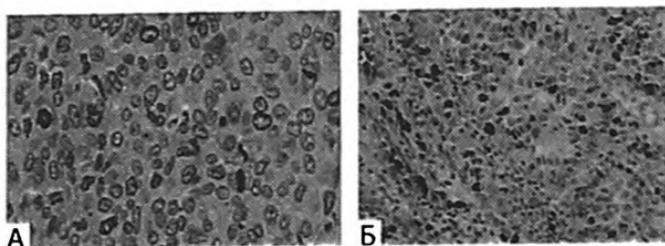


Рис. 3. Извитые канальцы коркового вещества почки крыс третьей группы. Реципиентский интервал 48 часов. А. — высокая митотическая активность. Окраска гематоксилином и эозином. Ув. 900. Б. — увеличение числа клеток, экспрессирующих Ki67. Иммуногистохимическое исследование. Ув. 200.

Адоптивный перенос лимфоидных клеток от зрелых животных к старым также приводит к подъему (в 7 раз; $p < 0,001$) уровня статмокинетического индекса через 48 ч после их трансплантации (Таблица). Активность клеточного деления сохраняется примерно на этом же уровне и через 56 ч, что в 2,2 раза выше ($p < 0,05$) уровня статмокинетического индекса при трансплантации спленоцитов от зрелых зрелым животным, в 3,7 раза ($p < 0,01$) — при трансплантации от старых старым и в 2,2 раза ниже ($p < 0,05$) — при выполнении адоптивного переноса этих же лимфоидных клеток зрелым животным.

Таким образом, использование системы адоптивного переноса позволило выявить особенности проявления морфогенетических свойств лимфоцитов у животных их разных возрастных групп. При трансплантации спленоцитов, полученных от старых доноров старым реципиентам не обнаружено стимуляции пролиферативных процессов в эпителии канальцев почек последних. Подобные изменения в системе адоптивного переноса могут происходить как за счет изменения морфогенетических свойств лимфоидных клеток, так и за счет изменения пролиферативных потенций клеток почечного эпителия или за счет наличия обеих причин одновременно. Перенос этих же спленоцитов зрелым донорам сопровождается проявлением их морфогенетической функции. При этом активность пролиферативных процессов в почках реципиентов оказалась выражена не меньше, чем в контрольной группе. Трансплантация спленоцитов от зрелых доноров старым реципиентам также приводит к проявлению морфогенетических свойств лимфоидных клеток. Однако уровень активности пролиферативных процессов в почках реципиентов оказался значительно ниже, чем в контрольной группе.

Анализ результатов проведенных исследований позволяет сделать основ-

ной вывод — при старении организма снижение уровня пролиферативных процессов на связано с ослаблением морфогенетических свойств лимфоидных клеток, так как последние в полной мере проявляются в организме молодых животных, хотя значительно снижены у старых. При старении в организме снижаются пролиферативные потенции почечной ткани, что проявляется в торможении реализации морфогенетических свойств лимфоцитов зрелых животных непосредственно в паренхиме органа у старых животных.

ЛИТЕРАТУРА

1. Ястребов А.П. Некоторые итоги и перспективы изучения механизмов регенерации тканей при воздействии на организм экстремальных факторов/Очерки экспериментальной патофизиологии.- Екатеринбург: Изд-во «СВ-96». - 1999. - С.13-26.
2. Бабаева А.Г. Иммунология процессов адаптивного роста, пролиферации и их нарушений / А.Г. Бабаева, Е.А. Зотикова. – М.: Наука, 1987. – 207 с.
3. Бабаева А.Г. Единство и противоположность цитогенетической активности лимфоцитов и их антителообразующей функции при восстановительных процессах в органах//Бюллетень экспериментальной биологии и медицины – 1999. – Том 128, №11. – С.484 – 490.
4. Сазонов С.В. Т-лимфоциты – регуляторы активности пролиферации клеток в ткани. Вестник Уральской медицинской академической науки, Екатеринбург, 2007, №1 (15), С. 14-20.
5. Сазонов С.В., Ястребов А.П. Возможности трансплантации лимфоцитов для восстановления регенерации в органах при старении организма. Госпитальный вестник, Екатеринбург, 2006, №4, с.24-29.
6. Ястребов А.П., Гребнев Д.Ю., Маклакова И.Ю., Осипенко А.В., Макеев О.Г., Мешанинов В.Н., Сазонов С.В., Вечкаева И.В., Сырнев В.А. Об участии стволовых клеток в регуляции регенераторных процессов при экстремальных повреждениях. Сборник научных работ «Клеточные технологии – практическому здравоохранению, 2015, с. 108-113.
7. Бляхер М.С., Гуторова Н.М., Федорова И.М. и др. Численность субпопуляций лимфоцитов в селезенке и уровень пролиферации кровяной ткани у мышей при оперативных вмешательствах//Микробиология и иммунология – 1996. – №3. – С.301 – 303.
8. Сазонов С.В. Возрастные особенности состояния регенераторных процессов в тканях/Очерки экспериментальной патофизиологии.- Екатеринбург: Изд-во «СВ-96». - 1999. - С.352-365.
9. Сазонов С.В. Анализ пролиферативных процессов в органах с разными механизмами клеточного обновления при старении организма. Морфология, 2016, 149 (3), С.177.
10. Сазонов С.В. Состояние митотического цикла в клетках почечного эпителия после односторонней нефрэктомии. Сборник научных трудов VIII

Всероссийской конференции по патологии клетки. 11-12 ноября 2010. Москва. С. 210-212.

11. Сазонов С.В. Особенности пролиферативных процессов в тканях с высокой скоростью клеточного обновления при возрастной инволюции организма. Морфология, 2012, Т.141, №3, С. 136.

12. Сазонов С.В., Леонтьев С.Л., Ястребов А.П. Возрастные особенности временных параметров клеточного цикла в эпителиальных клетках паренхиматозных органов у крыс. Сборник научных трудов научной конференции с международным участием: «Актуальные вопросы морфогенеза в норме и патологии», Москва, 6-7 апреля 2016 г. С. 157-158.

13. Babaeva A.G. Recent trends in regeneration research// Life Sci. - N.Y.- Lond., 1989. – Vol.172. -P.121-128.

14. Сазонов С.В., Попов А.М., Лисьих Ю.И., Попугайло М.В. Влияние лимфоцитов на пролиферацию почечного эпителия при гипотермии. Госпитальный вестник, Екатеринбург, 2006, №4, С. 32-38.

15. Сазонов С.В., Шамшурин Е.О., Береснева О.Ю., Курумчина С.Г., Валамина И.Е. Изменение морфогенетических свойств трансплантированных Т-лимфоцитов при старении организма. Материалы Ш Всероссийского симпозиума с международным участием «Актуальные вопросы тканевой и клеточной трансплантологии», Москва, ЦИТО, 25-26 апреля 2007 г.

16. Сазонов С.В., Попов А.М., Лисьих Ю.И., Попугайло М.В. Морфогенетическая активность трансплантированных лимфоидных клеток при гипотермии. Материалы Ш Всероссийского симпозиума с международным участием «Актуальные вопросы тканевой и клеточной трансплантологии», Москва, ЦИТО, 25-26 апреля 2007 г.

17. Сазонов С.В. Морфогенетические свойства лимфоидных клеток при возрастной инволюции организма. Аллергология и иммунология, 2008, Том 9, №3.

18. Сазонов С.В., Ястребов А.П., Леонтьев С.Л. Состояние клеточной регенерации после односторонней нефрэктомии при действии холода на организм. Сборник научных трудов Всероссийской научной конференции «Регенеративная биология и медицина», Москва, 2011, 14.10.2011, С. 136-137.

19. Гребнев Д.Ю., Ястребов А.П., Маклакова И.Ю., Сазонов С.В., Леонтьев С.Л. Сравнительный анализ регенерации эпителия тощей кишки зрелых и старых лабораторных животных в условиях острой кровопотери на фоне трансплантации стволовых клеток. Клеточная трансплантология и тканевая инженерия, 2012, Т.УИ, №2, С. 22-23.

20. Сазонов С.В., Ястребов А.П., Леонтьев С.Л. Влияние трансплантированных Т-лимфоцитов на состояние регенераторных процессов в органах при старении организма. Клеточная трансплантология и тканевая инженерия, 2012, Т.УИ, №2, С. 46.

21. Flaherty D., Wagner C., Gross C. Aging and lymphocyte subsets in the

spleen and peripheral blood of the Sprague-Dawley rat// Immunopharmacol. -1997.- Vol.2. – P.185-195.

22. Haynes L., Linton P.J., Swain S.L. Age-related changes in CD4 T cell of T cell receptor transgenic mice// Mech. Ageing Dev.- 1997.- Vol.93 (1-3). P.95-105.

23. Proust J.J., Quadri R.A., Arbogast A., Phelouzat M. Mecanismes moleculaires du dysfonctionnement lymphocytaire lie a l'age// Pathol.Biol.Paris, 1996. – Vol.44(8). – P. 729-236.

24. Mora J.R., von Andrian U.H. T-cell homing specificity and plasticity: new concepts and future challenges. Trends Immunol. 2016. May; 27 (5) – p. 235-43.

25. Сазонов С.В., Кобышев К.В. Использование адоптивного переноса лимфоидных клеток для стимуляции пролиферативных процессов при возрастной инволюции организма. Цитология, 2011, Т. 53, №9. С.735-736.

26. Сазонов С.В., Бриллиант А.А., Кобышев К.В. Стандартизация иммуногистохимического определения уровня экспрессии Ki-67 в клетках различных тканей. Морфология, 2017, Т.151, №3, С. 100.

27. Сазонов С.В. Определение уровня пролиферации в тканях органов при иммуногистохимическом исследовании Ki-67. Морфология, 2018, Т.153, №3, С. 242.

28. Сазонов С.В., Ястребов А.П. Состояние процессов пролиферации в почечном эпителии после односторонней нефрэктомии. Морфология, 2010, Том 137, №4, С.167.