

УДК 612.67

Г. М. Бутенко, Л. Ф. Андріанова, Т. Л. Єхнева, Н. І. Іванова

ВЗАЄМОВІДНОШЕННЯ МІЖ КЛІТИННИМИ ПОПУЛЯЦІЯМИ, ЩО БЕРУТЬ УЧАСТЬ В ІМУННІЙ ВІДПОВІДІ ПРИ СТАРІННІ

Як відомо, старіння супроводжується змінами розміру й структури лімфоїдних органів, а також виразними функціональними порушеннями імунітету [14]. Але зниження імунної функції при старінні не може бути повністю обгрунтоване лише зміною кількості клітин, що залучаються до імунної реакції. Численні дані вказують на те, що не можна при цьому встановити певного зв'язку між кількістю Т або В лімфоцитів у крові та лімфоїдних органах, з одного боку, та змінами імунної реакції, з іншого [12, 15]. Тому останнім часом значно більшу увагу дослідників привертають зміни, що відбуваються в самих клітинах, та тих міжклітинних взаємовідношеннях і взаємодіях, які можуть статися в лімфоїдній системі при старінні. Зокрема, деякі автори спостерігали зменшення проліферативної активності лімфоцитів при виникненні імунної реакції [11], інші — вказують на падіння допоміжної, або зростання гальмівної активності залежних від тимуса лімфоцитів [5, 7, 9], але трапляються й вказівки на зменшення супресорної функції Т лімфоцитів [10]. Висловлюється також думка про те, що при старінні організму змінюється якісний склад імунокомпетентних клітин, що відбиває звичайний перебіг вікового гістогенезу [8].

Все це обумовило необхідність дослідження ролі деяких ланок розвитку гуморальної імунної відповіді при старінні з позиції взаємовідношення між різноманітними клітинними популяціями, які беруть участь у цій реакції — макрофагами, Т і В лімфоцитами, клітинами імунологічної пам'яті.

Методика досліджень

Досліди проведені на інбредних мишах лінії СВА (розплідник лабораторних тварин «Столбовая») віком 3—5 (молоді дорослі), 9 (дорослі), 17 (старіючі) та 24—29 (старі) місяців. Як основний експериментальний засіб було застосовано реципрокне перенесення клітин в межах сингенної лінії інтактним або смертельно опроміненим реципієнтам при різних комбінаціях віку донора та реципієнта. Переносили перитонеальні макрофаги, клітини селезінки та кісткового мозку. Клітини селезінки вводили в дозі $1 \cdot 10^7$ в хвостову вену через 2—4 год після опромінення кісткового мозку — в дозі $1,5 \cdot 10^7$.

Як антиген були використані еритроцити барана (ЕБ), які вводили внутрішньо або внутріочеревинно в дозі $5 \cdot 10^6$ або $5 \cdot 10^8$ на тварину.

Перитонеальні макрофаги одержували при введенні в черевну порожнину 2,5% крохмального гелю. Через 4 доби після цього вводили 1 мл 3% суспензії ЕБ внутріочеревинно, і через 30 хв одержували навантажені ЕБ макрофаги. Нефагоцитовані ЕБ руйнували осмотичним шоком та видаляли триразовим відмиванням. Потім підраховували кількість поглинутих еритроцитів. Кількість макрофагів від старих і дорослих тварин добирали так, щоб вони містили рівну кількість поглинутих ЕБ ($5-35 \cdot 16^6$). Потім ці клітини вводили інтраперитонеально дорослим реципієнтам і через 5 діб визначали імунну відповідь.

Імунну реакцію досліджували за кількістю антитілоутворювальних клітин (АУК) за методом локального гемолізу в гелі [3, 6].

Опромінення проводилось на апараті РУМ-13 в дозі 850 p при силі опромінення 39 $p/xв$, з фокусною відстанню 40 $см$ і фільтрами $Si-0,5$; $Al-1$. При статистичному аналізі поряд з параметричними критеріями, використані також непараметричні методи [1].

Результати досліджень

Експерименти по переносу навантажених ЕБ макрофагів були проведені за планом рендемізованого блоку з трьох реципієнтів віком 9 місяців, яким були введені (1) макрофаги дорослих донорів (2), макрофаги старих донорів, (3) відповідна кількість вільних еритроцитів без макрофагів. Порівняння результатів проводилось між членами одного блоку. Як видно з табл. 1, спостерігається істотна різниця у відповіді на ЕБ, поглинуті макрофагами старих або дорослих тварин. Водночас не відзначається вірогідної різниці у відповіді на введення вільних ЕБ, або тієї ж їх кількості, але поглинутих макрофагами дорослої тварини. Можливо, це пов'язано з швидким фагоцитозом ЕБ власними макрофагами реципієнта, що веде до зрівняння умов (див. таблицю).

Імунна відповідь дорослих мишей СВА на введення макрофагів дорослих та старих тварин, навантажених однаковою кількістю ЕБ

Статистичні показники	Кількість ПАУК на $1 \cdot 10^7$ клітин селезінки		
	1. Макрофаги дорослих тварин	2. Макрофаги старих тварин	3. Вільні ЕБ
Середнє арифметичне	64,6	20,6	57,2
Середня різниця	$\Delta \bar{X}_{1-2} = -55,3 \pm 17,7$		
	$p_{1-2} < 0,01$	$\Delta \bar{X}_{1-3} = 8,3 \pm 14,2$	$p_{1-3} > 0,1$

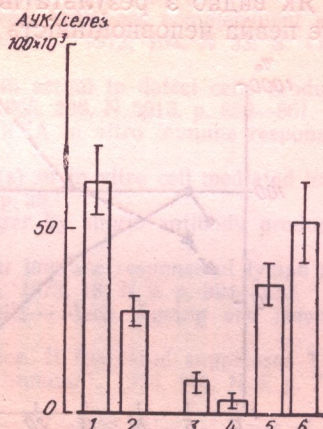
Далі були проведені дослідження по виявленню ролі Т і В лімфоцитів в обмеженні розміру імунної відповіді при старінні. Було встановлено, що додавання клітин кісткового мозку (В лімфоцитів) від молодих мишей старим тваринам одночасно з імунізацією не приводить до збільшення імунної відповіді, що може свідчити про існування лімітуючої ланки серед Т лімфоцитів. Але попереднє, за три дні, введення тієї ж дози антигену — примірування, яке викликає розмноження Т клітин, веде при наступній імунізації до зменшення реакції у молодих тварин і збільшення у старих. Додавання В лімфоцитів у цій ситуації ще більше посилювало імунну відповідь, що можливо, свідчить про існування дефіциту в популяції В лімфоцитів у старих тварин (рис. 1). Крім того, додавання клітин молодого кісткового мозку якимось чином втручається в міжклітинні співвідношення і змінює їх. Так, наприклад, існує чітка негативна кореляція між кількістю АУК і загальним числом клітин селезінки у старих примірованих мишей ($r = -0,592$; $p < 0,01$). У молодих такої кореляції не спостерігається ($r = 0,336$; $p < 0,1$). Після введення молодих клітин кісткового мозку старим примірованим реципієнтам негативна кореляція змінюється на позитивну ($r = 0,611$; $p < 0,005$), тобто, збільшення продукції АУК супроводжується збільшенням і загальної кількості клітин селезінки.

Зниження імунної відповіді у молодих тварин у ранні строки після примірування пояснюють збільшенням продукції Т лімфоцитів-супресорів у цей період [18]. Як видно з рис. 2, це гальмування імунної реакції має виразну залежність від віку. Примірування зменшує реак-

цію у молодих тварин, мало впливає на 17 місячних і значно збільшує у старих, так що вона за своїм розміром майже сягає первинної відповіді молодих мишей. Можливо, цей факт має бути розцінений як наслідок меншого утворення гальмівних Т клітин при старінні. Слід відзначити при цьому, що титри гемолітичних антитіл при первинній відповіді у 3 та 17 місячних мишей значно відрізнялись (відповідно $\log_2 8$ та $\log_2 5$, $p < 0,05$), тоді як у примірованих вони були майже однакові ($\log_2 10$).

Рис. 1. Вплив примірування та додавання клітин кісткового мозку молодих тварин на імунну відповідь до ЕБ мишей СВА 5 та 27 місяців.

- 1 — первинна імунна відповідь мишей віком 5 місяців;
- 2 — імунна відповідь після примірування (5 місячні);
- 3 — первинна імунна відповідь мишей віком 27 місяців;
- 4 — первинна імунна відповідь з додаванням молодих клітин кісткового мозку у тварин віком 27 місяців;
- 5 — імунна відповідь після примірування (27 місячні);
- 6 — імунна відповідь після примірування та додавання молодих клітин кісткового мозку (реципієнти 27 місячні).



і $\log_2 9,5$), при різній кількості АУК селезінки. Можливо, це пояснюється порушенням контролю з боку антитіл за продукцією АУК.

Наступна серія експериментів була присвячена вивченню кількості клітин імунологічної пам'яті при одноразовому введенні антигену. Необхідність такого підходу обумовлена тим, що зв'язане з віком зниження імунної реактивності по-різному відбивається на первинній та вторинній імунній відповіді: зміни первинної реакції протікають більш катастрофічно, тоді як для вторинної реакції вони значно менші. Донорами клітин селезінки у цій групі були миші 3—4 та 24—29 місяців, яким за місяць було введено $5 \cdot 10^6$ або $5 \cdot 10^8$ ЕБ. Вторинна відповідь реєструвалась у реципієнтів за кількістю прямих та непрямих АУК через 6, 7 і 9 діб після переносу $1 \cdot 10^7$ ядерних клітин селезінки донорів разом з $5 \cdot 10^8$ ЕБ. За силою цієї адаптивної вторинної відповіді робили висновок про розмір популяції клітин імунологічної пам'яті у донора. Як це видно з рис. 3, у старих тварин спостерігається зменшення утворення клітин імунологічної пам'яті. Але якщо порівняти цю зміну зі зменшенням первинної продукції АУК (див. схему на рис. 3), то стає очевидним, що при старінні характерний перерозподіл напрямів розвитку імунокомпетентних клітин з утворенням меншої кількості зрілих продуцентів антитіл і значно більшим пулом клітин імунологічної пам'яті.

Обговорення результатів досліджень

Проведені експерименти вказують на те, що навряд чи існує якась відокремлена ланка, зміни якої могли б обумовити всі порушення імунітету при старінні. Зокрема, нам вдалось показати, що такі зміни мають місце і в макрофагах, і в Т та В лімфоцитах, а також при утворенні клітин імунологічної пам'яті. Вивчення властивостей макрофагів викликати імунну відповідь при навантаженні їх антигеном показало, що макрофаги від старих тварин менше стимулюють продукцію АУК. З цього приводу можна висловити декілька припущень. Як відомо, здат-

ність макрофагів викликати імунну відповідь пояснюють тим, що в них тривало зберігаються незруйновані імуногенні частки антигену, які служать сигналом для імунокомпетентних клітин [2], або утворенням імуногенного комплексу антигену та РНК у вигляді суперантигену, який і стає активатором імунокомпетентних клітин [4]. Тому, можливо, причиною зниження реакції може бути як зміна в обробці та зберігання антигену, так і в механізмах передачі інформації імунокомпетентним клітинам. Для цього потрібні далі дослідження.

Як видно з результатів наших досліджень, очевидно, при старінні існує певна неповноцінність Т і В лімфоцитів. Попереднє примірування,

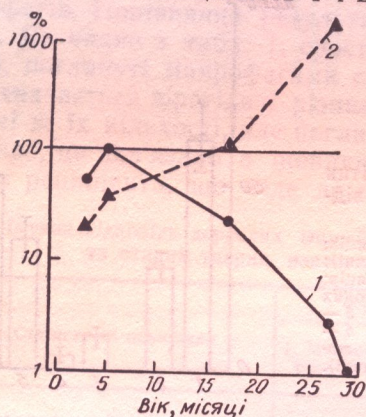


Рис. 2. Вікові зміни первинної імунної відповіді (1—за 100% прийнята реакція в 5 місяців), та впливу примірування (2—за 100% прийнята відповідна первинна імунна відповідь) у мишей СВА, імунізованих ЕБ.

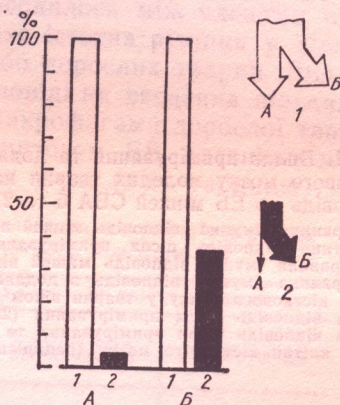


Рис. 3. Зміни кількості АУК (А) та клітин імунологічної пам'яті (Б) в первинній імунній реакції у мишей СВА віком 3—4 (1) та 27—29 місяців. Справа схематичне зображення перерозподілу шляхів утворення відповідних клітин у молодому (1) та старому (2) організмі при первинній імунній реакції.

яке сприяє прискоренню мітотичного поділу, приводить до збільшення Т клітинного пулу у старих організмів, можливо, за рахунок допоміжних, а не супресорних лімфоцитів, як це характерно для молодого віку. Таке явище, очевидно, можна було б використати з практичною метою в разі потреби в імунізації людей похилого та старого віку, для чого необхідно розробити відповідні зміни в схемі введення антигену.

Додавання клітин кісткового мозку молодій тварині, яке при одночасному з антигеном введенні не супроводжувалось будь-яким ефектом в продукції АУК, при введенні після примірування давало досить виразне збільшення реакції, разом зі зміною кореляції між числом ядерних клітин селезінки та АУК. Це може бути вказівкою на те, що введені клітини відіграють не лише замісну роль, але й змінюють міжклітинні регуляторні впливи щодо розмноження та диференціації.

Про порушення клітинних співвідношень при старінні свідчить також нерівномірне зменшення продукції диференційованих первинних АУК та клітин імунологічної пам'яті. Якщо вироблення перших падає при старінні в 20—30 разів, то кількість клітин пам'яті — лише в три рази. Можливо, це є своєрідна компенсація неповноцінності первинної реакції.

Отже, можна висловити думку про те, що падіння імунної реактивності з віком можна пояснити зниженням активності та зміною взаємодії клітин у багатьох ланках, що забезпечують функцію імунітету. Це стосується як діяльності відокремлених клітинних популяцій, так і сис-

теми в цілому. Істотним фактором може бути також комплекс внутрі-системних, а можливо, й надсистемних регуляторних впливів. Всі ці зміни адитивні і, складаючись разом, вони приводять до виразних наслідків, які так чітко проявляються в старому організмі.

Література

1. Гублер Е. В., Генкин А. А. Применение непараметрических критериев статистики в медико-биологических исследованиях. Л., Медицина, 1973. 144 с.
2. Cruchard A., Unanue E. R. Immunogenicite de deux Antigenes completement endocytés par les macrophages.—Schweiz. med. Wochenschr., 1972, 102, N 33, S. 1172—1174.
3. Dresser D. W., Wortis H. H. Use of an antiglobulin serum to detect cells producing antibody with low haemolytic efficiency.—Nature, 1965, 208, N 5013, p. 859—861.
4. Fishman M., Adler F. L., Rice S. G. Macrophage RNA in vitro immune response to phage.—Ann. N. Y. Acad. Sci., 1973, 207, p. 73—81.
5. Hirano T., Nordin A. A. The regulatory mechanism(s) of in vitro cell mediated immunity in aged mice.—Gerontologist, 1975, 15, N 5, 11, p. 28.
6. Jerne N. K., Nordin A. A. Plaque formation in agar by single antibody production cells.—Science, 1963, 140, N 3565, p. 405.
7. Meredith P. e. a. Age-related changes in the cellular immune response of lymph node and thymus cell in long-lived mice.—Cell Immunol., 1975, 18, N 2, p. 324—330.
8. Popp D. The effect of age on antigen-sensitive cells.—Mech. Ageing and Develop., 1975, 4, N 3—4, p. 221—230.
9. Segre D., Segre M. Humoral immunity in aged mice. II Increased suppressor T cell activity in immunologically deficient old mice.—J. Immunol., 1976, 116, N 3, p. 735—738.
10. Steinberg A. D. Pathogenic of autoimmunity in New Zealand mice. V. Loss of thymic suppressor function.—Arthritis and Reum., 1974, 17, N 1, p. 11—14.
11. Stoltzner G., Makinodan T. Age dependent decline in proliferation of lymphocytes.—In: Adv. in exp. Med. Biol., v. 61, Explorations in Aging. N. Y.—London, Plen. Press., 1975, p. 21—37.
12. Stutman O. Cell-mediated immunity and aging.—Federation. Proc., 1974, 33, N 9, p. 2028—2032.
13. Tada T., Tanigushi M., Takemori T. Properties of primed suppressor T cells and their products.—Transplant. Rev., 1975, 26, p. 106—129.
14. Walford R. L. The immunological theory of aging. Munksgaard, Copenhagen, 1969. 260 p.
15. Yunis E. J., Greenberg L. J. Immunogenetics of Aging.—Abstr. 10th Internat. Congr. Gerontol., v. II, Jerusalem, 1975, p. 40.

Лабораторія імунології
Інституту геронтології АМН СРСР

Надійшла до редакції
12.IV 1977 р.

G. M. Butenko, L. F. Andrianova, T. L. Ekhneva, N. I. Ivanova

INTERRELATIONS BETWEEN CELL POPULATIONS INVOLVED IN IMMUNE RESPONSE IN AGING

Summary

The interrelations between various cells involved in the immune response were studied using the method of syngenic cell transfer into intact or irradiated recipients, CBA mice of different ages. It is found that the macrophages from old animals have a lower capacity of immune response induction; the priming leads to a decrease in the response of young mice and an increase in old animals, possibly due to a reduction in production of suppressors T-cells; the correlation between the number of antibody producing cells and the total number of nucleated spleen cells in old animals is negative and changes for a positive after injection of bone marrow cells from young animals; there are disturbances in the relationship between the antibody producing cells and the memory cells.

Laboratory of Immunology, Institute of Gerontology,
Academy of Medical Sciences, USSR, Kiev