

## ВЛИЯНИЕ ПЕРИОДИЧЕСКОГО ГОЛОДАНИЯ НА КЛЕТКИ КОСТНОГО МОЗГА ЖИВОТНЫХ РАЗНОГО ВОЗРАСТА

© Н. В. Колот

*Кафедра генетики и цитологии Харьковского национального университета им. В. Н. Каразина,  
Харьков, 61022, Украина;  
электронный адрес: natakolot@mail.ru*

В настоящее время недостаточно данных о том, что происходит с клетками костного мозга на фоне периодического голодания. Поэтому задача настоящей работы заключалась в изучении влияния периодического голодания на пролиферативный потенциал и морфологию гетерогенного клеточного пула костного мозга молодых и старых животных. Показано, что периодическое голодание независимо от возраста приводит к снижению количества клеток в костном мозге, но при этом не оказывает негативного влияния на их жизнеспособность и морфологию. Установлено, что периодическое голодание у молодых крыс вызывает увеличение доли дифференцированных клеток, а у старых крыс — недифференцированных бластов и малодифференцированных предшественников клеток крови. Анализ клеточных культур животных показал, что культивирование способствует селективному снижению гетерогенности клеток. Высокий пролиферативный потенциал клеток костного мозга старых периодически голодающих крыс указывает на то, что периодическое голодание на поздних стадиях онтогенеза оказывает антивозрастной эффект на клетки в системе *in vivo* и *in vitro*.

**Ключевые слова:** клетки костного мозга, возраст, периодическое голодание, пролиферация, недифференцированные бласты.

**Принятые сокращения:** Л/Э — лейкоэритробластическое отношение, ИСН — индекс созревания нейтрофилов, ИСЭ — индекс созревания эритроцитов.

В последние десятилетия развития биологии и медицины наблюдается повышенный интерес к изучению клеток костного мозга и возможностям их использования в клеточной и тканевой терапии нарушений, зависящих от возраста (Travols, 2006; Gurcan, Akkus, 2008; Salibian et al., 2013). Костный мозг является центральным органом иммунной системы, выполняющим множество жизненно важных функций, таких как гемолимфопоэз и иммуногенез (Николаева и др., 2015), хотя его объем от общей массы тела небольшой и составляет приблизительно 3 % у взрослых крыс, 2 % у собак и 5 % у человека (Travols, 2006). Паренхима органа представлена островками гемопоэтической ткани, в состав которой входят гемопоэтические стволовые клетки, недифференцированные прогениторы, а также все типы клеток крови на разных стадиях дифференцировки (Travols, 2006). Помимо гемопоэтической ткани в паренхиме органа локализуются адипоциты, являясь источником энергии и участвуя в регуляции гемопоэза (Nagasawa, Sugiyama, 2012). Паренхима органа окружена большим количеством капилляров в виде синусоидов, в просвет которых проникают дифференцированные клетки крови (Travols, 2006). Основной стромы органа является ретикулярная соединительная ткань, создающая микроокружение для пролиферации, созревания и дифференцировки гемопоэтических клеток (Nagasawa, Sugiyama, 2012). К элементам стромы относятся фибробласты, адипоциты, эндотелиоциты, адвенти-

циальные и остеогенные клетки, макрофаги, а также уникальная гетерогенная популяция недифференцированных клеток негемопоэтического ряда: мезенхимные стволовые клетки, мультипотентные клетки-предшественники (multipotent adult precursor cell — MAPC) взрослого организма, эндотелиальные стволовые клетки и плюрипотентные стволовые клетки, коммитированные тканевые стволовые клетки (Анохина, Бурлакова, 2007; Anthony, Link, 2014).

Несмотря на наличие гетерогенного пула стволовых клеток и их высокого регенерационного потенциала, в костном мозге происходят возрастные дегенеративно-дистрофические изменения — снижение скорости гемопоэза, увеличение количества и размеров адипоцитов (Maciel et al., 2014; Takeshita et al., 2014); дисбаланс между адипогенезом и остеобластогенезом (Bethel et al., 2013), снижение объема гемопоэтической ткани и постепенное ее замещение жировой тканью (Maciel et al., 2014). Это способствует появлению в иммунной системе следующих функциональных нарушений: изменение количественного соотношения между всеми популяциями иммунокомпетентных клеток; снижение количества Т-лимфоцитов и их иммунной функции; отсутствие дифференцировки В-лимфоцитов в продуцирующие антитела плазматические клетки; репликативное истощение потенциала стволовых и клонально размножающихся клеток; увеличение Т-клеток, обладающих иммунной памятью; снижение ме-

таблицеской активности гранулоцитов (Анисимов, 2008; Bethel et al., 2013). Возрастные изменения в иммунной системе стимулируют развитие иммунодефицита и хронического воспаления, увеличивая рост числа аутоиммунных и онкологических заболеваний (Maciel et al., 2014).

Ограничение калорийности в питании является мощной антивозрастной стратегией, сохранившейся в ходе эволюции животных (Anthony, Link, 2014). Показано, что калорийно-ограниченная диета увеличивает продолжительность жизни экспериментальных животных (Божков, 2001; Colman et al., 2014). Высказано предположение (Tang et al., 2016), что ограничение калорийности способствует репрограммированию стволовоподобных клеток, пролонгируя их способность к самообновлению, пролиферации и дифференцировке в некоторых тканях на поздних стадиях онтогенеза организма. Возможно, ограничение калорийности в питании может селективно задерживать старение в тканях взрослого организма.

Пока еще мало изучено, как ограничение калорийности или периодическое голодание влияет на морфофункциональные особенности гетерогенного пула иммунокомпетентных клеток костного мозга животных, особенно на поздних стадиях онтогенеза. В связи с этим актуальным является проведение исследования морфофункциональных характеристик иммунокомпетентных и стволовых клеток на фоне ограничения калорийности питания.

Задача настоящей работы — исследовать влияние периодического голодания на пролиферативный потенциал и морфологию гетерогенного клеточного пула костного мозга молодых и старых животных.

## Материал и методика

Исследования проводили на клетках костного мозга 3- (n = 20) и 19-месячных (n = 20) самцов крыс линии Wistar массой 150—200 г. Животных содержали в стандартных условиях вивария, которые соответствуют «Санитарным правилам по устройству, оборудованию и содержанию экспериментально-биологических клиник (вивариев)» (Санитарные правила 2.2.1.3218-14 от 29 августа 2014 г. № 51, РФ, <http://www.rosпотребнадзор.ru>). Животных делили на 4 группы: группа 1 и 2 — соответственно 3- и 19-месячные животные, получающие питание ad libitum (контрольные группы 1 и 2); группа 3 и 4 — соответственно 3- и 19-месячные животные, которых переводили со стандартного режима кормления на периодическое голодание (животных кормили через день при свободном доступе к воде). Все экспериментальные манипуляции с лабораторными животными проводили в соответствии с «Общими принципами экспериментов на животных», утвержденными I Национальным конгрессом по биоэтике (20.09.2001 г., Киев, Украина), и с требованиями «Европейской конвенции о защите позвоночных животных, используемых в экспериментальных и других научных целях» (г. Страсбург, 1985 г.). Проведение настоящего исследования одобрено биоэтическим комитетом Харьковского национального университета им. В. Н. Каразина.

Клетки костного мозга выделяли из диафизов, предварительно устранив эпифизы бедренных и берцовых костей животных по описанному методу (Javazon et al., 2004). Диафизы промывали охлажденным до 4 °С натрий-фосфатным буферным раствором (рН 7.4) под давле-

нием. Далее полученную костномозговую суспензию клеток с тканевыми фрагментами дезагрегировали механически ресуспендированием. После этого суспензию фильтровали через нейлоновый фильтр с диаметром пор 100 мкм (cell dissociation sieve TGK, Sigma). Клеточную суспензию отмывали тем же буфером путем центрифугирования в течение 10 мин при 1500 g. Эритроциты из клеточной суспензии удаляли однократной обработкой раствором, содержащим 154 мМ хлорида аммония, 10 мМ бикарбоната натрия, 0.082 мМ этилендиаминтетраацетата (ХимЛаборРеактив, Украина) в течение 5 мин при комнатной температуре, после этого костномозговую клеточную суспензию дважды отмывали охлажденным натрий-фосфатным буфером. Полученная суспензия содержала одиночные жизнеспособные клетки в количестве от (2—4) · 10<sup>6</sup> кл./мл.

Во всех экспериментах исходная концентрация клеток костного мозга составляла (2.3 ± 0.2) · 10<sup>6</sup> кл./мл. Клетки культивировали в пластиковых чашках Петри (35 мм, Nunk, Дания) в питательной среде, приготовленной на основе среды 199 (ВетМед, Украина), содержащей 20 % эмбриональной сыворотки коров (Gibco, США), 10 мМ буфера HEPES (Sigma, США), 2 мМ глутамина (ХимЛаборРеактив, Украина) и антибиотики (100 ед./мл натриевой соли бензилпенициллина и 100 мг/мл гентамицина), при 37 °С в атмосфере, содержащей 5 % CO<sub>2</sub>. Культивирование осуществляли на протяжении 4 сут без смены среды.

Оценку пролиферативной активности и жизнеспособности осуществляли ежедневно путем подсчета числа клеток в фиксированных полях зрения в камере Горяева. Жизнеспособность клеток в ходе культивирования определяли в тесте с трипановым синим (Sigma, США). Окрашенные клетки считали в камере Горяева, просчитывая в целом не менее 500 клеток. Данные представляли в процентах от общего числа клеток.

Клеточные типы (недифференцированные бласты, клетки гранулоцитарного, моноцитарного, лимфоидного и эритроидного ростков) считали сразу после получения клеточной суспензии и на 4-е сут культивирования в разных участках мазка. Мазки костного мозга окрашивали свежеприготовленным раствором красителя Романовско-Гимзы. На каждом стекле определяли процентную долю клеток каждого вида в 500 клеточных элементах.

Морфологические характеристики клеток костного мозга животных оценивали, анализируя микрофотографии случайно выбранных полей зрения (не менее 5—8), которые получали с помощью светооптического микроскопа Konus Campus 5306 с цифровой камерой-окуляром 3 M Pixels CCD Camera CMOS Camera (Digital Eyepiece Camera, Китай). Микрофотографии обрабатывали при помощи программы Fotoshop CS 5.

Для оценки состояния костного мозга учитывали костномозговые индексы (Кишкун, 2010). Рассчитывали лейкоэритробластическое отношение (Л/Э) как отношение суммы процентного содержания всех элементов гранулоцитарного ростка к сумме процентного содержания всех элементов эритроидного ростка костного мозга. Вычисляли индекс созревания нейтрофилов (ИСН), который характеризует состояние гранулоцитарного ростка и равен отношению процентного содержания молодых элементов гранулоцитарного ряда (промиелоцитов, миелоцитов и метамиелоцитов) к процентному содержанию зрелых гранулоцитов (палочкоядерных и сегментоядерных нейтрофилов). Кроме того, характеризовали состояние

эритроидного ростка по индексу созревания эритрокари-оцитов (ИСЭ), который представляет собой отношение гемоглобинсодержащих нормобластов (полихроматофильных и оксифильных нормобластов) к общему процентному содержанию всех нормобластов.

Статистический анализ результатов проводили с использованием программы STATISTICA 7.0 (Factorial ANOVA). Для характеристики полученных выборок использовали среднее, стандартное отклонение, стандартную ошибку среднего и объем выборки. Статистическую достоверность различий между двумя группами данных оценивали с помощью непараметрического U-критерия Манна—Уитни. Корреляционный анализ проводили с использованием коэффициента Спирмана. Данные представлены средними значениями и их стандартной ошибкой, полученными в 3 параллельных пробах. Статистически значимыми считали значения при  $P < 0.05$ .

### Результаты

Данные по содержанию клеток в костном мозге 3- и 19-месячных животных, содержащихся на стандартном режиме кормления и периодическом голодании, представлены в табл. 1. В суспензии, полученной из одной бедренной кости молодых и старых животных, содержалось не менее  $10^6$  кл./мл, что согласуется с данными из литературы (Javazon et al., 2004). Установлены возрастные различия по содержанию клеток в костном мозге. Так, у молодых животных количество клеток в костном мозге на 18 % было меньше, чем у старых животных. Периодическое голодание независимо от возраста способствует снижению пула клеток костного мозга у молодых и старых животных на 46 и 31 % соответственно. Жизнеспособность клеток костного мозга в момент получения суспензии была высокой во всех группах животных независимо от их возраста и режима кормления (табл. 1).

Изучение мазков ядросодержащих клеток костного мозга в световом микроскопе показало, что возраст и режим кормления не оказывают негативного влияния на их морфологические особенности (рис. 1, *a—z*). Сразу после выделения суспензия клеток от всех групп животных характеризовалась гетерогенностью. В ней присутствовали клетки всех без исключения ростков кроветворения, находящиеся на разных стадиях дифференцировки. Так, в момент получения в суспензии присутствовали клетки разного размера, различающиеся конфигурацией ядра, объемом и степенью окрашиваемости цитоплазмы, наличием или отсутствием в ней зернистости (рис. 1, *a—z*).

Проведение морфологического анализа гетерогенной популяции клеток костного мозга у контрольных и экспериментальных групп животных позволило обнаружить некоторые различия в их содержании (табл. 2). В костном мозге 3-месячных контрольных животных в отличие от старых животных были обнаружены недифференцированные бласты. А периодическое голодание молодых животных вызывало в костном мозге статистически значимое увеличение количества полихроматофильных нормобластов, палочкоядерных и сегментоядерных нейтрофилов (табл. 2). Повышение доли дифференцированных клеток у молодых животных может свидетельствовать о стимуляции фагоцитоза и аутофагии в организме животных на фоне их периодического голодания. В костном мозге старых периодически голодающих животных процентное содержание терминально дифференцированных клеток находилось в пределах контрольных значений, но при этом значимо увеличивалось количество недифференцированных бластов, эритробластов, оксифильных нормобластов и миелоцитов (табл. 2). Наличие малодифференцированных клеток на поздних стадиях онтогенеза животных может быть показателем того, что периодическое голодание стимулирует гемопозиз и самообновление гемопоэтических стволовых клеток.

Исходной концентрацией для культивирования клеток костного мозга была  $(2.0—2.3) \cdot 10^6$  кл./мл. Интенсивность роста клеток в культуре от контрольных молодых животных в 1-е сут культивирования была незначительной, и число клеток увеличилось только на 25 % по сравнению с исходной величиной. Затем количество клеток в культуре постепенно увеличивалось и на 4-е сут их содержание в 2 раза превышало исходные значения (рис. 2, *a*, кривая 1). Пролиферативная активность клеток костного мозга старых контрольных животных была низкой в ходе всего периода культивирования (рис. 2, *b*, кривая 1). Отсутствие роста клеток в первичной культуре отражает то, что клетки старых животных пребывают в состоянии покоя в условиях *in vitro*.

Периодическое голодание негативно влияло на пролиферативный потенциал клеток костного мозга 3-месячных животных. В ходе 3-суточного культивирования их количество не изменялось, а затем снижалось на 28 % по сравнению с исходными значениями (рис. 2, *a*, кривая 2). Противоположное влияние оказывало периодическое голодание на пролиферацию клеток костного мозга 19-месячных животных. В культурах клеток, полученных от старых периодически голодающих крыс, наблюдалось постепенное увеличение количества клеток, и на 4-е сут культивирования этот показатель в 2 раза превышал ис-

Таблица 1

#### Концентрация клеток в костном мозге крыс и их жизнеспособность

Группы животных	Концентрация, кл./мл, $\times 10^6$	Жизнеспособность, %	
		момент получения	4 сут культивирования
Контроль, 3 мес	$2.6 \pm 0.4$	$98.0 \pm 0.5$	$97.0 \pm 1.6$
Контроль, 19 мес	$3.2 \pm 0.2$	$98.0 \pm 0.6$	$98.0 \pm 0.3$
ПГ, 3 мес	$1.4 \pm 0.5^a$	$96.0 \pm 1.1$	$95.0 \pm 1.0$
ПГ, 19 мес	$2.2 \pm 0.4^a$	$97.0 \pm 0.8$	$95.0 \pm 1.2$

Примечание. Здесь и в табл. 2—4: ПГ — периодически голодающие крысы; <sup>a</sup> Достоверно относительно соответствующей контрольной группы (3- или 19-месячных крыс) при  $P < 0.05$ .

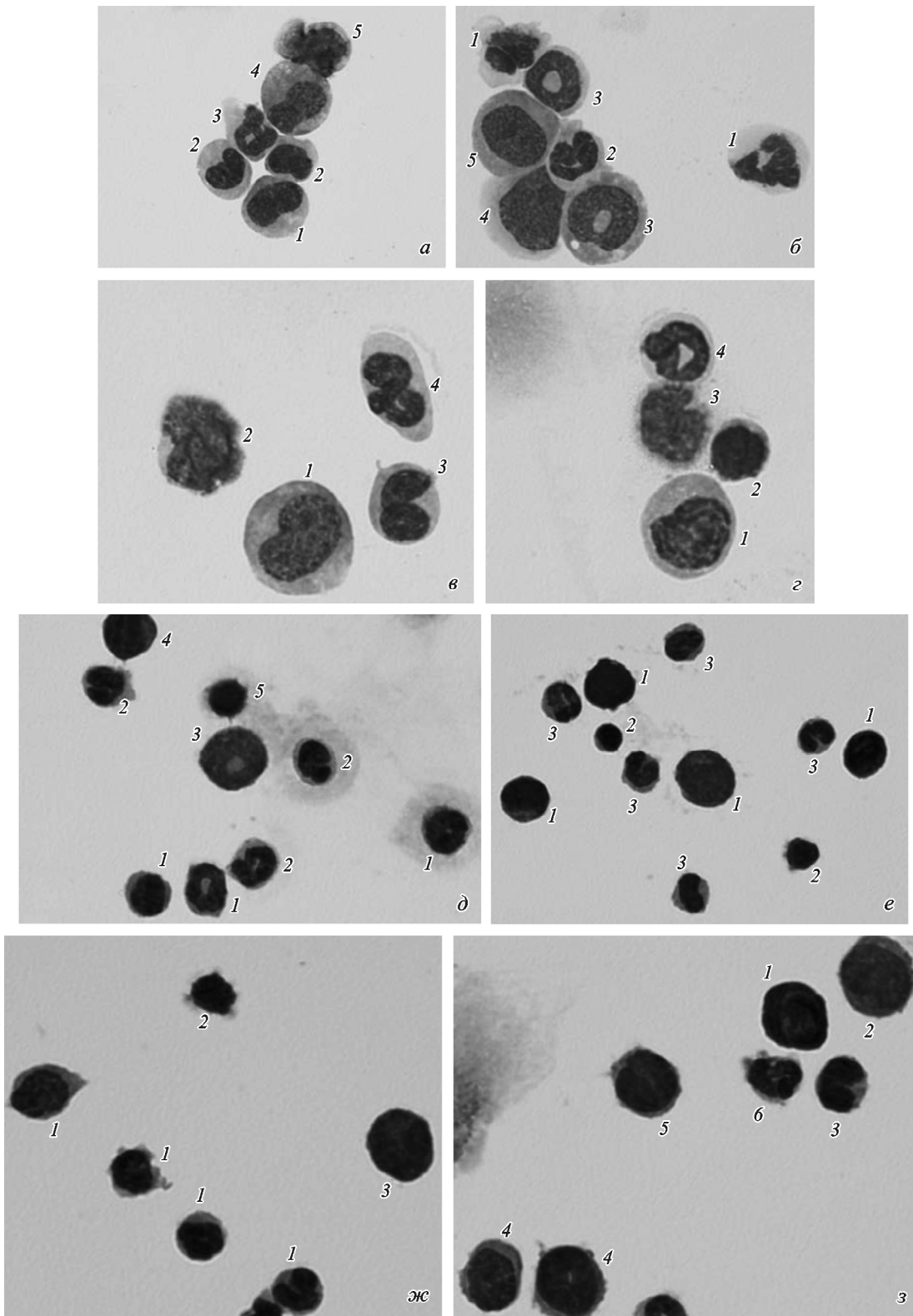


Рис. 1. Морфологические типы клеток костного мозга 3- (а, в, д, ж) и 19-месячных (б, з, е, з) крыс сразу после их получения (а—в) и на 4-е сут их культивирования (д—з).

а — 3 мес, контроль: 1 — миелоцит, 2 — метамиелоцит, 3 — сегментоядерный гранулоцит, 4 — проэритробласт, 5 — палочкоядерный нейтрофил.  
 б — 19 мес, контроль: 1 — сегментоядерный нейтрофил, 2 — палочкоядерный нейтрофил, 3 — оксифильный нормобласт, 4 — миелоцит, 5 — пролимфоцит.  
 в — 3 мес, периодически голодающие (ПГ): 1 — промиелоцит, 2 — проэритробласт, 3 — палочкоядерный нейтрофил, 4 — сегментоядерный нейтрофил.  
 з — 19 мес, ПГ: 1 — миелоцит, 2 — лимфоцит, 3 — метамиелоцит, 4 — палочкоядерный нейтрофил.  
 д — 3 мес, контроль: 1 — палочкоядерный нейтрофил, 2 — сегментоядерный гранулоцит, 3 — миелобласт, 4 — большой лимфоцит, 5 — малый лимфоцит.  
 е — 19 мес, контроль: 1 — большой лимфоцит, 2 — малый лимфоцит, 3 — палочкоядерный нейтрофил.  
 ж — 3 мес, ПГ: 1 — палочкоядерный нейтрофил, 2 — малый лимфоцит, 3 — большой лимфоцит.  
 з — 19 мес, ПГ: 1 — недифференцированная бластная клетка, 2 — промиелоцит, 3 — метамиелоцит, 4 — лимфобласт, 5 — лимфоцит, 6 — сегментоядерный нейтрофил. Окрашивание по Романовскому—Гимзе. Об. 100×.

Таблица 2

**Процентное содержание клеточных типов в костномозговой суспензии животных разного возраста сразу после ее получения**

Клеточные типы	Доля клеток костного мозга в группе крыс, %			
	3-месячные, контроль	19-месячные, контроль	3-месячные, ПГ	19-месячные, ПГ
Недифференцированные бласты	2.2 ± 1.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	3.0 ± 1.0 <sup>a</sup>
Эритробласты	2.0 ± 1.1	1.0 ± 0.1	1.0 ± 0.1	3.0 ± 1.1 <sup>a</sup>
Прозэритробласты	1.1 ± 0.2	1.0 ± 0.2	1.0 ± 0.2	1.0 ± 0.1
Базофильные нормобласты	4.0 ± 0.5	3.0 ± 0.7	0.0 ± 0.0	4.0 ± 0.5
Полихроматофильные нормобласты	10.0 ± 1.1	9.0 ± 1.8	2.0 ± 0.1 <sup>a</sup>	11.0 ± 1.1 <sup>a</sup>
Оксифильные нормобласты	4.0 ± 0.2	2.0 ± 0.1	0.0 ± 0.0	4.0 ± 0.2 <sup>a</sup>
Миелобласты	2.0 ± 0.8	1.0 ± 0.4	2.0 ± 1.1	2.0 ± 0.2
Промиелоциты	1.0 ± 0.4	2.0 ± 0.7	2.0 ± 0.5	1.3 ± 0.4
Миелоциты	7.0 ± 2.1	5.0 ± 0.1	7.0 ± 0.3	7.0 ± 1.1 <sup>a</sup>
Метамиелоциты	9.0 ± 1.2	10.0 ± 0.7	10.0 ± 1.3	10.0 ± 0.2
Палочкоядерные нейтрофилы	19.0 ± 0.3	22.0 ± 1.3	23.0 ± 1.1 <sup>a</sup>	19.0 ± 0.3
Сегментоядерные нейтрофилы	11.0 ± 0.4	15.0 ± 1.8	18.0 ± 0.8 <sup>a</sup>	14.0 ± 0.4
Эозинофильные гранулоциты	1.0 ± 0.3	1.0 ± 0.5	0.0 ± 0.0	1.0 ± 0.3
Моноциты	0.7 ± 0.2	1.0 ± 0.6	1.0 ± 0.1	0.8 ± 0.1
Лимфобласты	3.0 ± 1.2	2.0 ± 0.5	1.3 ± 0.5	3.5 ± 1.2
Пролимфоциты	1.0 ± 0.3	1.0 ± 0.3	1.0 ± 0.1	1.0 ± 0.3
Лимфоциты	20.0 ± 2.2	22.0 ± 1.2	31.0 ± 0.3 <sup>a</sup>	18.0 ± 0.2
Плазмоциты	1.5 ± 0.1	1.0 ± 0.2	0.0 ± 0.0	1.0 ± 0.1
Мегакариоциты	0.5 ± 0.2	1.0 ± 0.3	0.7 ± 0.3	0.5 ± 0.2

ходные значения (рис. 2, б, кривая 2). В целом периодическое голодание стимулировало пролиферативную активность клеток костного мозга только от старых животных в системе *in vitro*. Показано, что независимо от возраста и режима кормления животных жизнеспособность клеток в ходе всего периода культивирования в среднем составляла  $98 \pm 2.0\%$  (табл. 1).

На 4-е сут в первичных культурах от всех групп животных были обнаружены клетки, прикрепившиеся к пластику и свободно флотирующие в питательной среде. Клетки в первичных культурах от всех групп животных были схожи морфологически (рис. 1, д—з). Микроскопическое исследование культур всех групп животных показало отсутствие клеток с атипичной формой ядра и других видимых изменений. Это подтверждает то, что культивирование не вызывает морфологических изменений в клеточном составе костного мозга. Анализ морфотипов клеток показал снижение гетерогенности клеточных культур всех групп животных в ходе культивирования (рис. 1, д—з). В первичных культурах клеток молодых контрольных (рис. 1, д) и старых периодически голодающих крыс (рис. 1, з) возрастало число недифференцированных бластов, а также бластных клеток гранулоцитарного и лимфоидного ростков. Наличие недифференцированных клеток в культурах вышеуказанных групп животных является показателем их высокой пролиферативной активности. Морфологический анализ показал, что в культурах клеток старых контрольных (рис. 1, е) и молодых периодически голодающих крыс (рис. 1, ж) преобладали дифференцированные клетки (палочкоядерные и сегментоядерные нейтрофилы, лимфоциты). Наличие большого числа дифференцированных клеток

подтверждает то, что культуры клеток являются переживающими.

Процентное содержание разных клеточных типов на 4-е сут роста клеток в культуре представлены в табл. 3. Полученные данные показали, что в первичных культурах всех групп животных отсутствовали клетки эритроидного и мегакариоцитарного ростков.

Клеточный состав костного мозга подвержен не только качественным, но и количественным колебаниям. Поэтому для объективного анализа суспензии клеток костного мозга всех групп животных проводили определение костномозговых индексов (табл. 4). Повышение лейкоэритробластического соотношения (Л/Э) у молодых периодически голодающих крыс свидетельствует о гиперплазии клеток лейкопоза и подавлении красного ростка. Периодическое голодание старых животных не оказывало влияния на костномозговые индексы, их значения не отличались от показателей контроля. Другие индексы (ИСЭ и ИСН) у контрольных и экспериментальных групп тоже не имели достоверно значимых различий и оставались в пределах нормальных значений (Кишкун, 2010).

В процессе культивирования клеток от всех групп животных наблюдали подавление роста и дифференцировки клеток эритроидного ростка. Костномозговые индексы на 4-е сут культивирования не определяли. Возможно, преобладание в первичных культурах всех групп животных клеток гранулоцитарного и лимфоидного ростков свидетельствует о том, что эти клетки лучше переживают в системе *in vitro*. Следовательно, культивирование клеток является одним из методов селекции клеток костного мозга, при которой преимущественно остаются клетки гранулоцитарного и лимфоидного ростков.

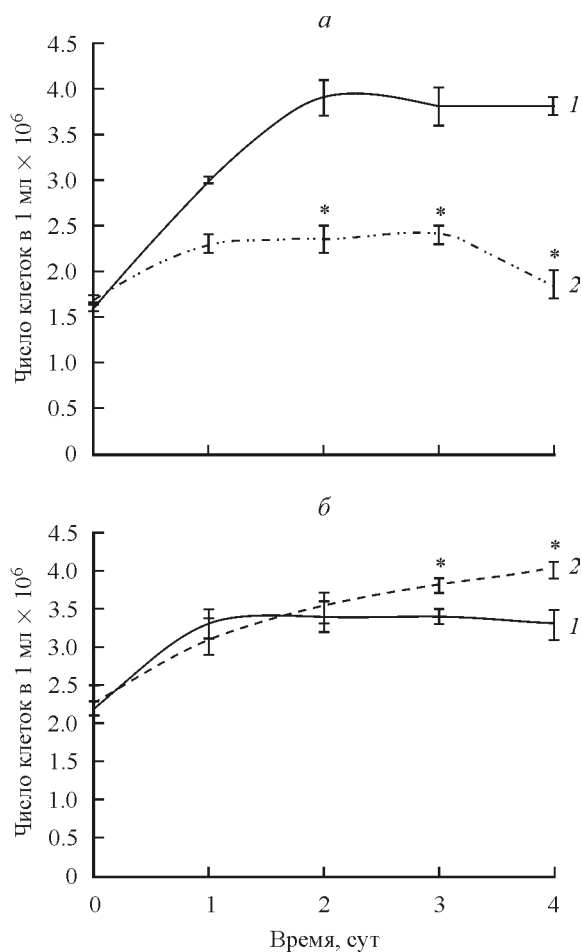


Рис. 2. Динамика роста клеток костного мозга крыс разного возраста при разном питании. Первичные культуры.

*a* — 3-месячные крысы контрольные (кривая 1) и периодически голодающие (ПГ) (кривая 2); *b* — 19-месячные крысы контрольные (кривая 1) и ПГ (кривая 2). Звездочка показывает достоверность отличия от соответствующей контрольной группы (3- или 19-месячных крыс) при  $P < 0.05$ .

## Обсуждение

Результаты большинства экспериментальных исследований в области молекулярной и клеточной биологии позволяют считать, что культуры клеток костного мозга имеют перспективы для внедрения в медицинскую практику (Gurkan, Akkus, 2008; Salibian et al., 2013; Anthony, Link, 2014). Поскольку костный мозг является источником уникальных по своим свойствам и функциям гемопоэтических и мезенхимных стволовых клеток (Анохина, Бурлакова, 2007; Ertl et al., 2008), а также выполняет ряд жизненно важных функций в организме, исследования влияния возраста и стрессов разной этиологии на гетерогенный пул костномозговых клеток остаются актуальными. Известно, что в ходе старения организма снижается объем костномозговой гемопоэтической ткани и увеличивается адипозной ткани, что негативно влияет на пул стволовых и иммунокомпетентных клеток (Maciel et al., 2014). Отличительными признаками старения на клеточном уровне являются деструкция органелл и внутриклеточное накопление различных форм молекулярных повреждений — мутации ДНК, образование «дефектных» ферментов, мембранных белков и белковых агрегатов (Madeo et al., 2015). Это приводит к развитию возрастных заболеваний, таких как нейродегенеративные расстройства, сахарный диабет II типа, онкологические заболевания, и вызывает преждевременное старение организма. Поэтому одной из основных проблем современной биологии и медицины является поиск способов увеличения продолжительности жизни.

Ограничение калорий или голодание может оказывать геропротекторное действие на организм (Colman et al., 2014; Tang et al., 2016), увеличивая продолжительность жизни и задерживая развитие некоторых заболеваний. Кроме того, экспериментально показан положительный эффект ограничения калорий на гемопоэтические клетки старых животных (Ertl et al., 2008). В основе влияния ограничения калорий и голодания на организм является индукция аутофагии, которая позволяет клеткам не только избавиться от поврежденных мембранных и других белков, деструктурированных органелл, токсинов и переработанных в ходе ее метаболизма клеточных компо-

Таблица 3

Доли клеточных типов в культуре клеток костного мозга крыс разного возраста и при разном питании через 4 сут культивирования

Клеточные типы	Доля клеток костного мозга в группе крыс, %			
	3-месячные, контроль	19-месячные, контроль	3-месячные, ПГ	19-месячные, ПГ
Недифференцированные бласты	5.0 ± 1.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	8.0 ± 1.0 <sup>a</sup>
Миелобласты	5.0 ± 0.4	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	9.0 ± 0.5 <sup>a</sup>
Промиелоциты	4.0 ± 0.3	2.0 ± 1.2	2.0 ± 0.4	2.0 ± 0.7
Миелоциты	3.0 ± 0.1	2.0 ± 1.1	5.0 ± 3.1	2.0 ± 0.7
Метамиелоциты	10.0 ± 2.4	11.0 ± 1.1	12.0 ± 3.4	8.0 ± 2.2
Палочкоядерные нейтрофилы	14.0 ± 0.2	13.0 ± 3.7	18.0 ± 3.2	12.0 ± 5.3
Сегментоядерные нейтрофилы	16.0 ± 1.4	19.0 ± 0.9	19.0 ± 3.4	15.0 ± 4.1
Моноциты	1.0 ± 0.2	0.5 ± 0.1	1.0 ± 0.6	2.0 ± 0.1
Лимфобласты	14.0 ± 0.3	4.0 ± 1.1	5.0 ± 0.5	9.0 ± 0.3
Пролимфоциты	6.0 ± 0.2	7.0 ± 2.0	10.0 ± 2.2	9.0 ± 1.2
Лимфоциты	22.0 ± 1.2	27.0 ± 4.5	28.0 ± 1.2	24.0 ± 4.2

ментов, но и обновить свои внутриклеточные компоненты. Цитопротекторное действие аутофагии обеспечивается за счет: 1) использования в условиях голодания эндогенных внутриклеточных субстратов для поддержания биоэнергетического метаболизма и анаболических реакций в клетке, подавляя развитие клеточного стресса, особенно протеотоксического; 2) удаления дисфункциональных и поврежденных внутриклеточных органелл; 3) удаления из клетки потенциально токсических белков (Madeo et al., 2015). Молекулярные механизмы аутофагии в большой мере изучены (Swideck, 2012). Известно, что голодание стимулирует развитие аутофагии за счет подавления TORC1 (target of rapamycin) и других регуляторных сигнальных путей (Madeo et al., 2015).

Процесс аутофагии также необходим для поддержания баланса между пролиферацией и гибелью В- и Т-лимфоцитов, а также для терминальной стадии дифференцировки клеток эритроидного ростка и мегакариоцитов (Ковалева и др., 2014). Возможно, аутофагия на фоне ограничения калорий или голодания способствует активации защитных функций стволовых клеток, вызывая повышение их пролиферативного потенциала, обновления их внутриклеточных компонентов, замедляя возрастные изменения в организме и увеличивая продолжительность жизни. Именно поэтому мы изучали влияние периодического голодания на гетерогенный пул иммунокомпетентных клеток костного мозга молодых и старых животных.

В настоящей работе показано, что количество клеток в костном мозге старых животных выше, чем у молодых. Это может быть связано с тем, что с возрастом у млекопитающих в костном мозге увеличивается количество адипоцитов (Maciel et al., 2014). Переведение животных на периодическое голодание способствует снижению количества клеток в костном мозге независимо от возраста. Это совпадает с исследованиями (Shushimita et al., 2014), в которых описано снижение клеток в костном мозге молодых животных на фоне ограничения калорий питания. Показатель жизнеспособности клеток подтверждает то, что метод выделения клеток из костного мозга (Javazon et al., 2004) эффективен и позволяет получить жизнеспособную клеточную суспензию.

Периодическое голодание не оказывает негативного влияния на гетерогенный пул клеток костного мозга животных обоих возрастов. Однако у старых периодически голодающих крыс в костном мозге увеличиваются доли недифференцированных бластов, эритробластов, оксифильных нормобластов и миелоцитов. Можно предположить, что у старых животных периодическое голодание вызывает активацию аутофагии в клетках костного мозга, которая стимулирует недифференцированные клетки к самообновлению и дифференцировке за счет обновления их внутриклеточных структур.

У молодых животных периодическое голодание способствует увеличению дифференцированных клеток, таких как палочкоядерные и сегментоядерные нейтрофилы, лимфоциты. Согласно данным из литературы (Shushimita et al., 2014), ограничение калорий и голодание на ранних этапах онтогенеза животных подавляют лимфопоэз и увеличивают созревание и дифференцировку всех видов лимфоцитов. Кроме того, при голодании активация аутофагии ускоряет дифференцировку клеток лимфоидного и эритроидного ростков (Ковалева и др., 2014).

Изменение пролиферативного потенциала клеток костного мозга и их жизнеспособности в первичной культуре отражает влияние периодического голодания не толь-

Таблица 4

## Показатели костномозговых индексов у крыс разного возраста и при разном питании

Группы животных	Л/Э	ИСН	ИСЭ
Контроль, 3 мес	2.80	0.56	0.66
Контроль, 19 мес	15.20	0.46	0.50 <sup>a</sup>
ПГ, 3 мес	4.60	0.46	0.69
ПГ, 19 мес	2.60	0.55	0.63

ко на организменном, но и на клеточном уровне. Полученные данные показали, что периодическое голодание увеличивает пролиферативный потенциал клеток костного мозга только старых животных. Известно, что дифференцированные клетки не пролиферируют в культуре, а к пролиферации в основном способны стволовые клетки и малодифференцированные прогениторы (Ertl et al., 2008). Судьба непролиферирующих клеток в культуре может быть двоякой. Они могут подвергаться деградации (некрозу, апоптозу) или сохраняться неизменными в культуре в течение нескольких суток, т. е. формировать пул переживающих клеток. Жизнеспособность клеток оставалась высокой в ходе культивирования независимо от возраста и режима кормления животных. Двукратное увеличение числа клеток в первичной культуре указывает на то, что пролиферативный потенциал клеток костного мозга молодых контрольных и старых периодически голодающих крыс в этих условиях достаточно высок. Есть данные (Anthony, Link, 2014), что стволовые клетки взрослого организма могут приспосабливаться к внешним изменениям и влиять на пролиферативную активность их клеточного микроокружения.

Культивирование является одним из эффективных способов «селекции» клеток. Так, на 4-е сут в первичных культурах наших экспериментов независимо от возраста и режима кормления животных отсутствовали клетки эритроидного и мегакариоцитарного ростков. В культурах клеток с низким пролиферативным потенциалом присутствовали в основном дифференцированные клетки. Это является доказательством того, что эти культуры являются переживающими. Напротив, в клеточных культурах с высоким пролиферативным потенциалом были обнаружены бласты и клетки-прогениторы лимфоцитарного и гранулоцитарного ростков. Следовательно, в ходе культивирования осуществляется гибель клеток эритроидного и мегакариоцитарного ростков на фоне увеличения пролиферации и дифференцировки клеток лимфоидного и гранулоцитарного ростков.

Обобщая полученные данные, можно предположить, что периодическое голодание на поздних стадиях онтогенеза оказывает антивозрастной эффект на клетки костного мозга в системе *in vivo* и *in vitro*. Это предположение основано на наличии высокого пролиферативного потенциала, а также недифференцированных бластов и клеточ-предшественников в первичных культурах клеток костного мозга старых животных на фоне периодического голодания. Возможно, периодическое голодание является «мягким» стрессом, который у старых животных стимулирует выход стволовых клеток из состояния покоя и обеспечивает их самообновление и дифференцировку. Однако механизмы геропротекторного влияния периодического голодания на разных стадиях онтогенеза остаются пока до конца невыясненными.

## Список литературы

- Анисимов В. Н. 2008. Молекулярные и физиологические механизмы старения. СПб.: Наука. 1 : 481 с. (Anisimov V. N. 2008. Molecular and physiological mechanisms of aging. 2nd ed. St. Petersburg: Nauka. 1 : 481.)
- Анохина Е. Б., Бурлакова Л. Б. 2007. Гетерогенность стромальных клеток-предшественников, выделенных из костного мозга крыс. Цитология. 49 (1) : 40—47. (Anokhina E. B., Buravkova L. B. 2007. Heterogeneity of stromal precursor cells isolated from rat bone marrow. Tsitologiya. 49 (1) : 40—47.)
- Божков А. И. 2001. Низкокалорийная диета как модель увеличения продолжительности жизни и исследования механизмов старения. Успехи геронтол. 8 : 89—99. (Bozhkov A. I. 2001. A low-calorie diet as a model to increase life expectancy and study the mechanisms of aging. Advances Gerontol. 8 : 89—99.)
- Кишкун А. А. 2010. Клиническая лабораторная диагностика: учебное пособие. М.: ГЭОТАР-Медиа. 976 с. (Kiskun A. A. 2010. Clinical laboratory diagnostics: textbook. Moscow: GEOTAR-Media. 976 p.)
- Ковалева О. В., Шитова М. С., Зборовская И. С. 2014. Аутофагия: клеточная гибель или способ выживания? Клин. онкогематол. 7 (2) : 103—113. (Kovaleva O. V., Shitova M. S., Zborovskaya I. S. 2014. Autophagy: cell death or survival strategy? Clin. Oncogematol. 7 (2) : 103—113.)
- Николаева Л. П., Черданцев Д. В., Хват Н. С. 2015. Особенности миелограммы костного мозга трубчатых костей. Современные проблемы науки и образования. 4 : 55—61. (Nikolaeva L. P., Cherdancev D. V., Hvat N. S. 2015. The myelogram features of long bone marrow. Modern Problems of Science and Education. 4 : 55—61.)
- Anthony B. A., Link D. C. 2014. Regulation of hematopoietic stem cells by bone marrow stromal cells. Trends. Immunol. 35 : 32—37.
- Bethel M., Chitteti B. R., Srour E. F., Kacena M. A. 2013. The changing balance between osteoblastogenesis and adipogenesis in aging and its impact on hematopoiesis. Curr. Osteoporos. Rep. 11 : 99—106.
- Colman R. J., Beasley T. M., Kemnitz J. W., Johnson S. C., Weindruch R., Anderson R. M. 2014. Caloric restriction reduces age-related and all-cause mortality in rhesus monkeys. Nature Commun. 5 : 1—5.
- Ertl R. P., Chen J., Astle C. M., Duffy T. M., Harrison D. E. 2008. Effects of dietary restriction on hematopoietic stem-cell aging are genetically regulated. Blood. 111 : 1709—1716.
- Gurkan U. A., Akkus O. 2008. The mechanical environment of bone marrow: a review. Annals Biomed. Eng. 36 : 1978—1991.
- Javazon E. H., Beggs K. J., Flake A. W. 2004. Mesenchymal stem cells: paradoxes of passaging. Exp. Hematol. 32 : 414—425.
- Maciel B. B., Rebelatto C. L. K., Brofman P. R. S., Brito H. F. V., Patricio L. F. L., Cruz M. A., Dittrich R. L. 2014. Morphology and morphometry of feline bone marrow-derived mesenchymal stem cells in culture. Pesq. Vet. Bras. 34 : 1127—1134.
- Madeo F., Zimmermann A., Maiuri M. C., Kroemer G. 2015. Essential role for autophagy in life span extension. J. Clin. Invest. 125 (1) : 85—93.
- Nagasawa T., Sugiyama T. 2012. Bone marrow niches for hematopoietic stem cells and immune cells. Inflammation & Allergy. 11 : 201—206.
- Salibian A. A., Widgerow A. D., Abrouk M., Evans G. R. 2013. Stem cells in plastic surgery: a review of current clinical and translational applications. Arch. Plast. Surg. 40 : 666—675.
- Sedwick C. 2012. Yoshinori Ohsumi: autophagy from beginning to end. J. Cell Biol. 197 (2) : 164—165.
- Shushimita S., de Bruijn M. J., de Bruin R. W., Jzermans J. N., Hendriks R. W., Dor F. J. 2014. Dietary restriction and fasting arrest B and T cell development and increase mature B and T cell numbers in bone marrow. PLoS ONE. 9 (2) : 872—877.
- Takeshita S., Fumoto T., Naoe Y., Keda K. 2014. Age-related marrow adipogenesis is linked to increased expression of RANKL. J. Biol. Chem. 289 : 16 699—16 710.
- Tang D., Tao S., Chen Z., Koliesnik I. O., Calmes P. G., Herr V., Han B., Gebert N., Zörnig M., Löffler B., Morita Y., Rudolph K. L. 2016. Dietary restriction improves repopulation but impairs lymphoid differentiation capacity of hematopoietic stem cells in early aging. J. Exp. Med. 213 : 535—553.
- Travols G. S. 2006. Normal structure, function, and histology of the bone marrow. Toxicol. Pathol. 34 : 548—565.

Поступила 1 II 2017

## THE EFFECT OF PERIODIC STARVATION ON BONE MARROW CELLS FROM ANIMAL'S OF DIFFERENT AGE

N. V. Kolot

V. N. Karazin Kharkiv National University, Department of Genetics and Cytology, Kharkiv, 61022, Ukraine; e-mail: natakolot@mail.ru

At present, there is not enough date about what happens to the bone marrow cells in the background of calorie restriction or periodic starvation. The object of the study was to investigate the influence of periodic starvation on the proliferative potential and cell morphology of heterogeneous bone marrow pool of young and old animals. We have shown that the periodic starvation leads to reduction in the number of cells in the bone marrow independently of the age of the animals, but it does not adversely affect the viability and morphology. It has been found that a periodic starvation in young rats causes an increase in the proportion of differentiated cells, and in opposite, the number of undifferentiated blasts and precursor cells of blood is increased in old rats. High proliferative potential of bone marrow cells of periodically starving old rats has been established. Analysis of the cultures of all groups of animals showed that the cultivation promotes the selective reduction of the heterogeneity of the cells. It is suggested that periodic starvation at later stages of ontogeny has anti-aging effects on the bone marrow cells in the system *in vivo* and *in vitro*.

Key words: bone marrow cells, age, periodic starvation, proliferation, undifferentiated blasts.