

УДК 571.27

<sup>1,2</sup>Довгий Р. С., <sup>1</sup>Сківка Л. М.

## ФУНКЦІОНАЛЬНИЙ СТАН АЛЬВЕОЛЯРНИХ МАКРОФАГІВ ТА НЕЙТРОФІЛІВ КІСТКОВОГО МОЗКУ МИШЕЙ РІЗНОГО ВІКУ

<sup>1</sup>Навчально-науковий центр «Інститут біології» при Київському національному університеті ім. Тараса Шевченка (м. Київ)

<sup>2</sup>Державна установа «Інститут геронтології ім. Д.Ф. Чеботарьова НАМН України» (м. Київ)  
roman\_dovhyi@univ.kiev.ua

Стаття є фрагментом НДР «Механізми регуляції метаболічних процесів в організмі за умов розвитку патологічних станів», № державної реєстрації 16БФ036-01.

**Вступ.** Старіння розглядається як комплексний процес, при якому порушується функціонування усіх систем організму [20]. Ефективність роботи імунної системи також знижується з віком. Це супроводжується підвищенням частоти виникнення зл�оакісних новоутворень та інфекційних захворювань різної етіології, зростає ризик розвитку аутоімунних хвороб [7]. Останнім часом особлива увага у дослідженнях вікових змін імунної системи надається клітинам вродженого (неспецифічного) імунітету, серед яких важливу роль в розвитку вікових порушень відіграють фагоцити. Старіння супроводжується порушеннями у функціонуванні фагоцитів [18].

Однак, дані стосовно вікових особливостей функціонального стану фагоцитів різних популяцій і різної локалізації у літературі нечисленні і носять суперечливий характер. Зокрема, відсутня єдина думка щодо вікових змін ендоцитарної активності та оксидативного метаболізму – ключових функцій фагоцитів, залучених у протипухлинну резистентність та антиінфекційний захист організму [18,32]. Більшість авторів констатують зниження метаболічної активності фагоцитів з віком. Однак, результати деяких дослідницьких груп вказують на те, що при старінні підвищується стійкість організму до окремих інфекційних агентів завдяки перебудові метаболізму фагоцитів [27].

Виключне значення для підтримання імунного гомеостазу, у тому числі й з віком, мають тканинні фагоцити [13]. Відомо, що фагоцити різних тканин відрізняються за походженням. Більшість тканинних макрофагів мають ембріональне походження і в нормі не потребують трансміграції моноцитів з кісткового мозку в тканини для підтримання своєї кількості [9]. В окремих тканинах пул макрофагів підтримується за рахунок постійного надходження і диференціювання циркулюючих моноцитів [5,21]. Крім того, дендритні клітини та нейтрофіли, які також є резидентними фагоцитами багатьох тканин, мають кістковомозкове походження [8].

Linehan et al. (2014) виявили порушення фагоцитозу макрофагів ембріонального походження мишей з віком. При цьому у макрофагів, що диференціювалися з моноцитів кісткового мозку автори не спостерігали таких порушень [19]. Ці дані свідчать про те, що онтогенез фагоцитуючих клітин може відігравати важливу роль у розвитку їхніх вікових змін.

**Мета дослідження:** порівняти оксидативний метаболізм та фагоцитарну активність тканинних макрофагів ембріонального походження (альвеолярних макрофагів [14]) та нейтрофілів кісткового мозку.

**Об'єкт і методи дослідження.** У досліджах використовували молодих (2-3 міс.) та старих (18-23 міс.) мишей-самців лінії C57/B6 з віварію ДУ «Інститут геронтології ім. Д.Ф. Чеботарьова НАМН України». Тварин утримували в умовах вільного доступу до води та корму.

Експерименти виконані з дотриманням вимог Європейської конвенції про захист хребетних тварин, що використовуються для дослідних та інших наукових цілей, (Страсбург, 1986) та Закону України «Про захист тварин від жорстокого поводження» (2006).

Нейтрофіли виділяли з кісткового мозку центрифугуванням у градієнті щільності перколу. Стегно та гомілку виділяли з дотриманням правил асептики, стерилізували у 70% етиловому спирті, і промивали 3 рази у DPBS (Sigma, США). Обережно відрізали епіфізи, кістковомозкову порожнину промивали 5 мл HBSS (Thermo Fisher Scientific, США) і фільтрували через нейлоновий фільтр (70 мкм). Лейкоцити нашаровували на 62% розчин перколу (Sigma, США) у співвідношенні 1:1. Центрифугували при 1200 г протягом 30 хвилин. Після центрифугування, нейтрофіли збирали з-під шару 62% перколу, і відмивали DPBS [22]. Отримані клітини ресуспендували, підраховували в камері Ньюбауера, 1x10<sup>6</sup> клітин на одну пробу використовували для оцінки продукції РФК та фагоцитарної активності.

Для отримання альвеолярних макрофагів стерильно виділяли легені *en bloc* (разом з трахеєю), залишки крові відмивали охолодженим Ca<sup>++</sup>/Mg<sup>++</sup>-free PBS (Ca<sup>++</sup>/Mg<sup>++</sup>-free phosphate buffer solution). Легені тричі промивали 1 мл DPBS з 1 мМ EDTA за

допомогою інсулінового шприца. Отриманий бронхоальвеолярний лаваж центрифугували при 400 g протягом 10 хвилин. Супернатант видаляли, альвеолярні макрофаги відмивали DPBS, ресуспендували, підраховували в камері Ньюбауера.  $2 \times 10^5$  клітин на одну пробу використовували для оцінки продукції РФК та фагоцитарної активності [11].

Внутрішньоклітинну продукцію реактивних форм кисню (РФК) оцінювали методом проточної цитометрії [34]. У пробірці для проточної цитометрії додавали клітини у потрібному об'ємі. В контрольну пробірку до суспензії клітин додавали 30 мкл DPBS. В дослідні пробірки вносили 4,2 мкл робочого розчину дихлорофлюоресцеїну (Sigma, США) та 25,8 мкл DPBS, перемішували. Пробірки інкубували упродовж 30 хвилин при 37°C, після чого клітини центрифугували при 250 g протягом 5 хв. і відмивали центрифугуванням у 2 мл охолодженого DPBS з додаванням 0,02% EDTA. Зразки фіксували в 400 мкл DPBS-EDTA з 0,04% параформальдегіду, аналіз проводили на проточному цитофлюориметрі (FACSAria Cell Sorter, BD Biosciences, США) по каналу флуоресценції FL1. Оцінювали відсоток клітин, які продукували РФК, а також середню інтенсивність флуоресценції (MFI) на кількість клітин, що відображає рівень внутрішньоклітинної продукції РФК.

Фагоцитарну активність альвеолярних макрофагів та нейтрофілів також оцінювали методом проточної цитометрії [6]. У пробірці для проточної цитометрії додавали клітини у потрібному об'ємі. В контрольну пробірку до суспензії клітин додавали 30 мкл DPBS. В дослідні пробірки вносили 10 мкл суспензії міченого флюоресцеїн-5-ізотіоціанатом *Staphylococcus aureus* Cowan (200 млн/мл) та 20 мкл DPBS, перемішували. Пробірки інкубували упродовж 30 хвилин при 37°C, після чого клітини центрифугували при 250 g протягом 5 хв. і відмивали центрифугуванням у 2 мл охолодженого DPBS з додаванням 0,02% EDTA. Зразки фіксували в 400 мкл DPBS-EDTA з 0,04% параформальдегіду, аналіз проводили на проточному цитофлюориметрі по каналу флуоресценції FL1. Результати представляли як відсоток фагоцитуючих клітин (фагоцитарне число) і фагоцитарний індекс (ФІ), котрий визначали за формулою:

$$[\text{Gmean}_{\text{pos}} / P_{\text{pos}}] - [\text{Gmean}_{\text{neg}} / P_{\text{neg}}],$$

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

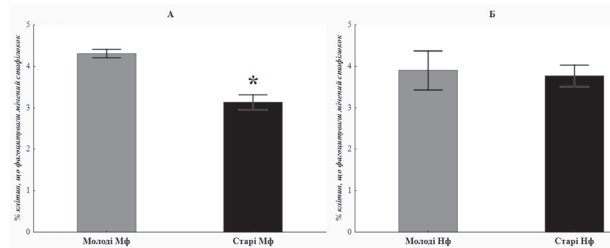
Статистичний аналіз результатів проводили за допомогою t-критерію Стьюдента. Дані представлені як середні значення (M) та стандартна помилка середнього (SE).

**Результати дослідження та їх обговорення.**

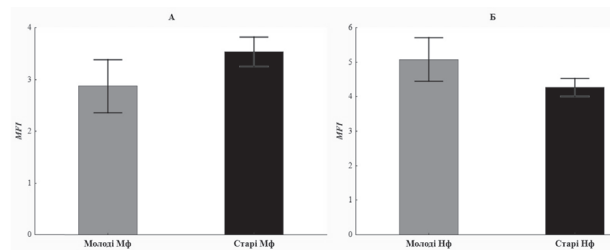
Фагоцитоз є важливим імунобіологічним процесом, який бере участь у виконанні різноманітних функцій

організму [12]. Ендоцитарна активність резидентних фагоцитів тканин необхідна для їх реконструкції і для підтримання гомеостазу [25]. Фагоцитоз відіграє також ключову роль у протимікробному захисті, оскільки він потрібен як для безпосереднього знищення мікроорганізмів професійними фагоцитами, так і для ініціації адаптивної імунної відповіді за рахунок презентації ендоцитованих антигенів дендритними клітинами [17].

За результатами наших досліджень спостерігалось достовірне зниження фагоцитарного числа альвеолярних макрофагів у старих мишей ( $p=0,019$ ) (рис. 1А). Разом з тим, цей показник статистично вірогідно не відрізнявся у кістковомозкових нейтрофілів, отриманих від тварин різного віку (рис. 1Б). Також не спостерігалось достовірної різниці фагоцитарного індексу як альвеолярних макрофагів, так і нейтрофілів від мишей різного віку (рис. 2). Wong et al. (2017) виявили у старих мишей цієї ж лінії достовірно нижчий відсоток альвеолярних макрофагів, що фагоцитували апоптисовані нейтрофіли та мічені часточки, порівняно з молодими тваринами [33]. Ці дані підтверджують результати



наших експериментів. Крім того, у вищенаведеному дослідженні також виявлено зниження експресії скавенджер рецептора CD204 у альвеолярних ма-



крофагів з віком. Відомо, що цей рецептор здатен розпізнавати бактеріальні ліганди [15], і порушення його експресії при старінні може бути причиною зниження фагоцитарного числа альвеолярних макрофагів старих тварин у нашому експерименті.

**Рис. 1. Фагоцитарне число альвеолярних макрофагів (А) та нейтрофілів (Б), отриманих від мишей різного віку. Мφ – альвеолярні макрофаги, Нφ – нейтрофіли. \* $p=0,019$ .**

**Рис. 2. Фагоцитарний індекс альвеолярних макрофагів (А) та нейтрофілів (Б), отриманих від мишей різного віку. Мφ – альвеолярні макрофаги, Нφ – нейтрофіли. MFI – середня інтенсивність флуоресценції.**

Синтез РФК є невід'ємним компонентом протимікробного захисту фагоцитів. Показано, що окрім

безпосереднього токсичного впливу на мікробні клітини, РФК здатні мобілізувати інші протимікробні механізми завдяки їхній дії в якості вторинних месенджерів клітинного сигналіну [2,35]. РФК задіяні в активації міграції фагоцитів, регуляції їх диференціювання і фагоцитарної активності. Посилення синтезу РФК може супроводжуватися загибеллю фагоцитів завдяки апоптогенній дії реактивних кисневих метаболітів [29].

Оксидативний метаболізм фагоцитів обох досліджених нами популяцій змінювався з віком. Відсоток клітин, що продукували РФК, достовірно зменшувався у популяції альвеолярних макрофагів, отриманих від старих мишей ( $p=0,025$ ) (рис. 3А). Також спостерігалася тенденція до зниження цього показника у нейтрофілів, отриманих від старих тварин ( $p=0,056$ ) (рис. 3Б). На рівні тенденції зареєстровано незначне посилення синтезу внутрішньоклітинних РФК альвеолярними макрофагами старих тварин. Натомість, не виявлено вікових змін рівня продукції РФК нейтрофілами (рис. 4).

Дані стосовно вікових змін продукції РФК альвеолярними макрофагами мишей у літературі відсутні. Однак, Tasat et al. (2013) виявлено зниження відсотку альвеолярних мононуклеарних фагоцитів, що продукують РФК, у старих щурів [30]. Це дозволяє зробити припущення, що виявлені нами вікові зміни тканинних фагоцитів легень не є видоспецифічними.

Як видно з отриманих нами результатів, функціональний стан нейтрофілів, отриманих з кісткового мозку, практично не відрізняється у молодих і старих тварин. Більшість даних, представлених у науковій літературі стосовно вікових змін нейтрофілів, отримані з використанням циркулюючих клітин молодих та старих донорів. Переважно ці результати вказують на порушення фагоцитозу нейтрофілів крові людини при старінні [4,32]. Разом з тим, показано відсутність порушень фагоцитарної функції циркулюючих нейтрофілів мишей з віком [1,23]. Вікові аспекти оксидативного метаболізму нейтрофілів також досліджені, головним чином, з використанням циркулюючих клітин. Результати цих досліджень доволі суперечливі. Окремі автори вказують на збільшення з віком продукції РФК нейтрофілами периферичної крові людини [16,31]. У нашому попередньому експерименті також було виявлено посилення продукції РФК поліморфноядерними фагоцитами селезінки старих мишей [1]. Деякі дослідницькі групи наводять докази відсутності змін [26], або навіть зниження утворення РФК циркулюючими нейтрофілами людини при старінні [10]. Відомо, що фенотип та морфологія циркулюючих нейтрофілів змінюються протягом їхнього нетривалого життя, із прозапальним зсувом метаболізму внаслідок «старіння» цих клітин [3]. Нейтрофіли кісткового мозку є новим предметом активних досліджень у зв'язку з виявленням феномену їх медулярного депонування і кліренсу цих клітин медулярними макрофагами [24,28]. Автори виявленого феномену висловлюють припущення,

що у кістковому мозку в умовах гомеостазу можуть накопичуватися як щойно диференційовані молоді, так і старіючі нейтрофіли. Які з них переважають поки що не встановлено. Це дозволяє висловити припущення, що відсутність статистично вірогідних відмінностей у досліджених метаболічних показниках кісткомозкових нейтрофілів у тварин різного віку в наших експериментах може зумовлюватися переважанням відпрацьованих клітин, які підлягають кліренсу, незалежно від віку тварин. Однак, висловлене припущення потребує додаткових досліджень.

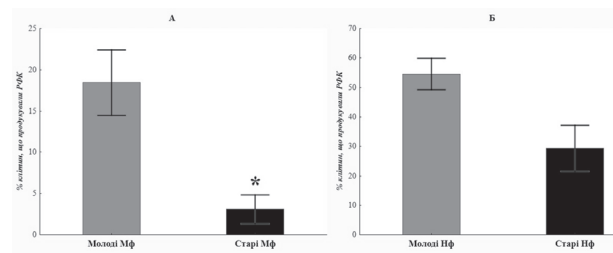


Рис. 3. Відсоток альвеолярних макрофагів (А) та нейтрофілів (Б), отриманих від тварин різного віку, що продукували реактивні форми кисню (РФК). Мφ – альвеолярні макрофаги, Нφ – нейтрофіли. \* $p=0,025$ .

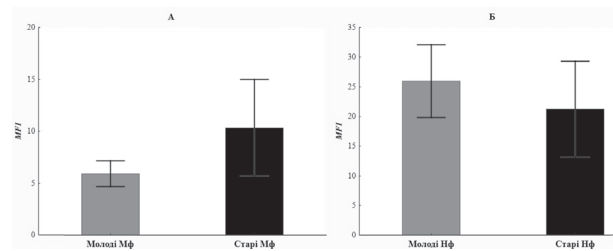


Рис. 4. Продукція реактивних форм кисню альвеолярними макрофагами (А) та нейтрофілами (Б), отриманими від мишей різного віку. Мφ – альвеолярні макрофаги, Нφ – нейтрофіли. MFI – середня інтенсивність флуоресценції.

**Висновки.** Зареєстровано виразні вікові зміни у популяції альвеолярних макрофагів, які проявлялися зниженням відсотку клітин, що фагоцитували мічений стафілокок, та клітин, що продукували РФК. Нейтрофіли кісткового мозку старих мишей по досліджених метаболічних показниках практично не відрізнялися від відповідних клітин, отриманих від молодих тварин. Це вказує на важливу роль тканинного мікрооточення старого організму у розвитку вікових порушень фагоцитів.

**Перспективи подальших досліджень.** Механізми розвитку порушень фагоцитів при старінні досліджені недостатньо. Ідентифікація причинних факторів, відповідальних за розвиток цих порушень, є запорукою успішної розробки етіотропних терапевтичних підходів для лікування захворювань у людей похилого віку.

**Література**

1. Dvogyi R.S. Funktsional'niy stan ta metabolichna polarizatsiya makrofagiv selezinki starikh imunizovanikh mishey / R.S. Dvogyi, D.V. Shitikov, I.M. Pishel' [ta in.] // Probl. star. i dolgoletiya. – 2015. – № 24 (2). – S. 144-152.
2. Abais J.M. Redox regulation of NLRP3 inflammasomes: ROS as trigger or effector? / J.M. Abais, M. Xia, Y. Zhang [et al.] // Antioxid. Redox Signal. – 2015. – Vol. 22 (13). – P. 1111-1129.
3. Adrover J.M. Aging: A temporal dimension for neutrophils / J.M. Adrover, J.A. Nicolas-Avila, A. Hidalgo // Trends Immunol. – 2016. – Vol. 37 (5). – P. 334-345.
4. Alonso-Fernandez P. Neutrophils of centenarians show function levels similar to those of young adults / P. Alonso-Fernandez, M. Puerto, I. Mate [et al.] // J. Am. Geriatr. Soc. – 2008. – Vol. 56 (12). – P. 2244-2251.
5. Bain C.C. The monocyte-macrophage axis in the intestine / C.C. Bain, A.M. Mowat // Cell. Immunol. – 2014. – Vol. 291 (1-2). – P. 41-48.
6. Cantinieaux B. *Staphylococcus aureus* phagocytosis. A new cytofluorometric method using FITC and paraformaldehyde / B. Cantinieaux, C. Hariga, P. Courtoy [et al.] // J. Immunol. Methods. – 1989. – Vol. 121 (2). – P. 203-208.
7. Castelo-Branco C. The immune system and aging: a review / C. Castelo-Branco, I. Soveral // Gynecol. Endocrinol. – 2014. – Vol. 30 (1). – P. 16-22.
8. De Kleer I. Ontogeny of myeloid cells / I. De Kleer, F. Willems, B. Lambrecht, S. Goriely // Front. Immunol. – 2014. – Vol. 5. – P. 423.
9. Epelman S. Origin and functions of tissue macrophages / S. Epelman // Immunity. – 2014. – Vol. 41 (1). – P. 21-35.
10. Fulop T. Signal transduction and functional changes in neutrophils with aging / T. Fulop, A. Larbi, N. Douzief [et al.] // Aging Cell. – 2004. – Vol. 3 (4). – P. 217-226.
11. Goncalves R. The isolation and characterization of murine macrophages / R. Goncalves, D.M. Mosser // Curr. Protoc. Immunol. – 2015. – Vol. 111.
12. Gordon S. Phagocytosis: an immunobiologic process / S. Gordon // Immunity. – 2016. – Vol. 44 (3). – P. 463-475.
13. Gordon S. Tissue macrophages: heterogeneity and functions / S. Gordon, A. Pluddemann // BMC Biology. – 2017. – Vol. 15. – P. 53.
14. Guilliams M. Alveolar macrophages develop from fetal monocytes that differentiate into long-lived cells in the first week of life via GM-CSF / M. Guilliams, I. De Kleer, S. Henri [et al.] // J. Exp. Med. – 2013. – Vol. 210 (10). – P. 1977-1992.
15. Kelley J.L. Scavenger receptor-A (CD204): a two-edged sword in health and disease / J.L. Kelley, T.R. Ozment, C. Li [et al.] // Crit. Rev. Immunol. – 2014. – Vol. 34 (3). – P. 241-261.
16. Kovalenko E.I. ROS production, intracellular HSP70 levels and their relationship in human neutrophils: effects of age / E.I. Kovalenko, A.A. Boyko, V.F. Semenov [et al.] // Oncotarget. – 2014. – Vol. 5 (23). – P. 11800-11812.
17. Lim J.J. Diversity and Versatility of Phagocytosis: Roles in Innate Immunity, Tissue Remodeling, and Homeostasis / J.J. Lim, S. Grinstein, Z. Roth // Front. Cell. Infect. Microbiol. – 2017. – Vol. 7. – P. 191.
18. Linehan E. Ageing and the immune system: focus on macrophages / E. Linehan, D.C. Fitzgerald // Eur J Microbiol Immunol (Bp). – 2015. – Vol. 5 (1). – P. 14-24.
19. Linehan E. Aging impairs peritoneal but not bone marrow-derived macrophage phagocytosis / E. Linehan, Y. Dombrowski, R. Snoddy [et al.] // Aging Cell. – 2014. – Vol. 13 (4). – P. 699-708.
20. Lopez-Otin C. The hallmarks of aging / C. Lopez-Otin, M.A. Blasco, L. Partridge [et al.] // Cell. – 2013. – Vol. 153 (6). – P. 1194-1217.
21. Malissen B. The origins and functions of dendritic cells and macrophages in the skin / B. Malissen, S. Tamoutounour, S. Henri // Nat. Rev. Immunol. – 2014. – Vol. 14 (6). – P. 417-428.
22. Mocsai A. G-protein-coupled receptor signaling in Syk-deficient neutrophils and mast cells / A. Mocsai, H. Zhang, Z. Jakus [et al.] // Blood. – 2003. – Vol. 101 (10). – P. 4155-4163.
23. Murciano C. Influence of aging on murine neutrophil and macrophage function against *Candida albicans* / C. Murciano, A. Yanez, J.E. O'Connor [et al.] // FEMS Immunol. Med. Microbiol. – 2008. – Vol. 53 (2). – P. 214-221.
24. Rankin S.M. The bone marrow: a site of neutrophil clearance / S.M. Rankin // J. Leukoc. Biol. – 2010. – Vol. 88 (2). – P. 241-251.
25. Röszer T. Understanding the mysterious M2 macrophage through activation markers and effector mechanisms / T. Röszer // Mediators Inflamm. – 2015. – Vol. 2015. – P. 816-460.
26. Sauce D. Reduced oxidative burst by primed neutrophils in the elderly individuals is associated with increased levels of the CD16bright/CD62Ldim immunosuppressive subset / D. Sauce, Y. Dong, L. Campillo-Gimenez [et al.] // J. Gerontol. A Biol. Sci. Med. Sci. – 2017. – Vol. 72 (2). – P. 163-172.
27. Smallwood H.S. Aging enhances the production of reactive oxygen species and bactericidal activity in peritoneal macrophages by upregulating classical activation pathways / H.S. Smallwood, D. Lopez-Ferrer, T.C. Squier // Biochemistry. – 2011. – Vol. 50 (45). – P. 9911-9922.
28. Strydom N. Regulation of circulating neutrophil numbers under homeostasis and in disease / S.M. Rankin, N. Strydom // J. Innate Immun. – 2013. – Vol. 5 (4). – P. 304-314.
29. Tan H.Y. The reactive oxygen species in macrophage polarization: reflecting its dual role in progression and treatment of human diseases / H.Y. Tan, N. Wang, S. Li [et al.] // Oxid. Med. Cell Longev. – 2016. – Vol. 2016. – P. 16 p.
30. Tasat D.R. Age-dependent change in reactive oxygen species and nitric oxide generation by rat alveolar macrophages / D.R. Tasat, R. Mancuso, S. O'Connor, B. Molinari // Aging Cell. – 2003. – Vol. 2. – P. 159-164.
31. Verschoor C.P. Circulating TNF and mitochondrial DNA are major determinants of neutrophil phenotype in the advanced-age, frail elderly / C.P. Verschoor, D. Loukov, A. Naidoo [et al.] // Mol. Immunol. – 2015. – Vol. 65 (1). – P. 148-156.
32. Wessels I. Immunosenescence of polymorphonuclear neutrophils / I. Wessels, J. Jansen, L. Rink, P. Uciechowski // ScientificWorldJournal. – 2010. – Vol. 10. – P. 145-160.
33. Wong C.K. Aging impairs alveolar macrophage phagocytosis and increases influenza-induced mortality in mice / C.K. Wong, C.A. Smith, K. Sakamoto [et al.] // J. Immunol. – 2017. – Vol. 199 (3). – P. 1060-1068.

34. Woo J.M. Curcumin protects retinal pigment epithelial cells against oxidative stress via induction of heme oxygenase-1 expression and reduction of reactive oxygen / J.M. Woo, D.-Y. Shin, S.J. Lee [et al.] // Mol. Vis. – 2012. – Vol. 18. – P. 901-908.
35. Zhang J. ROS and ROS-mediated cellular signaling / J. Zhang, X. Wang, V. Vikash [et al.] // Oxid. Med. Cell Longev. – 2016. – Vol. 2016. – 18 p.

**УДК 571.27**

**ФУНКЦИОНАЛЬНИЙ СТАН АЛЬВЕОЛЯРНИХ МАКРОФАГІВ ТА НЕЙТРОФІЛІВ КІСТКОВОГО МОЗКУ МИШЕЙ РІЗНОГО ВІКУ**

**Довгий Р. С., Сківка Л. М.**

**Резюме.** Фагоцити відіграють ключову роль у тканинному гомеостазі і вродженому імунному захисті організму. Зміни фагоцитуючих клітин з віком досліджені недостатньо. В літературі наявні суперечливі дані стосовно змін фагоцитозу та продукції реактивних форм кисню при старінні. Метою нашої роботи було порівняти вікові зміни оксидативного метаболізму та фагоцитарної активності тканинних макрофагів ембріонального походження та нейтрофілів кісткового мозку. Виявлено достовірне зниження фагоцитарного числа та відсотку клітин, що продукували реактивні форми кисню, у альвеолярних макрофагів старих мишей. Статистично вірогідні відмінності між дослідженими метаболічними характеристиками нейтрофілів кісткового мозку старих і молодих тварин були відсутні. Це вказує на важливу роль тканинного мікрооточення старого організму в розвитку вікових порушень фагоцитуючих клітин.

**Ключові слова:** старіння, альвеолярні макрофаги, нейтрофіли, фагоцитоз, реактивні форми кисню.

**УДК 571.27**

**ФУНКЦИОНАЛЬНОЕ СОСТОЯНИЕ АЛЬВЕОЛЯРНЫХ МАКРОФАГОВ И НЕЙТРОФИЛОВ КОСТНОГО МОЗГА МЫШЕЙ РАЗНОГО ВОЗРАСТА**

**Довгий Р. С., Сківка Л. М.**

**Резюме.** Фагоциты играют ключевую роль в тканевом гомеостазе и врожденной иммунной защите организма. Изменения фагоцитирующих клеток с возрастом исследованы недостаточно. В литературе имеются противоречивые данные относительно изменений фагоцитоза и продукции реактивных форм кислорода при старении. Целью нашей работы было сравнить возрастные изменения оксидативного метаболизма и фагоцитарной активности тканевых макрофагов эмбрионального происхождения и нейтрофилов костного мозга. Обнаружено достоверное снижение фагоцитарного числа и процента клеток, продуцирующих реактивные формы кислорода, у альвеолярных макрофагов старых мышей. Статистически достоверные отличия между исследованными метаболитическими характеристиками нейтрофилов костного мозга старых и молодых животных отсутствовали. Это указывает на важную роль тканевого микроокружения старого организма в развитии возрастных нарушений фагоцитирующих клеток.

**Ключевые слова:** старение, альвеолярные макрофаги, нейтрофилы, фагоцитоз, реактивные формы кислорода.

**UDC 571.27**

**FUNCTIONAL STATE OF ALVEOLAR MACROPHAGES AND BONE MARROW NEUTROPHILS FROM MICE OF DIFFERENT AGES**

**Dovhyi R. S., Skivka L. M.**

**Abstract.** Phagocytes play crucial role in tissue homeostasis and innate immune defence of the organism. Immune system functioning is deteriorated with aging. Phagocytosis and reactive oxygen species production are poorly studied processes with contradictory results being obtained in different experiments. Moreover, some studies suggest that resistance to certain infectious agents increase with age.

It is known that distinct phagocytes differ in their ontogenetic origin. Furthermore, Linehan et al (2014) showed age-related decline in peritoneal macrophage phagocytosis, while such defect was absent in bone marrow-derived macrophages. Thus, the aim of the research was to compare age-related changes in oxidative metabolism and phagocytic activity of tissue macrophages of embryonic origin and bone marrow neutrophils.

Young (2-3 mo) and aged (18-23 mo) male C57/B6 mice were used in the experiment. Neutrophils were obtained by percoll gradient centrifugation of bone marrow-derived cells. Alveolar macrophages were collected by bronchoalveolar lavage of the lungs. Cells were used to measure intracellular reactive oxygen species (ROS) production and phagocytic activity by flow cytometry. Percent of phagocytic cells, phagocytic index, percent of ROS producing cells and mean fluorescence intensity (MFI) per amount of ROS producing cells were analyzed. Statistical significance of the data was determined using Student's t-test.

There was statistically significant decrease in the percentage of alveolar macrophages obtained from aged mice, which phagocytized FITC-labeled *Staphylococcus aureus* ( $p=0,019$ ). In neutrophils, however, there was no change in proportion of phagocytizing cells with aging. Percentage of alveolar macrophages producing ROS was significantly lowered in aged mice ( $p=0,025$ ). Also, there was a tendency towards the decrease of ROS producing neutrophils with aging ( $p=0,056$ ). There was slight trend toward increase of ROS production per cell in alveolar macrophages obtained from old mice, while in neutrophils there was no statistical difference in this parameter

between cells from young and old animals Phagocytic index was unchanged in both alveolar macrophages and neutrophils obtained from old mice as compared to corresponding cells from young animals.

Our data on age-related changes of alveolar macrophages is corroborated by previous findings of different authors. Percent of ROS producing alveolar macrophages was decreased in aged rats. Wong et al. (2017) found the significantly lower percent of alveolar macrophages which phagocytized apoptotic neutrophils and fluorophore labeled beads. Also, they found out that CD204 expression was down-regulated with aging, which can explain our results, due to the ability of CD204 to recognize bacterial ligands.

As can be seen from our results, functional state of bone marrow neutrophils from aged mice was almost unaffected. Unimpaired phagocytosis in murine neutrophils from old animals was also shown in previous publications. There are controversial results regarding changes in ROS generation by neutrophils, with studies showing increased, unchanged and decreased production with aging. However, most of these studies were performed on neutrophils obtained from the blood of elderly. It was shown that phenotype and morphology of neutrophils change during their short life, with a shift toward more proinflammatory activation due to cell «aging». Bone marrow derived neutrophils must contain a larger proportion of «young» cells as compared to neutrophils from blood and tissues. Thus, different «age» of neutrophils used in experiments may be an important factor determining differences in the results of our experiment in comparison to aforementioned studies. However, this issue requires further study.

In conclusion, there were more pronounced age-related changes in tissue macrophages as compared to neutrophils. It points out that tissue microenvironment of an old organism plays important role in the development of age-related impairment of phagocytes.

**Keywords:** aging, alveolar macrophages, neutrophils, phagocytosis, reactive oxygen species.

*Рецензент – проф. Білаш С. М.*

**Стаття надійшла 11.08.2017 року**