

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ І НАУКИ УКРАЇНИ
ХАРКІВСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ
ІМЕНІ В. Н. КАРАЗІНА

ОГІЄНКО СВІТЛАНА ЛЕОНІДІВНА

УДК 612.35:612.419]:576.3

**ВІК-ЗАЛЕЖНІ ХАРАКТЕРИСТИКИ
КЛІТИН КІСТКОВОГО МОЗКУ У ПЕРВИННІЙ КУЛЬТУРІ
ЗА РІЗНИХ ФУНКЦІОНАЛЬНИХ СТАНІВ ПЕЧІНКИ**

03.00.13 – фізіологія людини і тварин

АВТОРЕФЕРАТ

дисертації на здобуття наукового ступеня
кандидата біологічних наук

Харків – 2019

Дисертацією є рукопис.

Робота виконана у Науково-дослідному інституті біології Харківського національного університету імені В. Н. Каразіна

Науковий керівник: доктор біологічних наук, професор
Божков Анатолій Іванович,
Науково-дослідний інститут біології Харківського
національного університету імені В. Н. Каразіна
Міністерства освіти і науки України,
м. Харків,
директор,
завідувач кафедри молекулярної біології та біотехнології

Офіційні опоненти: доктор біологічних наук, професор,
Берченко Ольга Григорівна,
Інститут неврології, психіатрії та наркології
НАМН України,
м. Харків,
завідувач лабораторії нейрофізіології,
імунології та біохімії

доктор біологічних наук, професор,
Петренко Олександр Юрійович,
Інститут проблем кріобіології і кріомедицини
НАН України,
м. Харків,
завідувач відділу кріобіохімії

Захист відбудеться «___»_____2019 року о _____ годині на засіданні спеціалізованої вченої ради К 64.051.17 Харківського національного університету імені В. Н. Каразіна за адресою: 61022, м. Харків, майдан Свободи, 6, ауд. 7-26

З дисертацією можна ознайомитися у Центральній науковій бібліотеці Харківського національного університету імені В. Н. Каразіна за адресою: 61022, м. Харків, майдан Свободи, 4.

Автореферат розісланий «___»_____2019 року

Вчений секретар
спеціалізованої вченої ради

М. К. Ковальова

ЗАГАЛЬНА ХАРАКТЕРИСТИКА РОБОТИ

Актуальність теми. Більшість трактувань явища старіння зводиться до того, що це – дегенеративний процес, який визначається втратою надійності функціонування біологічних систем і, як наслідок, підвищенням «уразливості» від різноманітних екзогенних факторів, що призводить до розвитку патологій та смерті (Анісімов В. Н., 2008, Bozhkov A. I. et al., 2019).

У спробах пояснити можливі механізми старіння, було висловлено велику кількість мономеханістичних гіпотез. Прикладом можуть служити теломеразна гіпотеза старіння, вільно-радикальна гіпотеза та інші (Harman D., 1956; Bersani F. S. et al., 2015). Однак, все різноманіття уявлень існуючих гіпотез може бути об'єднано в дві концепції: генетичну та середову, а точніше – єдину епігенетичну концепцію.

Ми вважаємо, що епігенетична концепція може дати пояснення механізмів старіння як результату темпоральних взаємодій метаболічної системи з мінливими факторами мікрооточення (середовища). Існуючі методи генетичних і молекулярно-біологічних методів дослідження не завжди дозволяють класифікувати та пояснити фізіологічні прояви адаптивних або патологічних реакцій організму. Це пов'язано з багаторівневістю регуляції біологічних процесів, наявністю альтернативних варіантів формування біологічної відповіді та, поки, мало вивченими механізмами інтеграційних взаємодій метаболічних процесів до єдиної фізіологічної відповіді (Bozhkov A. I. et al., 2019). Як відомо, найбільш ефективним методологічним прийомом пізнання є розробка і створення експериментальних моделей. Вони дозволяють не тільки досліджувати явища, але і перевіряти істинність висловлених гіпотез і дати прогноз поведінки систем в заданих умовах (O'Brien E. J. et al., 2015).

У зв'язку з цим, розробка експериментальних моделей, що дозволяють досліджувати механізми взаємодій метаболізму з комплексом факторів мікрооточення, може бути корисною у вирішенні глобальної проблеми – старіння та інших фізіологічних процесів. З огляду на багаторівневість регуляції та наявність альтернативних шляхів метаболізму для вирішення завдань геронтології, найбільш адекватними можуть бути клітинні моделі. Ми вважаємо, що вдалою клітинною моделлю вік-залежних механізмів відгуку метаболічної системи на фактори мікрооточення можуть бути клітини кісткового мозку.

По-перше, кістковий мозок представлений різними типами клітин: стовбуровими клітинами, з високим проліферативним і диференційованим потенціалом; біпотентними клітинами-попередниками (комітовані клітини); уніпотентними клітинами-попередниками та зрілими клітинами лімфоїдної та кровотворної системи (Zhou B. O. et al., 2015). В теперішній час сформувався уявлення щодо провідної ролі стовбурових клітин у вік-залежній втраті здатності організму до адаптації як результату «втрати» пула стовбурових клітин, в тому числі, кісткового мозку. У зв'язку з цим, актуальним є дослідження проліферативної активності клітин кісткового мозку.

По-друге, функціональна активність (інтенсивність проліферації та спрямованість диференціювання клітин кісткового мозку) змінюється у відповідь на патологічні та адаптивні зміни інших систем організму; тобто вони активно

реагують на мікрооточення, що формується в самому організмі (Florencio-Silva R. et al., 2015), що дозволяє дослідити в організмі взаємовідносини між тканинами.

По-третє, клітини кісткового мозку можна виділити та культивувати в системі *in vitro*. І, нарешті, показано, що в клітинах кісткового мозку старих тварин виявляються генетичні та епігенетичні зміни, які ведуть до зниження швидкості проліферації, вкорочення теломер, підвищенню кількості продуктів вільно-радикальних реакцій та ін., тобто мають місце вік-залежні зміни на клітинному рівні (Bara J. J. et al., 2014; Gallagher K. A. et al., 2015).

Отже, первинні культури клітин кісткового мозку, які отримані у молодих та старих тварин, можуть бути адекватною моделлю у вивченні взаємного впливу та інтеграції різних метаболічних процесів у ході старіння. Одним з підходів у зміні мікрооточення клітин кісткового мозку в системі *in vivo* є зміна функцій печінки. Для того, щоб моделювати функціональну активність печінки, нами були використано кілька підходів: 1–індукція фіброзу печінки багаторазовим введенням сірчаної кислоти міді (Cu–індукований фіброз печінки); 2–індукція фіброзу печінки багаторазовим введенням чотирьоххлористого вуглецю (CCl₄–індукований фіброз печінки); 3–вплив біологічно активних сполук (низькомолекулярні компоненти молозива) на функціональні характеристики печінки; 4–різний вік тварин (молоді і старі).

Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами. Дисертаційні наукові дослідження проводились протягом 2015 – 2018 років у НДІ біології Харківського національного університету імені В. Н. Каразіна згідно планів НДР № 0115U000502 «Отримання, скринінг та оцінка антитоксичних властивостей низькомолекулярних субстанцій з мікроводоростей» (здобувач – виконавець); НДР № 0115U000486 «Розробка теорії експериментальної регуляції тривалості онтогенезу» (здобувач – виконавець).

Мета та завдання досліджень. Метою цієї роботи було дослідити вплив мікрооточення клітин кісткового мозку на певні характеристики клітин кісткового мозку (вміст кальцію, міді, реактивних форм кисню), їх здібність до проліферації, «тривалість життя» клітин в культурі на моделях: старіння організму, наявність фіброзу печінки, дія низькомолекулярних компонентів молозива.

У межах теми дослідження визначені наступні **завдання**:

1. Оцінити проліферативну активність клітин кісткового мозку, отриманих у молодих та старих тварин, у первинній культурі з 1 по 4 добу культивування.
2. Виявити вплив Cu–індукованого фіброзу печінки та CCl₄–індукованого фіброзу печінки на проліферативну активність та «тривалість життя» клітин кісткового мозку у первинній культурі.
3. Охарактеризувати вплив індукованих фіброзів печінки на «тривалість життя» лімфоцитів.
4. Проаналізувати вплив концентрацій екзогенних іонів міді на інтенсивність росту клітин кісткового мозку, виділених у тварин різного віку в нормі та за умов Cu- та CCl₄–індукованого фіброзу печінки, у первинній культурі.
5. Дослідити вплив комплексу низькомолекулярних компонентів молозива на інтенсивність росту клітинних культур кісткового мозку, виділених у тварин різного віку в нормі та за умов Cu–індукованого фіброзу печінки.

6. Оцінити вік-залежний вплив Cu-індукованого фіброзу печінки на вміст іонів Cu^{2+} , Ca^{2+} та вільних форм кисню.

Об'єкт дослідження – показники поведінки клітин кісткового мозку у первинній культурі, які були отримані у тварин різного віку та за умов інтоксикації тварин, а також при застосуванні низькомолекулярних компонентів молозива.

Предмет дослідження – вік-залежні зміни проліферативної активності характеристик морфотипів клітин кісткового мозку у первинній культурі за умов інтоксикації тварин та при застосуванні низькомолекулярних компонентів молозива.

Методи дослідження – фізіологічні методи дослідження (оцінка нативності плазматичної мембрани клітин кісткового мозку, визначення вмісту іонів кальцію та реактивних форм кисню у клітинах кісткового мозку, культивування клітин кісткового мозку); препаративні (отримання культури клітин кісткового мозку); цитологічні (визначення кількості та морфотипів клітин кісткового мозку); спектрофотометричні (визначення вмісту іонів міді). Бази даних було сформовано в Microsoft Office Excel 2010.

Статистичний аналіз даних здійснювали з використанням методу непараметричної статистики (Манні – Уїтні), а також програмного пакету Statistica 8.0 фірми StatSoft. Графічну візуалізацію отриманих результатів виконували у програмах Origin 8.5.1 фірми OriginLab Corporation та Apache OpenOffice фірми Apache Software Foundation.

Наукова новизна одержаних результатів. *Наукова новизна* результатів дослідження, отриманих особисто здобувачем, полягає у наступному:

- на різних моделях (старіння, різні форми фіброзу печінки, вплив компонентів молозива) вперше показано вплив мікрооточення клітин кісткового мозку на патерн морфотипів клітин кісткового мозку, їх проліферативну активність та «тривалість життя» клітин кісткового мозку у первинній культурі. Зміна поведінки клітин кісткового мозку у культурі корелювала зі змінами таких фізико-хімічних характеристик клітин кісткового мозку, як вміст іонів кальцію, іонів міді та вільних форм кисню;

- уперше показано, що реакція клітин кісткового мозку на зміну мікрооточення, яка викликана індукованими патологіями печінки, залежить від віку тварин, тобто вік впливає на фізико-хімічні та функціональні характеристики клітин кісткового мозку;

- уперше показано, що розвиток фіброзу печінки має виражений вплив на характеристики клітин кісткового мозку; це залежить від індуктора фіброзу печінки (сірчаноокисла мідь та чотирьоххлористий вуглець). Розвиток Cu-індукованого фіброзу печінки супроводжується пригніченням швидкості росту клітин у первинній культурі, отриманих у молодих тварин, у той час, як клітин кісткового мозку, отримані у старих тварин та переведені у первинну культуру, зберігали проліферативну активність, на відміну від молодих тварин, хоча відставали від контролю;

- уперше показано, що фіброз печінки, індукований введенням чотирьоххлористого вуглецю, викликав іншу вік-залежну відповідь на рівні клітин кісткового мозку. Якщо клітини кісткового мозку були виділені у молодих тварин з

ССL₄-індукований фіброз печінки, то вони не відрізнялися за проліферативною активністю від контролю. У той же час, якщо клітини кісткового мозку були виділені у старих тварин з ССL₄-індукованим фіброзом печінки, то їх проліферативна активність не відрізнялася від контролю;

- уперше показано, що вікові характеристики клітин кісткового мозку, які сформувалися, впливають на наступну відповідь клітин кісткового мозку до дії сірчаною кислотою міді. Внесення 4 мМ та 8 мМ сірчаною кислотою міді до культури клітин кісткового мозку молодих тварин супроводжувалось дозо-залежним характером інгібування проліферативної активності. У культурі клітин кісткового мозку старих тварин мала місце зворотна дозова залежність, як для інтактних, так і для тварин з фіброзом печінки;

- уперше показано, що біологічно активні сполуки – низькомолекулярні компоненти молозива можуть відновлювати характеристики клітин кісткового мозку за впливу Си-індукованого фіброзу печінки;

- уперше показано взаємозв'язок між вмістом іонів міді, кальцію, вільних форм кисню та проліферативною активністю клітин кісткового мозку. На вміст іонів міді, кальцію, вільних форм кисню впливав вік тварин і стан їх печінки.

Практичне значення одержаних результатів. Результати роботи показали, що низькомолекулярні компоненти молозива можуть відновлювати характеристики клітин кісткового мозку при індукованих патологічних станах печінки, та можуть бути основою для подальшої розробки фармакологічних препаратів, що впливають на імуногенез клітин кісткового мозку. В теперішній час, ці роботи продовжуються в НДІ біології Харківського національного університету імені В. Н. Каразіна в рамках держбюджетної теми з Фермерським господарством «Альфа».

Результати дисертаційної роботи впроваджені в навчальний процес на біологічному факультеті Харківського національного університету імені В. Н. Каразіна при розробці практичних робіт з дисциплін «Клітинні технології» для студентів біологічного факультету, які навчаються за спеціальністю 162 «Біотехнології та біоінженерія» на першому (бакалаврському) рівні освіти кафедри молекулярної біології та біотехнології Харківського національного університету імені В. Н. Каразіна.

Біоетична експертиза. Роботу з лабораторними тваринами (щурами) проводили відповідно до вимог положень «Європейської конвенції про захист хребетних тварин, які використовуються для експериментальних та інших наукових цілей» (Страсбург, 1986) та згідно відповідних законів України. Біоетичною комісією НДІ біології Харківського національного університету імені В. Н. Каразіна порушень при проведенні науково-дослідної роботи не виявлено (протокол № 5 від 16 травня 2019 р.).

Особистий внесок здобувача. Дисертантом самостійно проведено аналіз літературних даних за темою дисертації, виконано експериментальні дослідження, проведено статистичні розрахунки, написано та оформлено розділи дисертації. Обговорення основних положень дисертаційної роботи виконано спільно з науковим керівником д.б.н., проф., директором НДІ біології Харківського національного університету імені В. Н. Каразіна Божковим А. І.

Апробація результатів дослідження. Основні результати дисертації були представлені на конференціях всеукраїнського та міжнародного рівнів: XIV International scientific conference of students, PhD students & young scientists “Shevchenkivska vesna: Biology” (Kyiv, 2016); XV International conference of students and young scientists “Shevchenkivska vesna: bioscience advances” (Kyiv, 2017); XIII International scientific conference for students and PhD students “Youth and progress of biology” (Lviv, 2017); XII International young scientists’ conference “Biology: from a molecule up to the biosphere” (Kharkiv, 2017); XIV international scientific conference for students and PhD students “Youth and progress of biology” dedicated to the 185th anniversary from the birthday of B. Dybowski (Lviv, 2018); The international research and practical conference “The development of nature sciences: problems and solutions” (Brno, 2018).

Публікації. За темою дисертаційної роботи було опубліковано 11 наукових праць, з яких 5 статей у зарубіжних фахових видань (серед них 3 статті у виданнях, які входять до наукометричної бази Scopus) та 6 тез доповідей в збірниках матеріалів вітчизняних та міжнародних конференцій.

Структура й обсяг дисертації. Дисертаційна робота складається зі вступу, 3 розділів, висновків, списку використаних джерел та 3 додатків. Обсяг загального тексту дисертації складає 150 сторінок, з них основного тексту 110 сторінок. Робота ілюстрована 30 рисунками. Список використаних джерел містить 224 найменування.

ОСНОВНИЙ ЗМІСТ РОБОТИ

У **вступі** обґрунтовано вибір теми дослідження. Сформульовано мету, завдання та методи дослідження. Визначено методи, наукову новизну, практичне значення та достовірність результатів. Надано відомості про публікації, особистий внесок здобувача та апробацію результатів дисертації.

В **огляді літератури** розглянуто сучасний стан знань щодо морфології та функціональної активності клітин кісткового мозку у нормі та за впливу патологій печінки. Проаналізовано дані наукової літератури, що дозволяють встановити наявність можливого взаємозв'язку між «тривалістю життя» клітин кісткового мозку у культурі *in vitro* та впливу патологій печінки, який був індукований дією токсичних факторів – сірчаноокислої міді та чотирьоххлористого вуглецю, а також впливу низькомолекулярних компонентів молозива на функції клітин кісткового мозку.

Матеріали та методи дослідження. Експериментальні дослідження були виконані на 3-х та 20-ти місячних (міс.) щурах-самцях лінії *Wistar*. Щурів вирощували та утримували у віварії НДІ біології Харківського національного університету імені В.Н. Каразіна. Дослідження проводили відповідно до «Спільних етичних принципів проведення експериментів на тваринах» (Україна, 2011р.), які узгоджуються з положеннями Європейської конвенції «Про захист хребетних тварин, які використовуються для експериментів та інших наукових цілей» (Страсбург, 1986 р). Зупинку експериментальних процедур здійснювали зануренням тварин в ефірний наркоз з подальшим отриманням крові та виділенням у них клітин кісткового мозку та печінки.

Для створення моделі Cu-індукованого фіброзу печінки використовували 3-х міс. (молодих) і 20-ти міс. (старих) тварини як описано в роботі (Bozhkov A. I. et al., 2017). Для створення моделі експериментального CCL₄-індукованого фіброзу печінки використовували 3 міс. і 20 міс. тварин як описано в роботі (Sakaida I. et al., 2004). Через 24 години після останнього введення та через 5 діб від першого введення тварин присипляли та виділяли клітини кісткового мозку

Клітини кісткового мозку виділяли з діафізів, попередньо видалявши епіфізи, двох стегнових кісток молодих і старих тварин за методом (Farr et al., 2016). Діафізи промивали охолодженим натрій-фосфатним буфером, який містив 137 мМ хлориду натрія, 2,7 мМ хлориду калія, 10 мМ гідрофосфату натрія та 1,46 мМ монофосфату калія (pH = 7,2 – 7,4). Отриману кістномозкову суспензію клітин ресуспендували. Після чого клітини пропускали через нейлоновий фільтр з діаметром пор 100 мкм (cell dissociation sieve TKG, Sigma).

Потім клітинну суспензію відмивали натрій-фосфатним буфером шляхом центрифугування протягом 10 хвилин при 3000 g. Еритроцити з клітинної суспензії клітин кісткового мозку видаляли шляхом одноразової обробки розчином, що містить 154 мМ хлориду амонію, 10 мМ бікарбонату натрію, 0,082 мМ ЕДТА (ХімЛаборРеактив, Україна) протягом 10 хвилин при кімнатній температурі. Потім кісткомозкову клітинну суспензію двічі відмивали 5 мл охолодженого натрій-фосфатного буфера. Після чого відбирали аліквоти для підрахунку клітин в камері Горяєва.

Для визначення життєздатності клітин кісткового мозку, отриманих у тварин різного віку, використовували тест з трипановим синім (Меньшиков В., 1987).

Клітини, отримані з двох стегнових кісток, культивували у пластикових чашках Петрі (35 мм, Nunk, Данія) в поживному середовищі, що приготовано на основі 199 середовища (ВетМед, Україна) з додаванням антибіотиків (8 % гентаміцину і 8 % стрептоміцину) і 20 % інактивованої фетальної телячої сироватки (Gibco, США). Культивування проводили при 37 °С в стандартних умовах в атмосфері 5 % CO₂ протягом 4 діб. Культуральне середовище при цьому не змінювали («накопичувальне культивування»). Початкова концентрація клітин кісткового мозку при культивуванні у всіх варіантах завжди становила 2 млн кл / мл.

Для визначення впливу сірчаноокислої міді на культуру клітин кісткового мозку, до неї вносили 4 мМ та 8 мМ сірчаноокислої міді. У контрольні чашки з культурами клітин кісткового мозку вносили по 125 мкл натрій-фосфатного буфера. Підрахунок клітин кісткового мозку здійснювали кожну добу шляхом підрахунку кількості клітин в фіксованих полях зору в камері Горяєва. Цитологічні препарати фіксували протягом 5 хвилин метиловим спиртом та переносили на 8-10 хвилин в робочий розчин готового барвника Романовського-Гімзе (розведення 1:20). Цитологічні препарати аналізували при збільшенні x 100 на мікроскопі «ZeissPrimoStarLED» (Німеччина). Морфотипи клітин кісткового мозку визначали відразу після отримання суспензії клітин кісткового мозку, а також на 2-ї та 4-у добу культивування, підраховуючи не менше 500 клітин у випадково обраних полях зору. Дані представляли у відсотках від загальної кількості, яка була прийнята за 100 % (Van Hoy et al., 2016).

Для визначення тривалості життя лімфоцитів, мієлоцитів, метамієлоцитів, паличкоядерних і сегментоядерних нейтрофілів в системі *in vitro* підраховували їх кількість на 0, 48 і 96 год культивування, підраховуючи не менше 500 клітин кожного з морфотипів, дані виражали в відсотках від загальної кількості клітин у зразку.

Вміст внутрішньоклітинного кальцію визначали за допомогою специфічного зонда до іонів кальцію – Fluo-3. За для цього, до суспензії клітин, що містила 2 млн клітин у мл, вносили 10 мкг/мл Fluo-3, який був приготований на 3,03 mM фосфатному буфері, який містив 2,89 mM CaCl₂ (ThermoFisher Scientific, USA). Суспензію клітин з барвником інкубували протягом 15 хвилин за температури 24 °C. Інтенсивність флуоресценції визначали на конфокальному мікроскопі LSM 510 META Carl Zeiss (Германія), $\times 100$, а вміст кальцію виражали у відносних одиницях.

Вміст вільних форм кисню (ROS) визначали, керуючись рекомендаціям фірми-виробника до набору Cellular ROS Assay Kit-Red (ab186027). Деконволюцію зображення та тривимірну реконструкцію об'єкту спостереження проводили з використанням програмного забезпечення Olympus CellSense Dimension Desktop.

Для статистичного аналізу отриманих вибірок використовували середнє, стандартне відхилення, стандартну помилку середнього, обсяг вибірки. Статистичну достовірність відмінностей між двома групами даних оцінювали за допомогою непараметричного критерію Манна-Уїтні за допомогою програмного пакету Statistica 8.0 фірми StatSoft. Відмінності між даними контрольних і експериментальних варіантів вважали достовірними при $p \leq 0,05$. Графічну візуалізацію отриманих результатів виконували у програмах Origin 8.5.1 та Apache OpenOffice.

Результати досліджень та їх обговорення

Вік-залежні зміни характеристики клітин кісткового мозку щурів у первинній культурі. Для визначення проліферативної активності клітин кісткового мозку готували суспензію клітин кісткового мозку, отриманих у молодих і старих тварин так, щоб в 1 мл культурального середовища завжди містилося по 2 млн клітин, і визначали кількість клітин протягом 4 діб культивування. Виявили, що за першу добу культивування кількість клітин кісткового мозку, отриманих у молодих тварин, збільшилася на 60 %, а у старих тварин за цей же час – на 112 % (рис. 1).

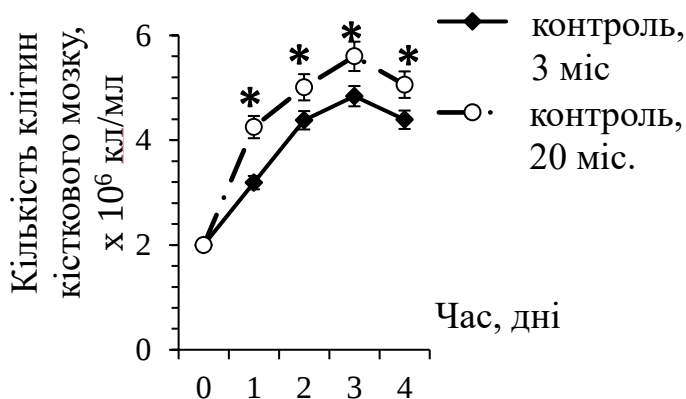


Рис. 1. Кількість клітин кісткового мозку з 1 по 4 добу культивування *in vitro*, що були отримані у інтактних 3 міс. та інтактних 20 міс. тварин (n = 12). * – $p \leq 0.05$ при порівнянні з клітинами молодих тварин

Надалі приріст клітин у молодих і старих тварин в системі *in vitro* був однаковий, і до 3-ї доби культивування вони виходили на стаціонарну фазу росту (рис. 1).

Проліферативний потенціал клітин кісткового мозку, отриманих у старих тварин перевищував такий у молодих тварин на першу добу культивування в системі *in vitro*.

У наступній серії експериментів визначали патерн клітин кісткового мозку: клітини-попередники – мієлоцити, метамієлоцити, а також паличкоядерні та сегментоядерні нейтрофіли, лімфоцити, еозинофіли, базофіли та моноцити (рис. 2А).

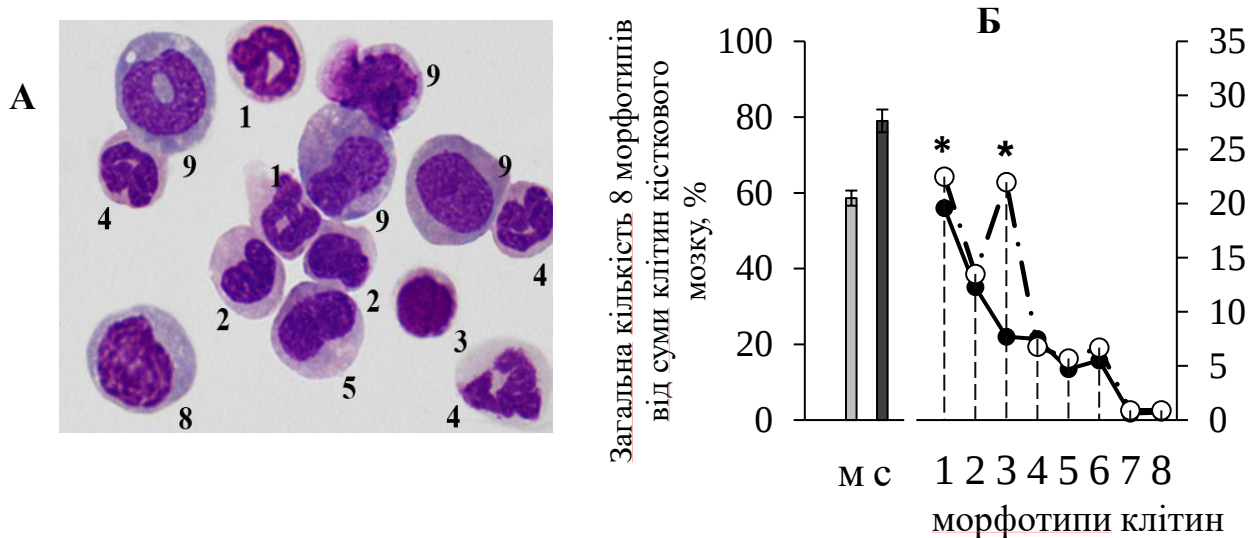


Рис. 2 Деякі морфологічні типи клітин кісткового мозку інтактних молодих (—●—) та старих (—○—) тварин (А): 1 – паличкоядерні нейтрофіли; 2 – метамієлоцити; 3 – лімфоцити; 4 – сегментоядерні нейтрофіли; 5 – мієлоцити; 6 – еозинофіли; 7 – базофіли; 8 – моноцити; 9 – недиференційована клітина, а також загальна кількість ідентифікованих типів клітин кісткового мозку молодих (м) та старих (с) тварин (Б). Забарвлення за Романовським-Гімзою, х 100. * – $p \leq 0.05$ при порівнянні з клітинами молодих тварин

Виявилося, що до цих восьми ідентифікованих морфотипів у молодих інтактних тварин належало 58,6 % від усіх клітин кісткового мозку (рис. 2А). Таким чином, інші 41,4 % – це морфологічно неідентифіковані типи клітин, до яких належать мезенхімальні та гемопоетичні стовбурові клітини, а також остаточно не диференційовані. У той же час, у інтактних старих тварин 79 % клітин належало до восьми ідентифікованих морфотипів, тобто не ідентифіковані типи клітин склали лише 21 % (рис. 2Б). У старих тварин була помітно змінена не тільки кількість неідентифікованих морфотипів, але й співвідношення між типами клітин (рис. 2Б). Найбільші відмінності між молодими і старими тваринами були виявлені у вмісті лімфоцитів: у старих тварин їх було в 2,8 рази більше, ніж у молодих (рис. 2Б). Отже, молоді та старі тварини відрізнялися між собою не тільки за загальною кількістю ідентифікованих морфотипов, але і співвідношенням цих клітин (патерн розподілу) у кістковому мозку інтактних тварин. Такі вік-залежні особливості клітин кісткового

мозку можуть пояснюватися зміною характеристик мікрооточення у кістковому мозку старих тварин. Для зміни мікрооточення у молодих та старих тварин індукували фіброз печінки.

Вік-залежні характеристики клітин кісткового мозку в первинній культурі у тварин з індукованим фіброзом печінки (Си- та CCL₄-індукованого фіброзу печінки). Відомо, що розвиток фіброзу, як і інших запальних процесів, супроводжується зміною великої кількості фізико-хімічних характеристик в організмі та, як наслідок, мікрооточення у кістковому мозку. З метою перевірки впливу мікрооточення на активність клітин кісткового мозку, їх отримували у молодих і старих тварин з Си-індукованим фіброзом печінки та CCL₄-індукованим фіброзом печінки (рис. 3А, Б), а потім переводили їх в систему *in vitro*, тобто створювали однотипне мікрооточення для клітин кісткового мозку. Якщо клітини кісткового мозку були отримані у молодих тварин з Си-індукованим фіброзом печінки, то вони активно проліферували протягом першої доби культивування та їх кількість перевищувала інтактний рівень в цей час (рис. 3В). Після цього їх кількість залишалася незмінною протягом 4 діб культивування (рис. 3В).

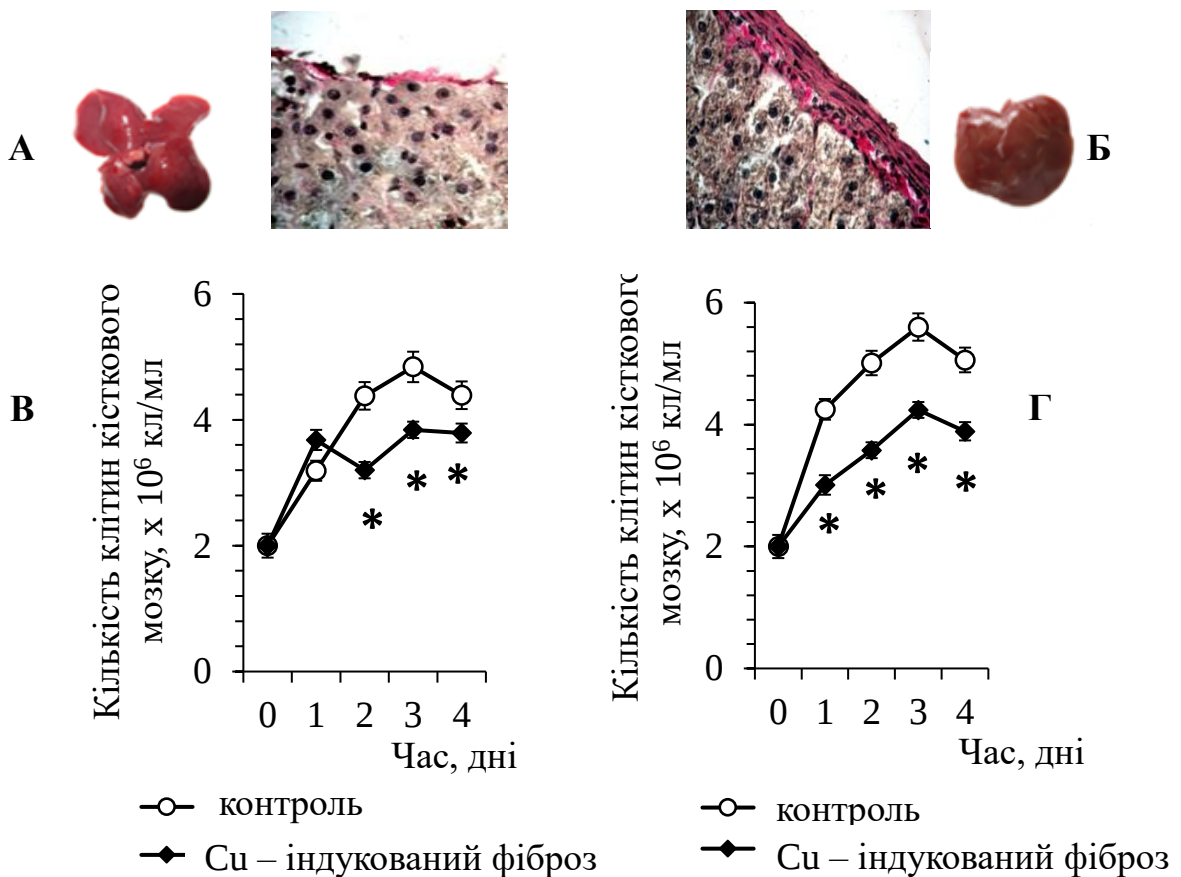


Рис. 3 Морфологічні та гістологічні препарати печінки контрольної групи тварин (А) та тварин з Си-індукованим фіброзом печінки (Б). Забарвлення за Ван-Гізоном, х 100, а також кількість клітин кісткового мозку с 1 по 4 добу культивування *in vitro*, що були отримані у 3 міс. (В) та 20 міс. (Г) контрольних тварин та з Си-індукованим фіброзом печінки (n = 12). * – p ≤ 0.05 при порівнянні з клітинами інтактних тварин відповідного віку

У тому випадку, якщо клітини кісткового мозку були отримані у старих тварин з Cu-індукованим фіброзом печінки, то клітини кісткового мозку зберігали здатність до проліферації в системі *in vitro* протягом 4 діб культивування, хоча вони й поступалися контрольному варіанту (рис. 3Г). Таким чином, Cu-індукований фіброз печінки мав вік-залежний вплив на проліферативну активність клітин кісткового мозку в системі *in vitro*.

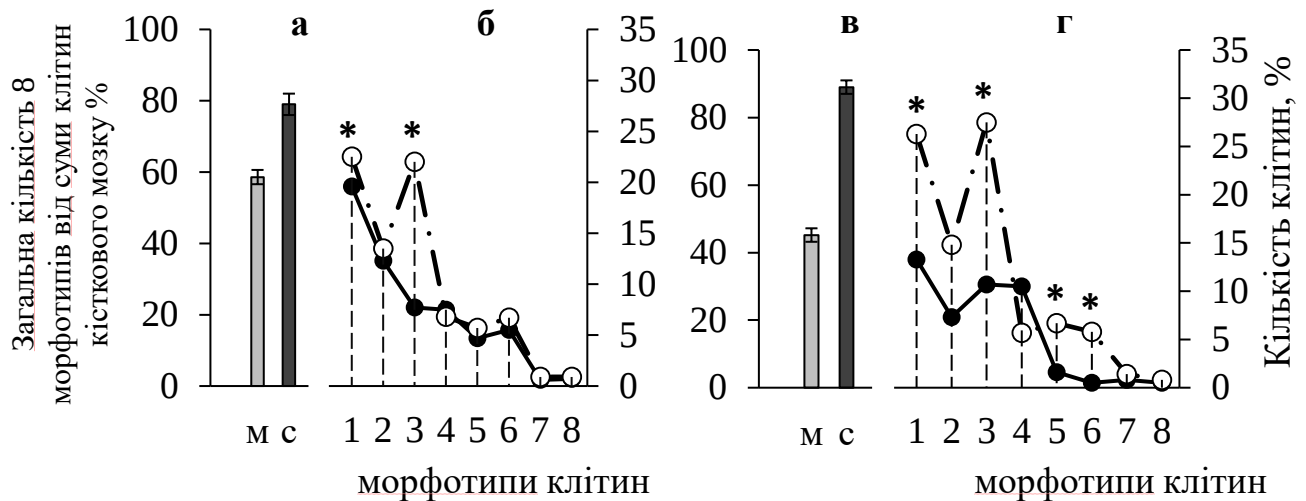


Рис. 4 Сумарна кількість клітин кісткового мозку від загальної кількості, в відсотках, виділених у молодих (м) і старих (с) тварин, відповідно; виділених у інтактних тварин (а) і тварин з фіброзом печінки (в). Патерн морфотипів клітин кісткового мозку, відповідно, у молодих (—●—) і старих (---○---) тварин, для інтактних груп (б) і груп з фіброзом печінки (г), де 1 – паличкоядерні нейтрофіли; 2 – метамієлоцити; 3 – лімфоцити; 4 – сегментоядерні нейтрофіли; 5 – мієлоцити; 6 – еозинофіли; 7 – базофіли; 8 – моноцити; 9 – недиференційована клітина (n = 12). * – $p \leq 0.05$ при порівнянні з клітинами молодих тварин з відповідним станом печінки

Було виявлено, що фіброз печінки викликав зміну розподілу восьми ідентифікованих морфотипів клітин кісткового мозку. Так, у молодих тварин з фіброзом кількість виявлених морфотипов зменшилася в порівнянні з інтактними тваринами на 13,4 %, а у старих тварин – збільшилася на 10 % і склала 89 % (рис. 4А–Г). У старих тварин було змінено не тільки кількість ідентифікованих морфотипів, але й співвідношення між типами клітин (рис. 4Б, Г). Найбільші відмінності між молодими і старими тваринами виявлялися у вмісті лімфоцитів. У старих тварин їх було в 2,8 рази більше, ніж у молодих тварин (рис. 4Б).

Індукція фіброзу супроводжувалася змінами патерну морфотипів клітин кісткового мозку, і це було більшою мірою виражено для молодих тварин, в порівнянні з інтактними старими тваринами. Так, у них зменшувався вміст паличкоядерних нейтрофілів і мієлоцитів (в 2,9 рази), еозинофілів (в 11 разів) в порівнянні з інтактними тваринами того ж віку (рис. 4Б, Г).

У той же час, у старих тварин з фіброзом печінки патерн морфотипів мало змінювався, в порівнянні з інтактними тваринами-незначно збільшувався вміст

паличкоядерних нейтрофілів, лімфоцитів, не змінювався вміст метамієлоцитів, сегментоядерних нейтрофілів, мієлоцитів, еозинофілів, базофілів і моноцитів (рис. 4Б, Г).

Отже, молоді та старі тварини відрізнялися між собою не тільки за загальною кількістю ідентифікованих морфотипов, але й співвідношенням цих клітин (патерн розподілу). Розвиток фіброзу печінки змінював патерн морфотипів у молодих тварин і не впливав на нього у старих тварин. З метою зміни мікрооточення клітин кісткового мозку, використовували ще один індуктор фіброзу – чотирьоххлористий вуглець.

У тому випадку, коли клітини кісткового мозку були отримані у молодих тварин з CCl_4 -індукованим фіброзом печінки (рис. 5А), їх кількість в культурі збільшувалася швидше, ніж в контрольному варіанті і ніж у тварин з Cu -індукованим фіброзом печінки (рис. 5А).

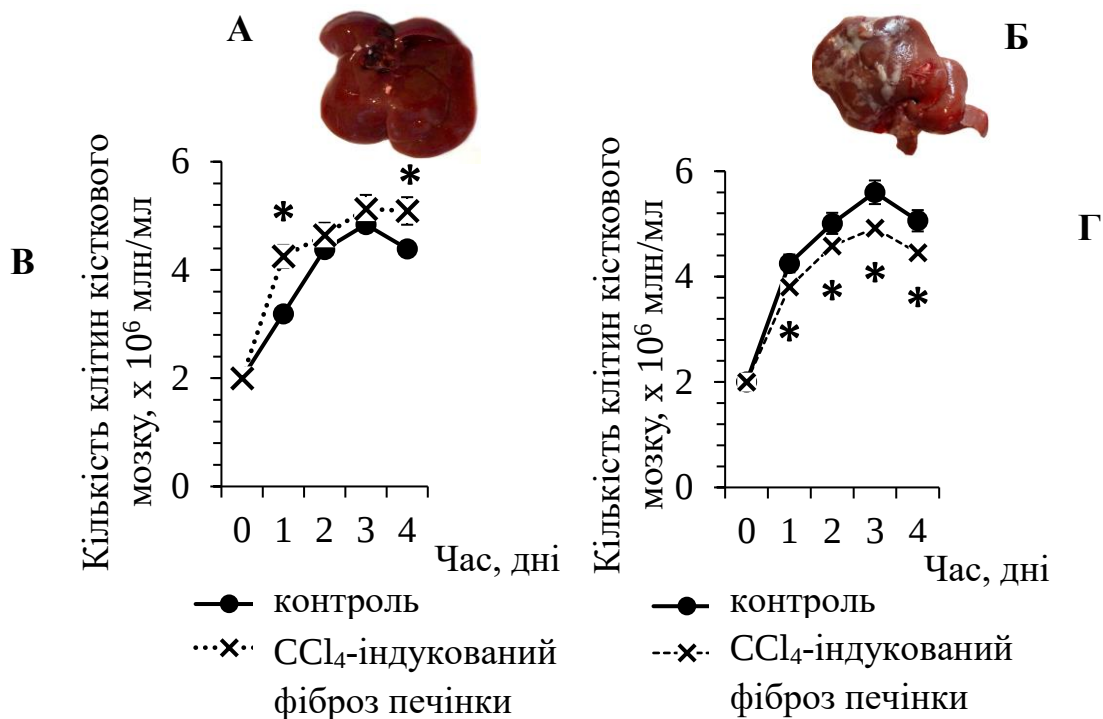


Рис. 5 Морфологія печінки контрольної групи тварин 20 міс. (А) та тварин з CCl_4 -індукованим фіброзом печінки 20 міс. (Б), а також кількість клітин кісткового мозку з 1 по 4 добу культивування *in vitro*, що були отримані у 3 міс (В) та 20 міс (Г) контрольних тварин та з CCl_4 -індукованим фіброзом печінки ($n = 12$). * – $p \leq 0.05$ при порівнянні з клітинами інтактних тварин відповідного віку

Якщо у старих тварин був індукований фіброз печінки введенням чотирьоххлористого вуглецю (рис. 5Б), то проліферативна активність клітин кісткового мозку мало відрізнялася від контролю, хоча й мала вік-залежний характер (рис. 5Г). Отже, Cu -індукований фіброз печінки надавав більш виражений ефект пригнічення проліферативної активності клітин кісткового мозку в культурі *in vitro* в порівнянні з CCl_4 -індукованим фіброзом печінки і мав виражений вік-залежний характер.

Можна припустити, що зміна мікрооточення в клітинах кісткового мозку за Cu -індукованого фіброзу печінки у молодих тварин супроводжувалась різними епігенетичними та метаболічними змінами в клітинах кісткового мозку, які приводили до пригнічення проліферативної активності клітин кісткового мозку в системі *in vitro*, а при CCl_4 -індукованому фіброзі печінки навпаки, збільшенням проліферативної активності клітин кісткового мозку в системі *in vitro*, який мав вік-залежний характер.

Вплив Cu -індукованого та CCl_4 -індукованого фіброзу печінки на тривалість життя лімфоцитів у первинній культурі. Як відомо, клітини кісткового мозку дуже розрізняються за тривалістю життя. У наступній серії експериментів визначали час збереження деяких типів клітин кісткового мозку в культурі, що може відображати особливості їх епігенотипів. Кількість лімфоцитів в культурі клітини кісткового мозку молодих інтактних тварин не змінюється в процесі культивування до 96 годин (рис. 7А). У той же час кількість лімфоцитів, отриманих у старих тварин, після переведення їх в систему *in vitro*, збільшилася на 72 % до 96 часу культивування (рис. 6Б).

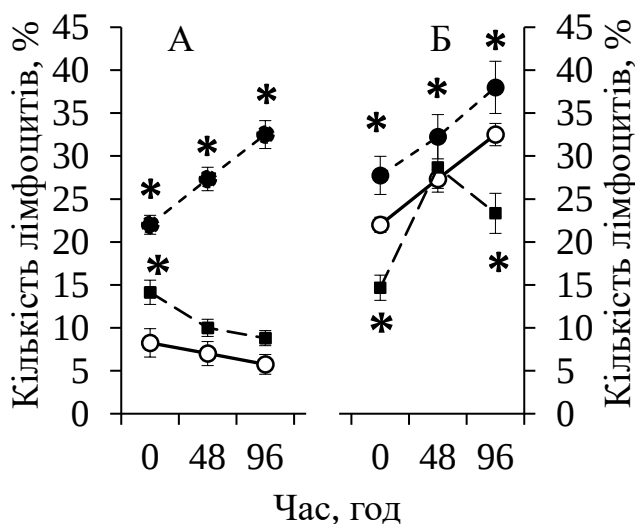


Рис. 6 Кількість лімфоцитів в первинній культурі, яка була отримана з кісткового мозку 3 міс. інтактних (○—), тварин з Cu -індукованим фіброзом печінки (---●---) і CCl_4 -індукований фіброз печінки (---■---) (А), і, аналогічно, для 20 міс. тварин тих же експериментальних варіантів (Б) ($n = 12$). * – $p \leq 0.05$ при порівнянні з клітинами інтактних тварин відповідного віку

Необхідно відзначити, що кількість лімфоцитів у молодих інтактних тварин становила 8,25 % від загальної кількості клітин кісткового мозку, в той же час на частку лімфоцитів у старих тварин припадало понад 20 % від загальної кількості клітин кісткового мозку (рис. 6).

У тому випадку, якщо у молодих тварин індукували фіброз печінки багаторазовим введенням сірчаноокислої міді, то кількість лімфоцитів у кістковому мозку збільшувалася в порівнянні з інтактними тваринами цього ж віку на 63 % (рис. 7А, нульова точка). Якщо клітини кісткового мозку молодих тварин з Cu -індукованим фіброзом печінки переводили в культуру, то кількість лімфоцитів лінійно збільшувалася на 48 і 96 годину культивування (рис. 6А). Якщо у молодих тварин індукували фіброз печінки введенням чотирьоххлористого вуглецю, то кількість лімфоцитів у них збільшувалася незначно в порівнянні з їх кількістю у молодих інтактних тварин. Однак лімфоцити не проліферували в культурі, якщо вони були отримані у молодих тварин з CCl_4 -індукованим фіброзом печінки

(рис. 6А). Таким чином, «тривалість життя» клітин кісткового мозку, отриманих у молодих та старих тварин, може бути пов'язана з різницею епігенетично – метаболічних характеристик клітин кісткового мозку, на формування яких впливає мікрооточення клітин кісткового мозку.

Вплив екзогенних іонів міді на первинну культуру клітин кісткового мозку. Оскільки за Cu-індукованого фіброзу печінки іони міді можуть безпосередньо впливати на характеристики клітин кісткового мозку, у наступній серії експериментів визначали вплив іонів міді, яку вносили безпосередньо в культуру клітин *in vitro*, при цьому в одному випадку клітини були виділені у інтактних тварин, а в іншому випадку клітини були виділені у тварин молодих і, відповідно, старих з Cu-індукованим фіброзом печінки. Культури клітин кісткового мозку молодих і старих тварин по-різному відповідали на внесення екзогенних іонів міді – вони більшою мірою інгібували проліферацію у молодих тварин, з проявом прямої дозової залежності (рис. 7 А – Г).

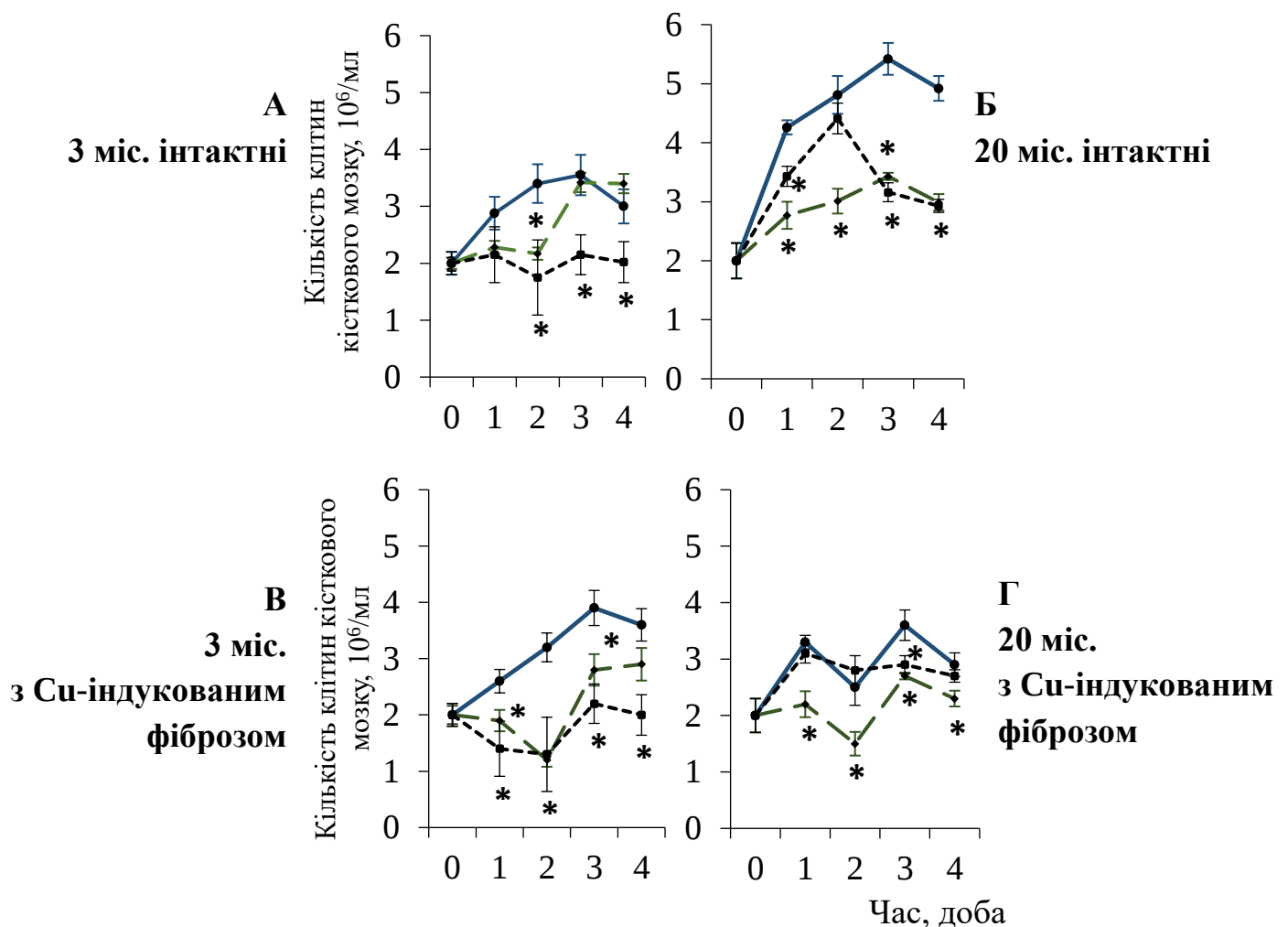


Рис. 7. Кількість клітин кісткового мозку в первинній культурі, виділеної у 3 міс. інтактних щурів (А) і 20 міс. щурів (Б), а також щурів з Cu – індукованим фіброзом печінки, відповідно, 3 міс. (В) і 20 міс. (Г), без внесення іонів міді в культуру (—●—), після внесення 4 mM CuSO₄ (—◆—) і 8 mM CuSO₄ (---▲---) на початку культивування. * – $p \leq 0.05$ при порівнянні з клітинами інтактних тварин

Клітини кісткового мозку старих тварин менш чутливі до іонів міді, та для них була виявлена зворотна дозова залежність, як для інтактних, так і для тварин з фіброзом печінки.

Ці результати вказують на те, що за впливу Cu-індукованого фіброзу печінки, мають місце зміни мікрооточення, а не просто вплив іонів міді на клітини кісткового мозку.

Вік-залежні характеристики клітин кісткового мозку в первинній культурі у тварин з індукованим фіброзом печінки та після дії біологічно активних сполук (низькомолекулярних компонентів молозива). Раніше у нашій лабораторії було показано, що низькомолекулярні компоненти молозива мають антиоксидантні та імунотропні властивості, та здатні нівелювати патологічні прояви фіброзу печінки (Bozhkov A. I. et al., 2017).

У зв'язку з цим, на наступному етапі роботи перевіряли вплив низькомолекулярних компонентів молозива на показники первинної культури клітин кісткового мозку. Загальна кількість клітин кісткового мозку, виділених у інтактних тварин, збільшувалася в культурі майже лінійно з першої по четверту добу росту (рис. 8). У тому випадку, якщо клітини кісткового мозку виділяли у тварин з фіброзом печінки, то інтенсивність їх проліферації в перші 24 години культивування була більш інтенсивною, ніж у клітин кісткового мозку контрольних тварин. Однак, в подальшому, їх кількість зменшувалася і залишалася незмінною протягом 96 годин, так що на 96 годину їх кількість була в 2 рази менша за інтактний контроль (рис. 8).

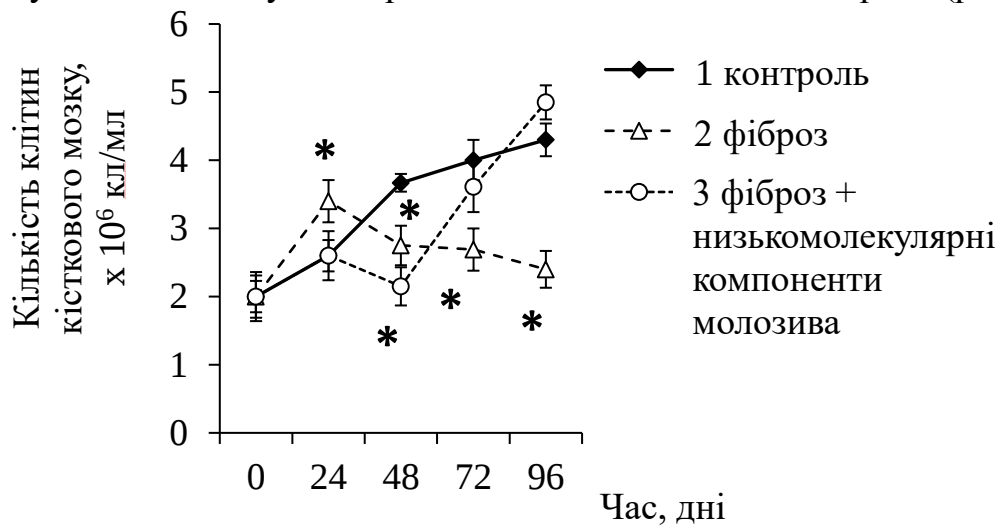


Рис. 8. Клітини кісткового мозку у первинній культурі *in vitro*. Клітини, отримані у інтактних тварин (1), у тварин з Cu-індукованим фіброзом печінки (2), у тварин з Cu-індукованим фіброзом печінки після введення їм низькомолекулярних компонентів молозива тричі з інтервалами 24 години (3).

* – при $p \leq 0,05$ у порівнянні з інтактним контролем

Іншу, ніж у інтактного контролю і фіброзу, динаміку кількості клітин кісткового мозку в культурі спостерігали для варіанту фіброзу з подальшим введенням тваринам низькомолекулярних компонентів молозива (рис. 8). Так, в перші 24 години культивування їх кількість не відрізнялася від інтактного контролю.

До 48 години вони відставали від контролю і не відрізнялися від варіанту фіброзу, в подальшому їх кількість різко збільшувалася (майже в 2,5 рази) і значущо не відрізнялася від інтактного контролю на 96 годину культивування (рис. 8).

Така різна динаміка кількості клітин кісткового мозку в культурі, виділених у тварин різних експериментальних груп, може бути пов'язана з "активною" реакцією клітин кісткового мозку на різні метаболічні стани в організмі. Такі метаболічні стану, які були індуковані фіброзом печінки і введенням низькомолекулярних компонентів молозива тваринам з фіброзом супроводжувалися зміною здатності клітин кісткового мозку до проліферації в первинній культурі.

Можливий взаємозв'язок іонного складу клітин кісткового мозку, отриманих у тварин різного віку, з їх проліферативною активністю. Клітини кісткового мозку, отримані у 20 міс. щурів, містили на 73 % більше кальцію в порівнянні з клітинами кісткового мозку, отриманими у 3 міс. щурів (рис. 9А).

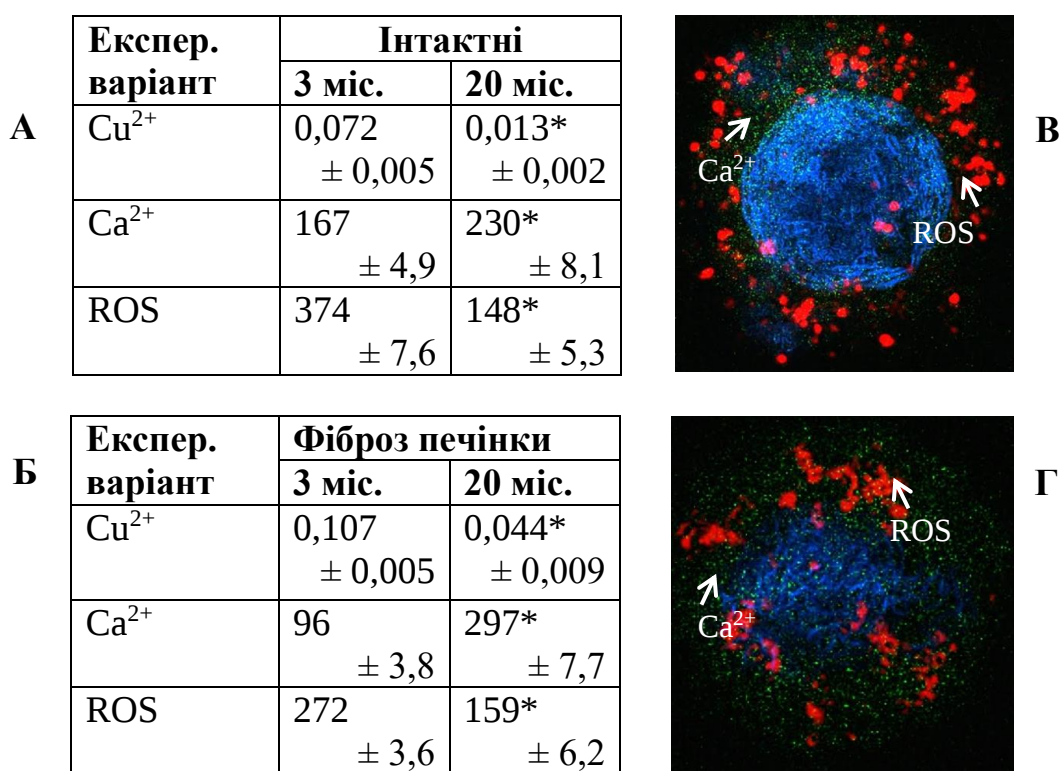


Рис. 9 Вміст іонів міді (мкг / 10^6 кл), іонів кальцію (ум. од.), ROS (ум. од.) в клітинах кісткового мозку інтактних тварин (А) та тварин з Cu-індукованим фіброзом печінки (Б). Флуоресценція Fluo-3 та ROS в клітинах кісткового мозку інтактних молодих (В) і старих (Г) тварин, лазерна скануюча конфокальна мікроскопія Olympus FV10i-LIV, x60 (Японія). * – $p \leq 0.05$ при порівнянні з клітинами молодих тварин

У той же час, клітини кісткового мозку старих тварин містили в 5 разів менше іонів міді в порівнянні з клітин кісткового мозку молодих тварин (рис. 9). Виявили, що зміст ROS в клітинах кісткового мозку старих тварин був в 2,5 рази менше, ніж в клітинах кісткового мозку молодих тварин (рис. 9А). Ці результати дозволяють вважати, що рівновага в системі «прооксиданти – антиоксиданти» в клітинах

кісткового мозку старих тварин зміщена в бік антиоксидантів, в той час, як в клітинах кісткового мозку к молодих тварин воно зміщене в сторону прооксидантів.

Виникає важливе питання – як будуть змінюватися ці характеристики клітин кісткового мозку у молодих і старих тварин, якщо в організмі виникнуть патологічні зміни в інших органах організму, тобто відбудуться зміни в системі мікрооточення клітин кісткового мозку, тобто «зовнішнього середовища» по відношенню до клітин кісткового мозку.

В якості такої патологічної моделі, яка супроводжується розвитком запального процесу, використовували модель Cu-індукованого фіброзу печінки (Bozhkov A. I. et al., 2017).

Виявилося, що наявність фіброзу печінки викликала вік-залежну адаптивну відповідь на рівні клітин кісткового мозку. Так, вміст іонів міді в клітинах кісткового мозку молодих тварин збільшувався тільки на 48 % від вихідного рівня, в той час, як в клітинах кісткового мозку старих тварин в 3,3 рази від вихідного рівня (рис. 9Б). Однак, навіть після таких змін вміст іонів міді в клітинах кісткового мозку старих тварин залишався в 2,4 рази меншим, в порівнянні з молодими тваринами (рис. 9Б).

Отже, зміна вмісту іонів міді в клітинах кісткового мозку на тлі вираженої інтоксикації організму сірчаноокислої міді залежить не тільки від дози введенного токсиканти, а й від змісту ендогенної міді в клітинах кісткового мозку, тобто вихідного стану, а початковий стан визначається віком, а точніше – специфічним мікрооточенням.

На тлі збільшення іонів міді в клітинах кісткового мозку спостерігалася зміна вмісту кальцію, і це залежало від віку. Так, вміст кальцію в клітинах кісткового мозку молодих тварин зменшувався на 75 % від його вихідного рівня, в цей час в клітинах кісткового мозку у старих тварин його вміст збільшувався у 3 рази від їх вихідного рівня (рис. 9Б).

Вміст ROS в клітинах кісткового мозку на тлі розвитку Cu-індукованого фіброзу печінки, також мав виражену вік-залежну відповідь. Так, кількість ROS в клітинах кісткового мозку молодих тварин збільшувалася від їх вихідного рівня на 58 %, а в клітинах кісткового мозку старих тварин, навпаки, зменшувалася на 28 % (рис. 9Б).

Отже, вік-залежні зміни іонного складу та показники редокс-системи клітин кісткового мозку на тлі інтоксикації організму сірчаноокислої міддю супроводжувалися і різними відповідями на клітинному рівні.

ВИСНОВКИ

У дисертаційній роботі вирішено важливе наукове завдання – встановлено вплив мікрооточення, зміненого індукованим фіброзом печінки та віком тварин, на характеристики клітин кісткового мозку у первинній культурі. Виявлено, що характеристики клітин кісткового мозку (вміст іонів кальцію, іонів міді, вільних форм кисню; здатність до проліферації та «тривалість життя» у первинній культурі, співвідношення морфологічно ідентифікованих/неідентифікованих типів клітин) залежить не від віку, а від характеристик мікрооточення клітин кісткового мозку, яка

моделюється функціональним станом печінки та біологічно активними сполуками, такими як, низькомолекулярні компоненти молозива.

1. Проліферативна активність клітин кісткового мозку, виділених у старих (20 міс.) інтактних тварин і переведених в культуру *in vitro*, перевищувала проліферативну активність клітин кісткового мозку молодих (3 міс.) тварин у первинній культурі.

2. Зміна мікрооточення, шляхом індукції фіброзу печінки введенням сірчаної кислоти міді та чотирьоххлористого вуглецю, викликала вік-залежну зміну кількості клітин кісткового мозку у первинній культурі.

Так, Си-індукований фіброз печінки супроводжується пригніченням швидкості росту клітин у первинній культурі, отриманих у молодих тварин; в той час, як клітини кісткового мозку, отримані у старих тварин та переведені у первинну культуру, зберігали проліферативну активність, на відміну від молодих тварин, хоча відставали від контролю.

ССL₄-індукований фіброз печінки викликав іншу вік-залежну відповідь на рівні клітин кісткового мозку. Якщо клітини кісткового мозку були виділені у молодих тварин з ССL₄-індукований фіброз печінки, то вони не відрізнялися за проліферативною активністю від контролю. У той же час, якщо клітини кісткового мозку були виділені у старих тварин з ССL₄-індукований фіброз печінки, то їх проліферативна активність не відрізнялася від контролю.

3. У кістковому мозку інтактних старих (20 міс.) тварин містилась більша кількість лімфоцитів (в 2,8 рази) у порівнянні з кістковим мозком молодих (3 міс.) тварин, співвідношення інших морфологічно ідентифікованих типів клітин кісткового мозку у старих тварин не відрізнялась від молодих тварин.

4. Клітини кісткового мозку, що були отримані у молодих та старих тварин з Си-індукованим фіброзом печінки, по-різному реагували на внесення сірчаної кислоти міді до первинної культури.

Внесення 4 мМ та 8 мМ сірчаної кислоти міді до культури клітин кісткового мозку молодих тварин супроводжувалась дозо-залежним характером інгібування проліферативної активності. У культурі клітин кісткового мозку старих тварин мала місце зворотна дозова залежність, як для інтактних, так і для тварин з фіброзом печінки.

5. Зміна характеристик мікрооточення, що була викликана триразовим щоденним введенням низькомолекулярних компонентів молозива тваринам з Си-індукованим фіброзом печінки супроводжувалась збільшенням проліферативної активності клітин кісткового мозку у первинній культурі. Загальна кількість морфологічно диференційованих клітин в кістковому мозку зменшувалась в порівнянні з інтактними тваринами і тваринами з фіброзом.

6. Зміна характеристик мікрооточення для клітин кісткового мозку, отриманих у молодих і старих інтактних тварин, супроводжувалась зміною таких фізико-хімічних характеристик, як вміст іонів міді, іонів кальцію та вільних форм кисню, що змінювало проліферативну активність у цих клітинах.

СПИСОК ПУБЛІКАЦІЙ ЗДОБУВАЧА ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ

Наукові праці у зарубіжних наукових фахових виданнях:

1. Божков А. И., **Огиенко С. Л.**, Бондарь А. Ю., Климова Е. М., Иванов Е. Г. Фиброз печени, индуцированный у молодых и старых животных, сопровождается возрастзависимыми изменениями в клетках костного мозга // Успехи геронтологии. 2019. Т. 32, № 1-2. С. 45-54. (Перевидана в: Bozhkov A. I., **Ohienko S. L.**, Bondar A. Yu., Klimova E. M., Ivanov E. G. Liver-induced fibrosis in young and old animals is accompanied by age-dependent changes in bone marrow cells // Advances in Gerontology. 2019. Vol. 32, N 1-2. P. 45-54). (SCOPUS, PubMed, Crossref, GoogleScholar). *(Особистий внесок здобувача: виконання експериментальної роботи, виконано статистичну обробку отриманих даних, участь у обговоренні результатів).*
2. **Ohienko S. L.**, Bondar A. Yu., Ivanov E. G., Bozhkov A. I. Liver fibrosis has a different effect on the “lifespan” of lymphocytes and neutrophils in the in vitro system isolated from the bone marrow of young and old rats // MOJ Gerontol Ger. 2019. Vol. 4, N 1. P. 36-40. *(Особистий внесок здобувача: виконання експериментальної роботи, виконано статистичну обробку отриманих даних, участь у обговоренні результатів).*
3. **Ohienko S. L.**, Bozhkov A. I., Bondar A. Yu., Ivanov E. G., Ionov I. A. Bone marrow cells obtained from old animals differ from the young animals cells in their ability to divide and in response to the presence of liver fibrosis in primary culture // Advances in Aging Research. 2019. Vol. 8. P. 14-27. (Crossref, GoogleScholar). *(Особистий внесок здобувача: виконання експериментальної роботи, виконано статистичну обробку отриманих даних, участь у обговоренні результатів).*
4. Bozhkov A. I., **Ohienko S. L.**, Kuznetsova Y. A., Bondar A. Y., Marchenko V. P., Gumennaya M. S. Donor age affects behavior and sensibility of bone marrow cells to copper ions in primary culture // Advances in Gerontology. 2017. Vol. 7, N 4. P. 336-344. (SCOPUS, PubMed, Crossref, GoogleScholar). (Перевидана в: Божков А. И., **Огиенко С. Л.**, Кузнецова Ю. А., Бондарь А. Ю., Марченко В. П., Гуменная М. С. Возраст донора влияет на «поведение» и чувствительность клеток костного мозга к ионам меди в первичной культуре // Успехи геронтологии. 2017. Т. 30, № 3. С. 457-467). *(Особистий внесок здобувача: виконання експериментальної роботи, виконано статистичну обробку отриманих даних, участь у обговоренні результатів).*
5. Anatoliy I. Bozhkov, Eugeny G. Ivanov, Yuliya A. Kuznetsova, **Svetlana L. Ohienko**, Anastasiya Yu. Bondar. Copper-induced liver fibrosis affects the behavior of bone marrow cells in primary culture // Frontiers in Biology. 2017. Vol. 12, N 4. P.271-279. (SCOPUS, Crossref, GoogleScholar) *(Особистий внесок здобувача: виконання експериментальної роботи, виконано статистичну обробку отриманих даних, участь у обговоренні результатів).*

Наукові праці апробаційного характеру (тези доповідей на наукових конференціях) за темою дисертації

6. Ohiienko S. L., Bondar' A. Yu., Ivanov E. G. Induced liver fibrosis influence on the bone marrow cells culture of rats' different ages // The development of nature sciences: problems and solutions: The international research and practical conference, 27-28 apr. 2018.: abstr. Brno, 2018. P. 64-66. (*Особистий внесок здобувача: виконання експериментальної роботи, виконано статистичну обробку отриманих даних, участь у обговоренні результатів, написання тез*).

7. Ohiienko S., Bondar A., Ivanov E. Assessment of cytotoxic action of bovine's colostrum low-molecular-weight components on bone marrow cells' culture // Youth and Progress of Biology. Program and Abstracts: XIV International Scientific Conference for Students and PhD Students, dedicated to the 185th anniversary from the birthday of B. Dybowski, 10-12 apr. 2018.: abstr. Lviv, 2018. P. 267-268. (*Особистий внесок здобувача: виконання експериментальної роботи, виконано статистичну обробку отриманих даних, участь у обговоренні результатів, написання тез*).

8. Ohiienko S. L., Bondar' A. Yu. Bone marrow cells behavior in the primary culture under influence of CCl_4 – induced liver fibrosis // Shevchenkivska Vesna: Bioscience Advances: XV International Scientific Conference of Students and Young Scientists, 18-21 apr. 2017.: abstr. Kyiv, 2017. P. 153-154. (*Особистий внесок здобувача: виконання експериментальної роботи, виконано статистичну обробку отриманих даних, участь у обговоренні результатів, написання тез*).

9. Ohiienko S. L., Bondar' A. Yu., Gumennaya M. S., Marchenko V. P. Age affects the "behavior" and the sensibility to copper ion of animals' bone marrow cells in the primary culture // Youth and progress of biology: XIII international scientific conference for students and PhD students, 25-27 apr. 2017.: abstr. Lviv, 2017. P. 245-246. (*Особистий внесок здобувача: виконання експериментальної роботи, виконано статистичну обробку отриманих даних, участь у обговоренні результатів, написання тез*).

10. Ohiienko S. L., Bondar' A. Yu. Influence of anabaena flos-aquae extract on the bone marrow primary culture of young rats // Biology: from a molecule up to the biosphere»: 12th International young scientists' conference, 29 nov.-1 dec. 2017.: abstr. Kharkiv, 2017. P. 38. (*Особистий внесок здобувача: виконання експериментальної роботи, виконано статистичну обробку отриманих даних, участь у обговоренні результатів, написання тез*).

11. Ohiienko S. L., Kuznetsova Y. A., Bondar A. Yu. Colostrum low molecular components affects the primary culture of bone marrow cells // Shevchenkivska Vesna: Biology: XIV International Scientific Conference of Students, PhD Students and Young Scientists, 6 – 8 apr. 2016.: abstr. Kyiv, 2016. P. 16-17. (*Особистий внесок здобувача: виконання експериментальної роботи, виконано статистичну обробку отриманих даних, участь у обговоренні результатів, написання тез*).

АНОТАЦІЯ

Огієнко С. Л. Вік-залежні характеристики клітин кісткового мозку у первинній культурі за різних функціональних станів печінки. – Кваліфікаційна наукова праця на правах рукопису.

Дисертація на здобуття наукового ступеня кандидата біологічних наук за спеціальністю 03.00.13 – фізіологія людини і тварин. – Харківський національний університет імені В. Н. Каразіна Міністерства освіти і науки України, Харків, 2019.

Дисертацію присвячено дослідженню характеристик (проліферативного потенціалу, «тривалості життя» клітин в культурі, вміст іонів кальцію, міді і вільних форм кисню) клітин кісткового мозку в первинній культурі під дією віку тварин, функціонально змінених станів печінки, а також біологічно активних сполук - низькомолекулярних компонентів молозива з метою перевірки гіпотези про вплив мікрооточення клітин кісткового мозку на їх характеристики. В роботі показано, що вік має незначний вплив на характеристики клітин кісткового мозку, і в більшій мірі, на них впливають наявність патологій печінки.

Виявлено взаємозв'язок між вмістом іонів міді, іонів кальцію та вільних форм кисню з проліферативною активністю клітин кісткового мозку. Показано, що зміни, що викликані індукованим фіброзом печінки, можуть бути частково відновлені введенням біологічно активних сполук - низькомолекулярних компонентів молозива. Зроблено висновок, що на характеристики клітин кісткового мозку впливає не вік як такий, а зміна мікрооточення, яка викликана зміною функціональних характеристик організму.

Ключові слова: кістковий мозок, старіння, стовбурові клітини, мікрооточення, фіброз печінки, біологічно активні речовини.

АННОТАЦИЯ

Огиенко С. Л. Возраст – зависимые характеристики клеток костного мозга в первичной культуре при разных функциональных состояниях печени. – Квалификационная научная работа на правах рукописи.

Диссертация на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.00.13 – физиология человека и животных. – Харьковский национальный университет имени В. Н. Каразина Министерства образования и науки Украины, Харьков, 2019.

Диссертация посвящена исследованию характеристик (пролиферативного потенциала, «продолжительности жизни» клеток в культуре, содержание ионов кальция, меди и свободных форм кислорода) клеток костного мозга в первичной культуре под действием возраста животных, функционально измененных состояний печени, также биологически активных соединений – низькомолекулярных компонентов молозива с целью проверки гипотезы о влиянии микроокружения клеток костного мозга на их характеристики. В работе показано, что возраст незначительно влияет на характеристики клеток костного мозга, и в большей степени, на них оказывают влияние наличие патологий печени.

Выявлена взаимосвязь между содержанием ионов меди, ионов кальция и свободных форм кислорода с пролиферативной активностью клеток костного мозга. Показано, что изменения, вызванные индуцированным фиброзом печени, могут быть частично восстановлены введением биологически активных соединений – низкомолекулярных компонентов молозива. Сделано заключение, что на характеристики клеток костного мозга оказывает влияние не возраст как таковой, а смена микроокружения, которая вызвана изменением функциональных характеристик организма.

Ключевые слова: костный мозг, старение, стволовые клетки, микроокружение, фиброз печени, биологически активные соединения.

ABSTRACT

Ohiienko S. L. Age – dependent characteristics of the bone marrow cells in the primary culture at liver different functional states. – Qualification scientific paper, manuscript.

Thesis for a Candidate Degree in Biology, Specialty 03.00.13 – Physiology of humans and animals. – V. N. Karazin Kharkiv National University of the Ministry of Education and Science of Ukraine, Kharkiv, 2019.

All existing hypotheses in gerontology can be combined into two concepts – genetic and epigenetic, and the latter to be regarded as a single one considering contemporary data. Development of the epigenetic concept can clarify mechanisms of ageing as a result of temporal interactions of the metabolic system with factors of microenvironment, which change dynamically. However, the problem is currently that methods and approaches have not yet been developed to allow studying the features of the influence of factors of microenvironment on the characteristics of cells in the *in vivo* system. The essence of the problem is that the microenvironment of certain types of cells in the body is extremely dynamic and multi-component. In this regard, this important and complex problem to be solved, it is necessary to select appropriate experimental models. Bone marrow was chosen as a model in the study of the influence of microenvironment features on cells in ontogenesis in the organism system. The bone marrow is represented by different types of cells - stem cells, which differentiate in the bone marrow into blood cells. The rate of differentiation and orientation (types of cells formed) depend on the microenvironment of bone marrow cells. In turn, the characteristics of the microenvironment are an integral characteristic of other tissues and systems of the body. Therefore, by studying the types of bone marrow cells and their characteristics, one can understand the nature and characteristics of intercellular interactions, which is an important age-dependent characteristic.

Thus, by changing the characteristics and orientation of the differentiation of bone marrow cells in animals of different ages, one can obtain integral characteristics of age-related changes, and when modeling pathologies, in particular the liver, one can get an answer about the relationship of liver pathologies with bone marrow function and its role in the development of certain age-dependent pathologies.

The dissertation is devoted to research of the characteristics (proliferative potential, “life expectancy” of cells in culture, the content of calcium, copper and free oxygen

species) of bone marrow cells in primary culture under the influence of animals, liver fibrosis, and biologically active compounds – low molecular weight components of colostrum. It has done for verification the hypothesis about the influence of the bone marrow cells microenvironment on their characteristics. It is shown that age slightly affects the characteristics of bone marrow cells, and largely, they are affected by the presence of liver pathologies.

The relationship between the content of copper ions, calcium ions and free oxygen species with the proliferative activity of bone marrow cells was revealed. It is shown that changes caused by induced fibrosis of the liver can be partially restored by the administration of biologically active compounds – low molecular weight components of colostrum. It was concluded that the characteristics of bone marrow cells are affected not by age as such, but by a change in the microenvironment, which is caused by a change in the functional characteristics of the body. It was found that the characteristics of bone marrow cells (the content of calcium ions, copper ions, free oxygen species, the ability to proliferate and “life expectancy” in primary culture, the ratio of morphologically identifiable / unidentified cell types) does not depend on age as such, but on the characteristics of the microenvironment bone marrow cells, which is modeled by the functional state of the liver and biologically active compounds, such as low molecular weight components of colostrum.

Key words: bone marrow, aging, stem cells, microenvironment, liver fibrosis, biologically active compounds.

