Изучить омолаживающий эффект модификации гормонального фона и частичной иммуносупрессии на гетерохронной модели парабиоза беременных мышей-самок

- *Цель проекта:* выявить фактор старения, элиминация которого из общего кровотока во время беременности защищает плод от влияния микроокружения стареющего организма матери.

- *Задачи проекта*: Провести эксперимент, в котором после объединения кровеносных систем молодой и старой особей нужно их синхронно оплодотворить. Если молодая особь не будет ускоренно стариться, значит у старой отключен механизм старения.

- *Научная база:* ГУ «Институт геронтологии АМН Украины», Киев
  Лаборатория «Наномир», Москва.

2011

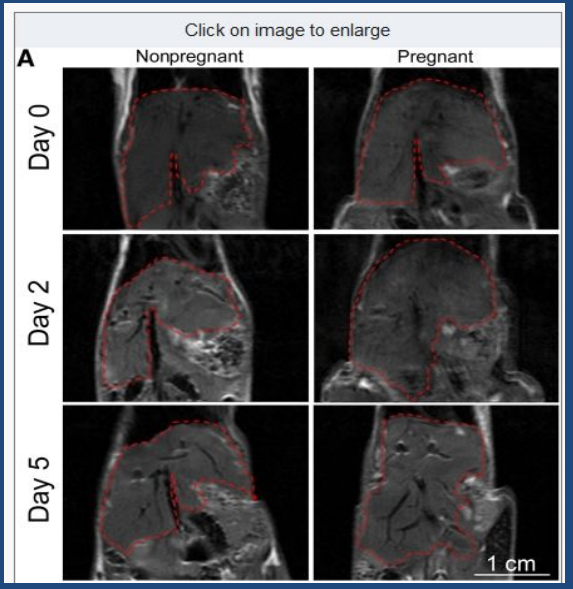
Актуальность проекта

История борьбы человечества со старостью насчитывает не одну тысячу лет. На заре цивилизации, а также много позднее, когда век homo sapience приближался к 30-40 годам, мысль о старости и смерти тревожила человечество. В наши дни, когда продолжительность жизни нередко достигает 80-90 лет, эта же мысль не оставляет людей.

- Внимание исследователей, изначально занимавшихся изучением эпигенетики эмбриональных стволовых клеток, привлек вопрос способности тканей к регенерации. Согласно сделанному ими наблюдению, регенеративные способности мышечных клеток-предшественников старых животных можно стимулировать путем парабиоза — экспериментальной методики, заключающейся в соединении кровеносных систем двух животных (в данном случае старого и молодого) и позволяющей одному организму воспользоваться факторами, циркулирующими в крови другого. Исходя из того, что беременность в определенной степени также является парабиозом (соединением двух организмов), авторы протестировали способность печени немолодых (10-12 месяцев) беременных и небеременных мышей к регенерации после гепатэктомии. Результаты наблюдения превзошли все ожидания: печень небеременных животных восстанавливалась только примерно до 50% от исходного объема, тогда как у беременных мышей объем восстановившегося органа составлял до 96% от исходного. В отличие от старых мышей, молодые животные (3 месяца) продемонстрировали выраженную способность печени к регенерации независимо от наличия беременности. В настоящее время авторы работают над расшифровкой молекулярных механизмов, лежащих в основе наблюдаемого ими феномена. Кроме того, они пытаются выяснить, оказывает ли беременность подобное влияние на регенеративные функции других органов.

Gielchinsky Y., Laufer N.,Weitman E., Abramovitch R., Granot Z., Bergman Y., Pikarsky E. Pregnancy restores the regenerative capacity of the aged liver via activation of an mTORC1 controlled hyperplasia/hypertrophy switch // *Genes Dev. 2010 March 15; 24(6): 543–548.*

Abstract: *Regenerative capacity is progressively lost with age. Here we show that pregnancy markedly improved liver regeneration in aged mice concomitantly with inducing a switch from proliferation-based liver regeneration to a regenerative process mediated by cell growth. We found that the key mediator of this switch was the Akt/mTORC1 pathway; its inhibition blocked hypertrophy, while increasing proliferation. Moreover, pharmacological activation of this pathway sufficed to induce the hypertrophy module, mimicking pregnancy. This treatment dramatically improved hepatic regenerative capacity and survival of old mice. Thus, cell growth-mediated mass reconstitution, which is relatively resistant to the detrimental effects of aging, is employed in a physiological situation and holds potential as a therapeutic strategy for ameliorating age-related functional deterioration.*



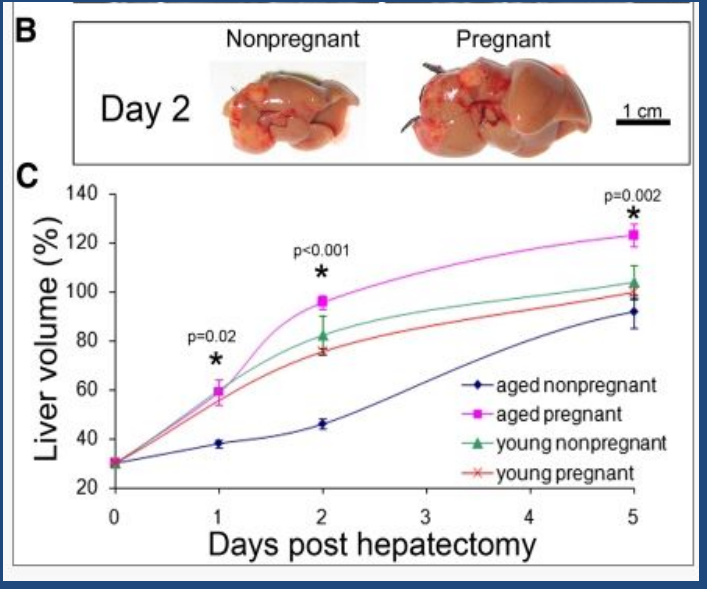


Figure 1.

Pregnancy improves liver regeneration in aged mice. (*A*) Representative serial MRI images of individual aged mice on the indicated days after two-thirds partial hepatectomy. Red hatched lines denote the liver contours. Bar, 1 cm. (*B*) Photographs of representative livers of aged mice removed 2 d after surgery. (*C*) For each mouse, liver volume on days 0, 1, 2, and 5 was determined by MRI and was recorded as a percentage of the liver volume prior to partial hepatectomy (mean ± SEM). (*) *P*-values were calculated for aged pregnant mice ($n = 5$) relative to aged nonpregnant mice ($n = 5$) using Student's *t*-test. (Aged) 10–12 mo old; (young) 3 mo old.

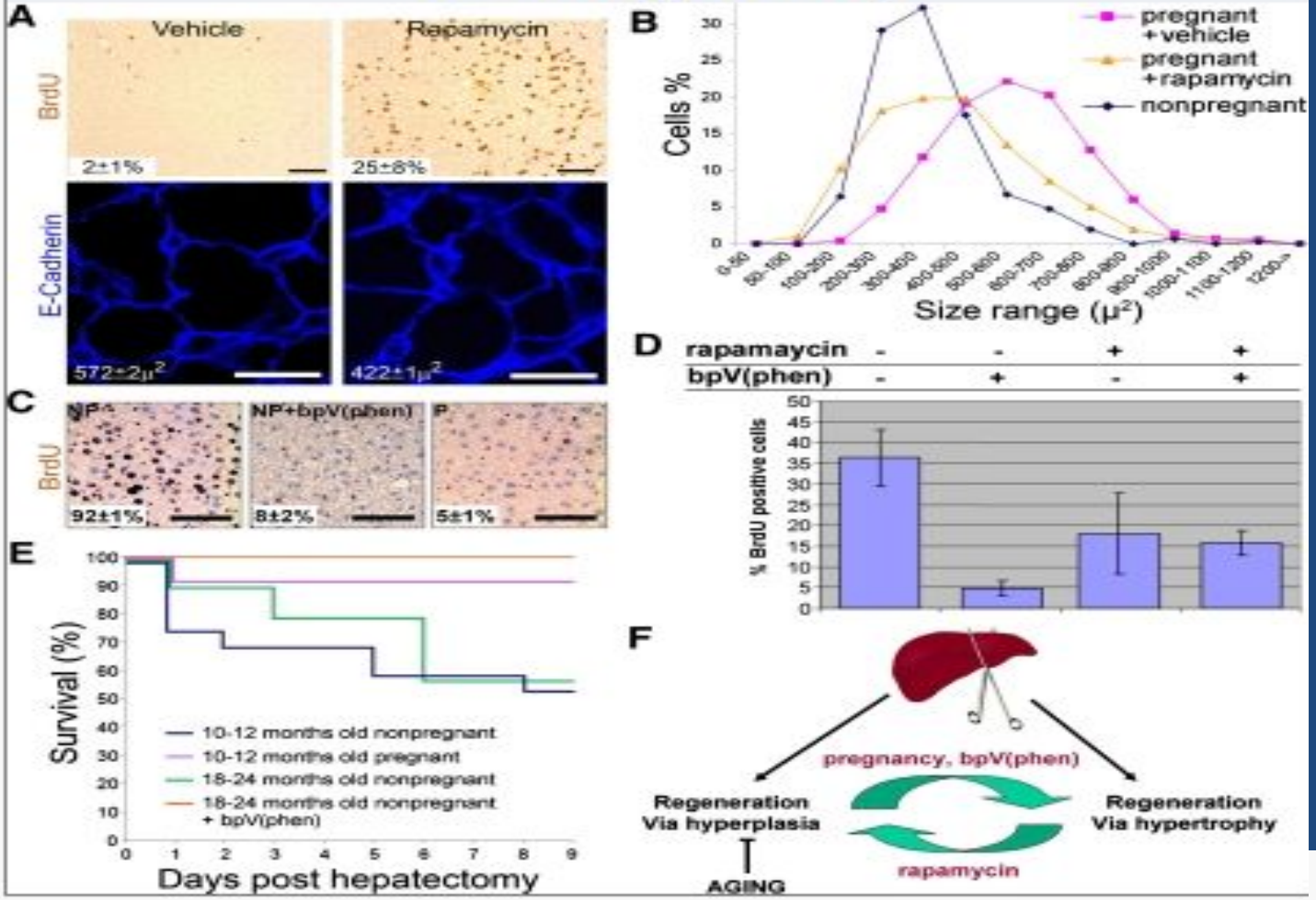


Figure 4.

The Akt/mTOR pathway controls the switch from the hyperplasia to the hypertrophy regeneration module. (*A*, *top* panel) Immunohistochemical staining for BrdU in vehicle- and rapamycin-treated aged pregnant mice 2 d after partial hepatectomy. Note the apparently paradoxical proliferation induced by the anti-proliferative drug rapamycin in the aged pregnant mice. Bars, 100 μm. $P = 0.04$, Student's *t*-test. (*Bottom* panel) Immunofluorescence staining for E-cadherin (blue). Bars, 20 μm. (*B*) Cell size distribution 2 d after surgery in hepatectomized livers of aged pregnant vehicle-treated (pink), aged pregnant rapamycin-treated (orange), and aged nonpregnant untreated (blue) mice. Each data point is representative of at least three mice. (*C*) Immunohistochemical staining for BrdU of livers from young nonpregnant (NP), nonpregnant treated with bpV(phen) [NP + bpV(phen)] or pregnant (P) mice 4 d after partial hepatectomy and continuous BrdU administration. Bars, 100 μm. (*D*) Average proliferation indices 2 d after hepatectomy with continuous BrdU in drinking water in mice of the indicated treatment groups. (*E*) Kaplan-Meier plots depicting survival in aged pregnant (pink), aged nonpregnant (blue), old (green), and bpV(phen)-treated old (orange) mice. (*F*) Proposed model for the two modules of liver regeneration. In most situations, liver regeneration occurs via hyperplasia. Certain circumstances, such as pregnancy and pharmaceutical activation of the Akt/mTORC1 pathway [e.g., by treatment with bpV(phen)], favor the hypertrophy module. Aging affects the latter module much less strongly than it affects the hyperplasia module, where it results in impairment of liver function and significant mortality.

- Исследователи из Гарварда обнаружили омолаживающий эффект крови молодых особей мышей на своих более взрослых собратьев. Недавно стало известно, что если к крови молодых грызунов добавить кровь "стариков", то она будто постареет. Новое исследование показало и обратный эффект — признаки старения уменьшаются. В ходе опытов учёные хирургическим путём объединили кровеносные системы двух особей грызунов. Таким образом, кровь взрослых животных подвергалась воздействию молекул и клеток, содержащихся в крови юных мышей. Далее биологи выяснили, что после этой процедуры старые гемопоэтические стволовые клетки стали вести себя как молодые: их общее число уменьшилось и они стали более пропорционально дифференцироваться в другие типы клеток крови. Омолаживающий эффект крови действовал и на стволовые клетки мышечной ткани. Из всего этого учёные делают вывод, что на восстановительные свойства стволовых клеток влияет не только естественный процесс старения, но и среда. Пока неизвестно, какое вещество из молодой крови заставляет старые стволовые клетки вести себя подобным образом, быть может инсулиноподобный фактор роста. Он оказывает влияние как на остеобласты, формирующие костную ткань и воздействующие на гемопоэтические клетки, так и на клетки мышечной ткани.

Mayack S.R., Shadrach J.L., Kim F.S., Wagers A.J. Systemic signals regulate ageing and rejuvenation of blood stem cell niches // *Nature* ***463****, 495-500 (28 January 2010)*

Abstract: *Ageing in multicellular organisms typically involves a progressive decline in cell replacement and repair processes, resulting in several physiological deficiencies, including inefficient muscle repair, reduced bone mass, and dysregulation of blood formation (haematopoiesis). Although defects in tissue-resident stem cells clearly contribute to these phenotypes, it is unclear to what extent they reflect stem cell intrinsic alterations or age-related changes in the stem cell supportive microenvironment, or niche. Here, using complementary in vivo and in vitro heterochronic models, we show that age-associated changes in stem cell supportive niche cells deregulate normal haematopoiesis by causing haematopoietic stem cell dysfunction. Furthermore, we find that age-dependent defects in niche cells are systemically regulated and can be reversed by exposure to a young circulation or by neutralization of the conserved longevity regulator, insulin-like growth factor-1, in the marrow microenvironment. Together, these results show a new and critical role for local and systemic factors in signalling age-related haematopoietic decline, and highlight a new model in which blood-borne factors in aged animals act through local niche cells to induce age-dependent disruption*

- Украинские учёные с целью выяснения пускового механизма иммунитета изучали гетерозронные парабиотические пары (молодые и старые мыши-самцы) и выясняли последовательность возникновения возрастных нарушений у молодых партнёров. Было установлено резкое снижение иммунологических функций, которое прогрессировало по мере сосуществования животных. Исследователи предполагают, что старение иммунной системы молодых мышей в общем кровотоке со старыми может быть опосредовано нарушением периферической дифференцировки Т-лимфоцитов.

Pishel I.N., Rodnichenko A.E., Orlova T.N., Shitikov., Kuchma M.D., Yuzik M.S., Butenko G.M. Imprairment of peripherial differentiation of T-cells a mechanism of accelerated aging of the immune system // Buk. Med. Herald. – 2009. – V. 13, №4ю – P. 227-230.

Abstract: A decrease of the immune functions with age is a well established fact. It can be assumed that this decrease is caused either by changes in the cells and lymphoid organ or by some humoral factors or due to some unknown regulatory influences at the cell population level. In order to analyze the trigger mechanism of age-related changes in the immune system we made the heterochronic pairs with different terms of coexistence. Objectives: to determine the sequence of agerelated alterations in the young immune system. Methods. Young and old male CBA/Ca mice were joined by parabiosis. Total 6 groups were made: young and old single controls, young and old isochronic pairs, and heterochronic pairs, each group having 3, 6 and 12 weeks of coexistence. Routine immunological methods and RT-PCR were used. Results. We observed age changes of the immune parameters in young heterochronic partners, which were progressing with an increasing term of animal coexistence. Initial changes in the immune parameters of the young heterochronic partners refer to the T-cell subpopulations in the spleen. The first change noticed was the increase of high proliferate CD8+CD44+ cell number after 3 weeks of pair coexistence. The progressive age-related changes in the T-cells subpopulations caused a complete dysfunction of the immune system, such as decrease of primary immune response to SRBC, PHA-stimulated lymphocyte proliferation in vitro, and splenic macrophage phagocytic function in young heterochronic partners. Conclusion. These results may suggest that primary age-related changes in young heterochronic partners may develop in T-cells migration and homeostatic differentiation.

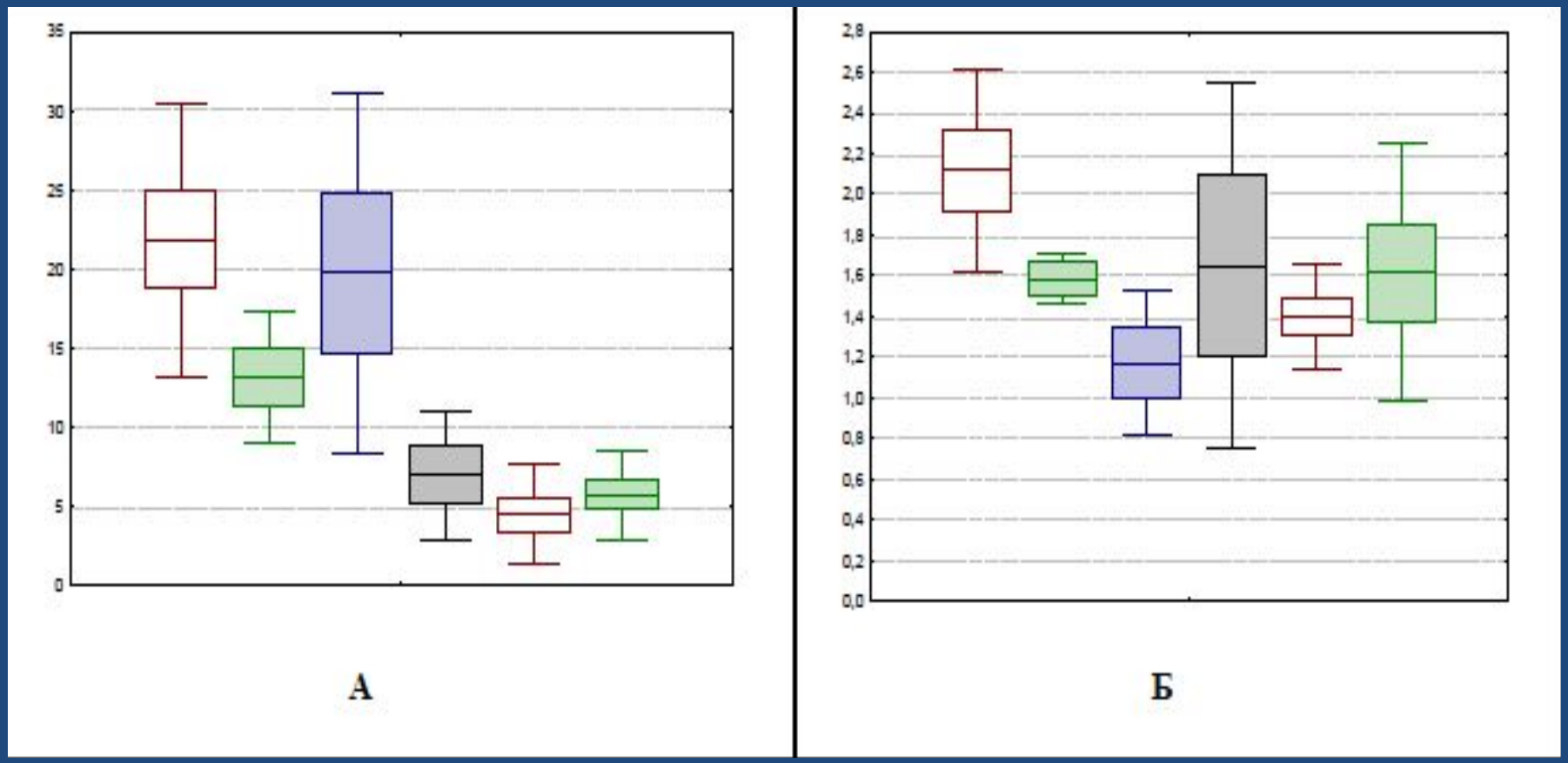


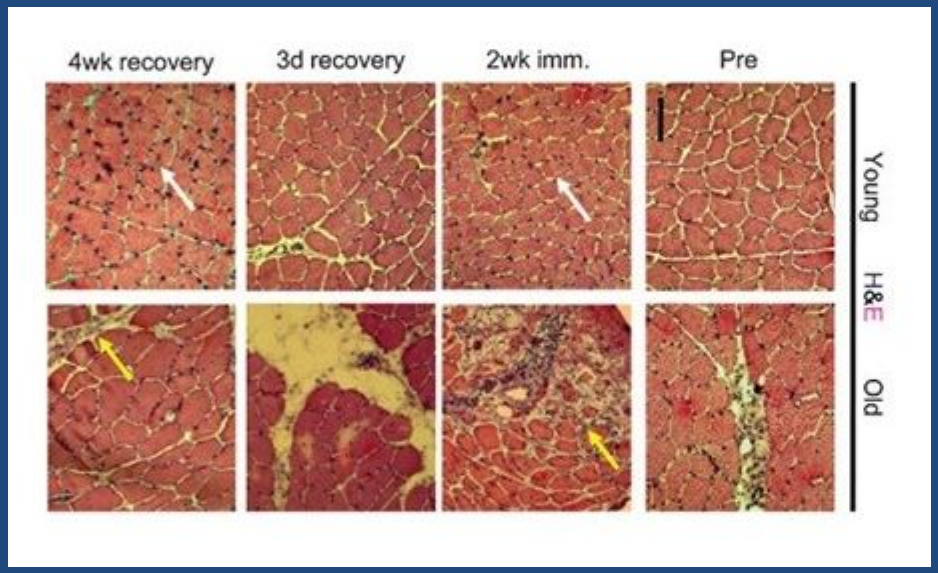
Рис. 1. Масса тимуса (А, мг) и пролиферативная активность спленоцитов (Б, у.ед.) у животных разных экспериментальных групп через 12 месяцев после операции

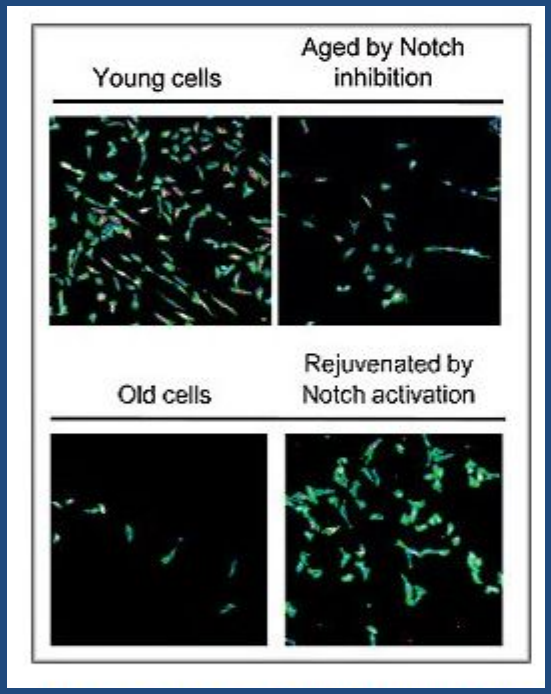
Примечания. 1. Номера групп животных указаны с 1 по 6 слева на право (по порядку). 2. Указаны среднее значение (центральная полоса), ошибка средней (верхняя и нижняя границы столбика) и среднеквадратическое отклонение (вертикальные границы разбросов). 3. * - $P_{(U)}<0,05$ по отношению к соответствующему изохронному контролю

- В этом же направлении работают и ученые из США, которые показали, что сателитные клетки мышц пожилых людей не в состоянии активироваться в ответ на мышечную атрофию в следствие низкой активности Notch, которая сопровождается увеличением концентрации трансформирующего ростового фактора бета (TGF-beta)/фосфоSmad3 (pSmad3). Также было показано, что свозрастом происходят отклонения в активности MARK/pFRK сигнальном каскаде, который принимает участие в регуляции активности Notch. Активация MAPK/Notch востанавливает миогенные функции сателитных клеток пожилых людей, в то время как ингибирование данной сигнальной системы у молодых людей приводит к образованию сателитных клеток пожилого типа..

Carlson ME, Suetta C, Conboy MJ, Aagaard P, Mackey A, Kjaer M, Conboy I. Molecular aging and rejuvenation of human muscle stem cells // *EMBO Mol Med. 2009 Nov;1(8-9):381-391.*

Abstract: Very little remains known about the regulation of human organ stem cells (in general, and during the aging process), and most previous data were collected in short-lived rodents. We examined whether stem cell aging in rodents could be extrapolated to genetically and environmentally variable humans. Our findings establish key evolutionarily conserved mechanisms of human stem cell aging. We find that satellite cells are maintained in aged human skeletal muscle, but fail to activate in response to muscle attrition, due to diminished activation of Notch compounded by elevated transforming growth factor beta (TGF-beta)/phospho Smad3 (pSmad3). Furthermore, this work reveals that mitogen-activated protein kinase (MAPK)/phosphate extracellular signal-regulated kinase (pERK) signalling declines in human muscle with age, and is important for activating Notch in human muscle stem cells. This molecular understanding, combined with data that human satellite cells remain intrinsically young, introduced novel therapeutic targets. Indeed, activation of MAPK/Notch restored 'youthful' myogenic responses to satellite cells from 70-year-old humans, rendering them similar to cells from 20-year-old humans. These findings strongly suggest that aging of human muscle maintenance and repair can be reversed by 'youthful' calibration of specific molecular pathways.





Brack AS, Conboy IM, Conboy MJ, Shen J, Rando TA. A temporal switch from notch to Wnt signaling in muscle stem cells is necessary for normal adult myogenesis // *Cell Stem Cell. 2008 Jan 10;2(1):50-59.*

<u>Abstract:</u> The temporal switch from progenitor cell proliferation to differentiation is essential for effective adult tissue repair. We previously reported the critical role of Notch signaling in the proliferative expansion of myogenic progenitors in mammalian postnatal myogenesis. We now show that the onset of differentiation is due to a transition from Notch signaling to Wnt signaling in myogenic progenitors and is associated with an increased expression of Wnt in the tissue and an increased responsiveness of progenitors to Wnt. Crosstalk between these two pathways occurs via GSK3beta, which is maintained in an active form by Notch but is inhibited by Wnt in the canonical Wnt signaling cascade. These results demonstrate that the temporal balance between Notch and Wnt signaling orchestrates the precise progression of muscle precursor cells along the myogenic lineage pathway, through stages of proliferative expansion and then differentiation, during postnatal myogenesis.

- Что требуется для проведения эксперимента?
- Институт геронтологии НАМН Украины готов за свой счёт прооперировать 10 пар лабораторных животных, чтобы получить достоверные результаты.

Требуется приобрести 10 пар животных чистой линии, корм для животных, расходные материалы для операций и анализов.

Требуется инвестиций всего $2500.

Институт геронтологии НАМН Украины готов написать научную статью с результатами этого эксперимента.