

# ВОЗРАСТНАЯ ДИНАМИКА ДИФФЕРЕНЦИРОВКИ ИММУННЫХ КЛЕТОК ТИМУСА ЧЕЛОВЕКА

В.Х.Хавинсон, Н.С.Линькова, В.О.Полякова, А.В.Дуднов, И.М.Кветной

*Санкт-Петербургский институт биорегуляции и геронтологии СЗО РАМН*

Методом иммуногистохимии в тимусе людей пожилого, старческого возраста и у долгожителей верифицирована экспрессия маркеров недифференцированных CD5<sup>+</sup>-клеток, В-лимфоцитов, Т-киллеров/супрессоров и Т-хелперов. Показано, что с возрастом число CD5<sup>+</sup>-клеток в тимусе человека прогрессивно снижается. Выявлены положительные корреляции между количеством CD5<sup>+</sup>-клеток и дифференцированных Т-лимфоцитов. Установлено, что с возрастом снижается способность дифференцировки CD5<sup>+</sup>-тимоцитов в Т-киллеры/супрессоры.

**Ключевые слова:** *недифференцированные CD5<sup>+</sup>-клетки, Т-лимфоциты, В-лимфоциты, тимус, старение*

Продолжительность жизни человека и темпы развития возрастной патологии во многом определяются состоянием иммунной системы, а именно ее центрального органа — тимуса [2]. К 60 годам количество незрелых лимфоидных клеток тимуса (тимоцитов), а также их дифференцированных форм значительно снижается [4]. Причиной этого процесса является, во-первых, дегенерация эпителиальных клеток вилочковой железы, обеспечивающих дифференцировку, пролиферацию и выживаемость тимоцитов и, во-вторых, снижение секреции биологически активных факторов тимуса — ИЛ-7 и тимического сывороточного фактора, регулирующих дифференцировку Т- и В-лимфоцитов [5]. Однако вопрос о том, насколько инволюция тимуса у лиц старше 60 лет затрагивает процессы пролиферации тимоцитов и незрелых В-лимфоцитов и их последующую дифференцировку, до сих пор изучен недостаточно.

Целью исследования явилось изучение возрастной динамики количества тимоцитов, а также выявление взаимосвязей между соотношением различных популяций зрелых Т- и В-лимфоцитов и их недифференцированных форм.

## МЕТОДИКА ИССЛЕДОВАНИЯ

Материал тимуса, полученный при аутопсии у людей различного возраста, был разделен на группы

*Адрес для корреспонденции:* miayu@yandex.ru. Линькова Н.С.

в соответствии с классификацией ВОЗ: 1-я группа — от пожилых людей (60-74 года), 2-я — от лиц старческого возраста (75-89 лет) и 3-я — от долгожителей (90 лет и старше).

Фрагменты тимуса фиксировали в растворе формалина с pH 7.0, обезжизняли и заливали в парафин по стандартной методике. Срезы вилочковой железы толщиной 3-5 мкм делали на микротоме “Leica 540 M”, наносили на предметные стекла с поли-L-лизинным покрытием. Препараты окрашивали гематоксилином и эозином, ставили иммуногистохимическую реакцию с целью выявления различных популяций иммунных клеток.

Имуногистохимическое выявление экспрессии недифференцированных иммунных клеток, зрелых Т-хелперов (Тх), Т-киллеров/супрессоров (ТКС) и В-лимфоцитов проводили с использованием соответствующих моноклональных антител CD5 (1:30; “Novocastra”), CD4 и CD8 (готовые к использованию; “Novocastra”), CD20 (1:30; “Novocastra”). В качестве вторичных антител использовали универсальный набор, содержащий биотинилированные антимышинные и антикроличьи иммуноглобулины. Визуализацию окрасок проводили с применением комплекса авидина с пероксидазой хрена (ABC-kit) с последующим проявлением пероксидазы хрена диаминобензидином (все реагенты “Novocastra”).

Для верификации тимоцитов выбран именно маркер CD5, поскольку соответствующий клеточный рецептор участвует в активации незрелых иммунных клеток тимуса [6]. Кроме того, молекула CD5

присутствует на зрелых В-лимфоцитах, Тх и ТКС [3], что позволяет проследить, в каком соотношении незрелые лимфоидные клетки дифференцируются в различные зрелые популяции.

Морфометрическое исследование проводили с использованием системы компьютерного анализа микроскопических изображений, состоящей из микроскопа "Nikon Eclipse E400", цифровой камеры "Nikon DXM1200", компьютера и программного обеспечения "VidiotestMorphology 5.0". В каждом случае анализировали 10 полей зрения при увеличении 400. Площадь экспрессии указанных маркеров рассчитывали как отношение площади, занимаемой иммунопозитивными клетками, к общей площади клеток в поле зрения в процентах. Оптическую плотность экспрессии измеряли в условных единицах.

Для статистической обработки данных использовали двусторонний критерий Стьюдента. Линейные зависимости между площадью экспрессии исследуемых иммуногистохимических маркеров оценивали с использованием корреляционного анализа по Пирсону. Для оценки достоверности линейного уравнения регрессии использовали коэффициент детерминации, рассчитываемый как квадрат значения коэффициента корреляции Пирсона.

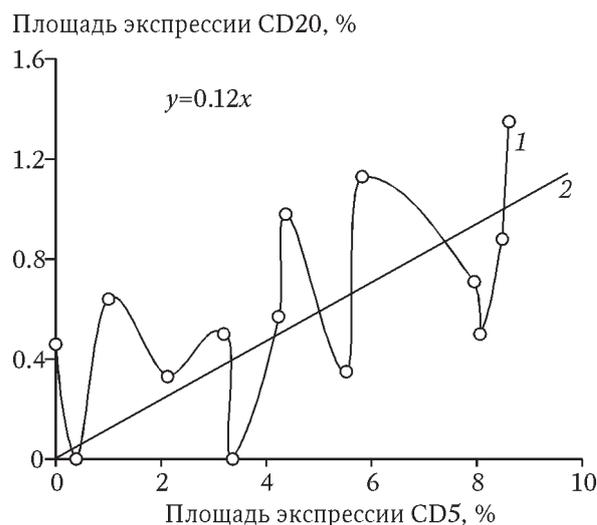
## РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Площадь экспрессии маркера CD5 в 1-й группе составила  $7.07 \pm 1.15\%$ , что в 1.4 раза больше, чем во 2-й группе ( $5.07 \pm 0.62\%$ ,  $p < 0.05$ ). При этом во 2-й группе площадь экспрессии CD5 была в 1.6 раза больше по сравнению с 3-й группой, где этот показатель составил  $3.26 \pm 0.72\%$  ( $p < 0.05$ ). Оптическая плотность экспрессии маркера CD5 во всех 3 исследуемых группах достоверно не различалась. Полученные данные свидетельствуют о том, что количество тимоцитов и незрелых В-клеток в тимусе у людей старше 60 лет прогрессивно снижается, причем максимальное снижение недифференцированных CD5<sup>+</sup>-иммунных клеток наблюдается у долгожителей. При этом количество рецепторов к указанному маркеру, приходящихся на 1

клетку, с возрастом не изменяется. Мы предположили, что возрастное снижение количества тимоцитов и недифференцированных В-клеток должно приводить к уменьшению зрелых форм Т- и В-лимфоцитов в тимусе.

Взаимосвязь между площадью экспрессии маркера зрелых В-лимфоцитов CD20 и площадью экспрессии CD5 была умеренно выражена, о чем свидетельствует низкое значение коэффициента корреляции Пирсона (таблица). В то же время аппроксимирующее уравнение (рис. 1) указывает, что среди популяции CD5<sup>+</sup>-клеток CD20<sup>+</sup> В-лимфоциты составляют 12%. Коэффициент детерминации показал, что количество зрелых В-лимфоцитов лишь на 34% определяется содержанием в тимусе незрелых CD5<sup>+</sup>-клеток и в большей степени зависит от других факторов.

Корреляционная связь между показателями площади экспрессии маркера Тх CD4 и маркера тимоцитов CD5 является сильной (таблица), а до-



**Рис. 1.** Зависимость площади экспрессии маркера В-лимфоцитов CD20 от площади экспрессии маркера недифференцированных Т- и В-клеток CD5 в тимусах людей в 1-3-й группах.

Здесь и на рис. 2, 3: 1 — экспериментальные данные, 2 — аппроксимирующая прямая.

Характеристики зависимостей между экспрессией различных маркеров иммунных клеток в тимусе человека

Возрастные группы	Сравниваемые показатели площади экспрессии		Коэффициент корреляции	Характер зависимости между величинами	Коэффициент детерминации
1, 2, 3	CD20	CD5	0.59	Умеренная	0.34
1, 2, 3	CD4	CD5	0.78	Сильная	0.60
1	CD8	CD5	0.92	Сильная	0.85
2, 3	CD8	CD5	0.80	Сильная	0.64

стоверность аппроксимирующего данные линейного уравнения, показывающего, что 12% тимоцитов дифференцируются в Тх (рис. 2), подтверждается высоким значением коэффициента детерминации.

При исследовании корреляции между площадью экспрессии маркера ТКС CD8 и площадью экспрессии маркера тимоцитов CD5 установлено, что она изменяется в зависимости от возрастной группы. В связи с этим корреляционное исследование было проведено отдельно для 1-й группы и объединенной 2-й и 3-й групп.

В 1-й группе коэффициент корреляции для показателей площади экспрессии CD8 и CD5 стре-

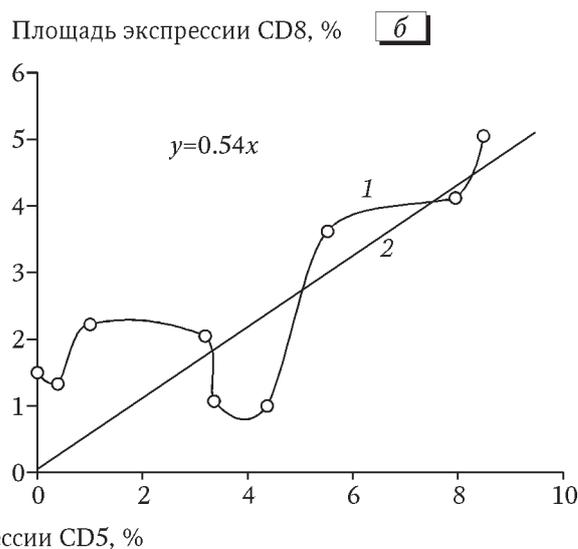
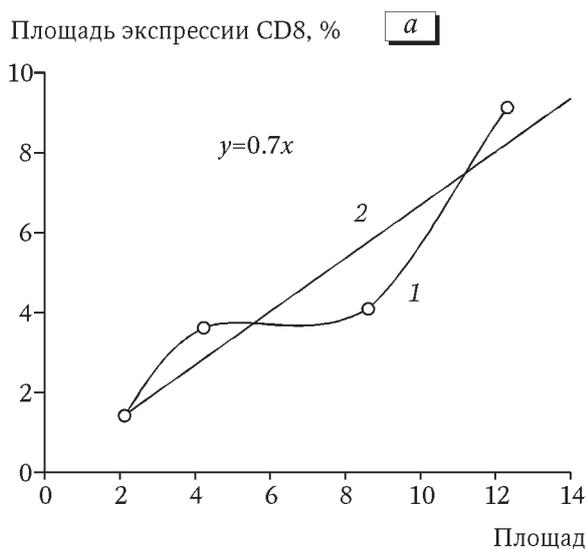


**Рис. 2.** Зависимость площади экспрессии маркера Тх CD4 от площади экспрессии маркера недифференцированных Т- и В-клеток CD5 в тимусах людей в 1-3-й группах.

мился к 1 (таблица), что свидетельствует о близости экспериментальных данных к линейной зависимости. Аппроксимирующая зависимость показывает, что 70% тимоцитов дифференцируются в ТКС (рис. 3, а), а коэффициент детерминации подтверждает достоверность такого вывода (таблица). Во 2-й и 3-й группах корреляция между площадью экспрессии CD8 и CD5 также сильно выражена, однако описывающее эту зависимость линейное уравнение показывает, что только 54% тимоцитов способны к дифференцировке в ТКС (рис. 3, б).

Полученные данные показали, что у людей старше 60 лет в тимусе снижается количество недифференцированных CD5<sup>+</sup>-клеток, причем с возрастом этот процесс ускоряется. 12% от общего числа CD5<sup>+</sup>-клеток составляют CD20<sup>+</sup> В-лимфоциты, при этом содержание В-лимфоцитов в тимусе не зависит от количества CD5<sup>+</sup>-клеток. Еще 12% от общего числа CD5<sup>+</sup>-клеток приходится на Тх, при этом количество Тх зависит от числа CD5<sup>+</sup>-timoцитов. Процесс дифференцировки ТКС из CD5<sup>+</sup>-timoцитов различается у пожилых людей и у лиц старше 74 лет. В пожилом возрасте 70% CD5<sup>+</sup>-клеток дифференцируются в ТКС, тогда как способность тимоцитов к дифференцировке в цитотоксические Т-клетки у людей старше 74 лет снижается до 54%.

С возрастом в тимусе снижается число недифференцированных CD5<sup>+</sup>-клеток, что обуславливает уменьшение количества зрелых Т-лимфоцитов (Тх и ТКС), но не влияет на число зрелых В-клеток. При этом в старческом возрасте и у долгожителей наблюдается снижение способности



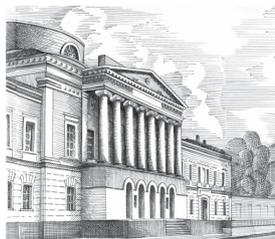
**Рис. 3.** Зависимость площади экспрессии маркера ТКС CD8 от площади экспрессии маркера недифференцированных Т- и В-клеток CD5 в тимусах от возраста. а – 1-я группа, б – 2-я и 3-я группы.

CD5<sup>+</sup>-timoцитов дифференцироваться в ТКС, что является дополнительной причиной уменьшения этой популяции иммунных клеток.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Пальцев М.А., Кветной И.М., Полякова В.О. и др. // Успехи геронтол. 2009. Т. 22, № 1. С. 24-36.
2. Хавинсон В.Х., Кветной И.М., Южаков В.В. и др. Пептидэргическая регуляция гомеостаза. СПб., 2003.
3. Gagnon J., Chen X.L., Forand-Boulerice M. et al. // Immunol. Cell Biol. 2010. Vol. 88, N 4. P. 451-460.
4. Lawson V.J., Weston K., Maurice D. // Eur. J. Immunol. 2010. Vol. 40, N 1. P. 232-241.
5. Marino J.H., Tan C., Taylor A.A. et al. // Hum. Immunol. 2010. Vol. 71, N 4. P. 329-333.
6. Toga A., Wada T., Sakakibara Y. et al. // J. Infect. Dis. 2010. Vol. 201, N 12. P. 1923-1932.

Получено 21.02.10



## Долгушин И.И., Андреева Ю.С., Савочкина А.Ю. Нейтрофильные внеклеточные ловушки и методы оценки функцио- нального статуса нейтрофилов

В монографии рассматриваются гистогенез, морфология, кинетика, рецепторный аппарат, антимикробные функции нейтрофильных гранулоцитов. Отдельная глава посвящена нейтрофильным внеклеточным ловушкам, их образованию, факторам, стимулирующим выброс ДНК нейтрофилов во внеклеточную среду, роли в защитных реакциях. В книге представлены разработанные авторами оригинальные экспресс-методы оценки содержания и антимикробной активности экстрацеллюлярных ловушек, образованных нейтрофилами, в периферической крови и мукозальных секретах, примеры использования данных методик для оценки эффективности иммуностропных препаратов и мукозальных вакцин. Представлены методы оценки функционального статуса нейтрофилов, нормативные показатели состояния нейтрофильного звена периферической крови и мукозальных секретов.

*Монография адресована врачам-иммунологам, врачам клинической лабораторной диагностики, врачам разных специальностей, занимающихся оценкой иммунной системы, а также интернам, аспирантам, студентам старших курсов высших медицинских учреждений.*

М.: Издательство РАМН. 2009 г. 206 с.