



00346899 1

На правах рукописи

ФЕДОРОВА
Екатерина Сергеевна

ВОЗРАСТНАЯ ДИНАМИКА ФАКТОРОВ МИКРООКРУЖЕНИЯ
В ТИМУСЕ ЧЕЛОВЕКА

14.00. 53 – геронтология и гериатрия

АВТОРЕФЕРАТ
диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

14 МАЯ 2009

Санкт-Петербург – 2009

Работа выполнена в отделе клеточной биологии и патологии
Санкт-Петербургского института биорегуляции и геронтологии СЗО РАМН

Научный руководитель:

доктор биологических наук
Полякова Виктория Олеговна

Официальные оппоненты:

доктор биологических наук
Кветная Татьяна Викторовна

доктор медицинских наук
Забезинский Марк Абрамович

Ведущая организация:


Федеральное государственное образовательное учреждение высшего профессионального образования «Санкт-Петербургский государственный университет»

Защита диссертации состоится «15» мая 2009 г. в 12 часов на заседании диссертационного совета Д 601.001.01 при Санкт-Петербургском институте биорегуляции и геронтологии СЗО РАМН по адресу: 197110, Россия, Санкт-Петербург, пр. Динамо, д. 3.

С диссертацией можно ознакомиться в фундаментальной библиотеке Санкт-Петербургского института биорегуляции и геронтологии СЗО РАМН (197110, Россия, Санкт-Петербург, пр. Динамо, д. 3).

Автореферат разослан «14» апреля 2009 г.

Ученый секретарь
диссертационного совета
кандидат биологических наук, доцент

 Козина Л.С.

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы

Тимус, наряду с костным мозгом, играет ключевую роль в развитии клеток иммунной системы. Образовавшиеся из стволовых клеток костного мозга предшественники Т-лимфоцитов мигрируют в тимус для созревания, где и происходит процессинг лимфоцитов, включающий отбор клеток и их клонов, которые распознают молекулярные конфигурации, значимые для защиты организма, и выбраковку аутореактивных клонов. Затем лимфоциты дифференцируются на две субпопуляции: Т-хелперы и Т-киллеры. Процесс созревания Т-лимфоцитов сопряжен с перемещением тимоцитов по компартментам тимуса и взаимодействием с клетками микроокружения, среди которых важное место занимают эпителиальные, тучные и дендритные клетки [Ярилин А.А., 1999; Ноздрачев А.Д., 2004].

Известно, что регуляция функций тимуса осуществляется большим количеством разнообразных сигнальных молекул, продуцируемых клетками микроокружения [Чернышева М.П. и др., 2004], среди которых биогенные амины, нейропептиды, цитокины и другие биологически активные вещества, осуществляющие нейроиммуноэндокринные взаимодействия. Так, например, показано, что эндогенный серотонин оказывает митогенное действие на пролиферацию лимфоидных клеток [Кветной И.М. et al., 2003]. В тимических эпителиальных клетках синтезируется фактор роста сосудов (VEGF - vascular endothelial growth factor) - один из основных паракринных регуляторов ангиогенеза [Muller S.M. et al., 2005]. Тучные клетки экспрессируют более 20 сигнальных молекул, среди которых основной фермент, катализирующий образование свободных радикалов, NO-синтаза [Moulian N. et al., 2001].

Возрастные инволютивные изменения тимуса, играющие ключевую роль в ослаблении системы клеточного и гуморального иммунитета, связаны с динамикой секреции факторов микроокружения [Пальцев М.А., Кветной И.М., 2008]. В связи с тем, что старение иммунной системы инициируется процессами, происходящими в тимусе, изучение возрастной динамики локальной экспрессии факторов микроокружения в вилочковой железе и их роли в процессах пролиферации и дифференцировки тимоцитов позволят не только более глубоко понять механизмы функционирования и возрастной инволюции тимуса, но и обосновать новые подходы к профилактике и коррекции возрастных иммунодефицитов и ассоциированных с ними нейроэндокринных расстройств.

Цель и задачи исследования

Целью диссертационного исследования является верификация и изучение возрастной динамики содержания серотонина, фактора роста сосудов, NO-синтазы и белка дендритных клеток CD35 в клетках микроокружения, оценка их роли в процессах возрастной инволюции тимуса человека.

Для достижения указанной цели были поставлены и последовательно решены следующие задачи:

1. Верифицировать содержание серотонина, фактора роста сосудов (VEGF), NO-синтазы в тучных клетках, маркерного протеина дендритных клеток CD35 и маркерного протеина Т-лимфоцитов CD5 в тимусе человека.
2. Изучить возрастную динамику содержания серотонина, VEGF, NO-синтазы и протеина CD35 в клетках микроокружения тимуса человека.
3. Изучить возрастные количественные изменения пула Т-клеток тимуса человека по экспрессии их маркерного протеина CD5.
4. Установить возможные корреляционные взаимосвязи между содержанием серотонина, VEGF, NO-синтазы, протеина CD35 и количеством Т-клеток на разных этапах онтогенеза человека.
5. Оценить роль конкретных факторов микроокружения тимуса человека в регуляции пула Т-лимфоцитов в процессе онтогенеза.

Научная новизна

В работе впервые верифицирована экспрессия и изучена возрастная динамика содержания таких факторов микроокружения, как серотонин, NO-синтаза, CD35, VEGF, а также маркерного протеина Т-лимфоцитов CD5 в тимусе человека. Впервые зарегистрированы корреляции между интенсивностью продукции факторов микроокружения и состоянием популяции Т-клеток на разных этапах онтогенеза человека. Выявлено сохранение синтеза серотонина в тимусе вплоть до старческого возраста, что отражает сохранность эндокринной функции железы при старении. Зарегистрировано снижение экспрессии VEGF в тимусе при старении, что свидетельствует о вовлечении ангиогенных факторов в механизм возрастной инволюции тимуса через нарушение трофики органа. Впервые выявлено возрастание экспрессии NO-синтазы в тимусе при старении, что отражает ключевую роль возрастного накопления свободных радикалов, приводящего к структурно-функциональной инволюции тимуса. Полученные данные значительно расширяют существующие представления о роли сигнальных молекул в регуляции функций тимуса в процессе онтогенеза, демонстрируя важный вклад клеток микроокружения в поддержание деятельности тимуса в стареющем организме.

Практическая значимость

Полученные результаты позволяют оценить важную регулируемую роль факторов микроокружения в тимусе человека на всем протяжении онтогенеза, что открывает пути разработки новых подходов для таргетной терапии возрастных иммунодефицитов и других заболеваний, ассоциированных со старением.

Основные положения, выносимые на защиту

1. Сигнальные молекулы, вырабатываемые клетками микроокружения тимуса, играют важную регулируемую роль для обеспечения межклеточных коммуникаций в тимусе на всем протяжении онтогенеза.
2. Серотонин, фактор роста сосудов (VEGF) и NO-синтаза являются ключевыми факторами развития инволюционных процессов в тимусе человека при старении.
3. Сохранность популяции Т-лимфоцитов в процессе онтогенеза регулируется продукцией факторов микроокружения тимуса.
4. Возрастная динамика факторов микроокружения обеспечивает достаточный уровень нейроиммуноэндокринных функций тимуса в стареющем организме.

Связь с научно-исследовательской работой Института

Диссертационная работа является логическим продолжением исследований, проводимых при выполнении магистерской диссертации в соответствии с планом научно-исследовательской работы в лаборатории клеточной биологии и патологии СПб ИБГ СЗО РАМН.

Структура и объем диссертации

Диссертация состоит из введения, 4 глав, выводов и списка литературы. Глава 1 (обзор литературы) представляет собой анализ данных литературы, отражающий современные представления о функциональной морфологии тимуса и роли факторов микроокружения (серотонина, фактора роста сосудов, NO-синтазы и CD35) в процессе возрастной инволюции железы. Глава 2 посвящена описанию материалов и методов, используемых в данном исследовании. Глава 3 представляет собственные экспериментальные данные изучения возрастной динамики факторов микроокружения в тимусе человека. Глава 4 посвящена обсуждению результатов исследования. Текст диссертации изложен на 129 страницах, содержит 6 таблиц, иллюстрирован 54 рисунками. Список литературы содержит 151 источник, из которых 60 отечественных.

Публикации

По материалам диссертации опубликовано 15 научных работ, в том числе 1 статья в журнале, рекомендованном ВАК Минобрнауки РФ для опубликования материалов диссертационных исследований.

Апробация и реализация диссертации

Материалы диссертации доложены на Девятой Всероссийской медико-биологической конференции молодых исследователей «Человек и его здоровье» (Санкт-Петербург, 2006); X Всероссийском Форуме с международным участием им. акад. В.И. Иоффе «Дни иммунологии в Санкт-Петербурге» (Санкт-Петербург, 2006); Всероссийской конференции

«Перспективы фундаментальной геронтологии» (Санкт-Петербург, 2006); II научно-практической геронтологической конференции с международным участием, посвященной памяти Э.С. Пушкиновой «Пушковские чтения» (Санкт-Петербург, 2006); Десятой Всероссийской медико-биологической конференции молодых исследователей «Человек и его здоровье» (Санкт-Петербург, 2007); VI Европейском Конгрессе Международной Ассоциации Геронтологии и Гериатрии (Санкт-Петербург, 2007); V Всероссийской конференции с международным участием, посвященной 100-летию со дня рождения В.Н. Черниговского – «Механизмы функционирования висцеральных систем» (Санкт-Петербург, 2007); 11-й Пушкинской международной школы-конференции молодых ученых «Биология – наука XXI века» (Пушино, 2007); III научно-практической геронтологической конференции с международным участием, посвященной памяти Э.С. Пушкиновой «Пушковские чтения» (Санкт-Петербург, 2007); студенческой научной конференции «Геронтологические чтения» (Белгород, 2008); VI Всероссийской конференции с международным участием, посвященной 50-летию открытия А.М. Уголевым мембранного пищеварения – «Механизмы функционирования висцеральных систем» (Санкт-Петербург, 2008); IV научно-практической геронтологической конференции с международным участием, посвященной памяти Э.С. Пушкиновой «Пушковские чтения» (Санкт-Петербург, 2008).

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Характеристика исследуемого материала

Исследования проведены на тимусах людей разных возрастных групп, умерших от различных соматических заболеваний. Аутопсийный материал для исследования (тимус) был получен в патологоанатомических отделениях НИИ акушерства и гинекологии им. Д. О. Отта РАМН и больницы св. Георгия, а также в Санкт-Петербургском городском патологоанатомическом бюро.

Секционный материал был разделен на группы с учетом международной возрастной классификации Всемирной Организации Здравоохранения (ВОЗ):

- группа 1 – плоды (19-33 недели внутриутробного развития; n=17);
- группа 2 – дети первого года жизни (2 суток - 7 месяцев; n=23);
- группа 3 – пожилые люди (60 лет – 74 года; n=19);
- группа 4 – люди старческого возраста (75–89 лет; n=17);
- группа 5 – долгожители (старше 90 лет; n=14).

В связи с тем, что основной целью работы явилось изучение возрастной динамики содержания факторов микроокружения в тимусе человека и их роли на процессах инволюции вилочковой железы при старении, для

исследования был взят тимус, находящийся на пике своего физиологического развития (детский тимус) и стареющий тимус (претерпевающий возрастную инволюцию). Всего исследовано 90 желез.

Гистологические методы

Фрагменты тимуса фиксировали в нейтральном растворе формалина (рН=7), проводили через спирты, ксилолы и заливали в парафин по стандартной методике. Для морфологического изучения срезы окрашивали гематоксилином-эозином и толуидиновым синим по стандартной методике.

Иммуногистохимические методы

Для иммуногистохимического исследования использовали первичные моноклональные мышинные анти-человеческие антитела к серотонину (1:50), VEGF (1:50), CD35 (1:50), NO-синтазе (1:50), CD5 (1:50). В качестве вторых антител использовали биотинилированные анти-мышинные иммуноглобулины из универсального набора. Визуализацию окрасок проводили с применением комплекса авидина с биотинилированной пероксидазой (ABC-kit) с последующим проявлением пероксидазы хрена диаминобензидином (все реагенты от Dako).

Морфометрическое исследование и статистическая обработка результатов

Для оценки интенсивности окрашивания были проведены морфометрические исследования с использованием системы компьютерного анализа микроскопических изображений Nikon Eclipse 400 и лицензионной программы Videotest Morphology 5.0. Для каждого препарата фотографировали 10 полей зрения (увеличение $\times 600$).

В качестве морфометрических показателей подсчитывали суммарную площадь экспрессии (в % от общей площади среза) и оптическую плотность (в условных единицах – у.е.). Указанные показатели являются общепринятыми параметрами для оценки экспрессии сигнальных молекул в клетках и тканях.

Статистическую обработку результатов проводили с помощью программы Statistica 6.0. Для анализа вида распределения использовали критерий Шапиро-Уилка (Shapiro-Wilk's W-test). Проверка гипотез о различиях между группами проводилась с помощью дисперсионного анализа (ANOVA) с использованием непараметрического метода Краскела-Уоллиса, для сравнения отдельных групп использовали непараметрический критерий Манна-Уитни. Для определения корреляционных зависимостей был использован непараметрический метод корреляционного анализа Спирмена.

Критический уровень достоверности нулевой статистической гипотезы (об отсутствии различий и влияний) принимали равным 0,05.

Результаты исследования представлены в виде среднего арифметического значения (Mean) и стандартной ошибки среднего (standard error of mean, SEM) – Mean \pm SEM.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Результаты светооптического исследования тимуса человека

При светооптическом исследовании препаратов тимуса первой возрастной группы (плоды с 19 по 33 недели внутриутробного развития) были обнаружены все структурные компоненты, присущие этому органу. Тимус покрыт широкой соединительнотканной капсулой, от которой отходят септы, разделяющие паренхиму на дольки; пространство долек заполнено мелкими лимфоцитами и эпителиальными клетками; граница между корковым и мозговым веществом частично размыта; в мозговом веществе обнаруживаются развивающиеся тельца Гассалья.

У детей первого года жизни (вторая возрастная группа) тимус имеет сходное строение. В отличие от плодов наблюдается большее число лимфоцитов, в некоторых участках лимфоциты формируют розеточные структуры, которые располагаются преимущественно в корковом веществе. В этой группе граница между корковым и мозговым веществом визуализируется отчетливо. Тельца Гассалья, образованные эпителиальными клетками, в основном располагаются в мозговом веществе.

На препаратах тимуса людей пожилого, старческого возраста и долгожителей (третья, четвертая и пятая возрастные группы, соответственно) большая часть долек замещена жировой и соединительной тканями. Жировая дистрофия и склероз делают невозможным четкое разделение тимуса на корковый и мозговой слои. В единично сохранившихся дольках отмечается гипоплазия тимоцитов, которые в основном располагаются в виде скоплений по 5-6 клеток, в то время как сохранившиеся тельца Гассалья гиперплазированы. В этой группе отмечается расширение сосудов с явлениями выраженного стаза крови и многочисленных скоплений эритроцитов в их просвете.

Таким образом, светооптическое исследование позволило установить, что тимусы плодов и детей первого года жизни имели нормальное для своего возраста строение. Тимусы людей пожилого, старческого возраста и долгожителей демонстрировали четко выраженные признаки инволюции.

Результаты иммуногистохимического исследования тимуса человека

Содержание серотонина в тимусах людей разных возрастных групп

В группе плодов специфическое окрашивание с антителами к серотонину обнаружено в следующих структурах тимуса: стенках сосудов медуллярной и кортикальной зон, эритроцитах в просветах сосудов, в отдельных клетках субкапсулярной и медуллярной зон, а также в соединительнотканной строме тимуса. В отдельных случаях слабое окрашивание наблюдается в тельцах Гассалья. По сравнению с первой возрастной группой на срезах тимуса детей первого года жизни отмечается реакция во внутريدольковых периваскулярных пространствах (ВПП), где

наблюдаются небольшие скопления иммуноокрашенных клеток округлой формы, которые формируют эндотелий новообразующихся сосудов. Также иммуноокрашивание наблюдается в стенках сосудов и эритроцитах. На препаратах тимуса людей пожилого возраста наблюдается иммуноокрашивание крупных одиночных клеток неправильной формы, локализованных в медуллярной зоне и ВПП. Также интенсивно окрашены немногочисленные тельца Гассала, преимущественно с деформированной капсулой. В четвертой и пятой возрастных группах (люди старческого возраста и долгожители) ткань тимуса практически полностью замещены жировой тканью. Специфическое иммуноокрашивание на серотонин наблюдается в отдельных клетках паренхимы немногочисленных сохранившихся тимусных долек. Также окрашенные клетки обнаруживаются в субкапсулярной зоне.

Компьютерный анализ микроскопических изображений позволил сравнить уровень содержания серотонина в тимусе человека в разных возрастных группах (табл. 1).

Таблица 1

Содержание серотонина в тимусе человека

№ группы	Возраст	Оптическая плотность, у.е	Суммарная площадь, %
1	19-33 нвр	0,16 ± 0,01	3,56 ± 0,68
2	2 сут - 7 мес	0,17 ± 0,01	5,39 ± 0,68
3	60-74 года	0,15 ± 0,01	8,12 ± 1,05 *
4	75-89 лет	0,18 ± 0,01	5,42 ± 1,04
5	90 лет и более	0,17 ± 0,02	2,64 ± 0,52 **

Примечание: нвр - неделя внутриутробного развития; результаты представлены в виде Mean±SEM; * - достоверное отличие от групп 1, 2, 4 и 5 ($p<0,01$); ** - достоверное отличие от групп 2, 3 и 4 ($p<0,01$)

Проведенные исследования позволяют заключить, что показатели оптической плотности иммуноокрашенных клеток тимуса, содержащих серотонин, не изменялись с возрастом ($p=0,45$) (табл. 1). Исходя из полученных данных, следует, что интенсивность синтеза серотонина в клетках вилочковой железы в ходе онтогенеза сохраняется на уровне, зарегистрированном у плодов.

Подсчет суммарной площади иммуноокрашенных серотонинсодержащих клеток показал, что этот параметр имеет самое высокое значение в группе пожилых людей (8,12±1,05%), что достоверно выше ($p<0,01$), чем в тимусах других возрастных групп. Минимальное значение количества иммуноокрашенных клеток (2,64±0,52%) наблюдается в

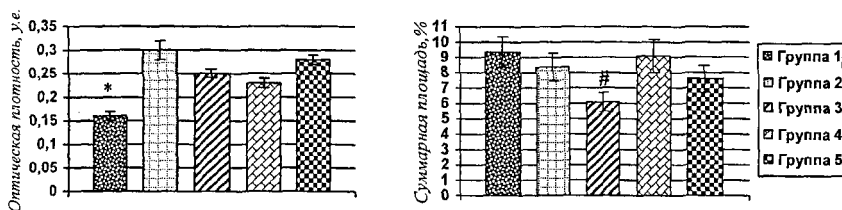
группе долгожителей ($p < 0,01$) по сравнению со второй, третьей и четвертой возрастными группами (табл. 1).

Таким образом, установлено, что количество клеток, содержащих серотонин, увеличивается в ходе постнатального онтогенеза, достигая максимума в пожилом возрасте. Затем происходит постепенное снижение числа серотонинсодержащих клеток, но тем не менее их количество у долгожителей остается на том же уровне, что и в группе плодов. Интенсивность содержания серотонина в клетках с возрастом не изменяется.

Экспрессия фактора роста сосудов в тимусе человека

Иммуногистохимический метод позволил выявить экспрессию фактора роста сосудов (VEGF) в сосудах тимуса, локализованных во всех тимусных компартаментах (субкапсулярной зоне, корковом и мозговом веществе). Иммуноокрашенные клетки, формирующие внутритимусное микроокружение, также наблюдаются в ВПП. Специфическое иммуноокрашивание обнаружено в тимусе людей всех изученных возрастных групп.

Сравнение средних значений оптической плотности для разных возрастных групп позволило установить минимальное значение ($0,16 \pm 0,009$ у.е.) в тимусе плодов, и оно достоверно отличается ($p < 0,01$) от значений других четырех групп (дети первого года жизни - $0,30 \pm 0,02$ у.е.; люди пожилого возраста - $0,25 \pm 0,009$ у.е.; люди старческого возраста - $0,23 \pm 0,01$ у.е.; долгожители - $0,28 \pm 0,01$ у.е.). Показатели оптической плотности VEGF в клетках тимуса человека на разных стадиях онтогенеза представлены на рис. 1А



А

Б

Рис. 1. Показатели оптической плотности (А) и суммарной площади экспрессии (Б) фактора роста сосудов в клетках тимуса человека в разных возрастных группах

* $p < 0,01$ - достоверное отличие от групп 2, 3, 4 и 5

$p < 0,05$ - достоверное отличие от групп 1 и 4

Анализ значений суммарной площади показал, что минимальное количество клеток ($6,06 \pm 0,65\%$) наблюдается в тканях тимуса пожилых людей, и это значение достоверно ($p < 0,05$) отличается от максимального уровня, который обнаруживается в группе плодов ($9,38 \pm 1,01\%$) и группе людей старческого возраста ($9,07 \pm 1,09\%$). Значения данного параметра в

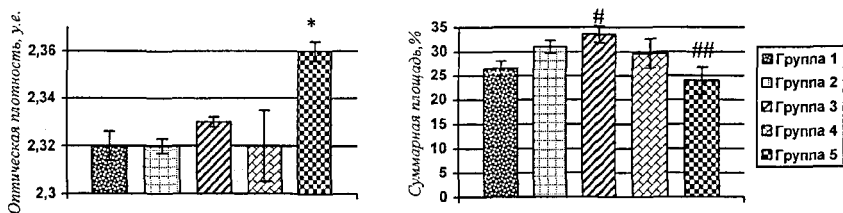
остальных возрастных группах достоверно не отличаются друг от друга: в группе детей первого года жизни суммарная площадь клеток, содержащих VEGF, составляет $8,34 \pm 0,92\%$; в группе долгожителей – $7,61 \pm 0,85\%$. Показатели суммарной площади экспрессии VEGF представлены на рис. 1Б.

Таким образом, содержание фактора роста сосудов в тимусе человека повышается в ходе постнатального онтогенеза, но при этом остается неизменным при старении. В то время как количество VEGF-содержащих клеток снижается на начальных этапах старения.

Экспрессия NO-синтазы в тучных клетках тимуса человека

В первой и второй возрастных группах специфическое иммуноокрашивание на NO-синтазу обнаружено преимущественно в тучных клетках (ТК), располагающихся в медуллярной и кортикальной зонах тимуса, а также в непосредственной близости к тельцам Гассалья и стенкам сосудов. На препаратах тимуса людей пожилого, старческого возраста и долгожителей наблюдается иммуноокрашивание крупных одиночно располагающихся ТК неправильной формы, локализованных в медуллярной зоне, ВПП и около телец Гассалья.

Установлено, что показатель оптической плотности NO-синтазы в иммуноокрашенных ТК достоверно повышается в ходе постнатального онтогенеза ($p < 0,01$) и наиболее высок у долгожителей ($2,36 \pm 0,004$ у.е.) по сравнению со средними значениями оптической плотности в первой, второй, третьей и четвертой возрастных группах ($2,32 \pm 0,006$ у.е., $2,32 \pm 0,003$ у.е., $2,33 \pm 0,002$ у.е. и $2,32 \pm 0,015$ у.е., соответственно) (рис. 2А).



А

Б

Рис. 2. Показатели оптической плотности (А) и суммарной площади экспрессии (Б) NO-синтазы в тучных клетках тимуса человека в разных возрастных группах

* $p < 0,01$ - достоверное отличие от групп 1, 2, 3 и 4

$p < 0,05$ - достоверное отличие от групп 1 и 5

$p < 0,05$ - достоверное отличие от групп 2 и 3

Подсчет суммарной площади иммуноокрашенных ТК показал, что этот параметр имеет максимальное значение в группе пожилых людей ($33,63 \pm 1,75\%$), что достоверно выше ($p < 0,05$), чем в тимусе плодов ($26,51 \pm 1,57\%$) и долгожителей ($23,93 \pm 2,85\%$). Минимальное количество

($p < 0,05$) ТК обнаружено в группе долгожителей ($23,93 \pm 2,85\%$) по сравнению со второй и третьей возрастными группами ($31,02 \pm 1,30\%$ и $33,63 \pm 1,75\%$, соответственно) (рис. 2Б).

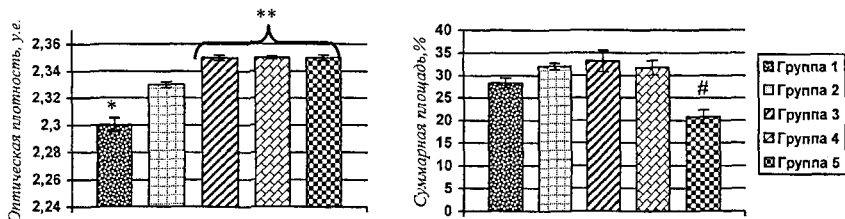
Таким образом, несмотря на снижение суммарной площади экспрессии NO-синтазы при старении, содержание этого фермента в отдельных ТК с возрастом увеличивается.

Экспрессия CD35 в дендритных клетках тимуса человека

В тимусах первой и второй групп иммуноокрашенные антителами CD35 дендритные клетки (ДК) преимущественно локализовались в корковом веществе, а также в непосредственной близости от ВПП. В некоторых случаях в исследуемых группах экспрессия CD35 верифицировалась в медулле.

На препаратах тимуса людей пожилого, старческого возраста и долгожителей наблюдалось иммуноокрашивание ДК преимущественно в медулле, а также вокруг ВПП.

Сравнение средних значений оптической плотности для разных возрастных групп позволило получить следующие результаты: минимальное значение ($2,30 \pm 0,005$ у.е.) обнаружено в тимусе плодов, и оно достоверно отличается ($p < 0,05$) от значений других четырех групп (дети первого года жизни - $2,33 \pm 0,002$ у.е.; люди пожилого возраста - $2,35 \pm 0,002$ у.е.; люди старческого возраста - $2,35 \pm 0,001$ у.е. и долгожители - $2,35 \pm 0,001$ у.е.). Максимальные значения оптической плотности ($p < 0,05$) содержания CD35 на ДК наблюдаются в третьей, четвертой и пятой возрастных группах (рис. 3А).



А

Б

Рис. 3. Показатели оптической плотности CD35 (**А**) и суммарной площади экспрессии (**Б**) CD35 в дендритных клетках тимуса человека в разных возрастных группах

* $p < 0,05$ - достоверное отличие от групп 2, 3, 4 и 5

** $p < 0,05$ - достоверное отличие от групп 1 и 2

$p < 0,05$ - достоверное отличие от групп 1, 2, 3 и 4.

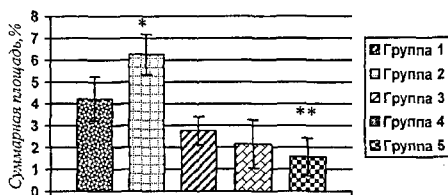
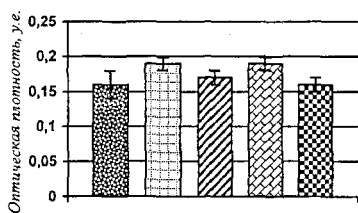
Средние значения суммарной площади также различаются между группами (рис. 3Б): данный показатель достоверно меньше ($p < 0,05$) в группе долгожителей ($20,78 \pm 1,55\%$) по сравнению с первой, второй, третьей и четвертой возрастными группами ($28,33 \pm 1,13\%$, $32,02 \pm 0,75\%$, $33,19 \pm 2,3\%$ и $31,77 \pm 1,65\%$, соответственно).

Таким образом, количество CD35-рецепторов на поверхности ДК в тимусе человека возрастает при старении, в то время как количество ДК уменьшается в процессе онтогенеза.

Экспрессия CD5 в тимусе человека

В тимусах первой группы (плоды) специфическое иммуноокрашивание на маркер Т-клеток CD5 было обнаружено преимущественно в корковом веществе. На препаратах тимуса детей первого года жизни наблюдалось интенсивное окрашивание лимфоцитов коры и медуллы, а также большое количество иммуноокрашенных клеток в просветах сосудов. В третьей, четвертой и пятой возрастных группах (люди пожилого, старческого возраста и долгожители) были обнаружены немногочисленные иммуноокрашенные клетки, расположенные преимущественно в медуллярной зоне, а небольшое количество позитивно-окрашенных лимфоцитов было локализовано в субкапсулярной зоне.

Сравнение средних значений оптической плотности для разных возрастных групп позволило установить отсутствие различий данного параметра в ходе онтогенеза ($p=0,57$). В группе плодов значение данного параметра составляет $0,16\pm 0,02$ у.е.; в группе детей первого года жизни – $0,19\pm 0,009$ у.е.; в группе людей пожилого возраста – $0,17\pm 0,01$ у.е.; в группе людей старческого возраста – $0,19\pm 0,009$ у.е.; в группе долгожителей – $0,16\pm 0,01$ у.е. Показатели оптической плотности сигнальной молекулы CD5 на клетках тимуса людей разных возрастных групп представлены на рис. 4А.



А **Б**
Рис. 4. Показатели оптической плотности (**А**) и суммарной площади экспрессии (**Б**) CD5 в клетках тимуса человека в разных возрастных группах

* $p < 0,001$ - достоверное отличие от групп 3, 4, 5

** $p < 0,01$ - достоверное отличие от групп 1 и 2

Сравнение средних значений суммарной площади экспрессии для разных возрастных групп позволило получить следующие результаты: максимальное значение ($6,25\pm 0,72\%$) обнаружено в тимусе детей первого года жизни (вторая возрастная группа) и оно достоверно отличается ($p < 0,001$) от значений групп пожилого, старческого возраста и долгожителей (люди пожилого возраста – $2,75\pm 0,43\%$; люди старческого возраста – $2,14\pm 0,31\%$; долгожители – $1,56\pm 0,28\%$). Минимальное значение

($1,56 \pm 0,28\%$), обнаруженное в группе долгожителей, достоверно отличается ($p < 0,01$) от значений в группах плодов ($4,23 \pm 0,68\%$) и детей первого года жизни ($6,25 \pm 0,72\%$). Показатели процента суммарной площади, занимаемой клетками, экспрессирующими CD5, представлены на рис. 4Б.

Корреляционный анализ результатов иммуногистохимического исследования

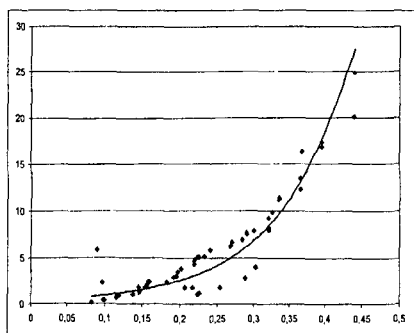
Был проведен корреляционный анализ с использованием непараметрического критерия Спирмена между показателями оптической плотности и суммарной площади различных факторов микроокружения и теми же показателями протеина CD5 как маркера Т-клеток для установления присутствия или отсутствия влияния тех или иных факторов на процессы инволюции тимуса, отражающиеся в количестве присутствующих в нем тимоцитов.

Корреляционный анализ позволил установить положительную корреляцию между уровнем содержания серотонина в клетках микроокружения тимуса и экспрессии CD5 на Т-клетках (по показателю суммарной площади) в группах людей пожилого, старческого возраста и долгожителей, при этом коэффициент корреляции составил $0,87$ ($p < 0,05$). Нами установлено максимальное значение суммарной площади клеток, содержащих серотонин, в тимусе людей пожилого возраста, но в ходе дальнейшего онтогенеза количество данных клеток снижается, хотя не исчезает полностью. Подобная картина снижения количества клеток наблюдается при анализе возрастной динамики маркера Т-клеток CD5.

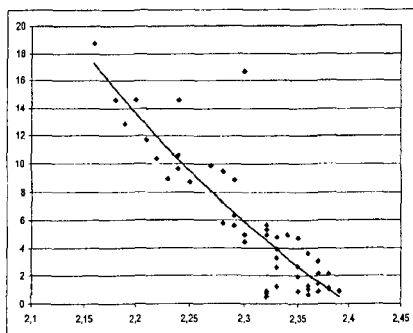
При сравнении динамики экспрессии фактора роста сосудов клетками микроокружения тимуса и мембранного протеина CD5 на поверхности Т-клеток была установлена положительная корреляционная зависимость по показателю оптической плотности VEGF и показателю суммарной площади CD5 на начальных этапах онтогенеза (в группе плодов и детей первого года жизни). Уровень корреляции составил $0,73$ ($p < 0,001$) (рис. 5А).

С помощью корреляционного анализа обнаружено отрицательное влияние NO-синтазы на развитие Т-клеток в тимусе. При увеличении экспрессии данного фермента тучными клетками при старении (в группах людей пожилого, старческого возраста и долгожителей) количество CD5 на поверхности клеток снижается. Коэффициент корреляции при этом составил $(-)0,89$ ($p < 0,05$) (рис.5Б).

Сравнение динамики экспрессии мембранных рецепторов CD35 на дендритных клетках и CD5 на тимоцитах показало наличие положительной корреляционной связи по показателям оптической плотности ($R = 0,69$, $p < 0,01$) на начальных этапах онтогенеза (первая и вторая возрастные группы).



А



Б

Рис. 5. Корреляционная связь между уровнем экспрессии VEGF и количеством тимоцитов (А); интенсивностью экспрессии NO-синтазы тучными клетками и количеством тимоцитов (Б) в тимусе человека в процессе онтогенеза

Примечание: ось ОХ – экспрессия VEGF (А) или экспрессия NO-синтазы (Б) (оптическая плотность, у.е.); ось ОУ – экспрессия CD5 (суммарная площадь,%)

При сравнении динамики количества тучных и дендритных клеток в процессе онтогенеза по показателю суммарной площади их маркеров (NO-синтазы и CD35, соответственно) оказалось, что в группах людей пожилого, старческого возраста и долгожителей количество указанных клеток изменяется сходным образом, коррелируя при этом с динамикой количества тимоцитов. Коэффициенты корреляции составили 0,71 ($p < 0,05$) для тучных клеток и тимоцитов и 0,83 ($p < 0,05$) для дендритных клеток и тимоцитов.

Также в ходе работы удалось установить отрицательную корреляцию между интенсивностью фактора роста сосудов в тимусе и количеством дендритных клеток в процессе онтогенеза ($R = -0,871$, $p < 0,05$), что подтверждает данные литературы о том, что фактор роста сосудов подавляет образование дендритных клеток, необходимых для осуществления клеточного иммунного ответа.

Таким образом, корреляционный анализ позволил установить взаимосвязь между динамикой изученных факторов микроокружения и количеством Т-клеток в тимусе человека в процессе онтогенеза.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В результате проведенных экспериментов нами было показано наличие и установлена возрастная динамика содержания серотонина, фактора роста сосудов, NO-синтазы и CD35 в клетках микроокружения человека. Также продемонстрирована экспрессия CD5 тимоцитами, что позволило проследить за возрастными изменениями количества Т-клеток в тимусе. С помощью

корреляционного анализа были установлены взаимосвязи между динамикой изученных факторов, продуцируемых клетками микроокружения, и количеством тимоцитов (по экспрессии поверхностного маркера CD5) в процессе возрастной инволюции тимуса.

Проведенное исследование позволило проследить возрастные количественные изменения Т-клеток в тимусе. Показатель суммарной площади для CD5-реактивных клеток демонстрирует наличие тимоцитов во всех возрастных группах, достоверное увеличение Т-клеток в группе детей первого года жизни и достоверное снижение их количества в группе долгожителей. Зарегистрированные нами данные совпадают с уже имеющимися представлениями о возрастной динамике количества Т-клеток в тимусе [Kvetnoy I.M. et al., 2003]. При этом показатель оптической плотности с возрастом не изменяется, что свидетельствует о наличии изменений лишь количества тимоцитов, но не интенсивности экспрессии ими CD5.

При исследовании динамики содержания серотонина в клетках микроокружения тимуса нами установлено достоверное возрастание уровня серотонина в клетках тимуса у людей пожилого возраста по показателю суммарной площади, что отражает увеличение количества клеток, продуцирующих данный парахринный гормон. Затем значение данного параметра начинает снижаться и достигает минимального значения в тканях тимуса долгожителей. Однако следует отметить, что полного исчезновения клеток, содержащих серотонин, не происходит, более того, площадь, занимаемая данными клетками в тимусе долгожителей, примерно равна значению данного параметра в тканях тимуса плодов. Уровень серотонина (по показателю оптической плотности) с возрастом не изменяется.

Известно, что серотонин обладает иммуномодулирующим действием [Jackson J. C. et al., 1984]. Возрастание уровня серотонина приводит к активации иммунной системы [Lowry C.A. et al., 2007]. Таким образом, полученными нами результаты можно интерпретировать как компенсаторное повышение синтеза серотонина клетками микроокружения тимуса для поддержания иммунной системы у людей старшего возраста. Можно предположить, что серотонин синтезируется клетками тимуса, а не доставляется в орган с кровотоком, так как в тимусе был обнаружен основной маркер нейроэндокринных клеток Хромогранин А [Чернышова Е.В., 2007]. Анализ полученных результатов также свидетельствует о том, что роль тимуса как эндокринной железы остается существенной в организме человека даже после значительного угасания иммунной функции тимуса.

Проведенный корреляционный анализ между уровнем содержания серотонина (по показателю суммарной площади) в клетках микроокружения и количеством Т-клеток (по показателю суммарной площади маркерного протеина CD5) в процессе возрастной инволюции тимуса подтверждает имеющиеся в литературе данные, свидетельствующие о положительных корреляционных связях между усилением продукции серотонина в эпителиальных клетках тимуса человека с возрастом и усилением

пролиферативной активности тимоцитов в корковом веществе тимуса [Kvetnoy I.M. et al., 2003].

Проведенные исследования позволили верифицировать экспрессию фактора роста сосудов (VEGF) в тимусах всех возрастных групп. Достоверное снижение значения оптической плотности VEGF в вилочковой железе плодов, возможно, свидетельствует либо о менее интенсивных процессах ангиогенеза в тимусе в период эмбрионального развития в отличие от постнатального онтогенеза, либо о том, что в антенатальном периоде процесс образования сосудов связан преимущественно с другими проангиогенными факторами.

Показатель суммарной площади клеток, экспрессирующих VEGF, демонстрирует минимальное количество данных клеток в тканях тимуса людей пожилого возраста, что, вероятнее всего, свидетельствует о вовлечении данного фактора в процессы инволюции посредством нарушения трофики железы. В ходе дальнейшего онтогенеза у людей старческого возраста и долгожителей наблюдается увеличение значения данного параметра. Установленный факт, возможно, связан с тем, что при старении наблюдается нарушение обеспечения органов и тканей человека кислородом [Коркушко О.В., Лишневецкая В.Ю., 2002]. Развивающаяся органо-тканевая гипоксия, наиболее выраженная в старческом возрасте, может служить стимулом ангиогенеза, осуществляемого с помощью VEGF. Однако, тем не менее, значительного повышения уровня экспрессии VEGF, которое можно было бы предполагать при достаточно сильном развитии гипоксии в процессе старения, не происходит. Возможно, это связано с тем, что VEGF также является одним из наиболее хорошо изученных опухолевых факторов (наряду с TNF и TGF- β), которые подавляют иммунную систему, ослабляя как эффекторную функцию, так и ранние стадии гемопоэза [Ohm J.E., et al., 2003].

Проведенный корреляционный анализ показал, что при увеличении экспрессии VEGF (по показателю оптической плотности) в тимусе на начальных этапах онтогенеза (в группах плодов и детей первого года жизни) происходит увеличение количества тимоцитов (по показателю суммарной площади протеина CD5). Данная положительная корреляционная связь свидетельствует о стимулирующей роли фактора роста сосудов в процессе тимопоэза. Полученные результаты расширяют представления о функции VEGF в тимусе человека. Проведенные ранее исследования на мышах показали, что инактивация гена фактора роста сосудов в тимических эпителиальных клетках приводит к неспособности данных клеток дифференцироваться, вследствие чего тимопоэз полностью блокируется, вызывая тяжелый иммунодефицит [Boehm T. et al., 2003].

В ходе исследования мы также установили отрицательную корреляцию между интенсивностью экспрессии VEGF (по показателю оптической плотности) и количеством дендритных клеток (по показателю суммарной площади экспрессии поверхностного протеина CD35) в тимусе человека в процессе онтогенеза. Полученные результаты подтверждают данные

литературы о том, что фактор роста сосудов подавляет образование дендритных клеток, необходимых для осуществления клеточного иммунного ответа [Gabrilovich D. et al., 1998; Fricke I. et al., 2007]. Данный эффект VEGF обусловлен его канцерогенным действием, при котором происходит подавление иммунного ответа, а ДК являются основными антиген-презентирующими клетками, без которых невозможно формирование необходимых иммунных реакций при различных патологических состояниях.

Верифицированная нами экспрессия NO-синтазы в тучных клетках тимуса человека свидетельствует об активном участии мастоцитов в механизмах окислительного стресса, который является одной из наиболее частых причин развития инволюционных, нейродегенеративных и гипоксических процессов, сопровождающих процессы старения и приводящих к структурно-функциональной атрофии органов и тканей. Полученные результаты исследования свидетельствуют о достоверном возрастании экспрессии NO-синтазы в тучных клетках тимуса у долгожителей по показателю оптической плотности, что отражает усиление их синтетической функции для данного фермента. Таким образом, усиление синтеза ключевого фермента накопления свободных радикалов в ткани тимуса в процессе онтогенеза приводит к инволюционным процессам, сопровождающим старение организма. Это также подтверждается полученной отрицательной корреляцией между интенсивностью экспрессии NO-синтазы тучными клетками (по показателю оптической плотности) и количеством тимоцитов (по показателю суммарной площади поверхностного протеина CD5) при старении (в группах людей пожилого, старческого возраста и долгожителей). Результаты корреляционного анализа отражают подавляющее действие свободных радикалов на процессы тимопоэза, так как усиление экспрессии NO-синтазы в тимусе приводит к уменьшению количества тимоцитов.

При этом общее количество тучных клеток, иммунореактивных к NO-синтазе (по показателю суммарной площади), возрастая у людей пожилого возраста, снижается в старческом возрасте до антенатального уровня и достигает минимального значения в группе долгожителей. Данная динамика количества ТК, возможно, связана с потерей ими при старении рецептора к фактору стволовых клеток (c-kit), и, как следствие этого, снижением пролиферативного потенциала. Известно, что способность к делению ТК постепенно снижается по мере их созревания и старения организма [Adachi S. et al., 1992].

Подобная возрастная динамика наблюдается в ткани тимуса и со стороны дендритных клеток, что является еще одним из проявлений сохранения определенных (хотя и значительно сниженных) иммунологических функций тимуса у старых людей. Учитывая, что дендритные клетки, с одной стороны, являются основными антиген-презентирующими клетками, а с другой, несут, помимо этого, выраженные регуляторные свойства, экспрессируя многие цитокины и цитотоксические факторы [Ярилин А.А., 1999], сохранение в какой-то мере их функции в

старческом возрасте обеспечивает необходимую протекцию старого организма от инфекционных факторов, аллергенов и опухолетропных воздействий.

Полученные нами результаты свидетельствуют о достоверном возрастании экспрессии CD35 на дендритных клетках тимуса человека в процессе онтогенеза (по показателю оптической плотности), что, по-видимому, может служить защитой этих важных клеток от атаки собственной системой комплемента, происходящей при аутоиммунных процессах, частота которых повышается с возрастом. И эта защита представляется особенно важной в связи с тем, что, как показано нами, количество дендритных клеток в тимусе у долгожителей достоверно уменьшается (по показателю суммарной площади). Последнее, по-видимому, связано со структурной инволюцией железы.

Проведенный корреляционный анализ позволил установить положительную корреляцию между уровнем экспрессии CD35 (по показателю оптической плотности) и количеством тимоцитов (по показателю суммарной площади маркерного протеина CD5) на начальных этапах онтогенеза (в группах плодов и детей первого года жизни). Известно, что тимус достаточно рано начинает формироваться в процессе эмбриогенеза (на 4-5 неделе внутриутробного развития) и очень хорошо развит у новорожденных. К моменту рождения это самый крупный орган, и его ткань очень активно продуцирует лимфоциты [Бабаева Ж.Н., Споров О.А., 1987; Полякова В.О., Кветной И.М., 2004]. Для осуществления процессов тимопоэза необходимо специальное клеточное микроокружение, продуцирующее разнообразные сигнальные молекулы. Усиление экспрессии CD35 на поверхности ДК на начальных этапах онтогенеза свидетельствует о важной стимулирующей роли, отражающейся в активации продукции тимоцитов в тимусе человека.

Резюмируя полученные нами данные, следует подчеркнуть, что инволюционные морфологические изменения в тимусе, регистрируемые при старении, не носят фатального характера. Сохраняя (хотя и в сниженной мере) присущие ему регуляторные нейроиммуоэндокринные функции, верифицируемые при иммуногистохимических исследованиях, тимус продолжает участвовать в обеспечении адаптационных и компенсаторно-приспособительных процессов в старом организме, сохраняя свои иммунологические и гормональные функции во многом за счет активной экспрессии сигнальных молекул, продуцируемых клетками микроокружения.

ВЫВОДЫ

1. В тимусе человека на всех этапах онтогенеза верифицирована активная продукция сигнальных молекул клетками микроокружения, а именно серотонина, фактора роста сосудов (VEGF), NO-синтазы, протеина CD35.
2. В процессе онтогенеза происходит достоверное уменьшение популяции тимоцитов по показателю суммарной площади экспрессии их поверхностного маркера CD5.
3. Возрастание площади секреции серотонина в клетках микроокружения при старении и сохранение его синтеза у людей старческого возраста и долгожителей свидетельствует о сохранности эндокринной функции тимуса в процессе онтогенеза.
4. Усиление синтеза серотонина на начальных этапах инволюции тимуса и сохранение его продукции на конечных этапах онтогенеза является показателем его иммуномодулирующей роли, направленной на поддержание иммунитета в стареющем организме.
5. Снижение экспрессии VEGF в тимусе при старении свидетельствует о вовлечении ангиогенных факторов в механизмы возрастной инволюции тимуса посредством нарушения трофики железы.
6. Верификация экспрессии NO-синтазы в тучных клетках тимуса человека свидетельствует об активном участии мастоцитов в механизмах окислительного стресса. Возрастание экспрессии NO-синтазы в тимусе при старении отражает накопление свободных радикалов в ткани тимуса, что приводит к структурно-функциональной инволюции органа.
7. Возрастание экспрессии протеина CD35 в тимусе человека в процессе онтогенеза демонстрирует сохранность популяции дендритных клеток при старении. Сохранение пула дендритных клеток в определенной мере обеспечивает необходимую протекцию стареющего организма от патогенных факторов, являясь проявлением сохранения определенных (хотя и значительно сниженных) иммунологических функций тимуса у людей пожилого, старческого возраста и долгожителей.
8. Тимус человека, несмотря на инволюционные морфологические изменения, сохраняет при старении достаточный уровень регуляторных нейроиммуноэндокринных функций, обеспечение которых во многом регулируется активной экспрессией сигнальных молекул, продуцируемых клетками микроокружения тимуса.

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

Полученные данные свидетельствуют о важной регулирующей роли факторов, продуцируемых клетками микроокружения тимуса в процессе онтогенеза, что позволяет рекомендовать проведение их детальных исследований как потенциальных мишеней для таргетной терапии возрастных иммунодефицитов и других заболеваний, ассоциированных со старением.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. Возрастная динамика экспрессии гормонов в тимусе человека/ Е.В. Чернышова, В.О. Полякова, А.Ю. Чебракова, Е.С. Федорова, П.Н. Зезюлин // Всероссийская конференция «Перспективы фундаментальной геронтологии» - СПб, 2006. – С. 157-158.
2. Возрастная динамика экспрессии NO-синтазы и CD35 в тучных и дендритных клетках тимуса человека/ В.О. Полякова, Е.С. Федорова, Е.В. Чернышова, А.Ю. Чебракова, И.В. Князькин, П.Н. Зезюлин // II-я научно-практическая геронтологическая конференция с международным участием, посвященная памяти Э.С. Пушкиной – «Пушкинские чтения» - СПб, 2006. – С.180-181.
3. Возрастные изменения гормональной функции иммуокомпетентных клеток/ В.О. Полякова, Е.С. Федорова, О.М. Литвякова, С.С. Коновалов, И.М. Кветной // IV научно-практическая геронтологическая конференция с международным участием, посвященная памяти Э.С. Пушкиной – «Пушкинские чтения» - СПб, 2008. – С. 217-218.
4. Возрастные изменения экспрессии вазоактивных гормонов и факторов апоптоза в тимусе человека/ В.О. Полякова, Е.В. Чернышова, А.Ю. Чебракова, П.Н. Зезюлин, Е.С. Федорова // Медицинская иммунология – СПб, 2006. - Том 8, № 2-3. – С. 380-381.
5. Возрастные изменения экспрессии p53 и MCL-1 в структурах нелимфоидного компонента тимуса человека/ А.Ю. Чебракова, Е.С. Федорова, Е.В. Чернышева, И.В. Князькин, А.В. Трофимов // Всероссийская конференция «Перспективы фундаментальной геронтологии» - СПб, 2006. – С. 155-156.
6. Полякова В.О. Гормональная функция иммуокомпетентных клеток в процессе старения/ В.О. Полякова, Е.С. Федорова, О.М. Литвякова // Геронтологические чтения – Белгород, 2008. – С. 14-15.
7. Полякова В.О. Гормоны в иммуокомпетентных клетках: иммуоцитохимическая локализация/ В.О. Полякова, Е.С. Федорова, П.Н. Зезюлин // 9-я Всероссийская медико-биологическая конференция молодых исследователей «Человек и его здоровье» - СПб, 2006. – С. 266.
8. Федорова Е.С. Влияние серотонина на популяцию Т-лимфоцитов в тимусе человека в процессе онтогенеза и старения // IV научно-практическая геронтологическая конференция с международным участием, посвященная памяти Э.С. Пушкиной – «Пушкинские чтения» - СПб, 2008. – С. 221-222.
9. Федорова Е.С. Возрастная динамика уровня фактора роста сосудов в тимусе человека/ Е.С. Федорова, В.О. Полякова // VI Всероссийская конференция с международным участием, посвященная 50-летию открытия А.М. Угольским мембранного пищеварения – «Механизмы функционирования висцеральных систем» - СПб, 2008. – С.210-211.
10. Федорова Е.С. Возрастная динамика экспрессии CD35 в дендритных клетках тимуса человека // 10-я Всероссийская медико-биологическая

конференция молодых исследователей «Человек и его здоровье» - СПб, 2007. – С.469-470.

11. Федорова Е.С. Роль NO-синтазы и тучных клеток в возрастной инволюции тимуса человека/ Е.С. Федорова, В.О.Полякова // 11-я Пушкинская международная школа-конференция молодых ученых «Биология – наука XXI века» - М., 2007. – С. 286-287.
12. Чернышова Е.В. Возрастная динамика экспрессии глюкагона в тимусе человека/ Е.В. Чернышова, Е.С. Федорова, Е.С. Сопова // III научно-практическая геронтологическая конференция с международным участием, посвященная памяти Э.С. Пушкиной – «Пушковские чтения» - СПб, 2007. – С. 187.
13. Чернышова Е.В. Экспрессия инсулина в тимусе людей разных возрастных групп/ Е.В. Чернышова, Е.С. Федорова // V Всероссийская конференция с международным участием, посвященная 100-летию со дня рождения В.Н. Черниговского – «Механизмы функционирования висцеральных систем» - СПб, 2007. – С.343-344.
14. Экспрессия серотонина и фактора роста сосудов (VEGF) в тимусе человека при возрастной инволюции/ Е.С. Федорова, В.О. Полякова, С.С. Коновалов, И.М. Кветной // **Успехи геронтологии.** –2009. – Т. 23, № 1. – С. 167-171.
15. Fedorova E.S. The role of mast and dendritic cells in aging of human thymus/ E.S. Fedorova, V.O. Polyakova // VI European congress; *Advances in gerontology* – SPb, 2007. - P. 31.

Федорова Екатерина Сергеевна ВОЗРАСТНАЯ ДИНАМИКА ФАКТОРОВ
МИКРООКРУЖЕНИЯ В ТИМУСЕ ЧЕЛОВЕКА // Автореф. дис. канд. биол. наук:
14.00.53 – СПб., 2009. –22 с.

Подписано в печать 10.04.2009. Формат 60*84 1/16.

Бумага офсетная. Печать офсетная. Печ. л. 1,0.

Тираж 100 экз. Заказ 99.

Отпечатано с готового оригинал-макета.

ЗАО "Принт - Экспресс"

197376, С.-Петербург, ул. Большая Монетная, 5 лит. А