

На правах рукописи

Донецкова Альмира Дмитриевна

**НОВЫЙ ПОДХОД К ИССЛЕДОВАНИЮ Т-ЛИМФОПОЭЗА
С ПОМОЩЬЮ ОПРЕДЕЛЕНИЯ Т-РЕЦЕПТОРНЫХ ЭКСЦИЗИОННЫХ
КОЛЕЦ В ЭКСПЕРИМЕНТЕ И КЛИНИКЕ**

03.03.03 – иммунология

**Автореферат
диссертации на соискание ученой степени
доктора медицинских наук**

Москва, 2013 г.

Работа выполнена в Федеральном государственном бюджетном учреждении «Государственный научный центр «Институт иммунологии» Федерального медико-биологического агентства

Научный консультант:

Ярилин Александр Александрович,
доктор медицинских наук, профессор

Официальные оппоненты:

Кадагидзе Заира Григорьевна, доктор медицинских наук, профессор, заведующая централизованным клинико-лабораторным отделом ФГБУ «Российский онкологический научный центр им. Н.Н. Блохина» РАМН

Суслов Анатолий Петрович, доктор медицинских наук, профессор, заведующий лабораторией медиаторов и эффекторов иммунитета ГУ «Научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. Н.Ф. Гамалеи» РАМН

Ганковская Людмила Викторовна, доктор медицинских наук, профессор, и.о. заведующей кафедрой иммунологии ГБОУ ВПО «Российский национальный исследовательский медицинский университет им. Н.И. Пирогова» Министерства здравоохранения и социального развития РФ

Ведущая организация: ФБУН «Московский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. Г.Н. Габричевского» Роспотребнадзора

Защита диссертации состоится «___» _____ 2014 г. в 14 часов на заседании совета по защите докторских и кандидатских диссертаций Д 208.017.01 в ФГБУ «ГНЦ Институт иммунологии» ФМБА России по адресу: 115478, Москва, Каширское шоссе, д. 24, к. 2. Факс: (499) 617-10-27.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке ФГБУ «ГНЦ Институт иммунологии» ФМБА России.

Автореферат разослан «___» _____ 2014 г.

Ученый секретарь
совета по защите докторских
и кандидатских диссертаций,
доктор биологических наук

Гудима Георгий Олегович

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность исследования

Актуальность темы определяется исключительно важной и разносторонней ролью, которую играет тимус в физиологии и патологии иммунной системы, его ключевым местом в патогенезе многих заболеваний. В тимусе происходит созревание Т-лимфоцитов, в том числе его основное событие - перестройка генов, кодирующих полипептидные цепи Т-клеточного рецептора (TCR). В процессе перестройки генов TCR происходит сближение пространственно разделенных генетических сегментов. Находящийся между ними генетический материал вырезается и замыкается в кольцо, которое хранится в эписомах. При делении Т-клеток эти кольца, названные TREС (T-cell receptor excision circles, Т-рецепторные эксцизионные кольца), не делятся. Присутствие TREС в Т-клетках является свидетелем реаранжировки генов TCR, а их содержание на уровне популяции Т-клеток служит мерой содержания в ней особой фракции Т-клеток – недавних эмигрантов из тимуса (RTE – recent thymic emigrants). Значительный интерес к этой фракции клеток появился лишь в последние десятилетия, и наши знания о них отнюдь нельзя считать полными. Существующие в настоящее время воззрения относительно назначения недавних эмигрантов из тимуса состоят в том, что эти клетки ответственны за формирование популяции периферических Т-лимфоцитов и заселение вторичных лимфоидных органов после рождения, вносят вклад в поддержание численности Т-клеток у взрослых, а в условиях лимфопении являются источником восстановления Т-клеточного гомеостаза. Недавние эмигранты их тимуса представляют собой стадию развития, предназначенную для адаптации Т-клеток в периферическом отделе иммунной системы и «тонкой доводки» антиген-распознающего репертуара.

За последние десятилетия арсенал методов анализа структуры и функции иммунной системы чрезвычайно расширился. Помимо проточной цитофлуориметрии с ее практически безграничными возможностями в области анализа субпопуляций лимфоцитов, разработаны методы ПЦР-анализа ключевых

генов Т-клеток, важных для понимания развития Т-лимфоцитов и взаимоотношения между тимусом и вторичными лимфоидными органами.

В 1998 г. был разработан методический подход, который позволяет решить задачу по оценке (в том числе, в условиях клиники) функции тимуса [Douek D.C. et al., 1998]. Функция тимуса определяется по содержанию в периферических Т-лимфоцитах Т-рецепторных эксцизионных колец. Наиболее высокое содержание TREС свойственно недавним эмигрантам из тимуса – Т-клеткам, которые после выхода из тимуса не успели поделиться. Напротив, Т-клетки памяти, участвовавшие в иммунном ответе, т.е. ранее отвечавшие пролиферацией на действие антигена, практически лишены TREС. Таким образом, содержание TREС в периферических Т-лимфоцитах отражает интенсивность двух процессов – эмиграции Т-клеток из тимуса (чем она выше, тем больше TREС в Т-клетках) и уровня пролиферативных процессов в периферическом отделе иммунной системы (они снижают содержание TREС в Т-клетках). Поскольку в отсутствие интенсивной антигенной стимуляции, в частности при инфекционных процессах, уровень пролиферации Т-клеток на периферии варьирует слабо, считается, что содержание TREС можно рассматривать преимущественно как показатель Т-лимфопоэтической функции тимуса. Благодаря наличию в составе TREС консервативных последовательностей ДНК их удается определить с помощью полимеразной цепной реакции.

Основными патологическими состояниями, при которых исследование TREС на клиническом уровне стало реальностью, являются первичные Т-клеточные иммунодефициты [Puck J.M., 2012]. Удаление тимуса – тимэктомия – может рассматриваться как воздействие (результат повреждения, лечебной процедуры), последствия которого необходимо оценивать и изучать. Помимо нарушения функции тимуса при ряде первичных иммунодефицитов (избирательно функция тимуса страдает, например, при синдроме Ди Джорджи), регистрируется нарушение функции этого центрального органа иммунной системы при СПИДе. Полагают, что функция тимуса нарушается при большом числе других заболеваний, но точных

сведений на этот счет нет в связи с отсутствием до недавних пор адекватных и доступных методов оценки функции тимуса.

Воздействие на тимус неблагоприятных факторов (облучение, лимфотоксические агенты) приводит к его опустошению. Однако точных сведений относительно влияния радиации на способность микроокружения тимуса поддерживать Т-лимфопоэз нет, поскольку до недавнего времени отсутствовали методы оценки этой способности и функции тимуса в целом. Между тем именно оценка этой функции имеет принципиальное значение для предсказания последствий действия радиации на иммунную систему и организм в целом. Значимость изучения последствий действия лимфотоксических факторов химической природы на лимфопоэз обусловлена широким применением с лечебной целью гормональных препаратов, а также важностью тонкого анализа влияния стресса на иммунную систему.

Таким образом, актуальность темы работы обусловлена важностью углубленного изучения вклада тимуса (с привлечением современного методического арсенала биомедицины) в поддержание структурно-функциональной полноценности тимус-зависимого звена иммунной системы при иммунопатологических состояниях и воздействии на иммунную систему неблагоприятных факторов.

Цель и задачи

Цель работы: разработать новый подход для исследования функции тимуса на основе определения Т-рецепторных эксцизионных колец в экспериментальных условиях и клинической практике.

Задачи работы:

1. Изучить возможность оценки функции тимуса путем выявления Т-рецепторных эксцизионных колец методом полимеразной цепной реакции; разработать тест-систему для оценки Т-лимфопоэза по уровню Т-рецепторных эксцизионных колец в эксперименте и клинике.

2. Провести экспериментальную оценку лучевого поражения и пострadiационного восстановления функциональной активности тимуса по данным измерения уровня Т-рецепторных эксцизионных колец в тимусе и периферических лимфоидных органах мышей.
3. Оценить вклад тимуса в восстановление популяции периферических Т-лимфоцитов после воздействия глюкокортикоидов.
4. Сравнить действие повреждающих агентов (γ -лучей и гидрокортизона), отличающихся по характеру воздействия на тимус, на его восстановление и взаимодействие с периферическим отделом иммунной системы.
5. Установить возрастные параметры содержания кольцевых структур ДНК в лимфоцитах периферической крови человека, отражающих недавний выход Т-клеток из тимуса и свидетельствующих об уровне функциональной активности органа.
6. Оценить функциональное состояние тимуса при увеличении его массы (тимомегалии) и при его удалении (тимэктомии) у детей, а также при аутоиммунной патологии и аллергических процессах у взрослых (на примере ревматоидного артрита и аллергического риноконъюнктивита); исследовать содержание недавних эмигрантов из тимуса в крови при проведении аллерген-специфической иммунотерапии.

Научная новизна

В диссертационной работе разработана новая научная концепция о восстановительных и миграционных процессах в лимфоидных органах в период регенерации после воздействия повреждающих факторов, проведен сравнительный анализ восстановительных процессов в тимусе и тимус-зависимом звене иммунной системы, развивающихся после действия ионизирующей радиации и глюкокортикоидов.

Использование подхода, основанного на определении Т-рецепторных эксцизионных колец в лимфоцитах тимуса, лимфатических узлов и селезенки, дало возможность выявить процессы, реализуемые в этих органах и направленные на

устранение Т-лимфопении, индуцированной облучением или действием химических факторов. При сублетальном облучении эти процессы состоят в стимуляции ключевого события дифференцировки Т-клеток – перестройки генов Т-клеточного рецептора, а также в ускорении эмиграции созревших клеток из тимуса на периферию. Определение TREC в тимусе служит мерой Т-лимфопоэтической активности этого органа, а определение их в периферическом отделе иммунной системы, включая вторичные лимфоидные органы, отражает уровень эмиграции зрелых Т-клеток из тимуса в периферический отдел иммунной системы.

Учитывая, что различные повреждающие агенты отличаются по характеру своего действия на тимус и вызывают в нем различные по механизму репаративные изменения, в диссертационной работе исследована зависимость вклада тимуса в восстановление популяции Т-клеток от характера изменений в этом органе (при равной степени его исходного повреждения). В работе впервые показано, что существует, по меньшей мере, два варианта восстановления тимуса и его взаимодействия с периферическим отделом иммунной системы: пассивный вариант характерен для случаев с действием агентов, не обладающих генотоксичностью (гидрокортизон, облучение в низких дозах), активный вариант характерен для действия генотоксических агентов (сублетальное облучение).

Результаты, полученные в экспериментальной части работы, позволили нам предложить применение тест-системы для оценки интенсивности эмиграции Т-лимфоцитов из тимуса у человека: при удалении тимуса у детей с врожденными пороками сердца, при увеличении массы тимуса у лиц с тимомегалией и при аутоиммунных и аллергических процессах у взрослых (на примере ревматоидного артрита и аллергического риноконъюнктивита).

В работе определены возрастные параметры содержания TREC в лимфоцитах периферической крови человека, отражающие недавний выход Т-клеток из тимуса и свидетельствующие об уровне функциональной активности этого органа. Показано, что содержание TREC снижается с возрастом: уровень TREC, высокий в первые 2 года, особенно быстро снижается в первые 10 лет жизни (в 4,5 раза); в течение

первых 20 лет жизни снижение происходит почти в 15 раз, затем – медленнее (в 3 раза за 50 лет), но прогрессирует в каждом очередном десятилетии. Снижение уровня TREC с возрастом происходит более интенсивно, чем снижение содержания RTE по фенотипическому маркеру CD31: в первые 10 лет жизни уровень TREC снижается в 4,5 раза, тогда как содержание CD3⁺CD4⁺CD45RA⁺CD31⁺-клеток – лишь 2,2 раза.

В диссертационной работе проанализирован вклад нарушений функции тимуса и тимус-зависимого звена иммунной системы в патогенез ряда иммунопатологических состояний: раскрыты механизмы изменения Т-лимфопоэза после полной и частичной тимэктомии; впервые выявлены изменения Т-лимфопоэтической функции тимуса при тимомегалии, вызывающие функциональный дефицит Т-клеточного звена иммунной системы.

При изучении зависимости уровня TREC от срока после тимэктомии при операциях по поводу врожденных пороков сердца рассчитан срок, необходимый для полной элиминации TREC из лимфоцитов периферической крови после тимэктомии, который составляет 3,8 лет, т.е. полнота тимэктомии может быть документирована исчезновением TREC не сразу, а спустя как минимум 3,8 лет после операции.

Положения, выносимые на защиту

1. Существует два варианта восстановления тимуса и его взаимодействия с периферическим отделом иммунной системы: активный вариант – характеризуется резкими изменениями уровня клеток, содержащих Т-рецепторные эксцизионные кольца, наблюдается после действия генотоксических агентов (сублетальное облучение), пассивный вариант – характеризуется отсутствием выраженной восстановительной реакции, наблюдается после действия агентов, не обладающих генотоксичностью (гидрокортизон, облучение в низких дозах).
2. Процессы, происходящие в лимфоидных органах после воздействия радиации, направлены на ускоренное удаление из тимуса клеток, испытавших прямое действие

γ-лучей, и на максимально быстрое устранение Т-лимфопении, индуцированной облучением.

3. Восстановление Т-лимфопоэза после введения гидрокортизона происходит равномерно без значительных колебаний содержания недавних эмигрантов из тимуса.

4. Установлена возрастная динамика эмиграции Т-клеток из тимуса; показано, что наиболее интенсивное снижение клеток, содержащих Т-рецепторные эксцизионные кольца, происходит в первое десятилетие после рождения.

5. Совокупность полученных данных о динамике эмиграции Т-клеток из тимуса вносит существенный вклад в понимание патогенеза ряда иммунопатологических состояний: тимомегалии, аутоиммунных процессов, последствий полной и частичной тимэктомии.

Научно-практическая значимость диссертации

В диссертационной работе выявлены процессы, происходящие в лимфоидных органах, направленные на максимально быстрое устранение Т-лимфопении, индуцированной облучением или действием химических факторов, а также проанализирован вклад нарушений эмиграции Т-клеток из тимуса в патогенез ряда иммунопатологических состояний: удаления тимуса, тимомегалии, аутоиммунных и аллергических заболеваний (ревматоидного артрита и аллергического риноконъюнктивита).

Значение полученных в работе результатов для практики подтверждается тем, что: разработана тест-система для оценки Т-лимфопоэза по уровню Т-рецепторных эксцизионных колец в эксперименте и клинике; определен вклад тимуса в восстановление популяции периферических Т-лимфоцитов после воздействия глюкокортикоидов, что может быть использовано в практической медицине при системном использовании лечебных препаратов на основе гидрокортизона; созданы предпосылки к усовершенствованию существующих и разработке новых схем применения иммуномодуляторов для нормализации Т-лимфопоэза при радиационных иммунодефицитах; определены возрастные параметры уровня

кольцевых структур ДНК в лимфоцитах периферической крови человека, отражающие недавний выход Т-клеток из тимуса и свидетельствующие об уровне функциональной активности органа; проведена оценка функционального состояния тимуса при ряде иммунопатологических состояний: тимомегалии и тимэктомии у детей, ревматоидном артрите и аллергическом риноконъюнктивите у взрослых, что может использоваться в клинической практике для прогнозирования эффективности различных форм иммунной защиты, риска развития заболеваний и эффективности терапии; на основании материалов диссертации разработано 2 методических пособия и 1 методические рекомендации, утвержденные ФМБА России (2008, 2010, 2012 г.).

Апробация работы

Материалы диссертационной работы были доложены и обсуждены на II международном конгрессе «Immune-mediated diseases: from theory to therapy» (2007 г., Москва), Российском Медицинском Форуме – 2007 (2007 г., Москва), XI и XIII Всероссийских научных форумах с международным участием имени академика В.И. Иоффе «Дни иммунологии в Санкт-Петербурге» (2007 г., 2009 г., Санкт-Петербург), VIII и XII международных конгрессах «Современные проблемы иммунологии, аллергологии и иммунофармакологии» (2007 г., 2013 г., Москва), II и III Объединенных иммунологических форумах (2008 г., Санкт-Петербург; 2013 г., Нижний Новгород).

Публикации

Основные материалы диссертации опубликованы в 40 печатных работах, из них 21 статья в 7 научных изданиях, рекомендованных ВАК Минобрнауки для публикации материалов докторских и кандидатских диссертаций («Иммунология», «Российский аллергологический журнал», «Российский иммунологический журнал», «Медицинская иммунология», «Клеточные технологии в биологии и медицине», «Российский медицинский журнал», «Радиационная биология. Радиоэкология»), 2 статьи в научных журналах, 2 методических пособия, 1 методические рекомендации, 14 публикаций в материалах отечественных и

международных конференций и конгрессов.

Структура диссертации

Диссертация изложена на 217 страницах машинописного текста, состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов, результатов собственных исследований, обсуждения, заключения, выводов, списка литературы, включающего 251 источник (39 отечественных и 212 зарубежных). Работа содержит 24 таблицы и 35 рисунков.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

В экспериментальной части работы объектом исследования служила 291 мышь линии C57BL/6, самки весом 18-20г, полученные из питомника РАМН «Столбовая». Было проведено девять независимых экспериментов, во всех экспериментах сформированы две группы, одинаковые между собой по возрасту и массе (опытная и контрольная), по 3 мыши в каждой группе.

Подбор дозы γ -облучения проводили на группе мышей (27 мышей), облученных в дозовом диапазоне от 0,5 до 8 Гр. Забой мышей этой группы и исследование лимфоидных органов проводили на 5 сут. после облучения, когда достигается максимум опустошения лимфоидных органов. 105 мышей подвергали общему воздействию γ -излучения ^{137}Cs на установке «Стебель» в дозе 4 Гр. Забой мышей и исследование лимфоидных органов проводили через 4, 8, 10, 12, 20, 30 и 60 сут. после облучения. 24 мышам вводили гидрокортизона ацетат («Фармак») в дозе 125 мг/кг внутривенно 1-кратно. Забой мышей проводили через 5, 10, 20 и 30 сут. после введения гидрокортизона. Контролем к каждому сроку наблюдения служили мыши соответствующего возраста и того же помета, что и опытные мыши.

Тимус, селезенку и 4 лимфатических узла (два подмышечных и два подколенных) извлекали, освобождали от соединительной ткани, измельчали, суспензировали в PBS («ПанЭко») с добавлением 1% BSA («Sigma») и 0,1% NaN_3 («Sigma»), удаляли эритроциты с помощью лизирующего буфера («Becton Dickinson»), дважды отмывали физиологическим раствором («ПанЭко»).

Для выделения нуклеиновых кислот использовали наборы «Проба НК» («ДНК-Технология»). Метод основан на лизисе образцов в 4М растворе гуанидинтиоцианата, осаждении нуклеиновых кислот изопропанолом с последующими отмывками этанолом и ацетоном. Объем полученной ДНК составил 50 мкл. Приготовленный препарат ДНК использовали для постановки ПЦР «в реальном времени». Для количественного определения кольцевой ДНК, содержащей сигнальные соединительные последовательности sjTREC (signal-joint TREC), методом ПЦР синтезированы праймеры sjTREC: прямой 5'-ССААGCTGACGGCAGGTTT-3', обратный 5'-AGCATGGCAAGCAGCACCC-3', зонд FAM-5'-TGCTGTGTGCCCTGCCCTGCC-3'- RTQ-1 [Broers A.E. et al., 2002] («Синтол»). В качестве нормировочного гена выбран константный участок гена α -цепи Т-клеточного рецептора (mTCRA): прямой праймер 5'-TGACTCCCAAATCAATGTG-3, обратный праймер 5'-GCAGGTGAAGCTTGTCTG-3', зонд FAM-5'-TGCTGGACATGAAAGCTATGGA - 3'- RTQ-1 («Синтол»). Определение абсолютного количества TREC в лимфоцитах проводили с использованием плазмид: экспериментальной (для определения TREC) и контрольной (для определения гена TCRA). Плазмиды получены в Институте молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта РАН из амплифицированного продукта фрагмента ДНК TREC тимуса мыши с последующим лигированием с вектором, трансформацией бактерий E.coli и клонированием. Разведения полученных плазмид с известными концентрациями ДНК TREC и TCRA использовали в ПЦР в качестве стандарта.

ПЦР ставили с использованием набора реагентов TaqMan Universal PCR Master Mix («Applied Biosystems») в объеме 25 мкл: 1 цикл - 50°C 2 мин, 95°C 10 мин; 45 циклов - 95°C 15 сек, 60°C 1 мин, использовали прибор “7300 Real-Time PCR System” («Applied Biosystems»).

Основным показателем содержания TREC служил индекс TREC/TCRA - отношение числа копий TREC к числу копий TCRA. В отдельных случаях

проводили расчет процента TREC-содержащих Т-клеток (для лимфоузлов и селезенки), а также расчет числа TREC-содержащих клеток на орган (для тимуса).

Для проведения проточной цитофлуориметрии суспензии клеток обрабатывали моноклональными анти-CD3-антителами, меченными APC («eBioscience»). Клетки инкубировали с моноклональными антителами в присутствии 0,1% NaN₃ («Sigma») в течение 30 мин при 4°C. Трижды отмытые клетки фиксировали 1% параформальдегидом («Sigma»).

Материал для клинического исследования был получен в медицинских учреждениях г. Москвы. Все лица (256 человек, из них 133 – мужского пола и 123 – женского) были разделены на возрастные подгруппы: от 1,5 месяцев до 2 лет, 2-10, 11-20, 21-30, 31-40, 41-50, 51-60, 61-70 лет. Распределение обследованных лиц по возрасту и особенностям патологии отражено на рисунке 1.

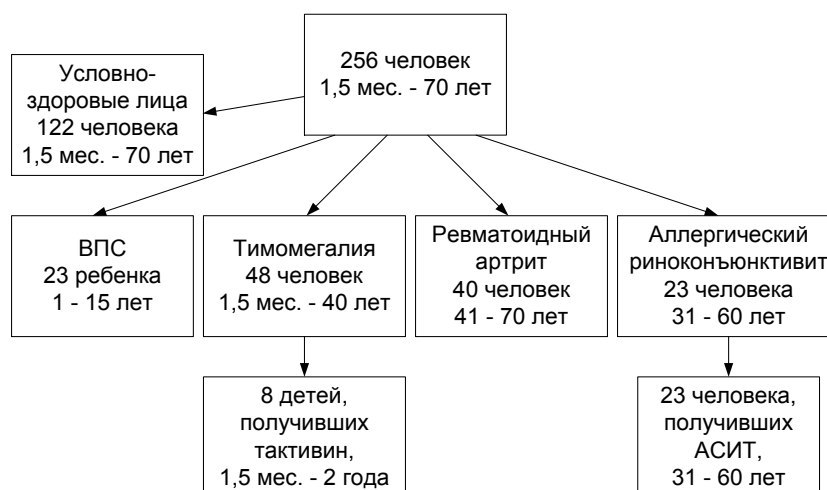


Рисунок 1 – Распределение обследованных лиц по группам

Больные аллергическом риноконъюнктивитом (23 человека) находились на амбулаторном и стационарном лечении в ГНЦ «Институт иммунологии ФМБА России», больные ревматоидным артритом (40 человек) – в городской клинической больнице №1 им. Н.И. Пирогова, дети с тимомегалией (48 детей) – в «Морозовской детской городской клинической больнице». Все пациенты были со среднетяжелым течением заболевания, материал для исследования был взят при поступлении до начала лечения. В группу сравнения вошли 53 условно-здоровых ребенка до 18 лет

без тимомегалии и 69 здоровых доноров, у которых диагнозы аллергических и аутоиммунных заболеваний были исключены.

23 ребенка в возрасте от 1 года до 15 лет были оперированы в Научном центре сердечно-сосудистой хирургии им. А.Н. Бакулева по поводу врожденных пороков сердца. Среди них выделены группы детей с разной степенью тимэктомии: полной – 4 ребенка, частичной – 5 детей; у 7 детей полнота тимэктомии была неизвестна; группу сравнения составили 7 детей с ВПС без удаления тимуса.

8 детей до 2 лет с тимомегалией получали тактивин («Биомед») интраназально в дозе 1 мкг/кг ежедневно в течение 5 дней. У всех детей, получавших тактивин, был диагностирован острый обструктивный бронхит. Для лечения бронхита дети получали антибиотики. Помимо тактивина, другие иммуномодуляторы в лечении детей этой группы не применялись. Забор крови проводили дважды: до начала лечения и через 1 день после окончания терапии тактивином.

Всем больным аллергическим риноконъюнктивитом с аллергией к пыльце деревьев (23 человека) проведен 1 курс АСИТ классическим методом водно-солевыми экстрактами из смеси пыльцы деревьев («Микроген») подкожно в течение 3 месяцев. Больные получили в среднем 32 инъекции (2 раза в неделю) со средней суммарной дозой 5237 PNU. Забор крови проводили четырехкратно: до начала лечения, непосредственно после окончания курса АСИТ, а также через 1 нед. и через 1 мес.

Периферическую кровь забирали в пробирки, содержащие K_3EDTA (2 мг/мл). Количество лейкоцитов и лимфоцитов в цельной крови, окрашенных в растворе Тюрка (3% раствор уксусной кислоты, подкрашенный генцианом фиолетовым), подсчитывали в счетной камере Горяева. Разделение клеточных элементов крови проводили путем центрифугирования в одноступенчатом градиенте плотности фиколла-верографина (плотность 1,077 г/мл).

Выделение ДНК проводили из 1×10^6 лимфоцитов крови с использованием набора «Проба НК» («ДНК-Технология»). Объем полученной ДНК составил 50 мкл.

Концентрацию ДНК определяли спектрофотометрически на спектрофотометре DU 730 («Beckman Coulter»), $A_{260/280}$ составляло 1,6-2,0.

Уровень TREC человека определяли методом ПЦР в режиме «реального времени» (абсолютный и относительный варианты); использовали праймеры: прямой 5'-CGT GAG AAC GGT GAA TGA AGA GCA GAC A-3', обратный 5'-CAT CCC TTT CAA CCA TGC TGA CAC CTC T-3', зонд 5'-FAM-TTT TTG TAA AGG TGC CCA CTC CTG TGC ACG GTG A-MGB-3' [Hochberg E.P. et al., 2001] («Синтол»). Количество геномной ДНК определяли с помощью β -актина (ACTB) («Applied Biosystems»). Для постановки ПЦР использовали набор реагентов TaqMan Universal PCR Master Mix («Applied Biosystems»). Режим амплификации: 1 цикл - 50°C 2 мин, 95°C 10 мин; 50 циклов - 94°C 30 сек, 60°C 30 сек, объем – 25 мкл.

Уровень ДНК TREC измеряли в относительных единицах, определяемых методом сравнения пороговых циклов (Ct - threshold cycle) TREC и β -актина (ACTB). Для определения абсолютного содержания TREC использовали разведения плазмиды с известной концентрацией ДНК TREC (плазида синтезирована совместно с Пащенко М.В. из ДНК человеческого тимуса). Число копий TREC пересчитывали на 10^3 лимфоцитов крови.

Экспрессию молекул на поверхности клеток оценивали методом проточной цитофлуориметрии с использованием моноклональных антител, меченных флуорохромами: антитела к CD3, меченные FITC («Сорбент»), а также к CD4, меченные PE, CD8 PerCP-Cy5.5, CD31 PE-Cy7, CD45RA и CD45RO, меченные APC («eBioscience»). Клетки отмывали, инкубировали с мечеными моноклональными антителами в присутствии 0,1% NaN_3 («Sigma») в течение 30 мин при 4°C, дважды отмывали и фиксировали в 1% растворе параформальдегида («Sigma»). Анализ образцов клеточных суспензий проводили на проточном цитофлуориметре BD FACSCanto™ II («Becton Dickinson») в стандартном режиме. Анализ данных проводили с помощью программного обеспечения BD FACSDiva и FCS Express.

Статистическую обработку результатов исследования проводили с использованием методов непараметрического анализа. Исследованные

количественные показатели представляли в виде $Me (LQ-UQ)$, где Me – медиана, LQ – нижний квартиль, UQ – верхний квартиль. Для сравнения двух независимых выборок по количественным признакам использовали U-критерий Манна-Уитни. Для анализа связи различий между связанными выборками применяли критерий Вилкоксона. Различие групп полагали статистически значимым при $P < 0,05$. Для выявления взаимосвязи переменных проводили расчет коэффициента ранговой корреляции по Спирмену. В случаях распределения, близкого к нормальному (визуальная оценка гистограммы распределения, $P > 0,05$ для критерия Шапиро-Уилка) использовали линейный регрессионный анализ. Обработку проводили в программном пакете StatSoft Statistica.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В экспериментальной части работы мы исследовали влияние повреждающих факторов (ионизирующей радиации и глюкокортикоидов) на функцию тимуса на основе определения численности TREC в модели на мышах.

Содержание TREC максимально в тимусе необлученных мышей – $41,6 (38,7-45,3) \times 10^{-3}$, где происходит созревание T-клеток и образование TREC в ходе перестройки генов TCR. Напротив, во вторичных лимфоидных органах TREC не формируются, а поступают в составе T-клеток, эмигрирующих из тимуса. Поэтому их содержание в этих органах существенно ниже, чем в тимусе ($P < 0,0001$).

Сопоставление индекса TREC/TCRA для лимфатических узлов и селезенки дает основание для заключения о более высоком (в 2,5 раза) удельном содержании TREC в лимфатических узлах по сравнению с селезенкой - $13,3 (10,1-15,7) \times 10^{-3}$ и $5,3 (4,2-6,7) \times 10^{-3}$, соответственно, что свидетельствует об определенной избирательности поступления новообразованных T-клеток в лимфатические узлы ($P = 0,000001$).

Для оценки влияния общего γ -облучения на содержание TREC в клетках тимуса и периферических лимфоидных органов мышей облучали в дозовом

диапазоне 0,5, 1, 2, 4 и 8 Гр. Исследование лимфоидных органов осуществляли в период максимального повреждения лимфоидной ткани (5 сут.).

Облучение вызывает опустошение лимфоидных органов, в особенности тимуса, которое проявляется уже при дозе 1 Гр; при дозе 4 Гр это снижение наиболее выражено (таблица 1). Облучение в дозе 8 Гр (летальная доза) вызывает резкое падение численности клеток до $0,8 (0,4-1,2) \times 10^6$ клеток на орган в тимусе, $0,2 (0,1-0,2) \times 10^6$ клеток на орган в лимфоузлах и $1,4 (1,0-3,0) \times 10^6$ на орган в селезенке; оценка уровня TREC при облучении в летальной дозе не проводилась.

Таблица 1 – Дозовая зависимость изменений клеточности тимуса и показателей, характеризующих содержание TREC, на 5 сут. после общего γ -облучения

Доза облучения, Гр	Число клеток, $\times 10^6$ на орган	TREC/TCRA, $\times 10^{-3}$	TREC, $\times 10^6$ копий на орган
0 (контроль)	184,0 (157,1-203,5)	41,6 (38,7-45,3)	7,6 (6,3-8,9)
0,5	191,5 (173,4-202,9)	38,7 (30,6-48,3)	7,5 (5,4-9,6)
1	93,7* (67,0-109,8)	50,8 (35,9-65,6)	5,2 (3,1-6,9)
2	63,4* (40,8-116,4)	36,8 (29,4-56,3)	3,8 (2,0-6,5)
4	13,8* (3,9-23,7)	15,4* (8,9-18,5)	0,2* (0,05-0,38)

* - $P < 0,05$ в сравнении с контролем

Популяция TREC-содержащих Т-клеток в лимфоидных органах более радиорезистентна, чем суммарная фракция Т-лимфоцитов. На пике опустошения тимуса (5 сут. после общего γ -облучения) изменения TREC-содержащих Т-клеток регистрируются лишь при дозе облучения 4 Гр (индекс TREC/TCRA составляет $15,4 (8,9-18,5) \times 10^{-3}$ против $41,6 (38,7-45,3) \times 10^{-3}$ в контроле). Это говорит, прежде всего, об относительной сохранности Т-лимфопоэтической функции тимуса после облучения в дозовом диапазоне от 0,5 до 2 Гр; нарушение процесса перестройки генов TCR и формирования TREC в тимусе регистрируется лишь при сублетальном облучении (4 Гр).

Общая клеточность лимфатических узлов начинает снижаться с дозы 1 Гр, а селезенки – с 2 Гр, достигая минимального уровня при облучении в дозе 4 Гр. Что касается уровня TREC-содержащих клеток во вторичных лимфоидных органах, можно указать на единственное существенное отклонение от нормы – снижение

индекса TREC/TCRA в лимфатических узлах (до $5,2 (4,3-6,7) \times 10^{-3}$ против $13,3 (10,1-15,7) \times 10^{-3}$ в контроле), отражающее ослабление притока Т-клеток, эмигрирующих из тимуса, в лимфоузлы при облучении в дозе 4 Гр (таблица 2).

Таблица 2 – Зависимость показателей, характеризующих клеточность и содержание TREC в лимфатических узлах и селезенке мышей, от дозы на 5 сут. после общего γ -облучения

Доза облучения, Гр	Число клеток, $\times 10^6$ на орган	TREC/TCRA, $\times 10^{-3}$	Процент TREC-содержащих CD3 ⁺ (Т-) клеток
Лимфатические узлы			
0 (контроль)	16,7 (14,8-18,5)	13,3 (10,1-15,7)	3,2 (2,7-3,9)
0,5	12,5 (7,2-18,4)	13,9 (9,3-16,8)	3,8 (1,8-5,5)
1	8,7* (5,0-12,6)	12,4 (9,3-15,8)	3,1 (2,6-3,5)
2	7,3* (4,9-10,5)	9,8 (6,7-13,4)	2,3 (1,9-3,2)
4	1,3* (0,6-3,5)	5,2* (4,3-6,7)	0,8* (0,2-1,4)
Селезенка			
0 (контроль)	156,0 (126,3-183,7)	5,3 (4,2-6,7)	1,3 (0,6-2,7)
0,5	162,2 (155,4-173,1)	6,4 (5,1-7,2)	1,9 (1,2-2,5)
1	150,3 (140,2-169,7)	5,4 (4,2-6,8)	1,1 (0,4-1,9)
2	96,7* (84,3-106,6)	4,3 (3,0-5,5)	0,9 (0,4-1,5)
4	27,6* (12,1-43,5)	3,1 (1,9-4,7)	0,5 (0,3-1,1)

* - $P < 0,05$ в сравнении с контролем

Процент TREC-содержащих Т-клеток в селезенке под влиянием облучения в дозовом диапазоне от 0,5 до 4 Гр практически не изменяется, их содержание соответствует изменениям индекса TREC/TCRA, а в лимфоузлах - снижается примерно в 4 раза при дозе облучения 4 Гр. Очевидно, что при этом речь может идти не о различиях в радиочувствительности Т-клеток этих лимфоидных органов, а об изменениях под влиянием облучения рециркуляции Т-клеток и их хоминга: уже давно показано, что под влиянием облучения нарушается поступление Т-лимфоцитов в лимфатические узлы при нормальном хоминге в селезенку [Anderson R.E. et al., 1974].

Таким образом, наиболее выраженные и информативные изменения показателей, основанных на определении TREC, наблюдаются в период пострadiационного восстановления лимфоидной ткани после сублетального γ -

облучения (4 Гр). Показатели общей клеточности и содержание TREC в тимусе мышей в течение 2 мес. после γ -облучения в дозе 4 Гр представлены в таблице 3.

Таблица 3 – Динамика восстановления показателей, характеризующих TREC в тимусе мышей, после общего γ -облучения в дозе 4 Гр

Срок, сутки	Число клеток, $\times 10^6$ на орган	TREC/TCRA, $\times 10^{-3}$	TREC, $\times 10^6$ копий на орган
Контроль	202,0 (194,3-210,0)	43,4 (24,4-65,8)	8,8 (4,9-14,9)
4	1,5* (0,8-3,8)	11,6* (9,5-15,8)	0,02* (0,01-0,02)
8	29,3* (0,8-90,4)	18,5 (15,8-40,7)	0,9 (0,1-4,1)
10	216,2 (174,8-240,5)	71,9* (69,0-84,0)	15,5 (14,7-16,7)
12	168,0 (128,0-186,0)	27,2 (20,3-30,0)	3,8 (3,7-4,6)
20	71,9* (52,6-78,9)	20,8 (20,4-23,3)	1,5* (1,1-1,8)
30	177,6 (59,2-191,8)	42,5 (34,5-54,9)	6,6 (3,3-7,5)
60	172,0 (130,0-236,0)	35,5 (26,2-42,2)	6,2 (4,6-7,3)

* - $P < 0,05$ в сравнении с контролем

Сублетальное облучение вызывает сильное опустошение тимуса, достигающее максимального проявления на 4-5 сут. К 10 сут. достигается полное восстановление числа клеток в тимусе, после чего наступает вторичная атрофия с максимумом на 20 сут., затем клеточность восстанавливается до нормального уровня к 30 сут. после облучения. Изменение индекса TREC/TCRA, а также количество копий TREC на орган следуют практически той же динамике с минимумами на 4 и 20 сут. (соответственно первичная и вторичная атрофия) и подъемом на 10 сут. (экстренное восстановление) (таблица 3). В фазе первичной атрофии тимуса (4 сут. после общего γ -облучения) отмечается статистически значимое падение уровня TREC – до $11,6 (9,5-15,8) \times 10^{-3}$ при $43,4 (24,4-65,8) \times 10^{-3}$ в контроле, очевидно связанное с ослаблением перестройки генов TCR ($P=0,007$). На пике экстренного восстановления всех популяций тимоцитов (10 сут.) наблюдается значительный подъем индекса TREC/TCRA – $71,9 (69,0-84,0) \times 10^{-3}$, знаменующий существенное усиление процесса перестройки генов TCR ($P=0,03$). В период вторичной атрофии этот показатель вновь снижается ниже уровня необлученного контроля к 20 сут. – $20,8 (20,4-23,3) \times 10^{-3}$ ($P=0,09$), а затем медленно поднимается до уровня нормальных

цифр к 30 сут. – $42,5 (34,5-54,9) \times 10^{-3}$. Выявляется умеренная корреляционная связь между абсолютным содержанием $CD3^+$ -timoцитов и числом TREC в тимусе (коэффициент корреляции по Спирмену – 0,64, $P < 0,05$). Нормализация всех показателей, связанных с TREC, достигается в тимусе к 30 сут. после облучения.

Наиболее важным показателем с точки зрения задач, решаемых в данной работе, является оценка эмиграции TREC-содержащих клеток во вторичные лимфоидные органы на фоне восстановления популяции периферических Т-лимфоцитов. В случае периферических лимфоидных органов мы рассчитывали уровень недавних эмигрантов из тимуса, т.е. процент TREC-содержащих клеток, на число $CD3^+$ -клеток.

Восстановление численности лимфоцитов во вторичных лимфоидных органах (селезенке и лимфатических узлах) происходит практически синхронно; в отличие от восстановления тимуса оно описывается монотонными кривыми без этапа вторичной атрофии. После облучения в дозе 4 Гр численность Т-клеток во вторичных лимфоидных органах достигает нормы к 30-60 сут. Динамика TREC, описывающая миграцию Т-клеток из тимуса в селезенку и лимфатические узлы, резко отличается от динамики восстановления численности лимфоцитов (таблица 4).

В лимфатических узлах динамика TREC в значительной степени соотносится с событиями восстановления тимуса. На 4 сут. наблюдается максимальное снижение как численности Т-клеток, так и содержания TREC – индекса TREC/TCRA и процента TREC-содержащих $CD3^+$ -клеток. Развитие экстренной регенерации тимуса находит отражение в усилении эмиграции в лимфатические узлы TREC-содержащих клеток, достигающей максимума на 12 сут. после облучения – $25,6 (18,8-32,4) \times 10^{-3}$. К 20 сут. показатели, характеризующие уровень TREC, снижаются – $6,0 (5,4-7,7) \times 10^{-3}$ ($P=0,02$), а к 30 сут. начинают приближаться к нормальным. Однако полной нормализации уровня TREC в лимфоузлах не происходит даже к 60 сут. – $9,1 (5,4-10,3) \times 10^{-3}$ при $13,7 (10,6-20,4) \times 10^{-3}$ в контроле ($P=0,046$).

Таблица 4 – Динамика восстановления показателей, характеризующих TREC в лимфатических узлах и селезенке мышей, после общего γ -облучения в дозе 4 Гр

Срок, сутки	Число клеток, $\times 10^6$ на орган	TREC/TCRA, $\times 10^{-3}$	Процент TREC-содержащих CD3 ⁺ (T-) клеток
Лимфатические узлы			
Контроль	16,8 (14,2-18,8)	13,7 (10,6-20,4)	2,4 (1,8-4,1)
4	0,6* (0,5-0,8)	2,0* (0,2-2,2)	0,4* (0,0-1,0)
8	1,4* (1,0-1,6)	9,9 (7,3-12,5)	1,3 (1,2-1,9)
12	3,8* (1,9-7,5)	25,6 (18,8-32,4)	6,8 (3,9-9,6)
20	10,8 (9,6-14,5)	6,0* (5,4-7,7)	1,4* (1,2-1,7)
30	15,5 (11,4-16,7)	7,7* (4,6-8,7)	1,5* (0,9-1,8)
60	19,6 (17,6-21,6)	9,1* (5,4-10,3)	1,6 (1,0-1,9)
Селезенка			
Контроль	179,0 (144,8-194,3)	5,1 (3,0-8,2)	1,4 (0,8-2,0)
4	17,2* (10,0-26,7)	3,5 (1,7-5,8)	0,6 (0,3-1,4)
8	54,7* (40,0-79,7)	1,4* (1,1-1,7)	0,2* (0,2-0,4)
12	141,0 (114,3-156,2)	1,8* (1,0-2,4)	1,1 (0,5-1,5)
20	137,1 (133,3-152,4)	7,5 (5,9-7,7)	2,2 (0,8-2,3)
30	162,0 (146,7-191,4)	4,0 (3,6-5,4)	0,6* (0,4-0,7)
60	166,1 (118,6-210,2)	5,4 (2,7-5,9)	1,3 (0,8-1,6)

* - $P < 0,05$ в сравнении с контролем

Параллельно с максимальным снижением числа T-лимфоцитов и падением уровня TREC-содержащих клеток в тимусе (4 сут.) происходит ослабление их выброса в селезенку – $3,5 (1,7-5,8) \times 10^{-3}$ при $5,1 (3,0-8,2) \times 10^{-3}$ в контроле, однако пока статистически незначимо ($P > 0,05$), но уже к 8 сут. уровень TREC-содержащих клеток в селезенке падает статистически значимо до $1,4 (1,1-1,7) \times 10^{-3}$, $P = 0,0005$. На этапе экстренного восстановления тимуса (10-12 сут. после облучения) уровень недавних эмигрантов из тимуса в селезенке начинает увеличиваться, но не достигает уровня нормальных величин. Усиление эмиграции TREC-содержащих клеток в селезенку отсрочено и наблюдается на 20 сут. после облучения – $7,5 (5,9-7,7) \times 10^{-3}$. В дальнейшем на этапе вторичной атрофии тимуса и после неё (30 сут.) вновь

происходит снижение показателей, характеризующих содержание TREC в селезенке. Лишь к 60 сут. показатель TREC/TCRA достигает нормы.

Таким образом, события, отражающие восстановление содержания TREC в клетках лимфатических узлов и селезенки, соотносятся с событиями восстановления тимуса, причем сначала на изменения выхода RTE из тимуса реагируют лимфатические узлы и позже – селезенка.

Процент TREC-содержащих Т-клеток (т.е. недавних эмигрантов из тимуса) на пике их выхода в периферический отдел иммунной системы максимален в лимфатических узлах, в селезенке он растет более медленно и постепенно. Процент TREC-содержащих Т-клеток во вторичных лимфоидных органах не достигает уровня нормальных цифр к 30 сут. ($P < 0,05$). Их восстановление интенсивнее происходит в селезенке, в лимфатических узлах же процент TREC-содержащих Т-клеток даже через 2 месяца после облучения остается сниженным.

Для решения этого вопроса о том, являются ли описанные выше закономерности общими для регенерации лимфоидной ткани после повреждения любыми факторами или они специфичны для облучения, мы изучали восстановительные процессы в иммунной системе, поврежденной действием глюкокортикоидов. Введение гидрокортизона в дозе 125 мкг вызывает сходный с сублетальным облучением уровень опустошения лимфоидных органов. Клеточность тимуса у мышей на 4-5 сут. после облучения (максимум опустошения) составляет 1,8% от исходного, в тот же срок после введения гидрокортизона – 0,8%. В лимфатических узлах соответствующие цифры составляют 3,1 и 4,8 %, в селезенке – 6,2 и 12,1%.

Последующие события в тимусе облученных и обработанных гидрокортизоном мышей оказываются кардинально различными. Численность клеток в тимусе облученных мышей после 4 сут. быстро возрастает, достигая исходного уровня к 10-12 сут., а затем снижается к 20 сут. почти до минимума. Эти фазы пострадиационных процессов в тимусе описаны как экстренное восстановление и вторичная атрофия [Yarilin A.A., 1995]. У мышей, получивших

инъекцию гидрокортизона, полностью отсутствует пик экстренного восстановления: содержание клеток до 20 сут. почти не возрастает. При действии обоих агентов практически полное восстановление численности клеток в тимусе наблюдается между 20 и 30 сут. Таким образом, хотя конечные результаты восстановительных процессов после повреждения тимуса двумя разными агентами практически одинаковы, промежуточные события процесса регенерации сильно различаются.

Мы оценили потенциал тимуса при двух вариантах его восстановления с точки зрения уровня в нем TREC-содержащих клеток, т.е. тимоцитов, в которых осуществился процесс перестройки генов TCR и которые участвуют в заселении вторичных лимфоидных органов (рисунок 2).

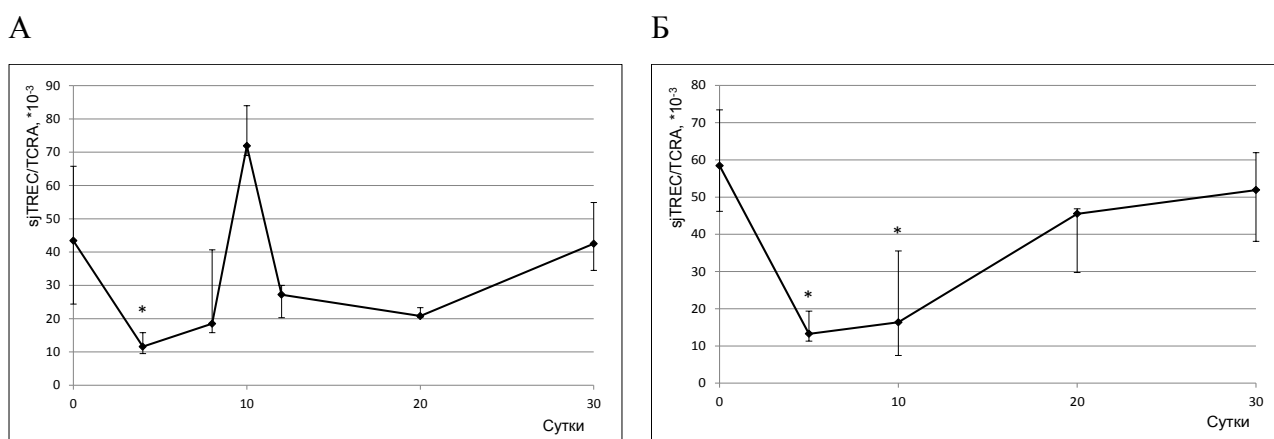


Рисунок 2 – Изменение индекса TREC/TCRA в тимусе мышей в процессе восстановления после действия повреждающих факторов: А - после общего γ -облучения в дозе 4 Гр; Б – после воздействия гидрокортизона. По оси абсцисс – сутки после облучения; по оси ординат – индекс TREC/TCRA, $\times 10^{-3}$; * - $P < 0,05$ в сравнении с контролем

Значительный дефицит TREC зарегистрирован в тимусе облученных мышей только на 5 сут., а после обработки гидрокортизоном – на 5-10 сут. после воздействия ($P < 0,05$). В то же время у облученных мышей наблюдается всплеск численности TREC в период экстренной регенерации тимуса (10 сут.); подобных изменений нет после воздействия гидрокортизона: уровень TREC-содержащих клеток остается сниженным. К 30 сут. значения индекса TREC/TCRA после воздействия обоих повреждающих факторов возвращаются к норме (у мышей, обработанных гидрокортизоном, величины индекса TREC/TCRA уже на 20 сут.

соответствуют норме). Таким образом, можно заключить, что при действии обоих агентов уровень TREC-содержащих клеток в процессе регенерации достаточно велик за исключением самых ранних этапов восстановления.

На рисунке 3 показано изменение процента TREC-содержащих Т-клеток во вторичных лимфоидных органах мышей в процессе восстановления после действия различных повреждающих факторов: общего γ -облучения (А) и гидрокортизона (Б).

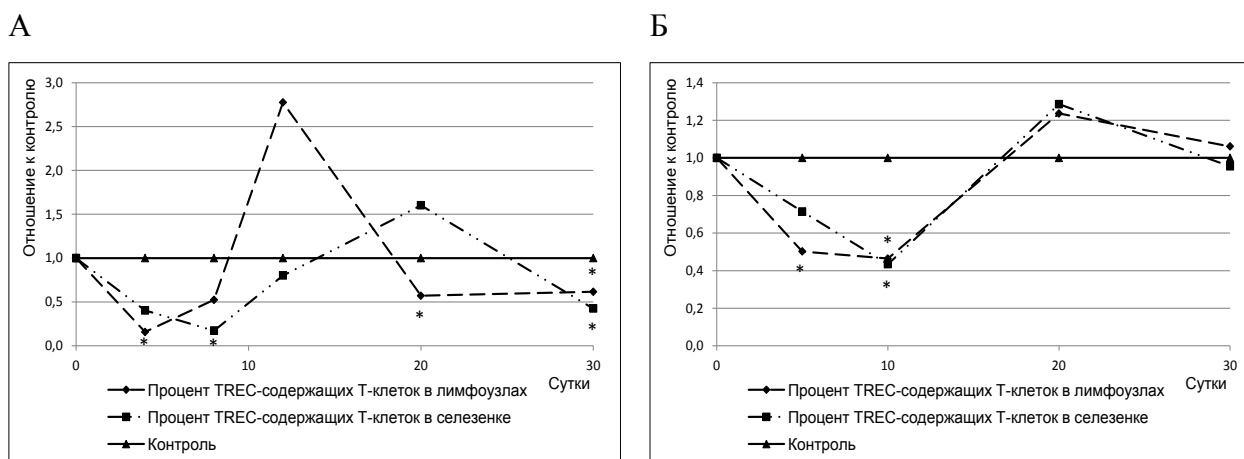


Рисунок 3 – Изменение процента TREC-содержащих Т-клеток (недавних эмигрантов из тимуса) во вторичных лимфоидных органах мышей в процессе восстановления после действия повреждающих факторов: А - общего γ -облучения в дозе 4 Гр; Б - гидрокортизона. По оси абсцисс – сутки после облучения; по оси ординат - показатели, нормированные по контролю, принятому за единицу; * - $p < 0,05$ в сравнении с контролем

В случае пострadiационного восстановления в лимфатических узлах регистрируется единственный четко выраженный пик TREC-содержащих Т-клеток на 12 сут. после облучения. Позже численность TREC-содержащих Т-клеток значительно снижается и сохраняется на сниженном уровне до 30 сут. В селезенке регистрируется аналогичный, хотя и менее выраженный и более отдаленный во времени подъем числа TREC-содержащих клеток на 20 сут. После действия гидрокортизона усиленные выбросы TREC-содержащих Т-клеток на периферию отсутствуют. При этом кривые, отражающие численность недавних эмигрантов из тимуса в лимфатических узлах и селезенке, практически совпадают: после спада на 5-10 сут. они достигают уровня нормы к 20 сут.

Таким образом, после действия радиации весьма четко прослеживается соответствие уровня TREC уровню клеточности тимуса: и в тимусе, и в лимфатических узлах подъем числа копий TREC соответствует периодам возрастания клеточности, а его снижение – периодам атрофии. В селезенке отмечается отсроченное во времени снижение и возрастание RTE. После действия гидрокортизона, когда экстренное восстановление и вторичная атрофия тимуса отсутствуют, не наблюдается и соответствующих колебаний уровня TREC в тимусе и лимфатических узлах; вместо этого регистрируется его постепенный подъем.

В клинической части работы мы оценивали интенсивность эмиграции Т-лимфоцитов из тимуса у человека: при удалении тимуса у детей с врожденными пороками сердца, при увеличении массы тимуса у лиц с тимомегалией, при аутоиммунных и аллергических процессах у взрослых (на примере ревматоидного артрита и аллергического риноконъюнктивита).

Общеизвестно, что функция тимуса снижается с возрастом. Это нашло отражение и в данных определения содержания TREC в клетках периферической крови [Douek D.C. et al., 1998]. В связи с этим содержание TREC в лимфоцитах периферической крови рассчитывали отдельно для возрастных групп, охватывающих десятилетие жизни; первое десятилетие дополнительно разделено на два отрезка – до 2 лет и 2-10 лет. Сравнение содержания TREC у лиц мужского и женского пола в одинаковых возрастных группах не выявило гендерных различий по уровню TREC ($P > 0,05$).

В таблице 5 представлено содержание TREC в лимфоцитах крови условно-здоровых детей и взрослых разных возрастов. Представленные данные свидетельствуют о том, что уровень TREC в пересчете на 10^3 лимфоцитов крови снижается с возрастом. Особенно быстрое снижение регистрируется в первые 10 лет жизни (с 73,3 до 16,4 копий/тыс. клеток, т.е. в 4,5 раза), с 10 до 20 лет уровень TREC снижается в 3,3 раза; за первый 20-летний период жизни снижение содержания TREC происходит почти в 15 раз (с 73,3 до 3,8 копий/тыс. клеток). Затем темп

снижения уровня TREC замедляется (в 3 раза за 50 лет), но прогрессирует в каждом очередном десятилетии.

Таблица 5 – Содержание TREC (число копий на 1 тыс. лимфоцитов) в лимфоцитах периферической крови здоровых лиц в зависимости от возраста

Возраст, годы	Число обследованных лиц, n	Медиана	Квартили		Значения	
			Нижний	Верхний	Минимальное	Максимальное
До 2	10	73,34	53,99	83,84	16,72	142,51
2-10	36	16,37	8,65	36,38	1,68	103,74
11-20	17	5,02	2,59	5,91	1,14	21,91
21-30	13	3,78	1,26	8,29	0,03	14,92
31-40	11	3,39	0,74	5,21	0,00	7,78
41-50	23	2,61	1,11	4,61	0,04	30,28
51-60	7	1,79	1,48	4,18	1,43	8,22
61-70	5	1,45	1,24	1,88	1,16	2,45

Как по данным литературы, так и по нашим данным снижение содержания TREC между ранним постнатальным периодом и возрастом старше 50 лет составляет почти два порядка величин [Lorenzi A.R. et al., 2006; Zhang L. et al., 1999]. В связи с этим важен учет возраста обследуемых лиц и сопоставление результатов с возрастным контролем.

Исследование содержания TREC в лимфоцитах периферической крови детей, подвергшихся тимэктомии во время операции по поводу врожденных пороков сердца, показало, что в группах детей с полной и частичной тимэктомией уровень TREC на два порядка ниже возрастной нормы – 0,37 (0,11 - 1,02), однако содержание TREC в лимфоцитах крови детей, подвергшихся по утверждению хирургов полной тимэктомии, не ниже, чем таковое у детей после частичной тимэктомии (таблица 6). В то же время этот показатель на 2 порядка ниже, чем у оперированных детей без удаления тимуса – 0,13 (0,07-1,56). Группа детей с неизвестной степенью тимэктомии гетерогенна по уровню TREC: из 7 детей у троих TREC полностью или практически полностью отсутствуют, у двоих их содержание снижено в разной степени и у двоих оно превышает возрастную норму. В группе без

тимэктомии средний уровень TREC соответствует возрастной норме; у двоих из семи детей он превышает возрастную норму. Различия между группами нельзя связать с возрастом детей, т.к. возрастные различия между группами практически отсутствуют, а также с разницей в сроках после операции (предполагается, что снижение числа TREC должно прогрессировать со временем после операции).

Таблица 6 – Содержание TREC при различной полноте удаления тимуса, определявшейся на основе свидетельств хирургов

Группа	Число детей	Средний возраст, годы	Срок между операцией и обследованием, годы	Уровень TREC, $2^{-\Delta Ct}$
1. Полная тимэктомия	4	8,5 (4,5-13)	3,5 (3-7)	0,004 (0,001-0,142)
2. Частичная тимэктомия	5 [#]	9,0 (1-12)	2,3 (1,5-2,5)	0,006 (0,001-0,007)
3. Полнота тимэктомии неизвестна	7	6,0 (4-7)	3,5 (1-5)	0,003 (0,000-0,430)
4. Операция без тимэктомии	7	6,0 (1-12)	-	0,125 (0,065-1,556)
Возрастная норма	56	9,0 (6,5-11)	-	0,368 (0,105 - 1,015)

[#] - один ребенок обследован дважды

Из приведенных данных следует вывод, что операция тимэктомии вне зависимости от ее полноты вызывает снижение содержания лимфоцитов, несущих TREC. В то же время соответствие между уровнем TREC и полнотой тимэктомии отсутствует.

Для дальнейшего анализа влияния тимэктомии на содержание в циркуляции недавних эмигрантов из тимуса использован противоположный подход: обследованные больные были сгруппированы по уровню TREC, и в сформированных таким образом группах регистрировали указания на полноту тимэктомии, возраст, срок между операцией и обследованием. Результаты представлены в таблице 7.

Таблица 7 – Связь уровня TREC с полнотой тимэктомии, сроком после операции и возрастом детей

Уровень TREC ($2^{-\Delta Ct}$)	Число обследованных лиц	Полнота тимэктомии [°]	Возраст, годы	Интервал между тимэктомией и обследованием, годы
0	2	1; 3	10,5 (4-15)	10 (3-15)
< 0,001	4 [#]	2; 2; 3; 3	5,0 (4-7,5)	3,3 (2,8-3,5)
0,001-0,0099	6 [#]	1; 1; 2; 2; 2; 3	7,0 (5-12)	2,5 (1,5-3,5)
0,01-0,099	5	1; 2; 3; 4; 4	13,0 (7-14)	4,0 (2,0-7,0)
0,1-0,99	5	3; 3; 4; 4; 4	1,0 (1-7)	0,8 (0,5-1,0)
1,0 и более	2	4; 4	9,0 (6-12)	-

[°] - 1 – полная тимэктомия; 2 – частичная тимэктомия; 3 – полнота тимэктомии неизвестна; 4 – операция без тимэктомии; [#] - один ребенок обследован дважды

Избранные интервалы значений показателя $2^{-\Delta Ct}$ можно трактовать следующим образом. Величины $2^{-\Delta Ct}$ не только равные 0, но и меньшие, чем 0,001, можно рассматривать как свидетельство практически полного выключения функции тимуса (даже при указаниях на то, что тимэктомия была частичной). Следующие два интервала, перекрывающие значения $2^{-\Delta Ct}$ от 0,001 до 0,1, соответствуют разной степени ослабления эмиграции клеток из тимуса. Интервал значений $2^{-\Delta Ct}$ от 0,1 до 1,0 соответствует нормальному уровню эмиграции, а показатели выше 1,0 – усиленной эмиграции клеток из тимуса.

Полное отсутствие TREC выявлено только у двоих детей, у одного из которых полнота тимэктомии подтверждена результатами хирургического вмешательства, а для второго сведения о степени удаления тимуса отсутствуют. Уровень TREC, близкий к нулевому, определялся у 4 детей - с частичной или неустановленной степенью тимэктомии. В двух промежуточных группах (с показателем $2^{-\Delta Ct}$, находящимся в интервале 0,001 – 0,099) без какой либо очевидной закономерности распределились данные от детей с полной, частичной и неустановленной степенью тимэктомии. Умеренная степень дефицита TREC обнаружена у двоих детей, не подвергавшихся тимэктомии. В группе с нормальным уровнем TREC оказались дети с неустановленной степенью тимэктомии и дети без тимэктомии. У двоих детей, не

подвергавшихся тимэктомии, обнаружено повышенное содержание TREC. В итоге сниженное содержание TREC выявлено у 88% (14 из 16) детей, подвергнутых тимэктомии разной полноты, и у 29% (2 из 7) детей, оперированных без удаления тимуса. Тяжелая степень снижения уровня TREC ($2^{-\Delta Ct}$ ниже 0,01) обнаружена только у тимэктомизированных детей (69%).

Распределение по уровню TREC затруднительно связать как с возрастом детей, так и с интервалом между операцией и обследованием. По этим параметрам выделяется лишь группа с показателем $2^{-\Delta Ct}$ в интервале 0,1-0,99 (норма): в ней преобладают самые младшие дети и дети с коротким интервалом между операцией и обследованием. Между тем и возраст, и срок после операции, безусловно, важны при оценке уровня TREC: о значении возраста свидетельствуют результаты, приведенные в предыдущем разделе, и сведения из литературы [Douek D.C. et al., 1998; Haynes B. F. et al., 2000], о значении интервала после операции свидетельствуют данные литературы [Arron S.T. et al., 2005]. Достаточно красноречивый пример, иллюстрирующий значимость срока после операции, дает и наш материал. У одного ребенка уровень TREC определяли дважды с интервалом в год – через 1,5 и 2,5 г после операции, сопровождавшейся неполной тимэктомией. За это время уровень $2^{-\Delta Ct}$ снизился более, чем в 10 раз - с 0,0064 до 0,0005, т.е. практически до нуля.

В связи с вышесказанным, пытаюсь оценить полноту тимэктомии на основании сведений об уровне TREC, мы учитывали срок, прошедший после операции тимэктомии. Для оценки значений содержания TREC, которые соответствуют представлению о нормальной элиминации RTE после тимэктомии, мы использовали графический подход. Из точек, отраженных на рисунке 4А, было выбрано 7 точек, распределение которых после логарифмирования близко к нормальному (при использовании критерия Шапиро-Уилка $P=0,36$). Была рассчитана регрессионная зависимость, описывающая снижение показателя $2^{-\Delta Ct}$ в зависимости от срока после операции, графическим выражением которой явилась прямая линия (линия 1 на рисунке 4Б) с наклоном, близким темпу снижения величины $2^{-\Delta Ct}$ у упомянутого

выше ребенка, повторно обследованного с интервалом в 1 год (линия 2 на рисунке 4Б).

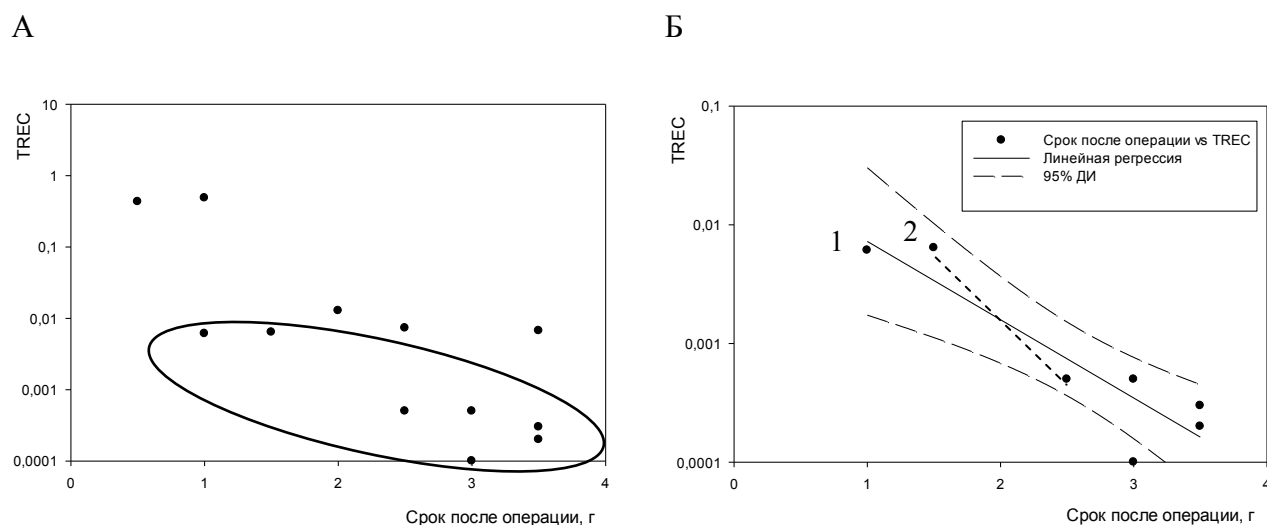


Рисунок 4 – Изменение уровня TREC в первые 3,5 года после операции

А – случаи неполной и полной тимэктомии; обведены точки, включенные в регрессионный анализ; Б – случаи с «функционально» полной тимэктомией.

1 – линия регрессии, описываемая уравнением $y = -1,48 - 0,66x$,

где x – срок после операции, $y = \log_{10} 2^{-\Delta Ct}$, 2 – линия, отражающая изменение уровня TREC у одного и того же больного (В.Е.) в течение года. По осям абсцисс – срок после операции, г; по осям ординат – логарифм величины $2^{-\Delta Ct}$

Мы постулировали, что эта зависимость описывает процесс элиминации RTE после тимэктомии, завершающийся полным или практически полным исчезновением клеток, содержащих TREC. Под элиминацией в данном случае следует понимать естественную гибель клеток в процессе их старения, а также постепенное «расходование» RTE в результате их вовлечения как в нормальные иммунные процессы (пролиферация под влиянием антигенной стимуляции), так и в гомеостатические процессы (пролиферация в ответ на снижение численности Т-лимфоцитов). После полной тимэктомии расходование RTE не компенсируется притоком «свежих» RTE из тимуса, что и обуславливает снижение числа клеток, содержащих TREC, а затем их полное исчезновение. В эту группу должна быть включена еще одна точка, соответствующая полному отсутствию TREC через 15 лет после тимэктомии (на графиках не показана).

Итак, в половине случаев (8 из 16 тимэктомированных детей, для которых был известен срок после операции) естественная убыль RTE практически не компенсируется образованием новых Т-клеток и приводит к закономерному снижению уровня TREC в лимфоцитах крови со временем после операции. Это может быть истолковано как свидетельство полноты тимэктомии у детей, у которых уровень TREC описывается данной регрессионной зависимостью. Решая уравнение регрессии для случая с y , стремящегося к нулю, получаем величину $x=3,8$. Эта величина соответствует сроку после операции, необходимому для практически полной элиминации TREC из периферических Т-клеток. Таким образом, полнота тимэктомии может быть документирована исчезновением TREC не сразу, а спустя как минимум 3,8 лет после операции. Это не противоречит данным, полученным на обезьянах, что в течение года после операции число TREC снижается примерно на один порядок [Arron S.T. et al., 2005].

Экспериментальные точки, не подчиняющиеся приведенной выше регрессионной зависимости, очевидно, соответствуют случаям неполной тимэктомии. Для этих детей также характерно снижение содержания TREC со временем после тимэктомии, однако у данной группы пациентов содержание TREC стабилизируется на уровне со значениями $2^{-\Delta Ct}$ на два порядка ниже нормы, т.е. по меньшей мере, на два порядка превосходящими минимальные уровни для группы с полной тимэктомией. По-видимому, это снижение отражает функциональные последствия неполной тимэктомии.

Таким образом, выводы о полноте тимэктомии, которые мы делаем на основании определения TREC, существенно отличаются от заключения хирургов: совпадение вывода, полученного на основании определения TREC, с заключением хирургов имело место только в половине случаев. Наличие TREC у детей с тимэктомией, которая рассматривалась хирургами как полная, не обязательно должно расцениваться как свидетельство ошибочности суждения врачей. Дело в том, что признаки активности тимуса после полного удаления этого органа могут быть результатом деятельности дополнительной тимусной ткани – так называемого

«шейного тимуса» - эктопической ткани тимуса в шейном отделе [Saggese D. et al., 2002]. Сложнее истолковать ситуацию, когда после частичной тимэктомии TREC не определяются. Отметим, что при этом варианте заключения о неполноте удаления тимуса *a priori* выглядят правдоподобными и более убедительными, чем данные анализов. Относительно этих случаев нам остается сделать допущение о значительном снижении тимопоэтической функции оставшихся после операции фрагментов тимуса. В пользу такой возможности говорит и снижение со временем числа TREC при явно неполном удалении тимуса (рисунок 4А). Явление функциональной инактивации не было ранее описано, но следует учесть, что клинически значимые сведения о функционировании тимуса человека *in vivo* практически отсутствуют. Представленный материал можно рассматривать в качестве попытки приблизиться к оценке полноценности функционирования тимуса в живом организме.

Следующий раздел нашей работы представляет собой фрагмент комплексного изучения лимфоидной составляющей иммунной системы детей с увеличением размеров тимуса, посвященный характеристике Т-лимфопоэза у детей этой группы. Поскольку вероятна связь увеличения размеров тимуса с изменением его функционирования, естественно было рассмотреть возможность нарушений тимопоэза, особенно при тимомегалии у детей раннего возраста, когда процессы развития Т-лимфоцитов проявляют максимальную зависимость от тимуса.

В таблице 8 представлены данные по содержанию TREC в лимфоцитах крови лиц с тимомегалией в возрасте от 1,5 месяцев до 40 лет (обследован 1 человек 40-летнего возраста). Оценка содержания TREC в лимфоцитах крови детей с тимомегалией до 2 лет и детей без тимомегалии той же возрастной группы показала, что при тимомегалии число копий TREC в пересчете на 1 тыс. лимфоцитов снижено в 2,5 раза – 29,6 (18,1-41) копий против 73,3 (54,0-83,8) копий в контроле. Наблюдаемые различия высоко достоверны ($P=0,001$). При сопоставлении числа копий TREC у детей до 2 лет с тимомегалией с показателями возрастной нормы оказывается, что они соответствуют нормальным показателям, свойственным

примерно 8-летним детям, у которых функциональная активность тимуса снижена по сравнению с детьми более раннего возраста. В дальнейшем (после 2 лет) снижение уровня RTE менее выражено. Обследование единственного пациента с тимомегалией в возрасте 40 лет показало практически полное отсутствие в клетках его крови TREC (0,01 копия/тыс. клеток), что значительно ниже возрастной нормы (3,39 копий/тыс. клеток).

Таблица 8 – Численность TREC (копий на 1 тыс. лимфоцитов) в лимфоцитах периферической крови лиц с тимомегалией

Возраст, годы	Число обследованных лиц, n	Медиана	Квартили		Значения	
			Нижний	Верхний	Минимальное	Максимальное
До 2	30	29,62*	18,19	41,09	8,92	103,49
2-10	13	8,90*	4,82	14,16	3,69	23,21
11-20	4	2,17	1,64	3,51	1,53	4,42
40	1	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01

* - $P < 0,05$ в сравнении с контрольной группой

Ранее сотрудниками нашей лаборатории показано, что среди иммунологических отклонений, зарегистрированных у детей раннего возраста с тимомегалией, наиболее постоянно проявляется Т-лимфопения с преобладающим снижением содержания $CD4^+$ -лимфоцитов, уровня пролиферативного ответа Т-клеток на митоген [Никонова М.Ф. и соавт., 2008]. Кроме того в предыдущих работах нами выявлено снижение содержания естественных регуляторных $CD4^+CD25^{hi}$ -Т-клеток и их основного внутриклеточного маркера FOXP3, а также усиление экспрессии генов супрессорных цитокинов TGF β , IL-10 и IL-6. Высказано предположение, что снижение содержания Т-лимфоцитов и их субпопуляций в крови детей раннего возраста с тимомегалией обусловлено общим ослаблением продуктивного Т-лимфопоэза. В настоящей работе мы нашли подтверждение этому факту: нами впервые получены прямые свидетельства ослабления эмиграции Т-клеток из тимуса в периферический отдел иммунной системы у детей первых лет жизни с тимомегалией, т.е. ослабления у них процессов Т-лимфопоэза в тимусе, что может привести к клинически значимым проявлениям иммунной недостаточности.

Попытка восстановления нарушенной функции тимуса при тимомегалии у детей *in vivo* с помощью пептидного иммуномодулятора – тактивина («Биомед») показала, что добавление тактивина (интраназально в течение 5 дней) в комплексное лечение острого обструктивного бронхита приводит к статистически значимому повышению содержанию TREC: до 58,10 (27,43-80,40) копий на 1 тыс. лимфоцитов периферической крови ($P=0,01$ для критерия Вилкоксона) (таблица 9). Причем уровень TREC достигает 80% от содержания TREC у детей без тимомегалии – 73,34 (53,99-83,84) копий на 1 тыс. лимфоцитов ($P=0,4$). Для утверждения о том, что фармакологическое действие тактивина связано с его влиянием на эмиграцию Т-клеток из тимуса необходимо продолжить исследования в этом направлении.

Таблица 9 – Численность TREC (копий на 1 тыс. лимфоцитов) в лимфоцитах периферической крови детей до 2 лет с тимомегалией до и после лечения тактивинном

Группы	Число обследованных лиц, n	Медиана	Квартили		Значения	
			Нижний	Верхний	Минимальное	Максимальное
До лечения тактивинном	8	17,62	11,81	35,72	9,12	46,32
После лечения тактивинном	8	58,10 [#]	27,43	80,40	17,83	96,38

[#] - $P=0,01$ относительно содержания TREC до лечения

Исследование уровня TREC при аутоиммунных заболеваниях нами проведено на примере ревматоидного артрита (РА). Мы определяли содержание TREC у 40 больных ревматоидным артритом в возрасте от 41 до 70 лет с длительностью заболевания 5,5 (2,0-15,0) лет. Диагноз РА установлен на основании классификационных диагностических критериев ревматоидного артрита 2010 года Американского колледжа ревматологов /Европейской лиги по борьбе с ревматизмом (ACR/EULAR, 2010). Часть больных РА находилась на терапии химиопрепаратами: 15 человек получало метотрексат в дозе 7,5-15 мг/нед, 6 человек – преднизолон в дозе 5 мг/сут. Однако содержание TREC у лиц, получавших терапию химиопрепаратами (глюкокортикоиды, цитостатики), в сравнении с больными РА

без подобного лечения в одинаковых возрастных группах не выявило статистически значимых различий по уровню TREC ($P>0,05$). В дальнейшем все больные РА, независимо от проводимой терапии, были разбиты на 3 возрастные подгруппы: 41-50, 51-60 и 61-70 лет (таблица 10).

Таблица 10 – Численность TREC (копий на 1 тыс. лимфоцитов) в лимфоцитах периферической крови больных ревматоидным артритом

Возраст, годы	Число обследованных лиц, n	Медиана	Квартили		Значения	
			Нижний	Верхний	Минимальное	Максимальное
41-50	8	1,10	0,67	2,44	0,22	7,08
51-60	16	0,44*	0,24	1,13	0,01	4,51
61-70	7	0,03*	0,00	0,63	0,00	1,00

* - $P<0,05$ в сравнении с контрольной группой

Из полученных данных следует, что содержание TREC в лимфоцитах крови больных ревматоидным артритом существенно ниже, чем у здоровых лиц тех же возрастных групп. Различия статистически значимы в возрастных группах старше 50 лет ($P<0,01$). Выраженность различий увеличивается с возрастом: она почти 2-кратная для возраста 41-50 лет, 4-кратная для возраста 51-60 лет и 48-кратная для лиц старше 60 лет, что, по-видимому, связано с длительностью аутоиммунного процесса (от полугода у лиц 40-50 лет до 31 года у больного 70 лет). Снижение содержания TREC можно трактовать как свидетельство ослабления Т-лимфопоэтической функции тимуса при ревматоидном артрите. Однако вклад в снижение уровня TREC в периферических Т-клетках может вносить также усиление пролиферации Т-клеток, что может быть связано с реакцией аутоспецифических клонов на антигены организма.

В ряде литературных источников имеются сведения об изменении содержания TREC при аллергических заболеваниях – атопическом дерматите и бронхиальной астме [Блинова Е.А. и соавт., 2012, Just H.L. et al., 2008]. Также встречается упоминание о снижении уровня TREC в крови под влиянием сублингвальной и

подкожной аллерген-специфической терапии больных с аллергией к клещам *Dermatophagoides pteronyssinus* [Pereira C. et al., 2012].

В своей работе мы провели анализ уровня TREC при аллергическом риноконъюнктивите с сенсibilизацией к пыльце деревьев, а также оценили влияние АСИТ на лимфопоэтическую функцию тимуса при этом заболевании. Исследование крови проводили четырехкратно: до начала лечения, непосредственно после окончания курса АСИТ, через 1 неделю и через 1 мес. после окончания курса лечения. В таблице 11 представлены данные по содержанию TREC в лимфоцитах крови больных аллергическим риноконъюнктивитом в возрасте от 21 до 60 лет в ремиссии заболевания.

Таблица 11 – Численность TREC (копий на 1 тыс. лимфоцитов) в лимфоцитах периферической крови больных аллергическим риноконъюнктивитом

Возраст, годы	Число обследованных лиц, n	Медиана	Квартили		Значения	
			Нижний	Верхний	Минимальное	Максимальное
21-30	6	3,78	2,92	5,54	0,21	9,95
31-40	9	3,31	3,15	5,32	2,10	14,52
41-50	2	2,25	1,28	3,22	1,28	3,22
51-60	5	1,91	1,55	6,14	0,57	7,00

Исходя из представленных в таблице 11 данных, можно заключить, что Т-лимфопоэтическая функция тимуса у больных аллергическим риноконъюнктивитом старше 20 лет не нарушена.

В таблице 12 представлена динамика уровня TREC в разные периоды после проведения курса аллерген-специфической терапии. Исследование не показало статистически значимых различий в содержании TREC как непосредственно после АСИТ, так и в течение первого месяца после ее проведения ($P > 0,05$ для критерия Вилкоксона). Следовательно, можно констатировать, что Т-лимфопоэтическая функция тимуса после проведения АСИТ у больных аллергическим риноконъюнктивитом не меняется.

Таблица 12 – Численность TREC (копий на 1 тыс. лимфоцитов) в лимфоцитах периферической крови больных аллергическим риноконъюнктивитом 21-60 лет в разные периоды после АСИТ

Группы	Число обследованных лиц, n	Медиана	Квартили		Значения	
			Нижний	Верхний	Минимальное	Максимальное
До АСИТ	23	3,35	2,60	6,40	0,21	14,52
По окончании АСИТ	11	4,59	3,22	6,94	1,60	10,57
Через 1 нед после АСИТ	5	2,51	1,84	7,70	1,51	14,47
Через 1 мес после АСИТ	11	4,96	2,57	6,58	1,59	16,55

Выявление TREC с помощью ПЦР в настоящее время является наиболее надежным методом оценки функционального состояния тимуса человека. Основной недостаток метода определения RTE по уровню TREC состоит в невозможности применить его при анализе индивидуальных Т-клеток. Чтобы обойти этот недостаток были предприняты попытки найти мембранные маркеры Т-клеток – недавних эмигрантов из тимуса, которые позволили бы использовать для определения этих клеток цитофлуориметрический анализ. Однако отсутствие однозначной связи используемых маркеров с RTE ограничивает область применения методов этой группы [Kimming S. et al., 2002, Ribeiro R.M. et al., 2007]. У человека более или менее надежные маркеры RTE обнаружены лишь для фракций RTE в отдельных субпопуляциях Т-лимфоцитов ($CD4^+$ или $CD8^+$). С возрастом четкость этих и без того неабсолютных связей снижается. В субпопуляции $CD4^+$ -Т-клеток фракцию недавних эмигрантов из тимуса можно определять, оценивая экспрессию мембранной молекулы CD31 [Kohler S. et al., 2009]. Мы испытали адекватность этого подхода на клетках крови 26 здоровых доноров в возрасте от 2 до 60 лет и 8 детей с тимомегалией в возрасте от 1,5 месяцев до 10 лет. На рисунке 5

представлены данные цитофлуориметрического определения клеток, содержащих молекулу CD31, на примере здорового донора 30 лет.

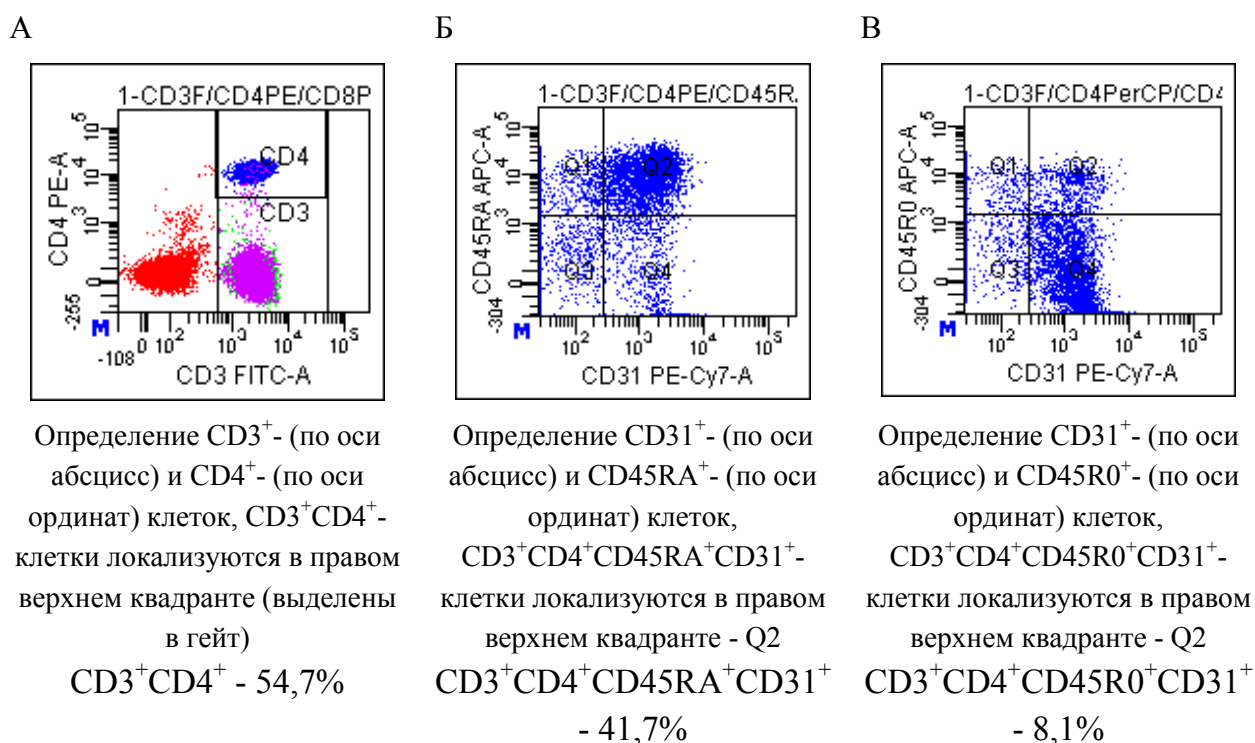


Рисунок 5 – Цитофлуориметрическое определение клеток, содержащих молекулу CD31, на примере здорового донора 30 лет

В таблице 13 представлены результаты исследования экспрессии CD31 на наивных Т-клетках и Т-клетках памяти популяций CD4⁺ и CD8⁺ здоровых людей. Как следует из таблицы, CD31⁺-клетки содержатся в обеих субпопуляциях Т-лимфоцитов, причем ими обогащена фракция наивных клеток.

Из таблицы 13 видно, что уровень CD3⁺CD4⁺CD45RA⁺CD31⁺-, так и CD3⁺CD8⁺CD45RA⁺CD31⁺-клеток в крови снижается с возрастом (о недавней эмиграции из тимуса позволяет судить экспрессия CD31 на CD4⁺-клетках). Наиболее быстрое снижение CD3⁺CD4⁺CD45RA⁺CD31⁺-клеток регистрируется в первые 10 лет жизни: почти в 2,2 раза (с 1,12 до 0,52x10⁹/л), дальнейшее снижение для этой же популяции клеток достигает 0,24x10⁹/л (те же 2,2 раза за 50 лет). Однако снижение содержания RTE с возрастом по фенотипическому маркеру CD31 не столь интенсивно, как снижение RTE по уровню TREC: в первые 10 лет жизни содержание TREC снижается в 4,5 раза.

Таблица 13 – Экспрессия CD31 на наивных CD4⁺-Т-клетках и CD4⁺-Т-клетках памяти здоровых людей

Возраст, лет	Число обследованных лиц	Все клетки		Наивные клетки (CD45RA ⁺)		Клетки памяти (CD45RO ⁺)	
		% [#]	Абс., ×10 ⁹ /л	% [#]	Абс., ×10 ⁹ /л	% [#]	Абс., ×10 ⁹ /л
CD3 ⁺ CD4 ⁺ -клетки							
2-10	4	59,6 (55,0-71,3)	1,12 (0,94-1,36)	54,8 (50,5-66,7)	0,71 (0,47-0,89)	4,9 (3,7-5,7)	0,05 (0,04-0,07)
11-20	6	47,4 (45,0-62,4)	0,52 (0,40-0,69)	31,2 (29,9-52,9)	0,25 (0,16-0,35)	16,3 (9,3-18,4)	0,06 (0,05-0,09)
21-30	3	42,9 (36,0-49,7)	0,37 (0,26-0,48)	29,8 (17,9-41,7)	0,12 (0,05-0,20)	10,2 (8,1-12,3)	0,04 (0,03-0,04)
31-40	4	30,5 (26,7-38,6)	0,25 (0,22-0,27)	26,9 (16,3-32,2)	0,07 (0,04-0,08)	6,3 (3,0-12,8)	0,02 (0,01-0,03)
41-50	6	38,4 (31,8-41,6)	0,24 (0,19-0,31)	21,8 (19,6-23,1)	0,05 (0,04-0,06)	16,4 (12,1-21,8)	0,04 (0,03-0,07)
51-60	3	31,5 (27,1-38,2)	0,24 (0,11-0,45)	13,0 (9,6-27,1)	0,03 (0,01-0,12)	18,7 (6,3-19,4)	0,03 (0,02-0,05)
CD3 ⁺ CD8 ⁺ -клетки							
2-10	4	79,6 (74,8-86,6)	0,84 (0,74-1,09)	74,9 (69,0-82,9)	0,69 (0,57-0,82)	5,3 (4,15-8,45)	0,05 (0,03-0,07)
11-20	6	73,9 (67,3-75,4)	0,50 (0,45-0,56)	56,6 (50,2-66,1)	0,30 (0,26-0,30)	20,1 (14,5-23,7)	0,10 (0,09-0,11)
21-30	3	74,3 (73,8-74,8)	0,35 (0,20-0,50)	50,0 (37,3-62,7)	0,19 (0,08-0,31)	23,5 (17,0-29,9)	0,07 (0,06-0,08)
31-40	4	70,4 (58,7-80,0)	0,24 (0,20-0,31)	47,9 (26,7-64,1)	0,10 (0,06-0,18)	12,4 (8,7-21,0)	0,04 (0,02-0,06)
41-50	6	69,7 (62,4-72,3)	0,19 (0,15-0,25)	43,8 (41,7-51,2)	0,09 (0,06-0,10)	19,1 (14,9-32,7)	0,05 (0,02-0,09)
51-60	3	57,1 (54,8-66,5)	0,26 (0,14-0,46)	34,7 (34,6-36,6)	0,07 (0,05-0,09)	20,6 (10,7-21,4)	0,06 (0,02-0,10)

[#] - Представлены проценты CD31⁺-клеток от общего числа соответствующей субпопуляции

Содержание RTE в небольшой группе детей с тимомегалией, оцененное по фенотипическому маркеру CD31, представлено в таблице 14.

Таблица 14 – Экспрессия CD31 на наивных Т-клетках и Т-клетках памяти популяций CD4⁺ и CD8⁺ у детей с тимомегалией

Возраст, лет	Число обследованных лиц	Все клетки		Наивные клетки (CD45RA ⁺)		Клетки памяти (CD45R0 ⁺)	
		% [#]	Абс., ×10 ⁹ /л	% [#]	Абс., ×10 ⁹ /л	% [#]	Абс., ×10 ⁹ /л
CD3 ⁺ CD4 ⁺ -клетки							
До 2	4	68,2 (62,6-74,6)	1,46 (1,26-2,00)	63,8 (55,5-68,4)	0,93 (0,70-1,37)	4,3 (2,9-6,5)	0,07 (0,04-0,11)
2-10	4	65,8 (57,4-71,7)	1,21 (1,05-1,28)	57,2 (50,6-63,4)	0,67 (0,53-0,81)	7,5 (5,7-18,2)	0,09 (0,06-0,22)
CD3 ⁺ CD8 ⁺ -клетки							
До 2	4	74,7 (59,2-86,4)	0,88 (0,57-1,24)	64,8 (46,8-81,1)	0,57 (0,41-0,71)	6,4 (4,4-7,6)	0,06 (0,03-0,10)
2-10	4	75,2 (72,9-83,5)	0,99 (0,70-1,04)	65,8 (59,3-74,8)	0,65 (0,43-0,78)	10,2 (8,2-12,6)	0,10 (0,06-0,13)

[#] - Представлены проценты CD31⁺-клеток от общего числа соответствующей субпопуляции

Таким образом, при тимомегалии у детей до 10 лет число клеток субпопуляции CD3⁺CD4⁺CD45RA⁺CD31⁺ не изменяется, P>0,05 (в то же время число копий TREC в пересчете на 1 тыс. лимфоцитов у детей с тимомегалией этой группы статистически значимо снижено, P<0,05). Следовательно, несмотря на то, что цитофлуориметрический анализ (на примере определения CD3⁺CD4⁺CD45RA⁺CD31⁺-клеток) применим для оценки содержания в популяции Т-лимфоцитов клеток, недавно эмигрировавших из тимуса, отсутствие однозначной связи используемого маркера с RTE ограничивает область применения данного метода. В настоящее время определение TREC с помощью ПЦР можно считать наиболее адекватным и надежным методом оценки Т-лимфопоэза в тимусе.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В диссертационной работе нами разработана новая научная концепция о восстановительных и миграционных процессах в лимфоидных органах, проведен сравнительный анализ восстановительных реакций в тимусе и тимус-зависимом звене иммунной системы, развивающихся после действия ионизирующей радиации и глюкокортикоидов. Показано, что существует два варианта восстановления тимуса и его взаимодействия с периферическим отделом иммунной системы: пассивный вариант характерен для случаев с действием агентов, не обладающих генотоксичностью (гидрокортизон, облучение в низких дозах), активный вариант характерен для действия генотоксических агентов (сублетальное облучение). От пассивного варианта он отличается наличием выраженной восстановительной реакции в тимусе на протяжении 20-суточного периода после облучения. Эта реакция неэффективна, поскольку завершается вторичной атрофией вследствие истощения внутритимусных ресурсов, однако она сопровождается достаточно интенсивной эмиграцией Т-лимфоцитов во вторичные лимфоидные органы.

Нами предложено применение разработанной тест-системы для оценки интенсивности эмиграции Т-лимфоцитов из тимуса при ряде патологических процессов: после воздействия радиации и гидрокортизона, удаления тимуса, при увеличении массы тимуса у лиц с тимомегалией, а также при аутоиммунных и аллергических процессах (ревматоидном артрите и аллергическом риноконъюнктивите).

В работе представлены возрастные параметры содержания Т-рецепторных эксцизионных колец в лимфоцитах периферической крови человека, отражающих недавний выход Т-клеток из тимуса и свидетельствующих об уровне функциональной активности органа. Показано, что уровень TREC, высокий в первые 2 года, снижается в течение жизни.

Нами раскрыты механизмы изменения Т-лимфопоэза после полной и частичной тимэктомии, выявлены изменения Т-лимфопоэтической функции тимуса при тимомегалии, проанализирован вклад нарушений функции тимуса и тимус-

зависимого звена иммунной системы в патогенез иммунопатологических состояний (аутоиммунных и аллергических заболеваний).

В диссертации показано, что операция тимэктомии вне зависимости от ее полноты вызывает снижение содержания лимфоцитов, несущих TREC (в группах детей с полной и частичной тимэктомией уровень TREC на два порядка ниже возрастной нормы). Однако выводы о полноте тимэктомии, которые мы делаем на основании определения TREC, существенно отличаются от заключения хирургов. Представленный в работе материал можно рассматривать в качестве попытки приблизиться к оценке полноценности функционирования тимуса в живом организме.

Снижение содержания TREC при тимомегалии в периферических Т-клетках указывает на ослабление эмиграции зрелых Т-клеток из органа, что позволяет внести уточнения в наши воззрения о патогенезе этого состояния. Ослабление эмиграции Т-лимфоцитов при тимомегалии может стать причиной усиления гомеостатической пролиферации, которая может исказить структуру популяции периферических Т-лимфоцитов и привести к нежелательным последствиям (например, таким, как аутоиммунная патология) в отдаленные сроки.

ВЫВОДЫ

1. Выявлены два варианта восстановления тимуса и его взаимодействия с периферическим отделом иммунной системы: активный (характеризуется резкими изменениями уровня клеток, содержащих Т-рецепторные эксцизионные кольца, наблюдается после действия генотоксических агентов – сублетального облучения) и пассивный (характеризуется отсутствием выраженной восстановительной реакции со значительными колебаниями уровня Т-рецепторных эксцизионных колец, наблюдается после действия агентов, не обладающих генотоксичностью – гидрокортизона и облучения в низких дозах).
2. Нарушение процесса перестройки генов Т-клеточного рецептора и формирования Т-рецепторных эксцизионных колец в тимусе выявляется лишь при

сублетальном облучении (доза облучения - 4 Гр); облучение в дозах ниже сублетальной (0,5-2 Гр) не приводит к изменению способности к дифференцировке и перестройке генов Т-клеточного рецептора.

3. После сублетального γ -облучения динамика восстановления содержания Т-рецепторных эксцизионных колец и клеточности тимуса практически совпадают: наблюдается падение уровня Т-рецепторных эксцизионных колец в фазе первичной атрофии тимуса, значительный подъем на пике экстренного восстановления, снижение – в период вторичной атрофии, нормализация – через 1 месяц после облучения; уровень Т-рецепторных эксцизионных колец в лимфатических узлах и селезенке отражает различные этапы восстановительных процессов, происходящих в тимусе.

4. При воздействии гидрокортизона после падения на 5-10 сут. в тимусе уровня клеток, содержащих Т-рецепторные эксцизионные кольца, отмечается их постепенное равномерное восстановление к 20 сут. Аналогичная восстановительная реакция наблюдается во вторичных лимфоидных органах.

5. Разработана тест-система для оценки функции тимуса человека по уровню Т-рецепторных эксцизионных колец на основе ПЦР.

6. Определены возрастные параметры содержания Т-рецепторных эксцизионных колец в лимфоцитах периферической крови человека, характеризующие функциональную активность тимуса; показано, что интенсивность эмиграции Т-клеток из тимуса снижается с возрастом: наиболее быстрое снижение регистрируется в первые 10 лет жизни, затем темп снижения замедляется.

7. Полная элиминация клеток, содержащих Т-рецепторные эксцизионные кольца, из лимфоцитов периферической крови человека происходит через 3,8 лет после тимэктомии.

8. При тимомегалии происходит снижение эмиграции зрелых Т-клеток из тимуса, которое приводит к уменьшению содержания Т-рецепторных эксцизионных колец в периферических Т-лимфоцитах.

9. Показано снижение содержания Т-рецепторных эксцизионных колец при аутоиммунных процессах (ревматоидном артрите), что может рассматриваться как свидетельство ослабления Т-лимфопоэтической функции тимуса.
10. При аллергических заболеваниях (аллергическом риноконъюнктивите) процесс перестройки генов Т-клеточного рецептора не изменяется. Аллерген-специфическая иммунотерапия смесью пыльцы деревьев не приводит изменениям эмиграции Т-клеток из тимуса.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. Ярилин, А.А. Регуляторные Т-клетки, зависимые от фактора FOXP3, и перспективы их изучения при беременности / А.А. Ярилин, А.Д. Донецкова // Russian Journal of Immunology. – 2005. – V. 9. – Suppl. 2. – P. 149-152.
2. Донецкова, А.Д. Определение FOXP3 – молекулярного маркера регуляторных клеток / А.Д. Донецкова, Л.В. Пичугина, М.Ф. Никонова, Н.И. Шарова, А.А. Ярилин // Медицинская иммунология. – 2005. – Т. 7. – № 2-3. – С. 112.
3. Ярилин, А.А. Регуляторные Foxp3⁺ Т-клетки и их роль при аллергии / А.А. Ярилин, А.Д. Донецкова // **Российский аллергологический журнал**. – 2005. – №2. – С. 22-26.
4. Ярилин, А.А. Естественные регуляторные Т-клетки и фактор FOXP3 / А.А. Ярилин, А.Д. Донецкова // **Иммунология**. – 2006. – Т. 27. – №3. – С. 176-188.
5. Шарова, Н.И. Экспрессия фенотипа регуляторных Т-лимфоцитов в культуре клеток кроветворных и лимфоидных органов плода человека / Н.И. Шарова, А.Д. Донецкова, И.В. Дубровина, Г.Т. Сухих, А.А. Ярилин // **Клеточные технологии в биологии и медицине**. – 2006. – № 2. – С. 96-102.
6. Sharova, N.I. Expression of regulatory T-lymphocyte phenotype in human fetal hemopoietic and lymphoid cell culture / N.I. Sharova, A.D. Donetskova, I.V. Dubrovina, G.T. Sukhikh, A.A. Yarilin // Bulletin of Experimental Biology and Medicine. – 2006. – Т. 141. – № 4. – P. 524-529.
7. Донецкова, А.Д. Анализ экспрессии молекулярного маркера регуляторных клеток FOXP3 в норме и при аллергопатологии у детей / А.Д. Донецкова, О.В. Бурменская, М.Н. Ярцев, Д.Ю. Трофимов, А.А. Ярилин // Медицинская иммунология. – 2007. – Т. 9. – № 2-3. – С. 180.

8. Донецкова, А.Д. Регуляторные Т-клетки при аллергии у детей / А.Д. Донецкова, О.В. Бурменская, М.Н. Ярцев, Д.Ю. Трофимов, Л.П. Алексеев, А.А. Ярилин // Российский аллергологический журнал. – 2007. – № 3, прил. 1. – С. 17.
9. Донецкова, А.Д. Выработка цитокинов эпителиальными клетками тимуса человека / А.Д. Донецкова, Н.И. Шарова, О.В. Бурменская, А.П. Топтыгина, Д.Ю. Трофимов, Л.П. Алексеев, А.А. Ярилин // Российский аллергологический журнал. – 2007. – № 3, прил. 1. – С. 70.
10. Донецкова, А.Д. Регуляторные Т-клетки при аллергических заболеваниях / А.Д. Донецкова, А.А. Ярилин // Российский Медицинский Форум – 2007. – М., 2007. – С. 121-122.
11. Донецкова, А.Д. Исследование регуляторных Т-клеток при аллергии у детей / А.Д. Донецкова, А.А. Ярилин // Физиология и патология иммунной системы. – 2007. – Т. 11. – № 6. – С. 11.
12. Донецкова, А.Д. Регуляторные Т-клетки при аллергии у детей / А.Д. Донецкова, Н.И. Шарова, М.М. Литвина, О.В. Бурменская, Д.Ю. Трофимов, М.Н. Ярцев, Л.П. Алексеев, А.А. Ярилин // **Медицинская иммунология.** – 2008. – Т. 10. – № 2-3. – С. 159-166.
13. Донецкова, А.Д. Возрастные особенности естественных регуляторных Т-клеток в норме и при аллергических заболеваниях / А.Д. Донецкова, М.Ф. Никонова, М.Н. Ярцев, А.А. Ярилин // Российский иммунологический журнал. – 2008. – Т. 2 (11). – № 2-3. – С. 214-215.
14. Трофимов, Д.Ю. Разработка тест-системы для определения уровня экспрессии мРНК Foxp3 на основе ОТ-ПЦР в режиме реального времени / Д.Ю. Трофимов, О.В. Бурменская, А.Д. Донецкова, Е.И. Батенева, А.А. Ярилин, Л.П. Алексеев // **Иммунология.** – 2008. – Т. 29. – № 3. – С. 182-187.
15. Шарова, Н.И. Экспрессия цитокиновых генов и секреция цитокинов эпителиальными и лимфоидными клетками тимуса человека / Н.И. Шарова, А.Д. Донецкова, А.П. Топтыгина, А.Н. Митин, М.М. Литвина, О.В. Бурменская, Д.Ю. Трофимов, Г.Т. Сухих, Л.П. Алексеев, А.А. Ярилин // **Иммунология.** – 2008. – Т. 29. – № 6. – С. 329-334.
16. Донецкова, А.Д. Регуляторные Т-лимфоциты у детей с тимомегалией / А.Д. Донецкова, М.Ф. Никонова, И.М. Данько, П.Д. Ваганов, О.В. Бурменская, Д.Ю. Трофимов, Л.П. Алексеев, А.А. Ярилин // **Российский иммунологический журнал.** – 2008. – Т. 2(11). – № 4. – С. 427-432.

17. Ярилин, А.А. Применение проточной цитометрии для оценки функциональной активности иммунной системы человека. Пособие для врачей клинической лабораторной диагностики / А.А. Ярилин, С.В. Климова, А.В. Симонова, М.В. Пащенко, М.Ф. Никонова, А.Д. Донецкова, А.И. Мартынов, С.С. Аршинова, Б.В. Пинегин. – М.: ДРИМ Продакшн, 2008. – 54 с.
18. Донецкова, А.Д. Индукция транскрипционных факторов субпопуляций Т-клеток при инкубации лимфоцитов с аллергенами / А.Д. Донецкова, М.Ф. Никонова, М.В. Пащенко, М.Н. Санков, И.В. Андреев, А.И. Мартынов, А.А. Ярилин // **Медицинская иммунология.** – 2009. – Т. 11. – № 4-5. – С. 351.
19. Пащенко, М.В. Оценка клеточного иммунитета. Пособие для врачей клинической лабораторной диагностики / М.В. Пащенко, А.В. Симонова, С.С. Аршинова, А.И. Мартынов, А.А. Ярилин, Б.В. Пинегин, В.В. Кулаков, С.В. Климова, М.Ф. Никонова, Н.И. Шарова, А.Д. Донецкова, М.М. Литвина, В.В. Муругин – М.: ДРИМ Продакшн, 2009. – 50 с.
20. Донецкова, А.Д. Индукция экспрессии транскрипционного фактора FOXP3 в кроветворных клетках-предшественниках и тимоцитах человека *in vitro* / А.Д. Донецкова, Н.И. Шарова, М.Ф. Никонова, А.А. Ярилин // **Иммунология.** – 2010. – Т. 31. – № 5. – С. 232-235.
21. Смолягин, А.И. Функциональные последствия тимэктомии у детей: численность, субпопуляционный состав лимфоцитов и содержание эксцизионных колец / А.И. Смолягин, А.Л. Фроленко, А.Д. Донецкова, А.А. Ярилин // **Иммунология.** – 2010. – Т. 31. – № 6. – С. 289-293.
22. Донецкова, А.Д. Тимусные эксцизионные кольца в лимфоцитах периферической крови, возрастная динамика и влияние тимэктомии / А.Д. Донецкова, А.Л. Фроленко, В.В. Трошина, А.И. Смолягин, А.А. Ярилин // **Иммунология.** – 2010. – № 6. – Т. 31. – С. 293-299.
23. Никонова, М.Ф. Экспрессия генов транскрипционных факторов, контролирующих дифференцировку CD4+ Т-клеток, при аллергопатологии / М.Ф. Никонова, А.Д. Донецкова, Н.И. Шарова, А.А. Ярилин // Физиология и патология иммунной системы. – 2010. – № 9. – С. 7-13.
24. Goloviznin, M. The approach to “in vivo” thymus gland function study in rheumatoid arthritis and acute myocardial infarction / M. Goloviznin, A. Donetskova, N. Lakhonina, M. Nikonova, A. Yarilin, Y. Buldakova, A. Tektova // *Int. Immunol.* – 2010. – V. 22. – Issue 1. – Suppl. 1. – P. 82.

25. Goloviznin, M. T cell receptor rearrangement excision circles (TREC) as potential biomarkers of ischemic heart disease / M. Goloviznin, A. Donetskova, N. Lakhonina, M. Nikonova, A. Yarilin, Y. Buldakova, A. Tektova // 6-th Malaysia, Indonesia & Brunei Darussalam Medical Science Conference. Materials. – 2010. – P. 50.
26. Донецкова, А.Д. Экспрессия генов транскрипционных факторов, контролирующих дифференцировку адаптивных субпопуляций CD4+ Т-лимфоцитов, в покоящихся и активированных лимфоцитах у здоровых людей / А.Д. Донецкова, М.Ф. Никонова, А.А. Ярилин // **Иммунология.** – 2011. – Т. 32. – № 4. – С. 184-189.
27. Никонова, М.Ф. Особенности экспрессии генов транскрипционных факторов, контролирующих дифференцировку адаптивных субпопуляций CD4+ Т-лимфоцитов, при аллергии / М.Ф. Никонова, А.Д. Донецкова, О.И. Сидорович, Л.В. Лусс, А.А. Ярилин // **Иммунология.** – 2011. – Т. 32. – № 4. – С. 189-192.
28. Никонова, М.Ф. Влияние препаратов аллергенов из пыльцы растений на экспрессию генов транскрипционных факторов, контролирующих дифференцировку Т-хелперов, в культуре лимфоцитов здоровых людей и больных аллергическим риноконъюнктивитом / М.Ф. Никонова, А.Д. Донецкова, И.В. Андреев, М.Н. Санков, О.И. Сидорович, А.И. Мартынов, А.А. Ярилин // **Иммунология.** – 2012. – Т. 33. – № 1. – С. 45-48.
29. Комогорова, В.В. Распределение ACANTHAMOEBA SP. штамма CDHT в органах мышей по данным полимеразной цепной реакции и влияние акантамебы на клеточность лимфоидных органов / В.В. Комогорова, С.В. Латышев, А.Д. Донецкова, А.М. Савилова, С.В. Шевелев, Я.А. Литвин, А.А. Ярилин // **Российский иммунологический журнал.** – 2012. – Т. 6 (15). – № 2. – С. 132-137.
30. Никонова, М.Ф. Биологическое действие препаратов аллергенов из пыльцы растений в культуре лимфоцитов человека / М.Ф. Никонова, А.Д. Донецкова, И.В. Андреев, М.Н. Санков, А.И. Мартынов, А.А. Ярилин // **Иммунология.** – 2012. – Т. 33. – № 2. – С. 86-89.
31. Ваганов, П.Д. Ослабление эмиграции Т-лимфоцитов из тимуса при тимомегалии у детей раннего возраста / П.Д. Ваганов, А.Д. Донецкова, М.Ф. Никонова, И.М. Данько, А.А. Ярилин // **Российский медицинский журнал.** – 2012. – № 5. – С. 27-29.
32. Ярилин, А.А. Т-клетки – недавние эмигранты из тимуса / А.А. Ярилин, А.Д. Донецкова // **Иммунология.** – 2012. – Т. 33. – № 6. – С. 326-334.

33. Головизнин, М.В. Лимфоциты с атипичным фенотипом у больных с различными клиническими вариантами ревматоидного артрита. Патология дифференцировки или следствие аутоиммунного воспаления / М.В. Головизнин, Н.С. Лахонина, М.Ф. Никонова, А.Д. Донецкова, Ю.Р. Булдакова, В.Т. Тимофеев, Г.С. Щепеткова // Вестник уральской медицинской академической науки. – 2012. – № 4 (41). – С. 105-106.
34. Ярилин, А.А. Метод оценки действия ионизирующей радиации и иммуотропных факторов на функцию тимуса. Методические рекомендации, утвержденные ФМБА России / А.А. Ярилин, Н.И. Шарова, А.Д. Донецкова, М.Ф. Никонова, Д.В. Купраш, А.М. Шварц – М., 2012. – 18с.
35. Донецкова, А.Д. Т-рецепторные эксцизионные кольца и значимость их определения в клинике / А.Д. Донецкова, А.А. Ярилин // **Иммунология.** – 2013. – Т. 34. – № 4. – С. 220-226.
36. Донецкова, А.Д. Определение Т-рецепторных эксцизионных колец как новый подход к исследованию функции тимуса / А.Д. Донецкова, М.Ф. Никонова, М.В. Пашенков, А.А. Ярилин // Российский иммунологический журнал. – 2013. – Т. 7(16). – № 2-3. – С. 174.
37. Никонова, М.Ф. Экспрессия генов дифференцировочных факторов субпопуляций CD4⁺ Т-клеток у больных с аллергией / М.Ф. Никонова, А.Д. Донецкова, О.И. Сидорович, Т.Г. Федоскова, Л.В. Лусс, А.А. Ярилин // Российский иммунологический журнал. – 2013. – Т. 7(16). – № 2-3. – С. 221.
38. Донецкова, А.Д. Динамика перестройки генов Т-клеточного рецептора и эмиграции Т-лимфоцитов из тимуса в период пострadiационного восстановления / А.Д. Донецкова, Н.И. Шарова, М.Ф. Никонова, А.Н. Митин, М.М. Литвина, В.В. Комогорова, А.А. Ярилин // **Радиационная биология. Радиоэкология.** – 2013. – Т. 53. – № 6. – С. 575-582.
39. Донецкова, А.Д. Вклад тимуса в восстановление популяции Т-клеток после действия различных повреждающих агентов / А.Д. Донецкова, Н.И. Шарова, М.Ф. Никонова, А.Н. Митин, М.М. Литвина, В.В. Комогорова, А.А. Ярилин // **Иммунология.** – 2013. – Т. 34. – № 6. – С. 309-313.
40. Митин, А.Н. Структура популяции Т-лимфоцитов костного мозга мыши и влияние на неё кортикостероидов / А.Н. Митин, А.Д. Донецкова, Н.И. Шарова, В.В. Комогорова, М.М. Литвина, А.А. Ярилин // **Иммунология.** – 2013. – Т. 34. – № 6. – С. 314-317.