

УДК 577.27

## ПОСЛЕДСТВИЯ СНИЖЕНИЯ ИММУННОЙ ТОЛЕРАНТНОСТИ ПОД ВОЗДЕЙСТВИЕМ ВЫСОКИХ ДОЗ D-ГАЛАКТОЗЫ ПОХОЖИ НА ВОЗРАСТНЫЕ ИЗМЕНЕНИЯ ИММУННОЙ СИСТЕМЫ\*

© 2019 Н.М. Ду<sup>1,2</sup>, Y.J. Wang<sup>1</sup>, X. Liu<sup>1</sup>, S.L. Wang<sup>2</sup>,  
S.M. Wu<sup>3</sup>, Z. Yuan<sup>3</sup>, X.K. Zhu<sup>1\*\*</sup>

<sup>1</sup> Research Center, Shengjing Hospital of China Medical University, 7 Mulan Road,  
Economic Development Zone, Benxi 117000, China; E-mail: zhuxk@sj-hospital.org

<sup>2</sup> Department of Oncology, Shengjing Hospital of China Medical University,  
Shenyang 110022, China

<sup>3</sup> Department of Blood Transfusion, Shengjing Hospital of China Medical University,  
Shenyang 110022, China

Поступила в редакцию 04.12.2018

После доработки 12.02.2019

Принята к публикации 12.02.2019

D-галактоза (D-Gal) вызывает накопление реактивных форм кислорода и образование полноценных конечных продуктов гликирования, приводящих к окислительному стрессу. D-Gal широко используется для индукции ускоренного старения и в медицинских исследованиях по задержке старения. Несмотря на то, что эпителиальные клетки тимуса особенно чувствительны к окислительному стрессу, есть несколько исследований, посвященных изменениям в тимусе у D-Gal-обработанных мышей. Для изучения влияния D-Gal на тимус грызунов, мы исследовали степень атрофии тимуса и связанное с этим падение относительного тимусного индекса (мг/10 г массы тела) у мышей линии C57BL/6J после подкожного введения D-Gal в дозах 200, 500 и 1000 мг/кг/день в течение 60 дней. По сравнению с мышами, обработанными 0,9%-ной солью, и с необработанными юными животными, инъекция 500 и 1000 мг D-Gal/кг/день приводила к значительной атрофии тимуса; подкожная инъекция 1000 мг D-Gal/кг/день приводила к такой же атрофии тимуса, которая наблюдалась у старых животных в возрасте 18–20 месяцев. У мышей, обработанных D-Gal в высоких дозах, было отмечено старческое изменение иммунной системы, нарушение иммунной толерантности, повышение уровня активированных иммунных клеток в селезенке и небольшое хроническое воспаление – результаты аналогичные тем, что наблюдаются при естественном старении мышей. Результаты проведенного исследования свидетельствовали о том, что мыши, обработанные D-Gal в высоких дозах, могут служить в качестве модели для изучения индуцированной атрофии тимуса и старческого изменения иммунной системы.

**КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА:** D-галактоза (D-Gal), окислительный стресс, старение тимуса, общая иммунная толерантность, негативная селекция.

DOI: 10.1134/S0320972519060058

Мировая человеческая популяция стареет; доля людей в возрасте >60 лет возросла с 9,2% в 1990 г. до 11,7% в 2013 г и в перспективе увеличится до 21,1% (>2 млрд) к 2050 г [1]. Старение сопровож-

дается разнообразными заболеваниями, такими, как сердечно-сосудистые, инсульт, диабет 2 типа, рак и другие. Многие исследователи пытались установить факторы, которые поддерживают здоровье в старости и/или защищают организм от возрастных заболеваний и дисфункций.

Результаты многочисленных исследований свидетельствовали о том, что реактивные формы кислорода (РФК) играют важную роль в процессе старения [2–4]. Окислительный стресс, нарушающий сигнальные и контрольные окислительно-восстановительные механизмы, приводит к старческим болезням, индуцирует не только прогрессирующее накопление повреждений структуры макромолекул, но так-

Принятые сокращения: РФК – реактивные формы кислорода, ТЕС – эпителиальные клетки тимуса, tT<sub>рег</sub> – регуляторные Т-клетки тимуса, MDA – малоновый диальдегид, SOD – супероксиддисмутаза, RBC – буфер для лизиса эритроцитов, AIRE – аутоиммунный регулятор, HRP – конъюгат пероксидазы хрена, TCR – Т-клеточный рецептор, TRA – тканеспецифичный антиген.

\* Первоначально английский вариант рукописи опубликован на сайте «Biochemistry» (Moscow) <http://protein.bio.msu.ru/biochimija>, в рубрике «Papers in Press», ВМ 18-334, 29.04.2019.

\*\* Адресат для корреспонденции.

же прогрессирующий сдвиг редокс-статуса клеток, что выражается в снижении функциональной эффективности различных клеточных метаболических путей [3]. Окислительно-восстановительная теория старения, разработанная на основе все возрастающего понимания механизмов окислительного стресса [5–7], предполагает, что возрастные изменения в структурах редокс-сети наблюдаются при многих заболеваниях, включая диабет 2 типа, неалкогольный цирроз печени, мерцательную аритмию и провоспалительные/фиброзные заболевания [3]. Для постановки экспериментов в рамках этой теории и для изучения потенциальных изменений в резистентности организма с возрастом была разработана модель D-Gal-индуцированного ускоренного старения мышей [8].

По сравнению с моделью естественного старения мышей или моделью предрасположенности к ускоренному старению мышей (*Senescence-Accelerated Mice Prone*, SAMP) [9, 10], модель с D-Gal-индуцируемым старением является более удобной, дешевой, стабильной и уже широко используемой. При обычных уровнях потребления D-Gal для здоровых людей (50 г/день) [11] она может метаболизировать в организме; более высокое ее количество превращается в спирт галактитол, который может накапливаться в клетках и приводить к осмотическому стрессу/формированию РФК [8]. Длительная экспозиция мышей с D-Gal в упомянутой выше модели приводит к неврологическим расстройствам, снижению активности ферментов антиоксидантной системы, снижению иммунного ответа, что напоминает признаки течения естественного процесса старения. Поэтому эта модель может быть использована при изучении старения мозга и в фармакологических исследованиях при поиске лекарств для задержки старения [8], при изучении старения тканей сердца [12], печени [13], почек [14] и кожи [15]. На сегодняшний день существует лишь несколько сообщений об изменениях в иммунной системе, индуцированных D-Gal у стареющих организмов, в частности, у мышей [16, 17].

Старение затрагивает все ткани и органы организма, но тимус является особым органом, поскольку он претерпевает возрастную дегенерацию, начиная с наступления периода половой зрелости [18]. Однако важным является также то, что тимус постепенно атрофируется с возрастом при критическом снижении уровня половых гормонов [19]. Действительно, эпителиальные клетки тимуса (ТЕС) могут быть особенно чувствительными к повреждению, индуцированному воспалением, а также рядом повреждающих молекул, таких как РФК [20]. Проведенные недавно исследования продемонстриро-

вали, что ТЕС являются дефицитными в отношении  $H_2O_2$ -редуцирующего фермента – каталазы, что предполагает наличие другого механизма для объяснения ускоренной дегенерации тимуса [20]. В соответствии с некоторыми наблюдениями, ТЕС очень чувствительны к повреждениям, связанным с аэробным метаболизмом; дегенерация ТЕС протекает быстрее у людей с избыточным весом или устойчивых к лептину [21]. Более того, Mohammad et al. [16] показали, что у мышей, обработанных D-Gal, в кортикальном и мозговом слоях тимуса развиваются гистологические изменения, сходные с изменениями, появляющимися при старении.

Поскольку эпителий тимуса играет ключевую роль в удалении клонов аутореактивных Т-клеток, постнатальное нарушение гомеостаза в ТЕС или естественная возрастная атрофия тимуса приводят к снижению системной иммунной толерантности. Это происходит частично путем негативной селекции тимоцитов и образованием кластера дифференцировки  $CD4^+$  регуляторных Т-клеток тимуса ( $tT_{reg}$ ) [22]. В свою очередь, нарушение общей иммунной толерантности может приводить к развитию хронического воспаления из-за выхода из тимуса аутореактивных Т-клеток, способных инфильтрировать в нелимфоидную ткань и индуцировать воспалительную реакцию. Эти события могут сопровождаться увеличением продукции фактора некроза опухоли (TNF)- $\alpha$  и интерлейкина (IL)-6. Этот тип индуцированного хронического воспаления получил название «*inflamm-aging*» [23, 24].

Таким образом, с возрастом атрофия тимуса может сопровождаться хроническим воспалением, вызванным снижением системной иммунной толерантности. Хотя D-Gal может индуцировать эту атрофию и влиять на иммунную толерантность организма путем, который кажется похожим на процесс естественного старения, экспериментально это пока еще не было подтверждено. В представленном исследовании была изучена взаимосвязь между атрофией тимуса и окислительным стрессом, индуцированным введением D-Gal. Кроме того, влияние D-Gal на общую толерантность иммунной системы организма была оценена, чтобы установить, могут ли мыши, обработанные D-Gal, служить в качестве адекватной модели для изучения атрофии тимуса и эффектов старения.

## МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

**Животные и лечение.** Мышей линии C57BL/6 (самки [25] массой 19–21 г в возрасте 6 недель) («Huafukang Bioscience Co.», Китай) содержали

в стерильных условиях в Экспериментальном исследовательском центре Госпиталя в г. Шенгджинг. Мышам был обеспечен доступ *ad libitum* к стандартной еде для грызунов и фильтрованной воде, они содержались в условиях нормального цикла день/ночь = 12/12 ч при 22 °С и 50%-ной влажности. После двух недель адаптации мышшей в возрасте 2 месяца разделили на пять групп по 16 особей в каждой ( $n = 16$ ): мышам первой группы ежедневно вводили подкожно (в течение 60 дней) по 0,1 мл изотонического солевого раствора (NS;  $n = 16$ ); мышам следующих трех групп ежедневно вводили подкожно (в течение 60 дней) по 0,1 мл раствора D-Gal (свежеприготовленного на NS каждую неделю) в дозах 200, 500 или 1000 мг/кг/день ( $n = 16$  в каждой группе); одновременно, группу из 16 необработанных мышшей в возрасте 2 месяца использовали как контрольных «юных», ничем не обработанных животных (Con;  $n = 16$ ). Старые самки в возрасте 16–18 месяцев ( $n = 16$ ) были закуплены в Нанкинском медицинском университете, их ничем не обрабатывали и использовали, как контроль из «очень старых» животных (Aged). В день после последней обработки NS-обработанные контрольные, все D-Gal-обработанные (уже в возрасте 4 месяца), «юные» необработанные контрольные (уже в возрасте 4 месяца) и «очень старые» необработанные контрольные (теперь в возрасте 18–20 месяцев) мышши были усыплены путем внутрибрюшинной инъекции пентабарбитала. Кровь забирали из сердца, сыворотку из каждого образца получали центрифугированием при 3000 об/мин в течение 15 мин при 4 °С в системе Micro 2R («Thermo-Scientific», Германия), и далее хранили при –80 °С. Сразу после этого тимус и селезенку у каждой мышши вырезали, взвешивали и обрабатывали, как указано ниже.

**Реагенты и антитела.** В работе использовали следующие реактивы: D-Gal («Sigma», Германия); малоновый диальдегид (MDA) и набор для определения супероксиддисмутазы (SOD) предоставил Нанкинский институт биоинженерии им. Цзяньчэна (Китай); набор для определения IL-6 мышшей методом ИФА («BD Biosciences», США); буфер для лизиса эритроцитов (RBC), набор для определения белка бицинхониновым методом, реактивы для Ds-Na-ПААГ электрофореза («Beuyotime», Китай); среда для получения лимфоцитов IX мышши («Dakewe Biosciences», Китай); коктейль для активации клеток, содержащий антибиотик брэфельдин А (2,5 мг/мл) и буфер для истинного ядерного фактора транскрипции (*True-Nuclear Transcription Factor*), («Biolegend», США). Для проточных цитометрических анализов были приобретены флуорохром-конъюгиро-

ванные кроличьи антитела против мышшиных маркеров клеточной поверхности («Biolegend», США). Они включали в себя: флуоресцеинизотиоционат (FITC)-анти-CD4 (клон GK1.5; конъюгат использовался в зависимости от специфики эксперимента), FITC-анти-CD8 (клон 53-6.7), фикоэритрин (PE)-анти-CD28 (клон 37.51), алекса флуор (AF)-647-анти-CD44 (клон IM7), PE-анти-Ki67 (клон 16A8), аллофикоцианин (APC)-анти-TNF $\alpha$  (клон MP6-XT22), PE-анти-CD25 (клон PC61), PE-анти-CD3 (клон 17A2) и AF-647-анти-Foxp3 (клон 150D). Первичные кроличьи антитела («Proteintech», США) были куплены для использования при анализе методом вестерн-блоттинга, они включали в себя антитела против аутоиммунного регулятора (AIRE) (поликлональные, 22517-1-AP) и против глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназы (GAPDH) (моноклональные, 60004-1-Ig). Конъюгат пероксидазы хрена (HRP) с козыми анти-кроличьими IgG использовали в качестве вторичных антител.

**Проточная цитометрия.** После вскрытия каждый тимус и каждую селезенку от различных мышшей разрезали на две части и использовали, как описано ниже. Для получения клеточной суспензии из образцов каждой селезенки и тимуса, использовали сетчатый фильтр ( $\varnothing$  70 мкм). Клетки крови в присутствии антикоагулянта ЭДТА и клетки селезенки очищали от эритроцитов с использованием лизирующего буфера RBC и промывали клеточный осадок буфером для окрашивания. После определения концентрации клеток с помощью гемоцитометра, аликвоты из каждого образца, содержащие по  $10^6$  клеток, окрашивали индивидуальными специфическими антителами против заданных маркеров CD поверхности клеток (на льду в темноте в течение 20 мин с использованием рекомендованного производителем количества антител). Параллельные аликвоты (по  $10^6$  клеток) фиксировали и пермеабилizовали 75%-ным этанолом в течение 1 ч и затем подвергали внутриклеточному окрашиванию с помощью антител к Ki-67 (на льду, в темноте, в течение 30 мин с использованием рекомендованного количества антител). Оставшиеся образцы клеток также фиксировали, пермеабилizовали с использованием буфера для истинного ядерного фактора транскрипции и проводили внутриклеточное окрашивание с помощью антител к Foxp3 (процедура аналогична окрашиванию Ki-67).

Для окраски клеток TNF $\alpha$  половину каждой селезенки помещали в 5 мл среды для сепарации лимфоцитов мышши (1,081 г/мл) и продавливали через сетчатый фильтр ( $\varnothing$  70 мкм). Полученную клеточную суспензию немедленно помещали в

центрифужные пробирки объемом 15 мл и осторожно наслаивали бессывороточную среду RPMI 1640. Образцы центрифугировали при 800 g в течение 30 мин при 4 °С и собирали супернатант, содержащий лимфоциты. После промывки клеток фосфатным буфером, лимфоциты суспендировали в коктейле для активации клеток, содержащем 2,5 мг/мл брэфелдина А, подсчитывали на гемоцитометре, и аликвоты (по 10<sup>6</sup> клеток) инкубировали в течение 6 ч при 37 °С в атмосфере 5% CO<sub>2</sub>. Затем образцы клеток собирали, промывали при центрифугировании буфером PBS и окрашивали с помощью анти-CD3 или анти-CD8 антител (на льду в темноте, в течение 20 мин с использованием рекомендованного количества антител). Затем клетки осаждали, фиксировали 2%-ным параформальдегидом, пермеабелизовали 0,1% (v/v) Triton X-100 и окрашивали анти-TNF $\alpha$  антителами (на льду, в темноте, в течение 30 мин с рекомендованным количеством антител).

Для каждого описанного выше случая окрашивания клеток выполняли процедуру проточной цитофлуориметрии с использованием FACS-calibur («BD Biosciences», США). Все полученные данные анализировали с использованием прилагаемой к прибору программы FlowJo. Минимальное количество событий на один образец составляло 10000.

#### **Биохимический анализ сыворотки SOD и MDA.**

Активность SOD и количество MDA в сыворотке крови определяли спектрофотометрически с помощью коммерческих наборов. Поглощение определяли с использованием ридера для микропланшетов Synergy H1 («BioTek», США). Уровни IL-6 в сыворотке определяли методом иммуноферментного анализа с использованием соответствующего набора ELISA kit («BD Biosciences», США) в соответствии с прилагаемой инструкцией. Чувствительности метода  $\geq 3,8$  пг/мл.

**Вестерн-блот анализ.** Для проведения вестерн-блоттинга общий белок каждой из оставшихся неиспользованными частей тимуса был экстрагирован с использованием буфера для радиоиммунопреципитации (RIPA) (1 мл буфера на 100 мг ткани); («Beuotime», Китай) в соответствии с инструкцией производителя. Общую концентрацию белка определяли бицинхониновым методом с помощью соответствующего набора; аликвоты (по 30 мкг белка) фракционировали методом Ds-Na-ПААГ электрофореза. После проведения электрофореза белки переносили на поливинилидендифторидные (PVDF) мембраны («Millipore», США). Мембраны блокировали 5%-ным обезжиренным молоком в Tris-буфере, содержащем 0,1% (v/v) Tween 20 (TBST, pH 7,5) в течение 2 ч при комнатной тем-

пературе. После тщательной промывки каждую мембрану инкубировали с первичными антителами (разведении 1 : 2000) в течение ночи при 4 °С. После тщательной промывки буфером TBST мембраны инкубировали со вторичными антителами, конъюгированными с HRP (разведение 1 : 40 000) в течение 2 ч при комнатной температуре. Во всех случаях в качестве внутреннего контроля была использована GAPDH. После повторной отмывки буфером TBST мембраны обрабатывали реагентом для хемолуминесцентного анализа («Thermo Scientific», США) и оценивали результаты анализа в системе для получения изображения C300 («Azure», США); результаты обрабатывали с использованием программы Image J (Национальный институт ментального здоровья, Вашингтон, D.C.).

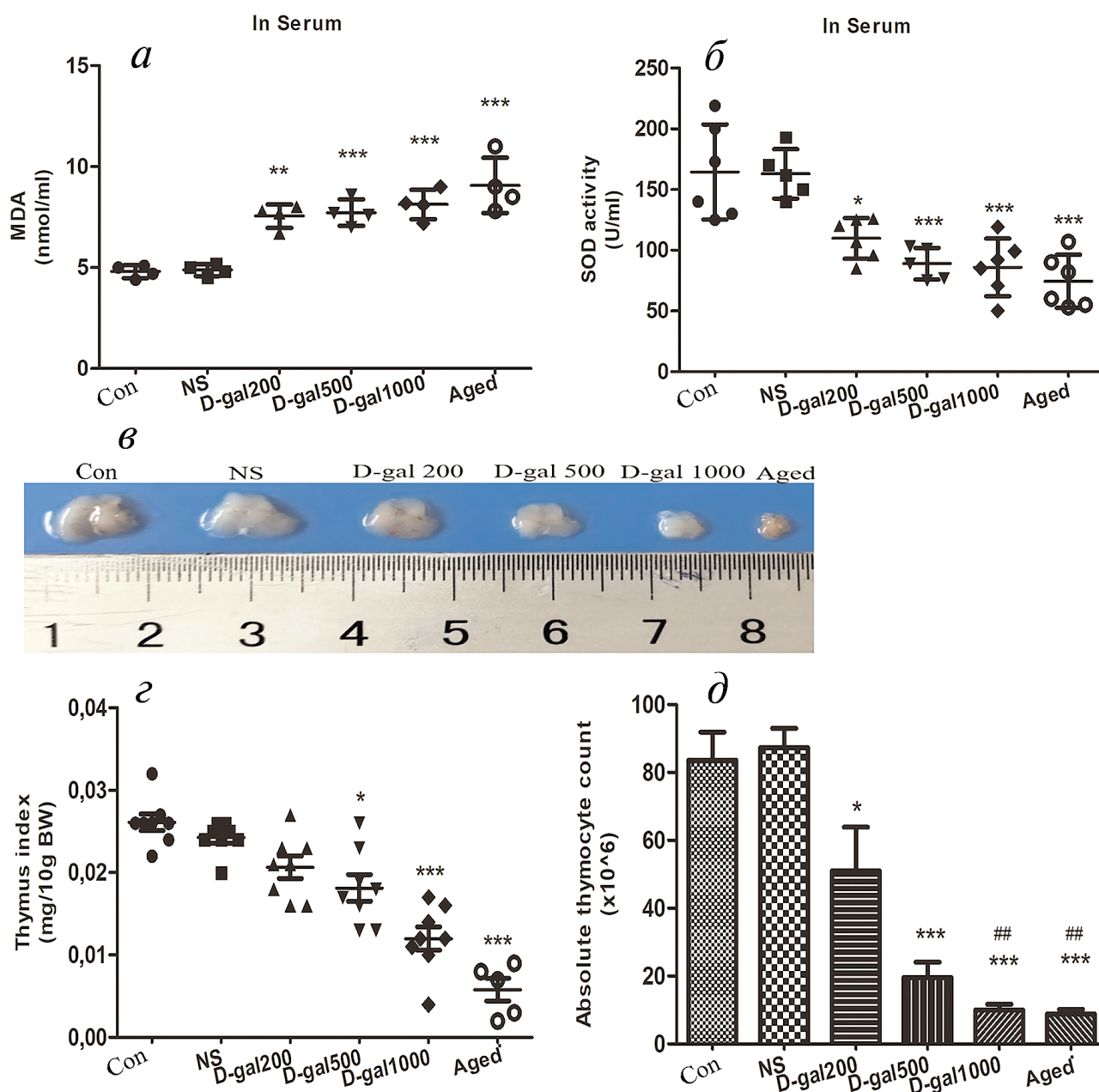
**Статистический анализ.** Данные для каждого параметра из каждой группы были представлены как средние значения  $\pm$  SD. Анализ различий между группами D-Gal-обработанных и контрольных животных выполняли с использованием однонаправленного дисперсионного анализа (ANOVA). Различия считали значимыми при  $p < 0,05$ . Все полученные данные анализировали с использованием программы Prism v.5.0 («GraphPad», США).

## **РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ**

**D-Gal вызывает окислительный стресс и атрофию тимуса у мышей, сходные с тем, что имеют место при старении.** Для оценки уровня окислительного стресса и атрофии тимуса при подкожной инъекции D-Gal мы определяли активность SOD и содержание MDA в сыворотке мышей четырех групп (см. «Методы исследования»), а также измеряли тимусы и рассчитывали тимусные индексы у D-Gal-обработанных и контрольных животных. Для предварительного анализа были использованы невысокие дозы D-Gal: 50 и 200 мг/кг/день. Несмотря на то, что при обработке животных D-Gal в любой из этих доз содержание MDA в сыворотке несколько повышалось, а активность SOD снижалась (данные не приводятся), существенной атрофии тимуса при этом не происходило. Поэтому в дальнейшем мы вводили мышам D-Gal в дозах 200, 500 или 1000 мг/кг/день. Как показано на рис. 1, *a* и *b*, уровни MDA были значительно повышены, а активности SOD понижены в крови животных в возрасте 4 месяца, обработанных D-Gal, по сравнению с контрольными, обработанными лишь солью (NS), или ничем не обработанными «юными» мышами (Con) в том же возрасте. При инъекции D-Gal в двух наивысших дозах (500 и 1000 мг/кг/день) уровни активности SOD достига-

ли активностей в контрольной группе, состоящей из старых (18–20 месяцев) не обработанных мышей (Aged); концентрации MDA при всех трех тестируемых дозах D-Gal достигали того же уровня, как и в контроле Aged. Что касается атрофии тимуса, то инъекция D-Gal в двух наивысших дозах оказывала значительный эффект (рис. 1, *в*), при-

чем, в дозе 1000 мг/кг/день воздействие было более сильным. Соответственно, относительные тимусные индексы (вес тимуса, мг/10 г массы тела) (рис. 1, *з*) и абсолютные количества тимоцитов (рис. 1, *д*) снижались в максимальной степени в группе мышей, обработанных D-Gal в наивысшей дозе.



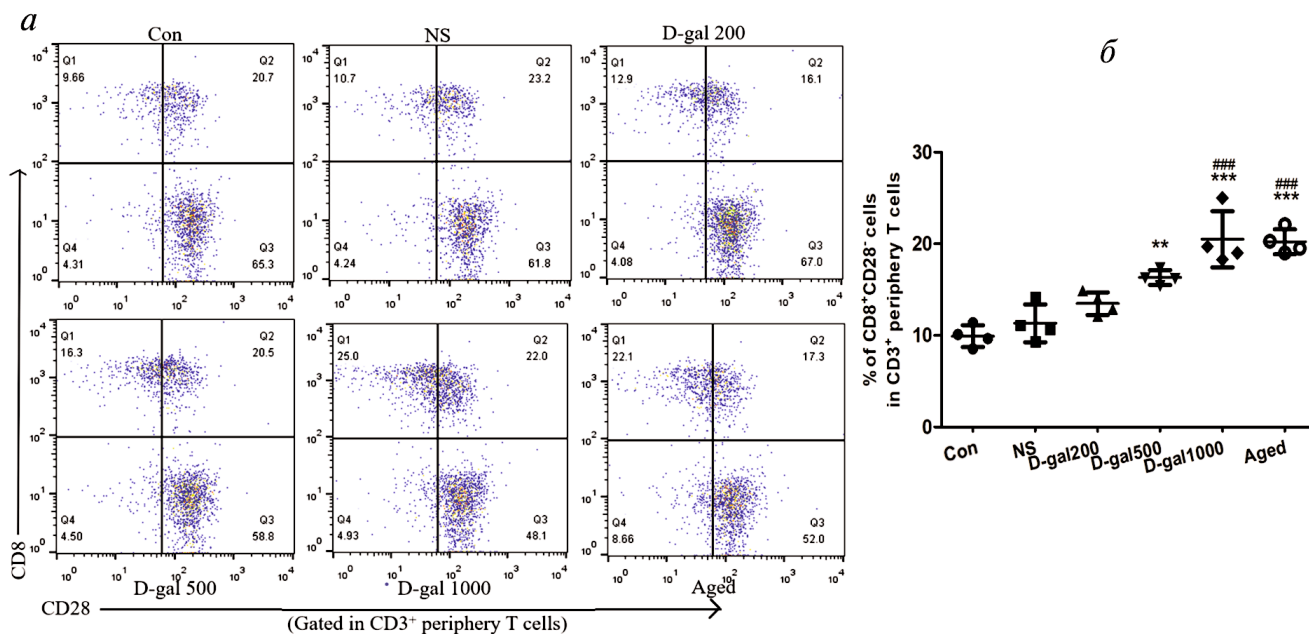
**Рис. 1.** Окислительный стресс и атрофия тимуса, индуцированные инъекцией D-Gal (ежедневно, 60 дней) у мышей линии C57/BL6. *а* – Содержание MDA в сыворотке мышей в возрасте 4 месяца, обработанных D-Gal (200, 500, 1000 мг/кг/день), «юных» необработанных мышей (4 месяца, Con), мышей в возрасте 4 месяца, обработанных 0,9% NaCl (NS) и старых (18–20 месяцев) мышей (Aged). *б* – Активность SOD в сыворотке мышей различных групп. *в* – Типичные виды тимуса. *з* – Тимусные индексы. *д* – Абсолютное количество тимоцитов. (Здесь и далее: \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,001$ , \*\*\* $p < 0,0001$  относительно Con и NS; ## $p < 0,001$  относительно 200 мг D-Gal/кг/день).

С цветным вариантом рис. 1 можно ознакомиться в электронной версии статьи на сайте: <http://sciencejournals.ru/journal/biokhsm/>

**Старение иммунной системы, индуцированное D-Gal, похоже на то, что имеет место при естественном старении.** Признаком старческих изменений иммунной системы является накопление высоко дифференцированных Т-клеток CD8<sup>+</sup>, несущих на своей поверхности белковый антиген CD28, но лишенных антигена CD28, одной из молекул, необходимых для рецептор-опосредованной активации Т-клеток. Накопление этих Т-клеток, называемых CD8<sup>+</sup>CD28<sup>-</sup> («дряхлающие клетки») связано с высоким уровнем воспаления и повышенным риском старческих заболеваний и смерти. Методом проточной цитофлуориметрии мы установили, что у «очень старых» (18–20 месяцев) мышей в крови сильно повышено процентное содержание «дряхлающих клеток» по сравнению с контрольными «юными» (4 месяца) животными (рис. 2, а и б). Уровни содержания этих клеток положительно регулировались в крови мышей, обработанных D-Gal в дозах 500 или 1000 мг/кг/день, по сравнению с контрольными, обработанными солью или необработанными «юными» животными. Полученные нами данные означали, что обработка мышей D-Gal в высоких дозах индуцирует такие же изменения в их иммунной системе, которые наблюдаются при естественном старении.

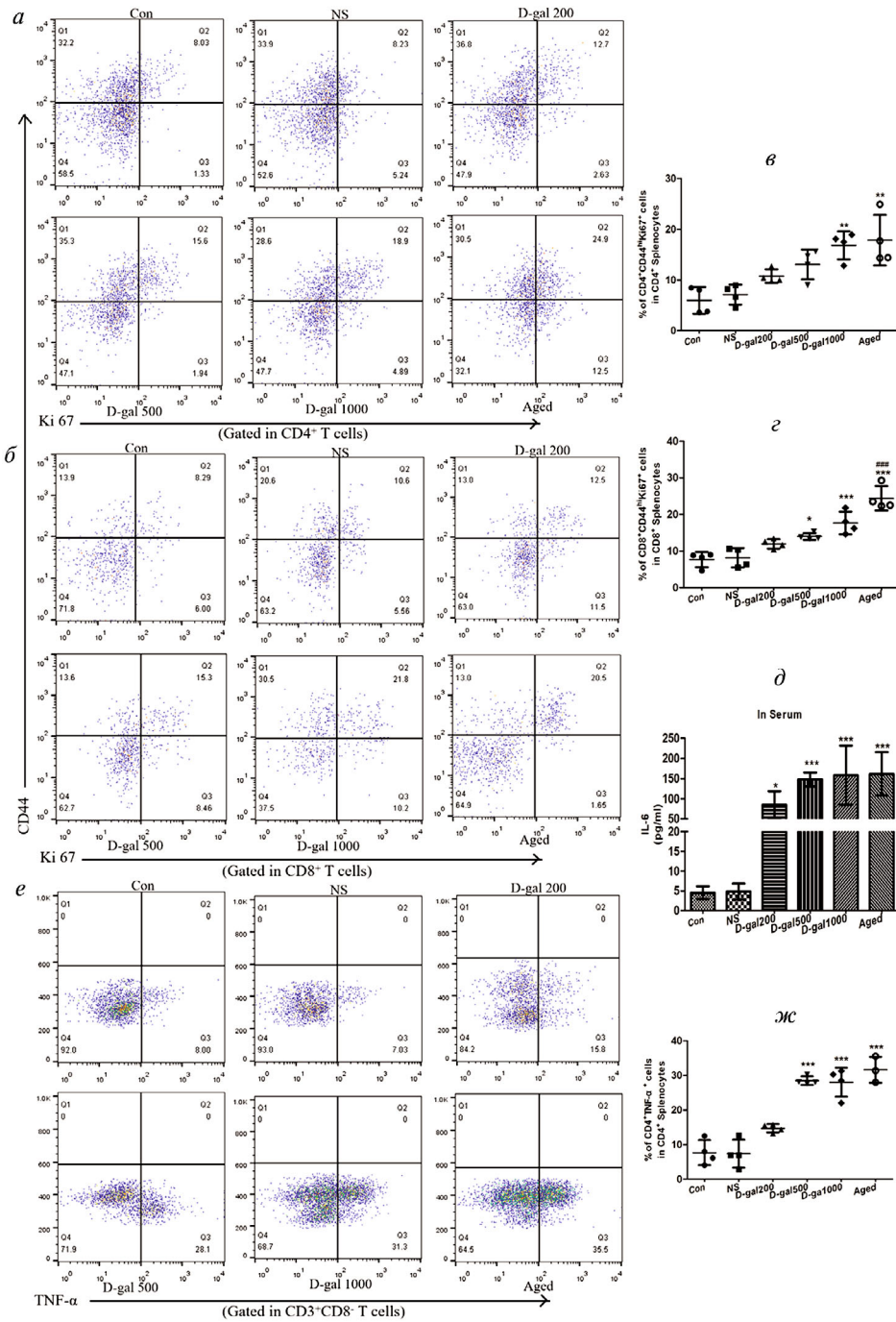
**Увеличение активированных иммунных клеток и небольшое хроническое воспаление у D-Gal-обработанных и естественно стареющих мышей.** Сниженные уровни мигрирующих из тимуса клеток (*recent thymic emigrants*, RTE); высокая доля Т-клеток CD44<sup>hi</sup> (отражает количество Т-клеток, контактирующих с собственными антигенами); наличие Т-клеток Ki67<sup>+</sup> (клетки RTE с повышенной пролиферативной способностью); присутствие клеток CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup> RTE (клетки из атрофированного тимуса с активированным иммунным фенотипом, являющиеся потенциально аутореактивными) – все это может отражать изменения *in situ*, приводящие к снижению иммунитета. Мы установили, что под действием D-Gal в высоких дозах у мышей наблюдалось повышение уровня активированных Т-клеток: CD4<sup>+</sup>CD44<sup>hi</sup>Ki67<sup>+</sup> и CD8<sup>+</sup>CD44<sup>hi</sup>Ki67<sup>+</sup> (рис. 3, а–е). Такое же высокое содержание этих Т-клеток наблюдалось у животных, состарившихся естественным путем.

Для ответа на вопрос: обусловлены ли какие-либо изменения в системной воспалительной реакции у мышей действием D-Gal или самим старением – мы оценили уровни цитокина воспаления IL-6 в сыворотке, а также доли среди спленцитов Т-клеток CD4<sup>+</sup>, содержащих TNFα. Было установлено, что уровни IL-6 в сыворотке



**Рис. 2.** Старческие изменения иммунной системы, индуцированные введением D-Gal (ежедневно, 60 дней), у мышей линии C57/BL6. *а* – Типичные точечные диаграммы иммунофлуоресценции клеток CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>CD28<sup>-</sup> (левые верхние квадранты) на общем фоне иммунофлуоресценции фракции всех периферических Т-клеток CD3<sup>+</sup> в образцах крови, полученных от D-Gal-обработанных и контрольных животных. *б* – Процентное содержание клеток CD8<sup>+</sup>CD28<sup>-</sup> во фракциях периферических Т-клеток CD3<sup>+</sup>.

С цветным вариантом рис. 2 можно ознакомиться в электронной версии статьи на сайте: <http://sciencejournals.ru/journal/biohsm/>



**Рис. 3.** Активированные иммунные клетки и хроническое воспаление низкой степени, индуцированное ежедневным введением D-Gal (60 days) у мышей линии C57/BL6. *a* – Типичные точковые диаграммы иммунофлуоресценции клеток CD44<sup>hi</sup>Ki67<sup>+</sup> (правый верхний квадрант) на общем фоне иммунофлуоресценции периферических T-клеток CD4<sup>+</sup> (спленоциты), полученных от D-Gal-обработанных и контрольных животных. *б* – Типичные точковые диаграммы иммунофлуоресценции клеток CD44<sup>hi</sup>Ki67<sup>+</sup> (правый верхний квадрант) на общем фоне флуоресценции периферических T-клеток CD8<sup>+</sup> (спленоциты), полученных от D-Gal-обработанных и контрольных животных. *в* и *г* – Процентное содержание клеток CD44<sup>hi</sup>Ki67<sup>+</sup> во фракциях периферических T-клеток CD4<sup>+</sup> и CD8<sup>+</sup>. *д* – Концентрация интерлейкина IL-6 в сыворотке. *е* – Типичные точковые диаграммы иммунофлуоресценции клеток TNF $\alpha$ <sup>+</sup> на общем фоне флуоресценции периферических T-клеток CD4<sup>+</sup> (спленоциты). (Примечание. В процессе TNF $\alpha$  активации коктейль для активации клеток может отрицательно регулировать экспрессию антигена CD4, поэтому в этом исследовании мы использовали подмножество T-клеток CD3<sup>+</sup>CD8<sup>-</sup> как представителя субпопуляции клеток CD4<sup>+</sup>). *ж* – Процентное содержание клеток CD4<sup>+</sup>TNF $\alpha$ <sup>+</sup> во фракциях T-клеток CD4<sup>+</sup>.

С цветным вариантом рис. 3 можно ознакомиться в электронной версии статьи на сайте: <http://sciencejournals.ru/journal/biohsm/>

были повышены как у мышей, обработанных D-Gal (в зависимости от введенной дозы D-Gal), так и у контрольных состарившихся животных (рис. 3, *д*). Доли клеток CD4<sup>+</sup> TNFα<sup>+</sup> среди Т-лимфоцитов селезенки также значительно возросли у мышей, обработанных D-Gal в дозе 500 или 1000 мг/кг/день, и у состарившихся необработанных животных, по сравнению с контрольными образцами клеток селезенки, полученными от «юных» мышей, которым вводили солевой раствор, и от необработанных «юных» животных (рис. 3, *е* и *ж*). Таким образом, уровни цитокинов воспаления в сыворотке и спленocyтaх мышей, обработанных D-Gal в высоких дозах, были такими же, как и у необработанных старых животных.

**D-Gal-обработанные мыши показывают нарушенное клональное удаление single-positive тимоцитов (SP), приводящее к дефектам и негативной селекции, что сходно с теми процессами, которые имеют место при старении мышей.** Нами была оценена способность тимуса, атрофирующегося в результате воздействия D-Gal, осуществлять негативную селекцию клонов моно-позитивных (single-positive, SP) и ди-позитивных (double-positive, DP) Т-лимфоцитов. Было установлено, что доля тимоцитов CD4CD8 DP (CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>) была достоверно снижена в тимусах, полученных от мышей, обработанных 1000 мг/кг/день D-Gal, и от старых мышей, в сравнении с тимусами, полученными от «юных» мышей, и мышей, обработанных D-Gal в меньших дозах (рис. 4, *а* и *б*). Напротив, доли CD4 SP (CD4<sup>+</sup>CD8<sup>-</sup>) или CD8 SP (CD4<sup>-</sup>CD8<sup>+</sup>) субпопуляций тимоцитов были повышены в атрофирующихся тимусах мышей, обработанных 1000 мг/кг/день D-Gal и в тимусах старых животных (рис. 4, *а*, *в* и *г*). Это означало, что атрофированный тимус не столь эффективно выполняет делецию (негативную селекцию) SP клонов.

Ухудшение негативной селекции не связано с дефицитом клеток tT<sub>reg</sub> в тимусе. Действительно, доли этих клеток в составе субпопуляции CD4 SP даже возрастала в тимусах старых мышей и мышей, обработанных 1000 мг D-Gal/кг/день по сравнению с содержанием этих клеток у животных двух контрольных групп (рис. 4, *д* и *е*). Это означало, что мыши, обработанные D-Gal, также, как и старые мыши, имеющие ослабленную иммунную толерантность и нарушенную негативную селекцию, были сбалансированы благодаря увеличению уровня тимусных регуляторных Т-клеток (tT<sub>reg</sub>).

**Снижение AIRE в mTEC D-Gal-обработанных мышей напоминает процесс старения.** Для индукции иммунной толерантности в тимусе необходимо участие тканеспецифичных антигенов (*tis-*

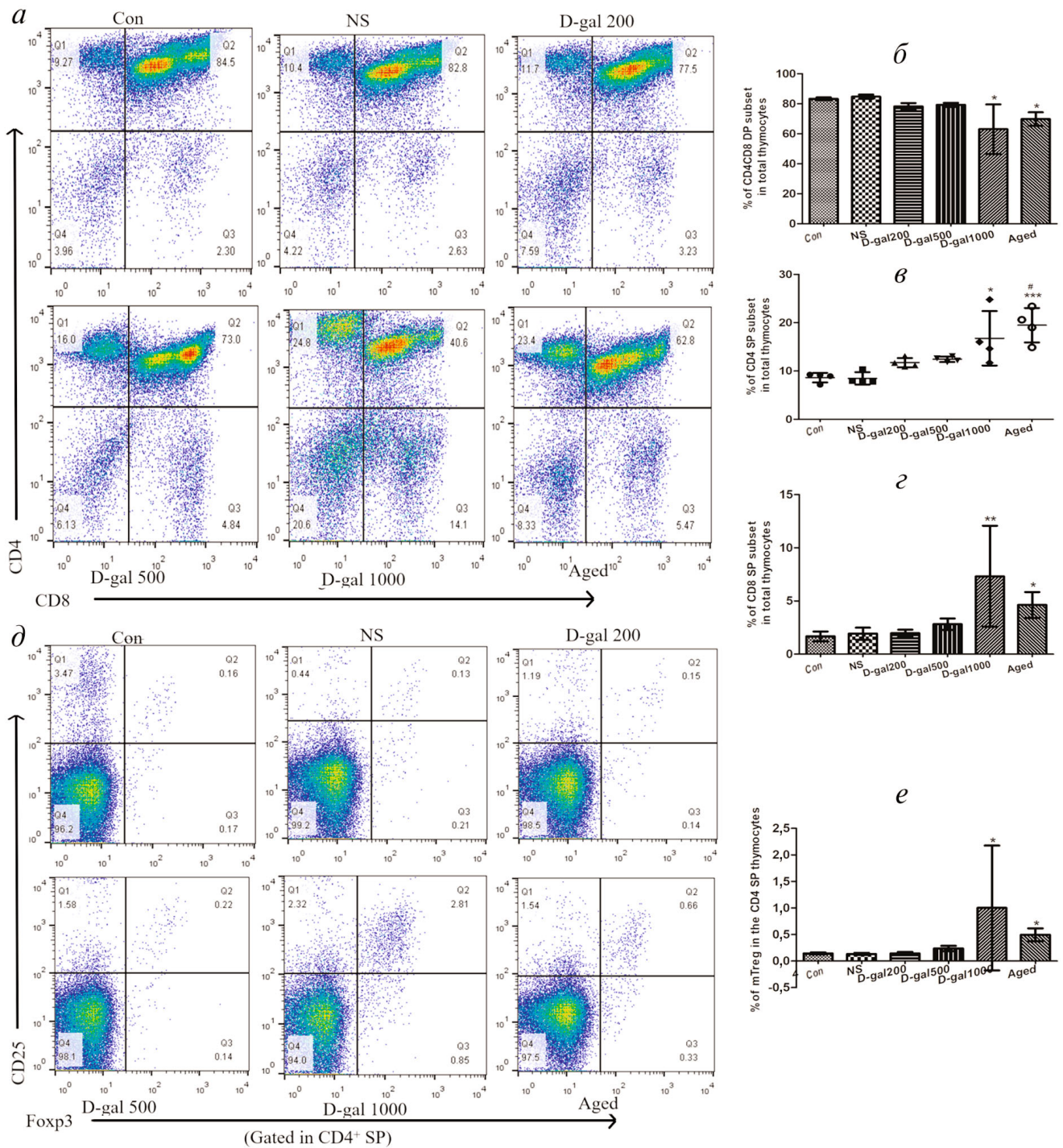
*sue-restricted antigens*; TRA (TSA, которые синтезируются не в периферических клетках, а в тимусе)) для того, чтобы развились тимоциты, способствующие делеции клонов Т-клеток, реактивных по отношению к собственным антигенам. AIRE является фактором транскрипции, экспрессируемым эпителиальными клетками мозгового слоя тимуса (mTEC) в целях стимуляции эктопической экспрессии TRA; подмножество клеток mTEC, экспрессирующих фактор AIRE, является ключевым для негативной селекции клонов аутореактивных Т-клеток. В своем исследовании мы наблюдали снижение негативной селекции в тимусе мышей, получавших большие дозы D-Gal (смотри выше), и, как представляется, это снижение может быть частично обусловлено дефицитом фактора AIRE (рис. 5, *а* и *б*). Относительная экспрессия AIRE в клетках тимуса обработанных D-Gal мышей находилась на том же уровне, что и у состарившихся естественным образом животных (хотя картина вестерн-блоттинга, кажется, свидетельствовала о более низком уровне экспрессии этого фактора у необработанных старых мышей). В любом случае, все эти значения были существенно понижены у обработанных D-Gal в высокой дозе и у старых животных по сравнению с «юными» (Con), обработанными раствором соли (NS) или D-Gal в низких дозах.

## ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

В представленном исследовании была изучена степень атрофии тимуса животных с использованием в качестве модели мышей, ускоренное старение которых было индуцировано D-Gal. Мы установили, что при ежедневной инъекции мышам D-Gal по 500 или 1000 мг/кг/день, в течение 60 дней наблюдалась значительная атрофия тимуса, в той же степени, как и у старых мышей в возрасте 18–20 месяцев. В соответствии с нашими наблюдениями у таких животных происходило снижение тимусного индекса, количества тимоцитов и прогрессирующее старческое изменение иммунной системы. Из-за атрофии тимуса у обработанных D-Gal молодых и у старых животных наблюдалось снижение негативной селекции клонов потенциально аутореактивных клеток и повышение количества активированных иммунных клеток, а также развитие хронического воспаления.

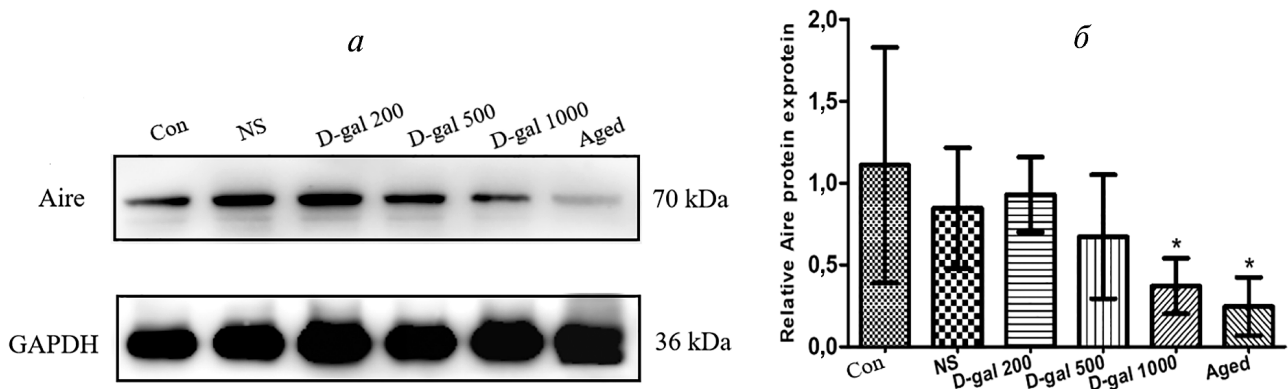
D-Gal является редуцирующим моносахаридом, который метаболизирует под действием D-галактокиназы или галактозо-1-фосфатуридилтрансферазы при обычной физиологической концентрации в организме. Любой избыток





**Рис. 4.** Влияние D-Gal (ежедневно, 60 дней) на общую иммунную толерантность у мышей. *a* – Типичные точковые диаграммы иммунофлуоресценции популяций клеток CD4CD8 DP (CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>, правый верхний квадрант), CD4 SP (CD4<sup>+</sup>CD8<sup>-</sup>, левый верхний квадрант) и CD8 SP (CD4<sup>-</sup>CD8<sup>+</sup>, правый нижний квадрант) среди всей популяции тимоцитов мышей. *b–c* – Процентное содержание клеток CD4CD8 DP, CD4 SP и CD8 SP в общих фракциях тимоцитов. *d* – Типичные точковые диаграммы иммунофлуоресценции клеток CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup> на фоне общей флуоресценции тимоцитов CD4 SP. *e* – Процентное содержание регулирующих клеток CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup> (mT<sub>reg</sub>) во фракциях тимоцитов CD4 SP. \**p* < 0,05, \*\**p* < 0,001 и \*\*\**p* < 0,0001 относительно Con и NS; #*p* < 0,05 относительно 200- и 500 мг D-Gal/кг/день. DP – ди-позитивные, SP – моно-позитивные.

С цветным вариантом рис. 4 можно ознакомиться в электронной версии статьи на сайте: <http://sciencejournals.ru/journal/biohsm/>



**Рис. 5.** Влияние D-Gal на экспрессию фактора Aire в тимусе. *a* – Типичная картина вестерн-блоттинга экстракта из тимуса, демонстрирующая экспрессию Aire и GAPDH. *б* – Относительные уровни экспрессии Aire у мышей, обработанных D-Gal, и у контрольных животных. \*  $p < 0,05$  относительно Con, NS и 200 мг D-Gal/кг/день

D-Gal превращается в спирт галактитол, накопление которого в клетках может индуцировать осмотический стресс и продукцию РФК [8]. Также D-Gal реагирует со свободными аминогруппами аминокислот с образованием полноценных конечных продуктов гликирования (*advanced glycation end-products*; AGE), стимулирующих продукцию свободных радикалов (события, связанные со старением и старческими заболеваниями) [26]. Накопление РФК и формирование AGE приводят, в конечном счете, к окислительному стрессу. В настоящее время общепризнаны два главных последствия окислительного стресса: во-первых, повреждения макромолекул и, во-вторых, разрушение окислительно-восстановительных сигнальных и контрольных механизмов, что приводит к развитию связанных с возрастом заболеваний [3]. «Редокс»-теория старения подразумевает, что развитие организмов в богатой кислородом среде порождает возникновение ключевых окислительно-восстановительных взаимодействий между организмом и окружающей средой. По сравнению с постоянным прижизненным контактом с кислородом в период роста/старения, эпизодическая, относительно кратковременная (в течение 60 дней) экспозиция животных с D-Gal может значительно ускорить процесс старения. Многие исследователи показали, что обработанные D-Gal животные (мыши) демонстрируют такую же степень старения, как и контрольные в возрасте 16–20 месяцев [16, 27]. Эта модель ускоренного старения под действием D-Gal уже продемонстрировала, что способна надежно имитировать процесс естественного старения животных.

Прогрессирующая с возрастом атрофия (инволюция) тимуса является одной из характерных черт процесса старения. Эта атрофия может быть объяснена участием нескольких ключевых

факторов, включая гормоны, лекарства на основе глюкокортикоидов, хемо-/радиотерапию и/или окислительный стресс [28]. В отличие от естественных факторов, глюкокортикоиды и лекарственная терапия воздействуют на развивающиеся Т-клетки [22, 29] и оказывают воздействие на ТЕС опосредованным образом, благодаря снижению перекрестного влияния, например, CD40 и/или RANK стимулов. Напротив, окислительный стресс мог влиять на ТЕС непосредственно [20] и приводить к острой или хронической атрофии тимуса с возрастом; этим можно объяснить, почему атрофия тимуса с возрастом продолжалась даже когда уровень половых гормонов заметно снижался [19].

Строение сформировавшегося тимуса отражает условия специализации внутритимусного микроокружения, которое обеспечивает процесс созревания Т-клеток [22]. В корковом слое тимуса трехмерная сеть взаимодействующих эпителиальных клеток (сТЕС) делает возможным осуществлять множественные взаимосвязи с незрелыми CD4<sup>-</sup>CD8<sup>-</sup> (ди-негативными, DN) и CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> (ди-позитивными, DP) тимоцитами. В мозговом слое тимуса субпопуляция mТЕС взаимодействует с более зрелыми клеточными субпопуляциями, такими как CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>-</sup> (моно-позитивные, SP) и регуляторные Т-клетки CD4<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup> (mT<sub>reg</sub>). Кортикальные DP тимоциты, регулируемые под воздействием сигнала от Т-клеточного рецептора (TCR) в ответ на собственные пептиды организма, представлены главным комплексом гистосовместимости (МНС) и могут претерпевать позитивную селекцию, приводящую к их созреванию по пути клеток CD4 или CD8 [30]. Только что претерпевшие селекцию тимоциты SP еще не являются полностью зрелыми и не способны начинать пролиферацию по сигналу TCR [31]. Такая задержка в приобретении функциональных свойств компе-

тентных клеток позволяет запускать в этих не полностью зрелых клетках апоптоз под действием сигнала от TCR, то есть выполнять негативную селекцию и элиминацию аутореактивных тимоцитов из всего созревающего клеточного ассортимента [32]. Так происходит развитие иммунотолерантности к собственным антигенам.

*AIRE* является фактором транскрипции, который экспрессируется клетками mTEC и способствует эктопической экспрессии тканеспецифичных антигенов (TRA) [33, 34]. Особые субпопуляции mTEC, экспрессирующие *AIRE* и способные к презентации TRA, чрезвычайно важны для негативной селекции. Мыши с дефицитом *AIRE* демонстрируют пониженную экспрессию TRA, аутоиммунный фенотип, продуцируют аутоиммунные антитела, характеризуются инфильтрацией воспалительных клеток в различные ткани, особенно в поджелудочную железу и слезные железы [35, 36]. В принципе, *AIRE* может предотвращать аутоиммунизацию, поддерживая как рецессивный, так и доминантный механизмы иммунотолерантности, стимулируя удаление тимоцитов, реактивных по отношению к случайно экспрессирующимся TRA или путем индукции дифференцировки таких тимоцитов в клетки типа  $tT_{reg}$  [34].

Мы предположили, что атрофия тимуса у мышей при естественном старении или при ускоренном старении, вызванном D-Gal, может также сопровождаться снижением общей иммунной толерантности у организма. Фактически, ослабление системной иммунной толерантности, обусловленное дефектом негативной селекции, наблюдалось при обоих случаях старения и, по-видимому, было частично связано с дефицитом фактора *AIRE*. В своем исследовании мы установили, что атрофия тимуса позитивно связана с генерацией клеток  $tT_{reg}$ . Как показали Oh et al. [37], повышение количества периферических  $T_{reg}$ -клеток у старых мышей не приводит к их обратному транспорту в стареющий тимус для усиления ингибирования генерации новых клеток  $tT_{reg}$ . На основании этого мы заключили, что атрофированный тимус может пытаться сбалансировать негативную селекцию

путем увеличения количества клеток  $tT_{reg}$  для поддержания общей толерантности T-клеток; нарушение этого баланса может приводить к появлению возрастных заболеваний.

Таким образом, представленное исследование продемонстрировало, что атрофия тимуса у мышей может быть индуцирована повторным введением (ежедневно, в течение 60 дней) D-Gal в высокой дозе, и что это связано, главным образом, с окислительным стрессом. Введение D-Gal не только имитировало, но, по-видимому, усиливало процессы естественного старения в организме животного. Следствием D-Gal-обработки явилось снижение системной иммунной толерантности, выразившееся в нарушении негативной селекции, повышении уровней активированных иммунных клеток в селезенке и в индукции воспалительного процесса, то же происходит и во время естественного старения. Трудно сказать, явилось ли старение причиной атрофии тимуса или наоборот. В настоящее время ясно, что какая-либо задержка атрофии тимуса или увеличение содержания антиоксидантов в организме животного, может явиться эффективной контрмерой против старческих воспалительных процессов и способом отсрочить будущие возрастные изменения иммунной системы.

**Финансирование.** Эта работа была поддержана Национальным фондом по естественным наукам (грант № 81270430).

**Благодарности.** Авторы выражают свою благодарность международному научному редактору за помощь в подготовке рукописи (<http://www.internationalscienceediting.com>).

**Конфликт интересов.** Авторы констатируют отсутствие конфликта интересов. Авторы сами отвечают за содержание рукописи.

**Соблюдение этических норм.** Со всеми животными обращались гуманно, как было одобрено Экспериментальным центром животных Китайского медицинского университета в соответствии с рекомендациями Руководства по уходу и использованию лабораторных животных Национального института здоровья.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Sander, M., Oxlund, B., Jespersen, A., Krasnik, A., Mortensen, E., Westendorp, R., and Rasmussen, L. (2015) The challenges of human population ageing, *Age Ageing*, **44**, 185–187, doi: 10.1093/ageing/afu189.
2. Martinez de Toda, I., and De la Fuente, M. (2015) The role of Hsp70 in oxi-inflamm-aging and its use as a potential biomarker of lifespan, *Biogerontology*, **16**, 709–721, doi: 10.1007/s10522-015-9607-7.
3. Go, Y., and Jones, D. (2017) Redox theory of aging: Implications for health and disease, *Clin. Sci.*, **131**, 1669–1688, doi: 10.1042/CS20160897.
4. Guzik, T., and Cosentino, F. (2018) Epigenetics and immunometabolism in diabetes and aging, *Antioxid. Redox Signal.*, **29**, 257–274, doi: 10.1089/ars.2017.7299.
5. Jones, D., and Sies, H. (2015) The redox code, *Antioxid. Redox Signal.*, **23**, 734–746, doi: 10.1089/ars.2015.6247.

6. Jones, D. (2016) Hydrogen peroxide and central redox theory for aerobic life: a tribute to Helmut Sies: scout, trailblazer, and redox pioneer, *Arch. Biochem. Biophys.*, **595**, 13–18, doi: 10.1016/j.abb.2015.10.022.
7. Sies, H. (2017) Hydrogen peroxide as a central redox signaling molecule in physiological oxidative stress: oxidative eustress, *Redox Biol.*, **11**, 613–619, doi: 10.1016/j.redox.2016.12.035.
8. Shwe, T., Pratchayasakul, W., Chattipakorn, N., and Chattipakorn, S. (2018) Role of D-galactose-induced brain aging and its potential used for therapeutic interventions, *Exp. Gerontol.*, **101**, 13–36, doi: 10.1016/j.exger.2017.10.029.
9. Li, M., Guo, K., Adachi, Y., and Ikehara, S. (2016) Immune dysfunction associated with abnormal bone marrow-derived mesenchymal stroma cells in senescence accelerated mice, *Intl. J. Mol. Sci.*, **17**, E183, doi: 10.3390/ijms17020183.
10. Currais, A., Farrokhi, C., Dargusch, R., Armando, A., Quehenberger, O., Schubert, D., and Maher, P. (2018) Fisetin reduces the impact of aging on behavior and physiology in the rapidly aging SAMP8 mouse, *J. Gerontol. A Biol. Sci. Med. Sci.*, **73**, 299–307, doi: 10.1093/gerona/glx104.
11. Morava, E. (2014) Galactose supplementation in phosphoglucomutase-1 deficiency: review and outlook for a novel treatable CDG, *Mol. Genet. Metab.*, **112**, 275–279, doi: 10.1016/j.ymgme.2014.06.002.
12. Bo-Htay, C., Palee, S., Apaijai, N., Chattipakorn, S., and Chattipakorn, N. (2018) Effects of D-galactose-induced aging on the heart and its potential interventions, *J. Cell. Mol. Med.*, **22**, 1392–1410, doi: 10.1111/jcmm.13472.
13. Wang, H., Hu, L., Li, L., Wu, X., Fan, Z., Zhang, C., Wang, J., Jia, J., and Wang, S. (2018) Inorganic nitrate alleviates the senescence-related decline in liver function, *Sci. China Life Sci.*, **61**, 24–34, doi: 10.1007/s11427-017-9207-x.
14. Mo, Z., Liu, Y., Li, C., Xu, L., Wen, L., Xian, Y., Lin, Z., Zhan, J., Chen, J., and Xu, F. (2017) Protective effect of SFE-CO2 of *Ligusticum chuanxiong* hort against D-galactose-induced injury in the mouse liver and kidney, *Rejuvenation Res.*, **20**, 231–243, doi: 10.1089/rej.2016.1870.
15. Li, W., Li, N., Sui, B., and Yang, D. (2017) Anti-aging effect of fullerene on skin aging through derived stem cells in a mouse model, *Exp. Ther. Med.*, **14**, 5045–5050, doi: 10.3892/etm.2017.5163.
16. Uddin, M., Nishio, N., Ito, S., Suzuki, H., and Isobe, K. (2010) Toxic effects of D-galactose on thymus and spleen that resemble aging, *J. Immunotoxicol.*, **7**, 165–173, doi: 10.3109/15476910903510806.
17. Li, M., Ouyang, W., Li, J., Si, L., Li, X., Guo, J., and Li, H. (2016) Effects of kinetin on thymus and immune function of aging rats, *Pakistan Vet. J.*, **36**, 356–362.
18. Chaudhry, M., Velardi, E., Dudakov, J., and van den Brink, M. (2016) Thymus: the next (re)generation, *Immunol. Rev.*, **271**, 56–71, doi: 10.1111/imr.12418.
19. Cepeda, S., and Griffith, A. (2018) Thymic stromal cells: roles in atrophy and age-associated dysfunction of the thymus, *Exp. Gerontol.*, **105**, 113–117, doi: 10.1016/j.exger.2017.12.022.
20. Griffith, A., Venables, T., Shi, J., Farr, A., van Remmen, H., Szewda, L., Fallahi, M., Rabinovitch, P., and Petrie, H. (2015) Metabolic damage and premature thymus aging caused by stromal catalase deficiency, *Cell. Rep.*, **12**, 1071–1079, doi: 10.1016/j.celrep.2015.07.008.
21. Dixit, V. (2010). Thymic fitness and approaches to enhance thymopoietic fitness in aging, *Curr. Opin. Immunol.*, **22**, 521–528, doi: 10.1016/j.coi.2010.06.010.
22. Abramson, J., and Anderson, G. (2017) Thymic epithelial cells, *Annu. Rev. Immunol.*, **35**, 85–118, doi: 10.1146/annurev-immunol-051116-052320.
23. Franceschi, C., and Campisi, J. (2014) Chronic inflammation (inflammaging) and its potential contribution to age-associated diseases, *J. Gerontol. A Biol. Sci. Med. Sci.*, **69** (S1), S4–S9, doi: 10.1093/gerona/glu057.
24. Coder, B., Wang, H., Ruan, L., and Su, D. (2015) Thymic involution perturbs negative selection leading to autoreactive T-cells that induce chronic inflammation, *J. Immunol.*, **194**, 5825–5837, doi: 10.4049/jimmunol.1500082.
25. Markle, J., and Fish, E. (2014) SeXX matters in immunity, *Trends Immunol.*, **35**, 97–104, doi: 10.1016/j.it.2013.10.006.
26. Rehman, S., Shah, S., Ali, T., Chung, J., and Kim, M. (2017) Anthocyanins reversed D-galactose-induced oxidative stress and neuroinflammation mediated cognitive impairment in adult rats, *Mol. Neurobiol.*, **54**, 255–271, doi: 10.1007/s12035-015-9604-5.
27. Cebe, T., Yanar, K., Atukeren, P., Ozan, T., Kuruc, A., Kunbaz, A., Sitar, M., Mengi, M., Aydin, M., and Esrefoglu, M. (2014) Comprehensive study of myocardial redox homeostasis in naturally- and mimetically-aged rats, *Age (Dordr.)*, **36**, 9728, doi: 10.1007/s11357-014-9728-y.
28. Majumdar, S., and Nandi, D. (2018) Thymic atrophy: experimental studies and therapeutic interventions, *Scand. J. Immunol.*, **87**, 4–14, doi: 10.1111/sji.12618.
29. Purton, J., Monk, J., Liddicoat, D., Kyprisoudis, K., Sakkal, S., Richardson, S., Godfrey, D., and Cole, T. (2004) Expression of the glucocorticoid receptor from the 1A promoter correlates with T-lymphocyte sensitivity to glucocorticoid-induced cell death, *J. Immunol.*, **173**, 3816–3824, doi: 10.4049/jimmunol.173.6.3816.
30. Kurd, N., and Robey, E. (2016) T-cell selection in the thymus: a spatial and temporal perspective, *Immunol. Rev.*, **271**, 114–126, doi: 10.1111/imr.12398.
31. Xing, Y., Wang, X., Jameson, S., and Hogquist, K. (2016) Late stages of T-cell maturation in the thymus involve NF- $\kappa$ B and tonic type I interferon signaling, *Nat. Immunol.*, **17**, 565–573, doi: 10.1038/ni.3419.
32. Klein, L., Kyewski, B., Allen, P., and Hogquist, K. (2014) Positive and negative selection of the T-cell repertoire: what thymocytes see (and don't see), *Nat. Rev. Immunol.*, **14**, 377–391, doi: 10.1038/nri3667.
33. Malchow, S., Leventhal, D., Lee, V., Nishi, S., Socci, N., and Savage, P. (2016) Aire enforces immune tolerance by directing autoreactive T cells into the regulatory T cell lineage, *Immunity*, **44**, 1102–1113, doi: 10.1016/j.immuni.2016.02.009.
34. Takaba, H., and Takayanagi, H. (2017) The mechanisms of T cell selection in the thymus, *Trends Immunol.*, **38**, 805–816, doi: 10.1016/j.it.2017.07.010.
35. DeVoss, J., LeClair, N., Hou, Y., Grewal, N., Johannes, K., Lu, W., Yang, T., Meagher, C., Fong, L., Strauss, E., and Anderson, M. (2010) An autoimmune response to odorant binding protein 1a is associated with dry eye in the Aire-deficient mouse, *J. Immunol.*, **184**, 4236–4246, doi: 10.4049/jimmunol.0902434.
36. Hubert, F., Kinkel, S., Crewther, P., Cannon, P., Webster, K., Link, M., Uiibo, R., O'Bryan, M., Meager, A., Forehan, S., Smyth, G., Mittaz, L., Antonarakis, S., Peterson, P., Heath, W., and Scott, H. (2009) Aire-deficient C57BL/6 mice mimicking the common human 13-base pair deletion mutation present with only a mild autoimmune phenotype, *J. Immunol.*, **182**, 3902–3918, doi: 10.4049/jimmunol.0802124.
37. Oh, J., Wang, W., Thomas, R., and Su, D. (2017) Capacity of  $tT_{reg}$  generation is not impaired in the atrophied thymus, *PLoS Biol.*, **15**, e2003352, doi: 10.1371/journal.pbio.2003352.

**DEFECTIVE CENTRAL IMMUNE TOLERANS INDUCED  
BY HIGH-DOSE D-GALACTOSE RESEMBLES AGING****H. M. Du<sup>1,2</sup>, Y. J. Wang<sup>1</sup>, X. Liu<sup>1</sup>, S. L. Wang<sup>2</sup>,  
S. M. Wu<sup>3</sup>, Z. Yuan<sup>3</sup>, and X. K. Zhu<sup>1\*</sup>**

<sup>1</sup> *Research Center, Shengjing Hospital of China Medical University,  
7 Mulan Road, Economic Development Zone, Benxi 117000,  
China; E-mail: zhuxk@sj-hospital.org*

<sup>2</sup> *Department of Oncology, Shengjing Hospital of China Medical  
University, Shenyang 110022, China*

<sup>3</sup> *Department of Blood Transfusion, Shengjing Hospital of China  
Medical University, Shenyang 110022, China*

Received December 4, 2018

Revised February 12, 2019

Accepted February 12, 2019

D-Galactose (D-Gal) causes accumulation of reactive oxygen species and the formation of advanced glycation end-products, ultimately resulting in oxidative stress. D-Gal has been widely used to induce accelerated aging in anti-aging medical research. Although thymic epithelial cells are particularly sensitive to oxidative stress, there are few reports on the thymus changes in D-Gal-induced-aging mice. To study the effect of D-Gal on rodent thymus, we investigated the degree of thymus atrophy and the atrophy relative index change in C57BL/6J mice following subcutaneous injection of D-Gal at different doses (200, 500, and 1000 mg/kg daily) for 60 days. Compared with vehicle (0.9% saline) treatment and young controls, D-Gal at a dose of 500 and 1000 mg/kg daily led to significant thymic atrophy; the 1000 mg/kg daily dose caused an atrophy similar to that observed in naturally aged (18–20-month-old) mice. In high-dose-D-Gal-treated mice, greater immuno-senescence, defective central immune tolerance, an increase in activated splenic immune cell levels, and chronic low-grade inflammation were noted, i.e., the outcomes similar to what occurs as a result of natural aging in mice. Taken together, the results of these studies indicate that high-dose-D-Gal-treated mice may be a valid model for studies of inducible thymic atrophy and effects of aging on immune system.

*Keywords:* D-galactose, oxidative stress, thymic aging, central immune tolerance, negative selection