

УДК 577.27

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

© 2019 Н.М. Ду^{1,2}, Y.J. Wang¹, X. Liu¹, S.L. Wang²,
S.M. Wu³, Z. Yuan³, X.K. Zhu^{1**}

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

² Department of Oncology, Shengjing Hospital of China Medical University,
Shenyang 110022, China

³ 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_{рег} – 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)- α 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 α (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 козьими 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 α 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 10⁶ клеток) инкубировали в течение 6 ч при 37 °С в атмосфере 5% CO₂. 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 α антителами (на льду, в темноте, в течение 30 мин с рекомендованным количеством антител).

Для каждого описанного выше случая окрашивания клеток выполняли процедуру проточной цитофлуорометрии 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.

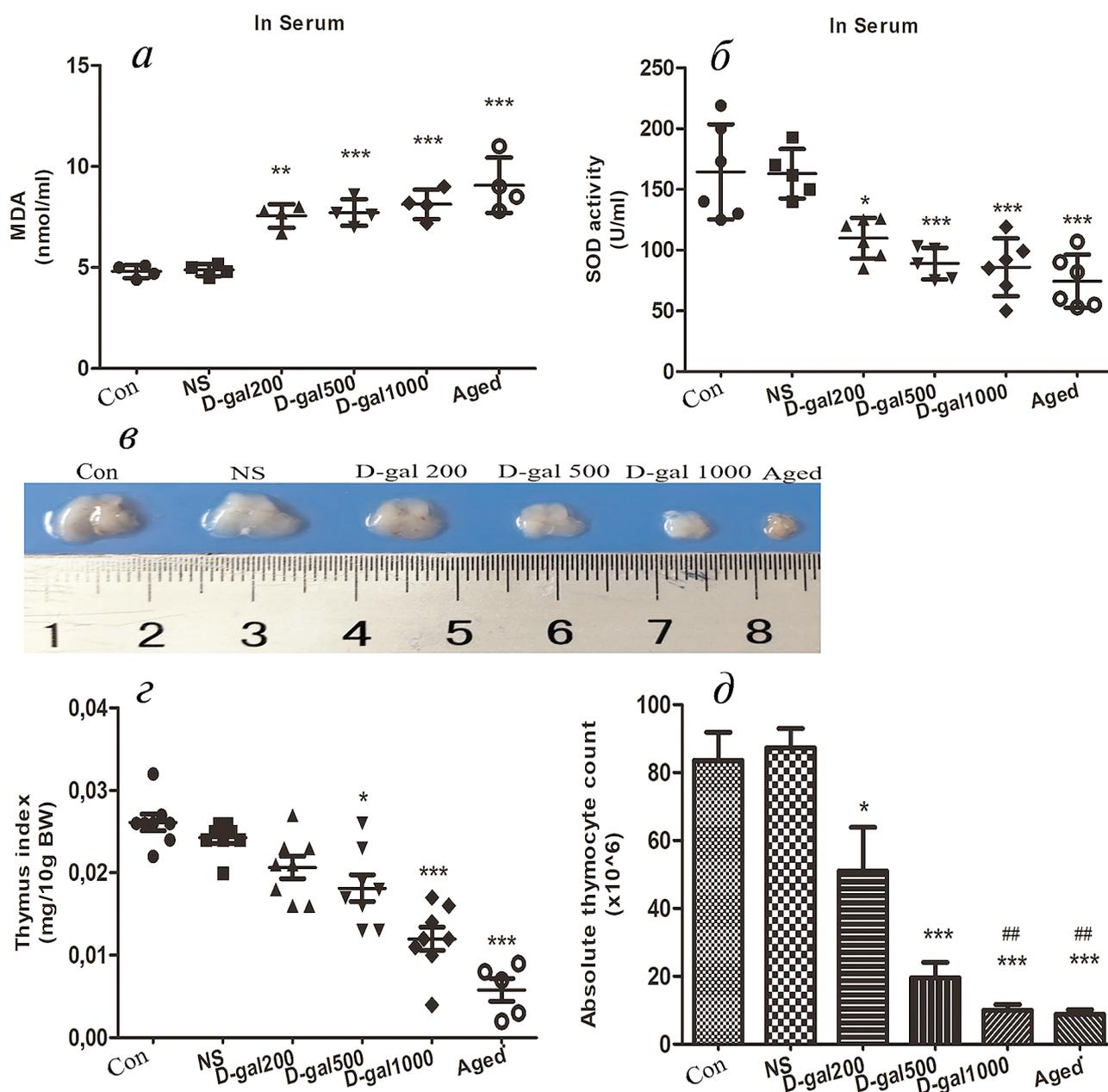


Рис. 1. Окислительный стресс и атрофия тимуса, индуцированные инъекцией D-Gal (ежедневно, 60 дней) у мышей линии C57/BL6. *а* – Содержание MDA в сыворотке мышей в возрасте 4 месяца, обработанных D-Gal (200, 500, 1000 мг/кг/день), «юных» необработанных мышей (4 месяца, Con), мышей в возрасте 4 месяца, 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⁺, 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⁺CD28⁻ («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^{hi} (отражает количество Т-клеток, контактирующих с собственными антигенами); наличие Т-клеток Ki67⁺ (клетки RTE с повышенной пролиферативной способностью); присутствие клеток CD4⁺/CD8⁺ 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⁺CD44^{hi}Ki67⁺ и CD8⁺CD44^{hi}Ki67⁺ (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⁺, содержащих TNF α . Было установлено, что уровни IL-6 в сыворотке

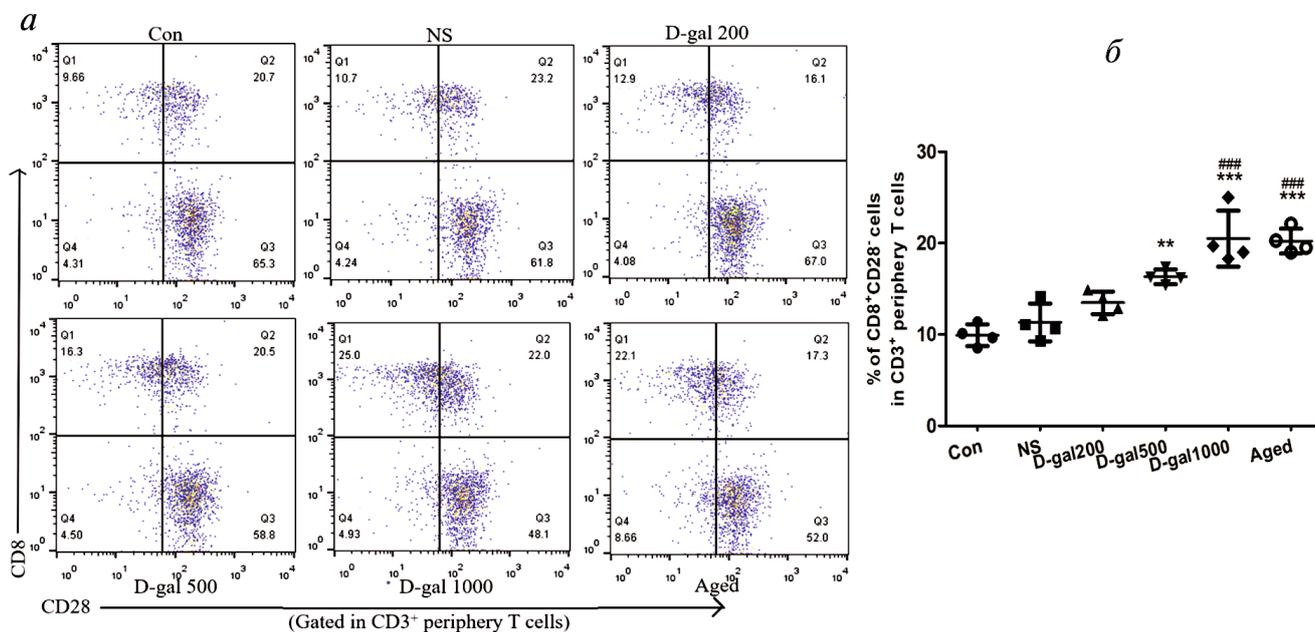


Рис. 2. Старческие изменения иммунной системы, индуцированные введением D-Gal (ежедневно, 60 дней), у мышей линии C57/BL6. а – Типичные точечные диаграммы иммунофлуоресценции клеток CD3⁺CD8⁺CD28⁻ (левые верхние квадранты) на общем фоне иммунофлуоресценции фракции всех периферических Т-клеток CD3⁺ в образцах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

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

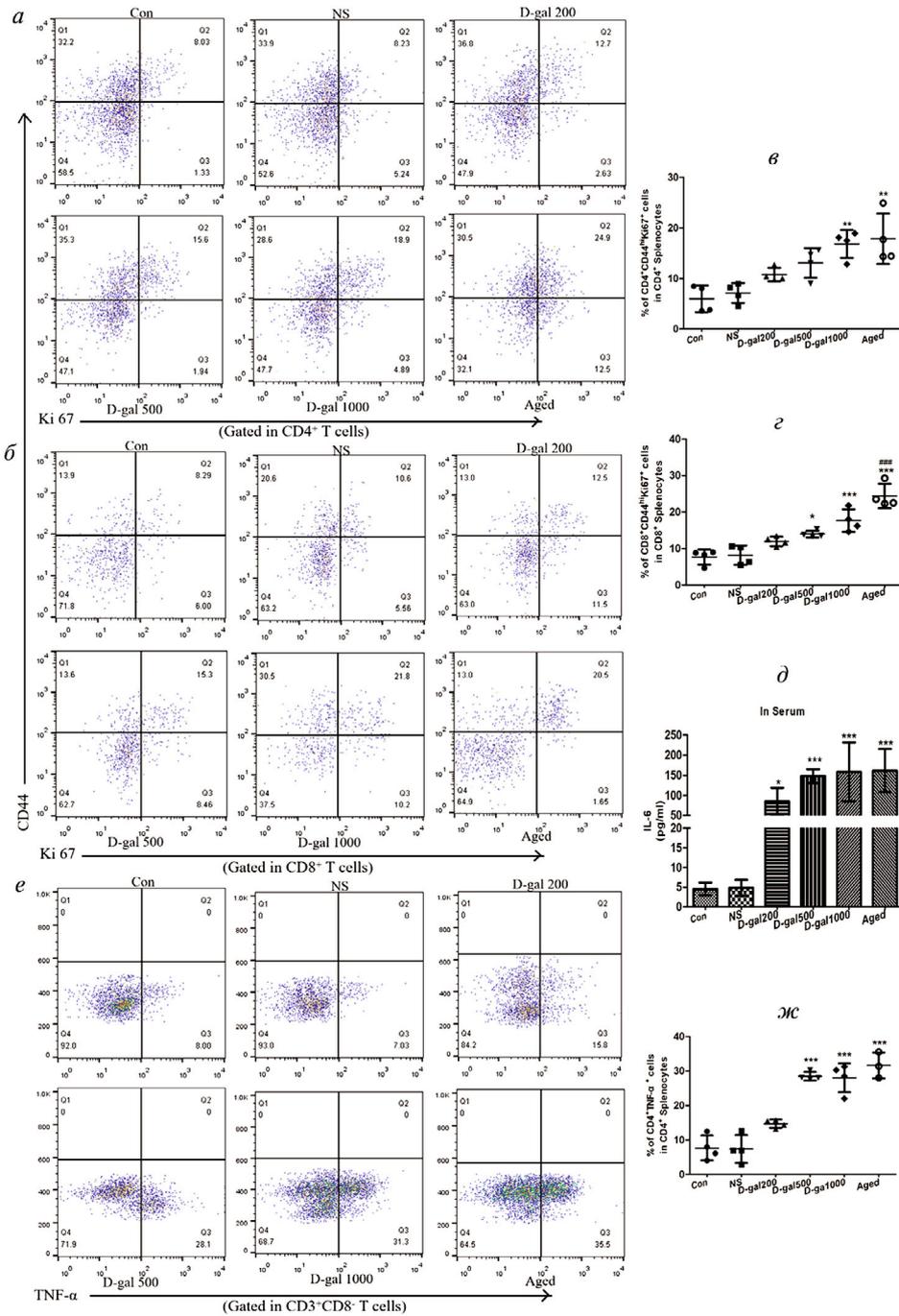


Рис. 3. Активированные иммунные клетки и хроническое воспаление низкой степени, индуцированное ежедневным введением D-Gal (60 days) у мышей линии C57/BL6. *a* – Типичные точковые диаграммы иммунофлуоресценции клеток CD44^{hi}Ki67⁺ (правый верхний квадрант) на общем фоне иммунофлуоресценции периферических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

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⁺ TNFα⁺ 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⁺CD8⁺) 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⁺CD8⁻) или CD8 SP (CD4⁻CD8⁺) 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_{reg} 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_{reg}).

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

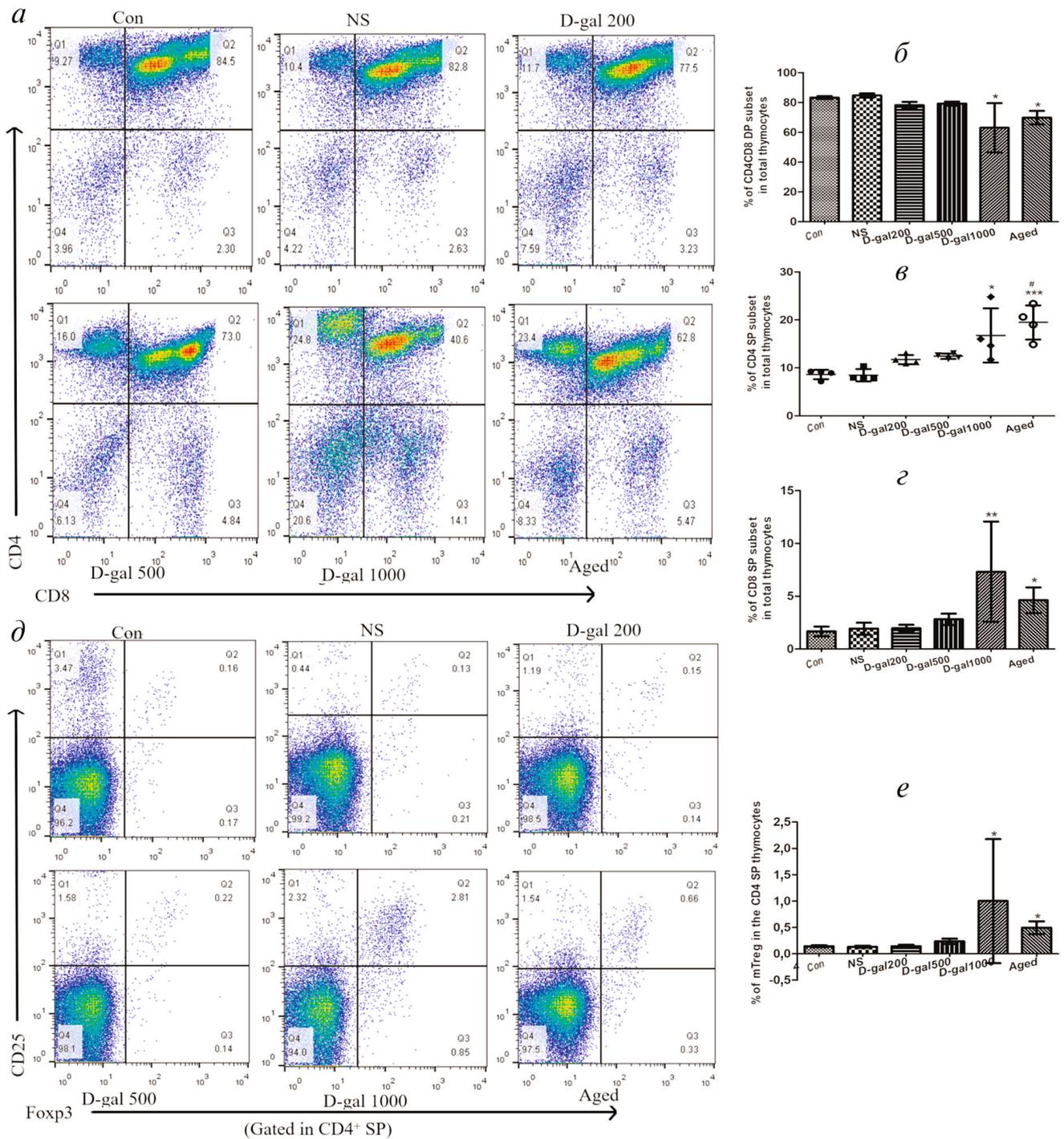


Рис. 4. Влияние D-Gal (ежедневно, 60 дней) на общую иммунную толерантность у мышей. *a* – Типичные точковые диаграммы иммунофлуоресценции популяций клеток CD4CD8 DP (CD4⁺CD8⁺, правый верхний квадрант), CD4 SP (CD4⁺CD8⁻, левый верхний квадрант) и CD8 SP (CD4⁻CD8⁺, правый нижний квадрант) среди всей популяции 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⁺Foxp3⁺ на фоне общей флуоресценции тимоцитов CD4 SP. *e* – Процентное содержание регулирующих клеток CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ (mT_{reg}) 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/>

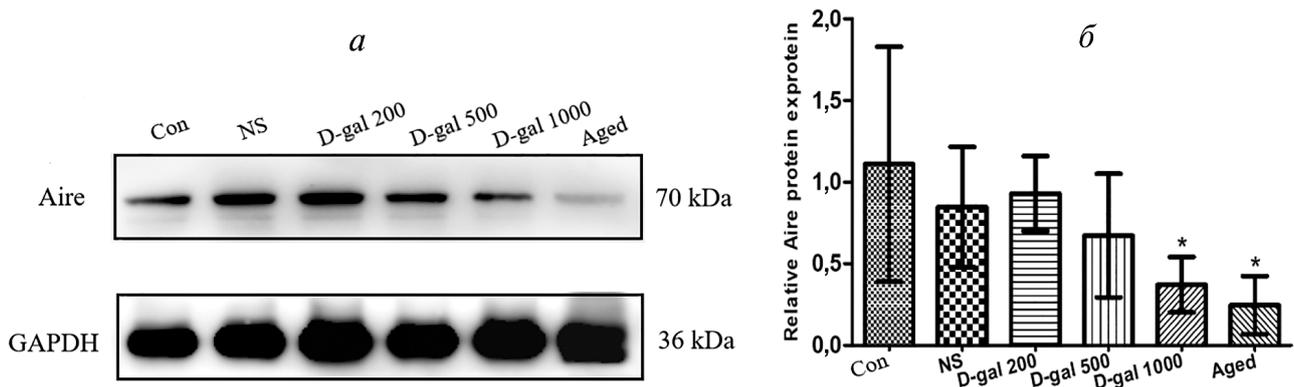


Рис. 5. Влияние D-Gal на экспрессию фактора Aire в тимусе. *a* – Типичная картина вестерн-блоттинга экстракта из тимуса, демонстрирующая экспрессию Aire и GAPDH. *б* – Относительные уровни экспрессии Aire у мышей, обработанных D-Gal, и у контрольных животных. * $p < 0,05$ относительно Con, NS и 200 мг 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⁻CD8⁻ (ди-негативными, DN) и CD4⁺CD8⁺ (ди-позитивными, DP) тимоцитами. В мозговом слое тимуса субпопуляция mТЕС взаимодействует с более зрелыми клеточными субпопуляциями, такими как CD4⁺/CD8⁻ (моно-позитивные, SP) и регуляторные Т-клетки CD4⁺Foxp3⁺ (mT_{reg}). 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 fullereneol 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., Szveda, 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., Kyriassoudis, 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- κ 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^{1,2}, Y. J. Wang¹, X. Liu¹, S. L. Wang²,
S. M. Wu³, Z. Yuan³, and X. K. Zhu^{1*}**

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

² *Department of Oncology, Shengjing Hospital of China Medical
University, Shenyang 110022, China*

³ *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