

БИОГЕРОНТОЛОГИЯ

УДК 577.24

КОЛИЧЕСТВЕННЫЕ ИЗМЕНЕНИЯ СУБПОПУЛЯЦИОННОГО СОСТАВА Т-КЛЕТОК НА ФОНЕ ХРОНИЧЕСКИХ НЕСПЕЦИФИЧЕСКИХ ВОСПАЛИТЕЛЬНЫХ ЗАБОЛЕВАНИЙ У ДОЛГОЖИТЕЛЕЙ

Топорова С.Г., Мирошниченко И.В., Столпникова В.Н., Левашова Т.В.

Российский национальный исследовательский медицинский университет им. Н.И. Пирогова, Российский геронтологический научно-клинический центр, Москва, Россия, e-mail: clinicarnimu@mail.ru

Цель исследования – установить связь между хроническим и иммунным воспалением у долгожителей и иммуностарением. Путем ретроспективного анализа историй болезни и иммунограмм (метод полихромной проточной цитометрии) первичного скринингового обследования у 98 долгожителей было показано, что большую часть из них составили лица с 2-3 ХНВЗ, увеличением численности активированных CD3⁺ HLA-DR Т-клеток (Т_{акт}) и дефицитом количества CD4⁺ и CD8⁺. По данным кластерного анализа были сформированы 2 группы пациентов с однотипными изменениями количества CD4⁺/CD8⁺/Т_{акт}, которые отражали состояние Т-клеточного иммунитета: активацию и дефицит. Установлена связь между ХНВЗ, независимо от их числа и локализации, и разной степенью дефицита количества CD4⁺ и /или CD8⁺. Связь ХНВЗ с развитием у долгожителей иммунного воспаления позволяет рассматривать их как возможную причину иммуностарения.

Ключевые слова: хроническое воспаление, активированные CD3⁺ HLA-DR Т-клетки, иммунодефицит, кластерный анализ, долгожители.

QUANTITATIVE CHANGES IN SUBPOPULATIONS OF T-CELLS WITH CHRONIC NONSPECIFIC INFLAMMATORY DISEASES IN CENTENARIANS

Toporova S.G., Miroshnichenko I.V., Stolpnikova V.N., Levashova T.V.

Russian national research medical university N.I. Pirogov, Russian gerontological research center, Moscow, Russia, e-mail: clinicarnimu@mail.ru

The purpose of the study was to establish an association between chronic and immune inflammation in centenarians and immune aging. By means of retrospective analysis of case histories of 98 centenarians

and immunograms obtained by the polychromatic flow cytometry method) it was shown that the majority of patients had 2-3 HNVZ, increased number of activated CD3⁺ HLA-DR - T cells (T_{act}), CD4⁺ and CD8⁺ deficiency. According to the cluster analysis 2 groups of patients were formed which demonstrated the similar types of changes in the amount of CD4⁺/CD8T⁺ /T_{act}, which reflected the state of the T- cells immunity, its activation and deficiency. The associations between HNVZ regardless of their number and location, and varying degrees of deficiency in the amounts of CD4⁺ and / or CD8⁺ were determined. The associations between HNVZ and the development of immune inflammation we regard as a cause of the immune aging.

Key words: chronic inflammation, the activated T- cell, immunodeficit, cluster analysis, ccentenarians.

Введение. Считается, что хроническое воспаление участвует в патогенезе всех заболеваний у долгожителей [4, 6, 7, 8, 11]. Возрастные изменения в иммунной системе начинаются довольно рано и касаются, прежде всего, популяции Т-лимфоцитов, которая играет ключевую роль в протекции различных заболеваний, в том числе и воспалительного генеза [9, 10]. Многими исследователями старость вообще рассматривается как Т-клеточный иммунодефицит [3].

Не вызывает сомнения, что хронические неспецифические воспалительные заболевания (ХНВЗ) тесно ассоциированы с дисфункцией иммунной системы, и прежде всего с ее Т- клеточным звеном, и могут быть фактором, влияющим на скорость иммуностарения [5, 9]. Однако многие вопросы остаются нерешенными, в частности, взаимосвязь между изменениями отдельных показателей Т-клеток и хроническим воспалением у долгожителей.

Цель исследования: установить взаимосвязь между показателями Т-клеточного иммунитета долгожителей и хроническими неспецифическими воспалительными заболеваниями (ХНВЗ) в стадии клинической ремиссии, которая представляют интерес с позиций вклада последних в иммунное воспаление и иммуностарение.

Материалы и методы. Материалом для ретроспективного анализа явились истории болезни и иммунограммы первичного скринингового лабораторного обследования 98 пациентов в возрасте 90 - 101 г, находившихся в клинике НКЦ геронтологии. В истории болезни оценивали структуру соматической патологии и подсчитывали число ХНВЗ с учетом их локализации. В иммунограммах, полученных методом четырехцветной проточной цитофлуорометрии периферической крови и набора моноклиальных антител – МкАТ (прибор FACSCalibur фирмы Becton Dickinson), анализировали количество субпопуляций с фенотипами CD3⁺CD4⁺ (CD4⁺), CD3⁺CD8⁺ (CD8⁺).

Для оценки функционального потенциала эффекторных клеток дополнительно определяли численность активированных $CD3^+HLA-DR^+$ ($T_{акт}$), длительное повышение уровня которых рассматривается как маркер хронического воспаления. В качестве фактора, влияющего на количество $CD4^+$, $CD8^+$ и $T_{акт}$ рассматривали число и локализацию ХНВЗ на фоне полиморбидности; в качестве фактора, влияющего на иммуностарение - развитие иммунного воспаления.

Критерием исключения из анализа явились истории болезни пациентов с указанием на наличие сахарного диабета II типа и обострения хронического воспалительного процесса. Статистическую обработку провели стандартными методами вариационной статистики. Определяли частоту отклонений показателей от нормы ($E \pm I_{95}, \%$) с I при уровне вероятности 95 ($M \pm I_{95}$). Сравнение средних показателей проводили с помощью t-критерия Стьюдента. Данные статистической обработки результатов исследования сопоставляли с общепринятой нормой для практически здорового человека среднего возраста.

Результаты исследования и их обсуждение. В структуре заболеваемости долгожителей преобладали болезни сердечно-сосудистой системы: ишемическая болезнь сердца (78%), стенокардия (65%), гипертоническая болезнь (43%), артериальная гипертензия (14%); атеросклеротические поражения церебральных (82%) и коронарных сосудов (51%), периферических артерий (51%). У 71% - выявлены дегенеративные заболевания опорно - двигательной системы. Из иволютивных процессов чаще выявляли катаракту (23%) и тугоухость (18%). Индекс морбидности у долгожителей находился в пределах $2,21 \pm 0,18 - 2,96 \pm 0,16$.

У всех пациентов в анамнезе отмечено наличие от 1 до 6 ХНВЗ разной локализации в состоянии клинической ремиссии. Из общего числа долгожителей 76,5% имели 1-3 ХНВЗ, 23,5% - 4 - 6. В большинстве случаев они были связаны с сосудистой патологией (атеросклероз) - 100%, со слизистыми оболочками пищеварительного тракта - 56% и верхних дыхательных путей - 18%; мочевой - 37% и половой - 10% систем. Клинических проявлений аутоиммунных процессов и аллергии в историях болезни не зафиксировано.

По данным статистической обработки количества субпопуляций Т-клеток у всех долгожителей отмечено реальное ($p < 0,05$) снижение численности $CD8^+$ ($211,4 \pm 14,3$ кл/мкл) в 78% случаев и $CD4^+$ ($433,6 \pm 23,1$ кл/мкл) - в 41%. У 27% пациентов количество $CD4^+$ было повышено и составляло $1325,0 \pm 52,13$ кл/мкл ($p < 0,05$). У 82,7%

долгожителей выявлено длительное увеличение численности $T_{акт}$ ($347,4 \pm 27,9$ кл/мкл, $p < 0,05$), подтверждающее наличие хронического воспаления и состояния активации эффекторных клеток.

Однако общая количественная характеристика отдельных субпопуляций недостаточно информативна в плане оценки состояния иммунитета по отношению к каждому из пациентов. Поэтому для дальнейшей статистической обработки показатели были разбиты по тем параметрам, которые были предложены в статье И.В. Мирошниченко с соавт. [2]. Был выделен кластер показателей $CD4^+$, $CD8^+$ и $T_{акт}$ и отобраны иммунограммы с разными типами их отклонений от нормы. Отклонения показателей от нормы по типу $CD4^+N/CD8^+N$; $CD4^+\uparrow/CD8^+N$; $CD4^+\uparrow/CD8^+\uparrow$ и увеличением количества $T_{акт}$ отражали состояние активации $CD8^+$ и/или $CD4^+$, где N- величина, соответствующая физиологической норме, \uparrow - выше нормы, \downarrow - ниже нормы. Отклонения показателей от нормы по типу $CD4^+\uparrow/CD8^+\downarrow/T_{акт}\uparrow/N$; $CD4^+N/CD8^+\downarrow/T_{акт}\uparrow/N$; $CD4^+\downarrow/CD8^+\downarrow/T_{акт}\uparrow/N$ с неоднозначными изменениями численности $T_{акт}$ отражали состояние дефицита $CD8^+$ и/или $CD4^+$.

В соответствии с выделенными типами отклонений были «сформированы» группы пациентов, состояние иммунитета которых, с учетом количества $T_{акт}$, соответствовало разной степени активации (группа 1) или дефицита $CD8^+$ и/или $CD4^+$ (группа 2), средние значения количества субпопуляций в которых представлены в (табл. 1).

Группа 1 включала 21,4% больных с увеличенным или в пределах нормы количеством $CD8^+$ и/или $CD4^+$ и повышенной численностью $T_{акт}$. Группу 2 составили 78,6% пациентов с дефицитом $CD8^+$ и/или $CD4^+$. Из них у 61,2 % больных численность $T_{акт}$ была увеличена на фоне дефицита количества $CD8^+$, у 17,4% - находилась в пределах нормы, что свидетельствует об ослаблении или даже невозможности (при $T_{акт} N$) иммунного ответа на хроническое воспаление.

Таким образом, количественная характеристика субпопуляций T-клеток свидетельствует о разной степени ослабления иммунитета у долгожителей, проявляющегося состояниями гиперактивации (17,4%), аутоиммунных реакций (22,4%) и вторичного дефицита $CD8^+$ и/или $CD4^+$ (42,8%).

Таблица 1.

Количественная характеристика субпопуляций Т-клеток в группах долгожителей в зависимости от вариантов одностипных отклонений от нормы CD4⁺/CD8⁺, и частота выявления численности T_{акт}↑ и T_{акт} N (E ± I₉₅)

№№ групп по вариантам отклонений от нормы количества CD4 ⁺ /CD8 ⁺	n	M ± I ₉₅ (кл/мкл) для субпопуляций при разном состоянии иммунитета				E ± I ₉₅ , % для показателей	
		CD4 ⁺	CD8 ⁺	T _{акт} ↑	T _{акт} N	T _{акт} ↑	T _{акт} N
Группа 1:	21	Состояние активации CD4 ⁺ и/или CD8 ⁺					
CD4 ⁺ N/CD8 ⁺ N	11	756 ±19	563 ±30	378 ±59*	-	100	-
CD4 ⁺ ↑/CD8 ⁺ N	6	1270 ±74*	595 ±39	450 ±58*	-	100	-
CD4 ⁺ ↑/ CD8 ⁺ ↑	4	1527 ±87	833 ±47	344 ±61*	-	100	-
Группа 2:	77	Состояние дефицита CD8 ⁺ и/или CD4 ⁺					
CD4 ⁺ ↑/ CD8 ⁺ ↓	13	1291 ±77*	252 ±21*	269 ±56*	53 ±6	85±20	15±18
CD4 ⁺ N↑/ CD8 ⁺ ↓	22	761 ±21	230 ±16*	226 ±18*	74 ±9	77±18	23±16
CD4 ⁺ ↓/ CD8 ⁺ ↓	42	434 ±24*	191 ±13*	206 ±13*	57 ±6	76±18	24±13
Примечание: * - p < 0,05, статистически достоверное уменьшение (↓) или увеличение (↑) среднего значения показателя, по сравнению с вариантом N/N группы 1; n-число пациентов.							

В механизме выявленных реакций гиперчувствительности замедленного типа, морфологическим проявлением которых является иммунное воспаление, существенную роль могли играть число и локализация ХНВЗ. У пациентов обеих групп отмечено наличие 1 - 6 ХНВЗ разной локализации. Количество ХНВЗ у каждого из них в большинстве случаев (76,5%) составляло 1 - 3, у остальных – 4 - 6. Но чаще (67,3%) встречались больные с 2-3 ХНВЗ, независимо от состояния иммунитета, хотя пациентов с дефицитом CD8⁺ и/или CD4⁺ было в 3,7 раза больше (табл. 2).

Таблица 2.

Связь частоты выявления различного количества ХНВЗ с состоянием
 иммунитета у долгожителей

Состояние иммунитета	Число паци- ентов	Количество ХНВЗ у одного пациента					
		Частота выявления различного количества ХНВЗ (/%)					
		1	2	3	4	5	6
активация	21	9	38	29	9	5	9
дефицит	77	9	31	36	16	6	1

Выявленное у большинства долгожителей (78,6%) состояние дефицита CD8⁺ и/или CD4⁺ свидетельствует о возникновении иммунного воспаления независимо от количества имеющихся у них ХНВЗ. Сопоставление количества ХНВЗ и численности T_{акт} у каждого долгожителя показало, что при одинаковой частоте выявления повышенных значений численности T_{акт}, степень ее увеличения у пациентов с 4-6 ХНВЗ, по сравнению с 1-3, была меньше в 1,8 раза (табл. 3), что могло быть обусловлено разным состоянием их иммунитета.

Таблица 3.

Связь количества ХНВЗ с частотой выявления (E±I₉₅) и численностью
 (M ± I₉₅) T_{акт} у долгожителей

Число ХНВЗ у 1 пациента	Число долгожител ей (n= 98)	E±I ₉₅ (n/%) для числа:		M ± I ₉₅ (кл/мкл) для числа:	
		T _{акт} N <10 (n=17)	T _{акт} ↑ >10 (n=81)	T _{акт} N <100 (n=17)	T _{акт} ↑ >100 (n=81)
1 -3	75	14/18,7	61/ 81,3	77,0±18,0	382,4±26,8*
4-6	23	3/13,1	20/86,9	59,5±3,8	217,1±27,5**

* - здесь и далее P <0,05. ** P <0,05 по отношению к показателю при 1 -3 ХНВЗ.

Детальный анализ связи числа ХНВЗ с количеством $T_{акт}$ в зависимости от состояния иммунитета выявил более широкий диапазон изменений количества маркера у пациентов с 1-3 ХНВЗ: от повышения численности $T_{акт}$ в 5 раз при активации $CD4^+$ и/или $CD8^+$ до 2,5 раз, и даже появления их значений в референсном интервале у 11,2% из них, при дефиците $CD4^+$ и/или $CD8^+$ (табл. 4). По сравнению с ними, степень повышения численности $T_{акт}$ у пациентов с 4 - 6 ХНВЗ была меньше (2,4 - 2,7 раз) независимо от состояния иммунитета.

Таблица 4.

Связь количества ХНВЗ у каждого из долгожителей с частотой выявления и численностью $T_{акт}$ в зависимости от состояния иммунитета

Состояние иммунитета	Число ХНВЗ	Число пациентов	E±I ₉₅ (n/%) для значений		M ± I ₉₅ (кл/мкл) для значений	
			$T_{акт}$ N <10 (n=17)	$T_{акт}$ ↑ >10 (n=81)	$T_{акт}$ N <100 (n=17)	$T_{акт}$ ↑ >100 (n=81)
Группа 1 Активация	1-3	16	-	16/15,3	-	493,3±51,2*
	4-6	5	-	5/5,1	-	242,2±41,2*
Группа 2 дефицит	1-3	59/11,2	14/11,2	45/39,8	63,8±6,5	215,2±19,4*
	4-6	18	3/3,0	15/15,3	59,5±3,8	265,4±26,8*

* P<0,05 по сравнению с показателями физиологической нормы; N – норма, > - больше, < - меньше; ↑-увеличение.

Как уже указывалось, прямая связь между количеством ХНВЗ у каждого из долгожителей со степенью нарушения состояния их иммунитета не прослеживается. Например, из 11 больных с количеством субпопуляций в пределах референсного интервала ($CD4^+N/CD8^+N$) и повышенной численностью $T_{акт}↑$ по одному - имели разное число ХНВЗ (6, 5, 4 и 3 каждый), остальные 7 – по 2. Возможно это в какой-то степени могло быть связано с полиморбидностью и действием ксенобиотиков [1, 9]. С другой стороны, в группу долгожителей только с 1 воспалением вошли 10 пациентов с

артериосклерозом (ИБС, ГБ, ДЭП) в возрасте 90-96 лет. Хотя эта информация вызывает сомнения и не все имеющиеся ХНВЗ могли быть пациентами просто указаны, тем не менее, мы эти данные обработали отдельно. У одного из них были отмечены изменения численности субпопуляций по типу $CD4^+ \uparrow CD8^+ N / T_{акт} \uparrow$, указывающие на состояние активации иммунного ответа; у 6-и - изменения по типу $CD4^+ N CD8^+ \downarrow / T_{акт} \uparrow / N$, свидетельствующие о наличии аутоиммунного процесса; у 3-х - по типу $CD4^+ \downarrow CD8^+ \downarrow / T_{акт} \uparrow / N$ - соответствующие состоянию дефицита $CD8^+$.

Что касается влияния локализации ХНВЗ на численность $T_{акт}$ у долгожителей, то сравнительный анализ не выявил реальной связи последних с конкретной нозологической формой. Содержание повышенного количества в крови $T_{акт}$ клеток у долгожителей с разным состоянием иммунитета в зависимости от локализации ХНВЗ статистически достоверных различий не имело (табл. 5).

Таблица 5.

Связь локализации ХНВЗ с количеством $T_{акт}$ и состоянием иммунитета у долгожителей

Локализация ХНВЗ	Число пациентов	Состояние иммунитета	E ± I ₉₅ (n/%) для значений:		M ± I ₉₅ (кл/мкл) для значений:	
			актТ N < 100 (n=17)	актТ↑ > 100 (n=81)	актТ N < 100 (n=17)	актТ↑ > 100 (n=81)
Атеросклероз	10	активация	1/10	-	-	499
		дефицит	3/30	6/60	77,0±±20,5	265,4±26,8*
Пиелонефрит	37	активация	-	12/32	-	373,5±49,2*
		дефицит	5/14	20/54	44,8±7,0	271,2±26,0*
Пищеварит. тракт	60	активация	-	26/43	-	334,3±72,4*
		дефицит	2/3	32/54	60,6±18,7	219,3±63,4*
Верх дых. пути	35	активация	-	9/26	-	407,5±112,4*
		дефицит	-	26/74	-	173,2±36,4*
Простатит	14	активация	-	5/36	-	308,0±117,0*
		дефицит	4/28	5/36	65,0±12,2	146,5±21,4*

N – физиологическая норма, ↑-увеличение; > больше, < меньше.

В какой-то мере это могло быть связано с большим разбросом индивидуальных значений численности $T_{акт}$, а также с различным количеством пациентов в сравниваемых группах.

Т.о., большую часть долгожителей составили лица с 2-4 ХНВЗ и дефицитом $CD8^+$ и/или $CD4^+$ (76,5%), среди которых у 45% - количество $T_{акт}$ было повышено в 2 - 2,5 раза, у 14,3% - в пределах физиологической нормы, что свидетельствует об ослаблении или неспособности иммунной системы отвечать на хронический воспалительный процесс. Выявленное 4 - 5-кратное увеличение количества $T_{акт}$ у 17,3% больных с численностью $CD8^+ / CD4^+$ в пределах физиологической нормы указывает на недостаточную эффективность процесса активации субпопуляций и может быть причиной пролонгирования хронизации воспаления.

На основании собственных данных можно заключить, что для развития иммунного воспаления у долгожителей может быть достаточно наличия любого числа ХНВЗ, которые можно рассматривать в качестве пускового и поддерживающего механизма повреждения тканей, характерных для возрастассоциированных заболеваний [6].

Выводы.

1. Установлена связь между наличием ХНВЗ, независимо от их числа и локализации, и различным состоянием Т-клеточного иммунитета: активацией или дефицитом $CD4^+$ и / или $CD8^+$.

2. Большую часть долгожителей (78,6%) составили лица с 2 - 4 ХНВЗ (67%) и разной степенью количественного дефицита $CD8^+$ и / или $CD4^+$, среди которых у 61% численность $T_{акт}$ была повышена, у 17% – в пределах физиологической нормы, что свидетельствует о снижении способности иммунной системы отвечать на хронический воспалительный процесс и развитии иммунного воспаления.

3. Связь ХНВЗ с развитием у долгожителей иммунного воспаления позволяет рассматривать хроническое воспаление как реальную причину иммуностарения.

4. Представленные данные свидетельствуют о взаимосвязи иммунного воспаления и иммуностарения, одним из пусковых и поддерживающих механизмов которого является наличие хронического воспаления.

Список литературы.

1. Лебедев К.А. Сочетание двух сигналов опасности (микроорганизмы и ксенобиотики) – основная причина активации хронических воспалительных процессов / К.А. Лебедев // Физиология человека. - 2012. - Т. 38, № 5. – С. 112 - 119.
2. Мирошниченко И.В. Возрастные изменения показателей иммунитета у пациентов с сахарным диабетом II типа / И.В. Мирошниченко, Т.В. Левашова, В.Н. Столпникова [и др.]. // Вестник РГМУ. – 2014. - № 1. - С. 5 - 9.
3. Ярилин А.А. Старение иммунной системы и тимус / А.А. Ярилин // Клиническая геронтология. – 2003. - Т. 9, № 3. - С. 8 - 17.
4. Candore G. Immunological and Immunogenetic markers of successful and unsuccessful ageing / G. Candore, G. Colonna-Romano, D. Lio [et al.]. // Advances in Cell Aging and Gerontology. – 2003. - № 13. - P. 29 - 45.
5. Caruso C. Mechanisms of immunosenescence / C. Caruso, S. Buffa, G. Candore [et al.]. // Immunity&Ageing. –2009. - №. 6. - P. 10 - 18.
6. Franceschi C. Inflamm-aging. An evolutionary perspective on immunosenescence / C. Franceschi, M. Bonafe, S. Valensin [et al.]. // Ann NY Acad Sci. – 2000. - №. 908. - P. 208 - 218.
7. Globerson A. Ageing of lymphocytes and lymphocytes in the aged / A. Globerson, R.B. Effros, // Review immunology today. - 2000. – Vol. 21, № 10. - P. 515 - 521.
8. Howcroft T.K. The role of inflammation in age-related disease / T.K. Howcroft, Y. Campisi, G.B. Louis [et al.]. // Aging. – 2013. - Vol. 5, № 1. - P. 84 - 93.
9. Krabbe K.S. Inflammatory mediators in the elderly / K.S. Krabbe, M. Pedersen, H. Bruunsgaard // Exp. Gerontol. – 2004. – № 39. – P. 687 - 699.
10. Miller R.A. Ageing and immune function / R.A. Miller // Int. Rev. Cytol. – 1999. - № 124. – P. 184 - 215.
11. Pawelec G. T cells and aging / G. Pawelec, Y. Barnett, R. Forsey [et al.]. // Front Biosci. – 2002. - № 7. – P. 1056 - 1183.

References.

1. Lebedev K.A. *Fiziologija cheloveka*. 2012, Vol. 21, no. 5, pp. 112 - 119.

2. Miroshnichenko I.V., Levashova T.V., Stolpnikova V.N., Sorokina E.A. *Vestnik RGMU*. 2014, no. 1, pp. 5 - 9.
3. Jarilin A.A. *Klinicheskaja gerontologija*. 2003, Vol. 9, no. 3, pp. 8 - 17.
4. Candore G., Colonna-Romano G., Lio D., Caruso C. *Advances in Cell Aging and Gerontology*. 2003, no. 13, pp. 29 - 45.
5. Caruso C., Buffa S., Candore G., Colonna-Romano G., Dunn-Walters D., Kipling D., Pawelec G. *Immunity&Ageing*. 2009, no. 6, pp. 10 - 18.
6. Franceschi C., Bonafe M., Valensin S., Olivieri F., De Luca M., Ottaviani E., De Benedictis G. *Ann NY Acad Sci*. 2000, no. 908, pp. 208 - 218.
7. Globerson A., Effros R.B. *Revief immunology todau*. 2000, Vol. 21, no. 10, pp. 515 - 521.
8. Howcroft T.K., Campisi Y., Louis G.B. [et al.]. *Aging*. 2013, Vol. 5, no. 1, pp. 84 - 93.
9. Krabbe K.S., Pedersen M., Bruunsgaard H. *Exp. Gerontol*. 2004, no. 39, pp. 687 - 699.
10. Miller R.A. *Jnt. Rev. Cytol*. 1999, no. 124, pp. 184 - 215.
11. Pawelec G., Barnett Y., Forsey R., Frasca D., Globerson A., McLeod J., Caruso C., Franceschi C., Fulop T., Gupta S., Mariani E., Mocchegiani E., Solana R. *Front Biosci*. 2002, no. 7, pp. 1056 -1183.