

УДК 591.147.3:612.11:57.084

ДИНАМИКА МОРФОЛОГИЧЕСКИХ ИЗМЕНЕНИЙ В ТИМУСЕ МЫШИ ПОСЛЕ ИММУНИЗАЦИИ*А.В. Полевщиков¹⁻³, О.В. Гурова², М.Д. Засеева², И.С. Старская³, В.В. Гусельникова^{2,3}*¹ Дальневосточный федеральный университет (690950, г. Владивосток, ул. Суханова, 8),² Санкт-Петербургский государственный университет (199034, г. Санкт-Петербург, Университетская наб., 7–9),³ НИИ экспериментальной медицины СЗО РАМН (197376, г. Санкт-Петербург, ул. акад. Павлова, 12)**Ключевые слова:** гематотимический барьер, лимфоциты, макрофаги, моноклональные антитела.**DYNAMIC OF IN MUSCLE THYMUS AFTER IMMUNIZATION**A.V. Polevschikov¹⁻³, O.V. Gurova², M.D. Zasseeva², I.S. Starskaya³, V.V. Guselnikova^{2,3}¹ Far East Federal University (8 Suhanova St. Vladivostok 690950 Russian Federation), ² St. Petersburg State University (7–9 University nab. St. Petersburg 199034 Russian Federation),³ SRI of Experimental Medicine NW RAMS (12 Pavlov St. St. Petersburg 197376 Russian Federation)**Background.** Status of thymus as central organ of immune system suppose its protection from external antigens by hematothymus barrier, but in 1960–90^s was shown possibility of external antigens infiltration into this organ. Purpose of this research was to evaluate morphological changes in muscle thymus after immunization.**Methods.** Experiment was under white outbred mice and mice of CBA line, by injection into peritoneal cavity of human red blood cells and bovine serum albumin. Thymus was extracted before experiment (control) and after 24, 48, 72, 96 hours after immunization. Paraffin section with haematoxylin and eosin, toluidine blue and rabbit polyclonal antibodies to histone H3 (immunohistochemistry).**Results.** Was shown significant increase of cortex cellularity and medulla of organ after 24 hours, that reach a maximum after 72 hours and go down after 96 hours after immunization. With coloration of proliferating cells by antibodies to histone H3 was shown its localization in cortex and medulla. Was shown significant increase of number of mitosis in cortex of organ.**Conclusions.** Results of experiment show changes in thymus morphology and activation of proliferation of thymocytes in respond of injection of antigen and allow to raise a question about conventionality of hematothymus barrier and even more about involvement of thymus in process of immune response.**Keywords:** hematothymus barrier, lymphocytes, macrophage, monoclonal antibodies.

Pacific Medical Journal, 2014, No. 4, p. 41–45.

Тимус представляет собой центральный орган иммунной системы млекопитающих, который обеспечивает созревание и дифференцировку Т-лимфоцитов. Тимус активно исследуется, однако многие вопросы его строения и функций все еще остаются открытыми [15]. Морфологически в тимусе выделяют две зоны: кортекс, или корковое вещество, и медуллу, или мозговое вещество, которые разделены васкуляризованной кортико-медуллярной границей и отличаются плотностью расположения клеток [10]. Именно в кортексе, в отличие от медуллы, особенно интенсивно идут процессы пролиферации и апоптоза [3]. В субкапсулярной области кортекса можно

обнаружить крупные митотически активные лимфобласты. Для кортекса считается нормой наличие апоптотических телец и макрофагов, содержащих фагоцитированные апоптотические тельца. Кортико-медуллярная граница характеризуется наличием множества кровеносных сосудов, присутствием зрелых и незрелых Т-лимфоцитов (timoцитов) и дендритных клеток, кроме того, здесь периваскулярно встречаются В-лимфоциты и плазматические клетки [9, 10]. Медулла окрашивается менее интенсивно и содержит меньше лимфоцитов и больше эпителиальных клеток по сравнению с кортексом. Медулла может быть общей для всех долек и образовывать выпячивания, которые иногда достигают капсулы, как это имеет место у мышей. Т-лимфоциты здесь бледнее окрашены, имеют более крупные размеры и содержат больше цитоплазмы по сравнению с кортикальными лимфоцитами. Кроме лимфоцитов и тимических эпителиальных клеток, в медулле также обнаруживаются макрофаги, дендритные клетки, В-лимфоциты, тучные клетки и эозинофилы. Соотношение между кортексом и медуллой варьирует в зависимости от физиологического состояния, а на гистологических срезах оно зависит от ориентации тимуса во время приготовления препаратов [10].

Статус тимуса как центрального органа иммунной системы предполагает его защищенность от внешних воздействий, которая обеспечивается гематотимическим барьером [7]. Тем не менее многие авторы ещё в 1960–90-х годах показали возможность проникновения антигена непосредственно в тимус после его внутрибрюшинного или внутривенного введения [4, 6, 8, 13, 14]. После же введения антигена непосредственно в тимус в нем формировались зародышевые центры и появлялись плазматические клетки. Несмотря на наличие в кортексе (но не в медулле) барьерных структур – две базальные мембраны, разделенные отложениями коллагена III типа, – гематотимический барьер оказался весьма условным понятием [1]. При внутривенном введении радиоактивно меченого человеческого сывороточного альбумина и овалбумина показано проникновение антигена во внесосудистое пространство органа. Молекулы из кровотока могут свободно мигрировать в мозговое вещество тимуса через фенестрированный эндотелий венул, но в корковом веществе выход молекул из кровеносных сосудов не регистрировался [12]. Тем не менее после внутривенного введения мышам моноклональных

антител против антигена Thy-1 (CD90) они обнаруживались в коре, причем через 24 часа после инъекции большинство клеток коркового вещества оказывается покрытым меткой [5]. Очевидно, что моноклональные антитела могут мигрировать в кортекс через стенки капилляров, что противоречит общепринятому понятию о существовании гематотимического барьера даже для кортекса.

Совокупность этих данных требует проведения морфологических исследований, способных подтвердить или поставить под сомнение результаты, полученные с использованием методов молекулярной биологии и проточной цитометрии. Поэтому, целью данной работы была оценка морфологических изменений в тимусе мыши после иммунизации.

Материал и методы. В ходе экспериментов (декабрь 2012 – май 2014 г.) использовали самок нелинейных белых мышей, а также самцов и самок мышей линии СВА массой в среднем 20 г (возраст 6–8 недель). Животных содержали в виварии при комнатной температуре и режиме освещения 12/12 часов. Корм и вода предоставлялись *ad libitum*.

Для изучения влияния иммунизации на морфологию тимуса мышам внутрибрюшинно вводили 5×10^8 эритроцитов человека на физиологическом растворе (0,14 М раствор NaCl) в объеме 0,5 мл на животное. Вскрытие мышей и извлечение тимуса проводили через 24, 48, 72 и 96 часов после иммунизации. Для количественной характеристики уровня митозов в тимусе после иммунизации сначала выполняли предстимуляцию животных 1% раствором декстрана (MW=60000-90000, ICN, США) в 1 мл физиологического раствора внутрибрюшинно. Через 48 часов проводили иммунизацию раствором бычьего сывороточного альбумина (БСА) в дозировке 2 мг на мышью в объеме 0,1 мл внутрибрюшинно. Вскрытие проводили на 3-и, 4-е и 5-е сутки после иммунизации. В качестве контроля использовали интактных животных. Каждая группа состояла из 5 мышей.

Животных выводили из опыта методом цервикальной дислокации, тимус фиксировали смесью спирт-формалин-уксусная кислота (9:3:1) в течение 24 часов с последующей заменой фиксатора на 70% этиловый спирт для хранения образцов. Проводку через спирты, хлороформ и заключение в парафин де-

лали по стандартной схеме. Срезы толщиной 4–5 мкм окрашивали гематоксилином и эозином или толуидиновым синим.

Для подтверждения наличия митозов в тимусе также проводили иммуногистохимическое окрашивание депарафинированных препаратов с помощью кроличьих поликлональных антител к гистону H3 (Abcam, США), используя коммерческий набор безбиотиновой визуализации Reveal Polyvalent Dab (Dako, Дания) в соответствии с рекомендациями производителя. Связавшиеся вторые антикроличьи антитела, меченые пероксидазой хрена, выявляли с помощью раствора диаминобензидина с последующей стандартной проводкой и заключением срезов. На препаратах подсчитывали число митотических фигур. Для этого использовали продольные срезы тимуса приблизительно на уровне середины органа. Подсчет выполняли в кортикальной зоне (количество митотических фигур в поле зрения микроскопа при увеличении $40\times$ (площадь приблизительно $0,15 \text{ мм}^2$). Для каждого органа подсчет проводили на 10 случайным образом выбранных полях зрения с последующим вычислением среднего значения. В каждой временной точке получали среднее значение для 5 животных. Средние значения для каждой точки сравнивали со значениями интактных мышей с помощью t-критерия Стьюдента в программе IBM SPSS Statistics 20.

Результаты исследования. Тимус мыши состоит из 2 долей, каждая из которых окружена соединительнотканной капсулой. В интактном органе можно четко выделить кортекс и медуллу. Медулла расположена в центре тимуса, а также в виде островков в толще коркового вещества. При этом бросается в глаза отсутствие вторичной лобуляции долей, характерное для большинства видов млекопитающих. Тем не менее корковое вещество тимуса не выглядит однородным, оно заметно структурировано; возможно, подобная структурированность у мышей заменяет собой лобуляцию. В районе кортико-медуллярной границы прослеживаются многочисленные кровеносные и лимфатические сосуды, при этом обычно не наблюдается лимфатических сосудов, содержащих лимфоциты. В кортексе часто встречаются митотические фигуры, что соответствует данным об активной пролиферации созревающих тимоцитов именно в этой области (рис. 1). В медулле плотность

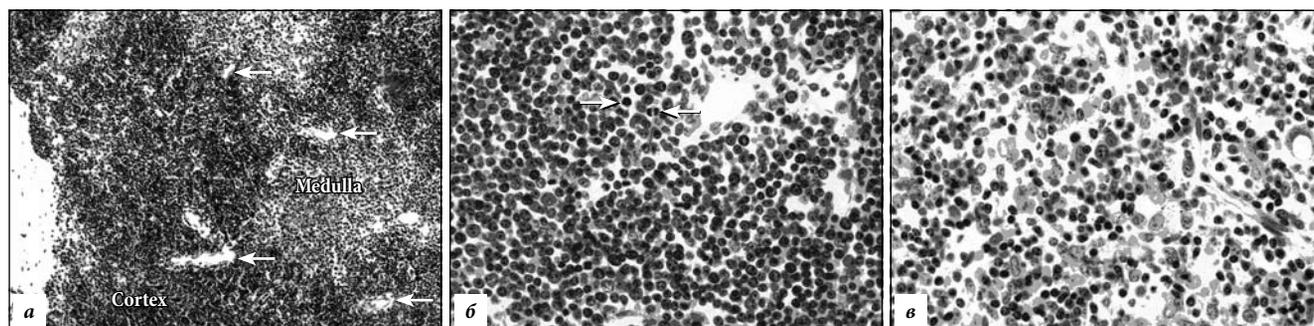


Рис. 1. Интактный тимус мыши:

а – общий вид (стрелки – просветы сосудов); б – кортекс (стрелки – фигуры митоза); в – медулла. Окр. гематоксилином и эозином; а – $\times 100$, б, в – $\times 400$.

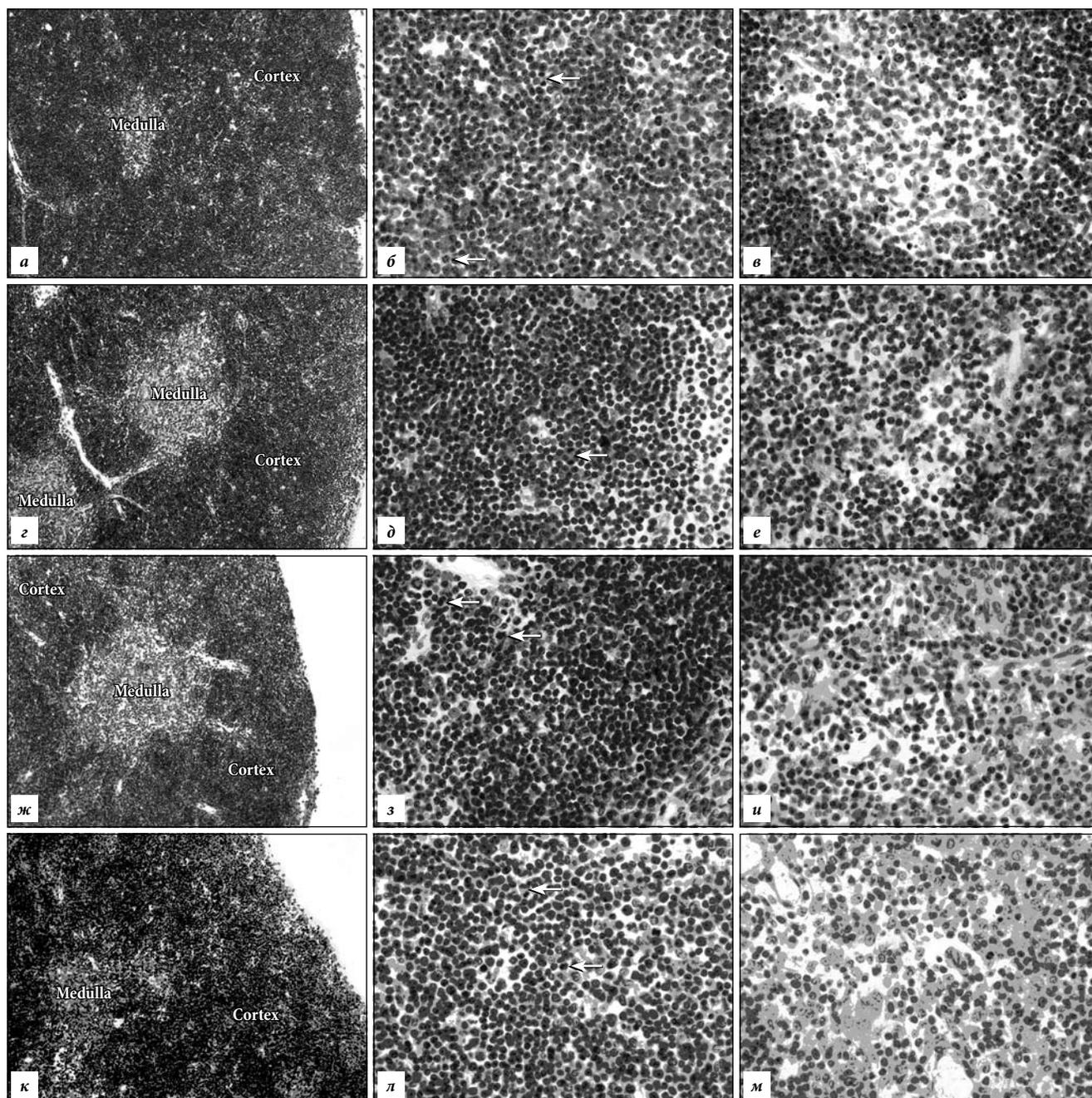


Рис. 2. Тимус мыши после иммунизации эритроцитами человека:

а-в – через 24 часа; z-е – через 48 часов; ж-и – через 72 часа; к-м – через 96 часов; а, z, ж, к – общий вид; б, д, з, л – кортекс (стрелки – фигуры митоза); в, е, и, м – медулла. Окр. гематоксилином и эозином, а, z, ж, к – $\times 100$, б, в, д, е, з, и, лм – $\times 400$.

упаковки тимоцитов заметно снижается, на их фоне просматриваются клетки стромы и межклеточное вещество. Митотические фигуры в мозговом веществе можно заметить лишь изредка.

После иммунизации не наблюдается признаков атрофии, подобной реакции на введение гидрокортизона. Тимус мышей, получивших внутрибрюшинную инъекцию суспензии эритроцитов человека, внешне походил на тимус интактных животных. Подобная картина характерна для всех экспериментальных временных точек, т.е. через 24, 48, 72 и 96 часов после иммунизации. При этом нельзя не обратить внимания

на резкое визуальное возрастание плотности клеток в кортексе тимуса уже через 24 часа после иммунизации. Площадь кортекса также увеличивалась, а медуллы – сокращалась. Через 48 часов после введения антигена происходило дальнейшее повышение плотности клеток в коре, сохранявшееся и через 72 часа после иммунизации. При этом площадь медуллы через 24 часа была минимальной, но возрастала к 48, а особенно – к 72 часам после введения эритроцитов человека. Плотность клеток в медулле на этих сроках оставалась более высокой по сравнению с интактным тимусом (рис. 2).

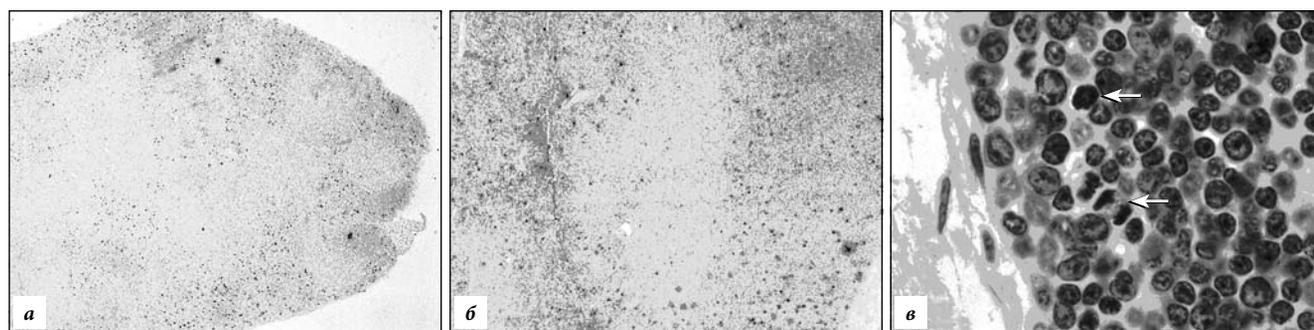


Рис. 3. Локализация пролиферирующих клеток в тимусе мыши:

а – тимус интактной мыши (контроль); б – тимус через 72 часа после иммунизации; в – многочисленные митотические фигуры (стрелки) в коре через 72 часа после иммунизации. а, б – окр. антелеми к гистону Н3, в – окр. гематоксилином и эозином; а – $\times 50$, б – $\times 100$, в – $\times 1000$.

Таблица

Динамика средней плотности лимфоцитов в корковой и мозговой зонах тимуса после иммунизации эритроцитами человека ($M \pm m$)

Срок после иммунизации, часы	Кол-во клеток на 10 000 $\mu\text{м}^2$	
	Кортекс	Медулла
0 (контроль)	244,4 \pm 14,3	113,9 \pm 8,7
24	427,8 \pm 24,4	197,2 \pm 13,1
48	552,4 \pm 31,6	269,4 \pm 22,4
72	541,7 \pm 19,7	216,7 \pm 14,8
96	383,3 \pm 17,3	166,7 \pm 8,9

Примечание: разница с контролем во все сроки наблюдения статистически значима.

В ходе анализа и обработки полученных изображений полностью подтвердилось достоверное повышение плотности клеток с морфологией лимфоцитов уже через 24 часа после иммунизации. Этот показатель становился максимальным 48 часов после введения эритроцитов, превышая показатели контроля в 2,26 раза для кортекса и в 2,37 раза для медуллы, начал снижаться через 72 часа, но превышал контроль примерно в 1,5 раза для обеих зон через и 96 часов эксперимента (табл.).

После предстимуляции декстраном и последующей иммунизацией БСА признаков атрофии тимуса не наблюдалось, в целом во всех экспериментальных временных точках общая гистологическая картина была сходна с таковой при иммунизации эритроцитами, однако с ускорением изменений в гистологической структуре тимуса на 24 часа. Предстимуляция декстраном также приводила к повышению числа пролиферирующих клеток, определенных с помощью антител в гистону Н3, как в кортексе, так и в медулле (рис. 3), и достоверному повышению числа митозов в кортексе, определенных визуально (рис. 4).

Обсуждение полученных данных. Результаты эксперимента свидетельствуют об изменении морфологии тимуса и активации пролиферации тимоцитов в ответ на внутрибрюшинное введение антигена. Усиление пролиферации тимоцитов в ответ на антигенную стимуляцию, с одной стороны, полностью соответствует

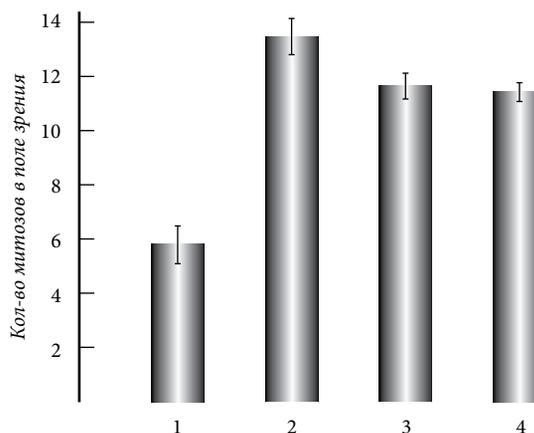


Рис. 4. Среднее число митотических фигур в кортикальной зоне тимуса после иммунизации БСА:

1 – интактные животные (контроль); 2 – 3-и сутки после иммунизации; 3 – 4-е сутки после иммунизации; 4 – 5-е сутки после иммунизации. Разница с контролем всех опытных групп статистически значима; разница между 3-ми сутками и 4–5-ми сутками статистически значима.

ряду предшествующих экспериментальных наблюдений, с другой стороны, позволяет ставить вопрос об условности понятия гематотимического барьера и даже о вовлеченности тимуса в процесс иммунного ответа. При этом можно рассматривать два пути возможного усиления пролиферации тимоцитов в ответ на введение антигена. Первый состоит в транспорте в тимус интерлейкина-3 и интерлейкина-7 (которые могут продуцироваться Т-лимфоцитами в ходе иммунного ответа в периферических лимфоидных органах [2]), обеспечивающих усиление тимопоэза. Данная гипотеза не противоречит современной концепции гематотимического барьера. В этом случае пролиферирующие тимоциты должны локализоваться исключительно в пределах тимического кортекса, что согласуется с результатами, приведенными в таблице и на рис. 4. Однако нельзя полностью исключить и варианта заноса в тимус антиген-презентирующих клеток, нагруженных антигеном вне тимуса, и прямой индукции пролиферации созревающих Т-лимфоцитов, что косвенно подтверждается рис. 2 и 3 и данными таблицы. Возможности перемещения в тимус антигенпрезентирующих клеток, содержащих антигены, была показана ранее [11]. Результаты

иммуногистохимического анализа после введения БСА непосредственно в средостение крысам, показали, что антиген обнаруживается в больших количествах как в корковом, так и в мозговом веществе тимуса, причем на самых ранних сроках окрашенными оказываются капсула и трабекулы [14]. Согласно другим данным, мышинные антитела против главного комплекса гистосовместимости II класса крыс проникают в тимус крыс как после внутрибрюшинной, так и после внутривенной инъекции, оказываясь через 60 мин в субкапсулярном пространстве, а через 12 часов достигая кортико-медулярной границы [8]. Таким образом, клетки тимуса, осуществляющие презентацию аутоантигенов созревающим тимоцитам в ходе позитивной и негативной селекции, доступны и для антигенов, которые могут проникать в тимус через капсулу. После подкожного и внутрибрюшинного введения вирусных и бактериальных антигенов морским свинкам в тимусе отмечалось увеличение числа отростчатых эпителиальных клеток, относительного количества макрофагов и общего содержания миелоидных элементов. После введения ТАВ-вакцины морским свинкам в тимусе наблюдалось формирование лимфатических узелков со светлыми центрами, которые были окружены малыми лимфоцитами. В центральной части узелков иногда наблюдались митотические фигуры. Наиболее часто такие узелки располагались в мозговом веществе и около междольковых септ, в непосредственной близости от них находились лимфатические сосуды.

Таким образом, нормальный тимус содержит все популяции клеток, которые необходимы для осуществления иммунного ответа, включая макрофаги, которые могут выступать в роли антиген-презентирующих клеток [4]. Однако эта гипотеза требует дополнительных экспериментальных доказательств, поскольку неминуемо приводит к утверждению о вовлеченности тимуса в процесс иммунного ответа, полностью ставит под сомнение концепцию гематотимического барьера и, более того, позволяет предполагать наличие антиген-зависимых этапов дифференцировки Т-лимфоцитов. На основании полученных данных можно сделать выводы, что в интактном тимусе мыши наблюдается большое число митотических фигур в кортексе, в мозговом веществе они практически отсутствуют. После иммунизации животных корпускулярным антигеном (эритроцитами человека) или растворимым антигеном (БСА) число митозов в кортексе достоверно повышается, митозы появляются также и в мозговом веществе.

Работа выполнена при финансовой поддержке программы № 1326 Дальневосточного федерального университета, грантов ДВО РАН № 12-1-П7-05 (ДВ-9.1.6.) и Санкт-Петербургского государственного университета (проект № 1.38.80.2012).

Литература

1. Васильев К.А., Полевщиков А.В. Нелимфоидные клетки тимуса рыб и проблема гематотимического барьера // Биология моря. 2014. Т. 40, №5. С. 331–341.
2. Кетлинский С.А., Симбирцев А.С. Цитокины. СПб.: Фолиант, 2008. 552 с.

3. Bai M., Doukas M., Papoudou-Bai A. [et al.] Immunohistological analysis of cell cycle and apoptosis regulators in thymus // Ann. Anat. – Anatomischer Anzeiger. 2013. Vol. 195. P. 159–165.
4. Henry L., Durrant T.E., Anderson G. Pericapillary collagen in the human thymus: implications for the concept of the 'blood-thymus' barrier // J. Anat. 1992. Vol. 181. P. 39–46.
5. Hoffmann-Fezer G., Antica M., Schuh R. [et al.] Distribution of injected anti-Thy-1 monoclonal antibodies in mouse lymphatic organs: evidence for penetration of the cortical blood-thymus barrier, and for intravascular antibody-binding onto lymphocytes // Hybridoma. 1989. Vol. 8. P. 517–527.
6. Kyewski B.A., Fathman C.G., Rouse R.V. Intrathymic presentation of circulating non-MHC antigens by medullary dendritic cells. An antigen-dependent microenvironment for T cell differentiation // J. Exp. Med. 1986. Vol. 163. P. 231–246.
7. Marshall A.H., White R.G. The immunological reactivity of the thymus // Br. J. Exp. Pathol. 1961. Vol. 42. P. 379–385.
8. Nieuwenhuis V., Stet R.J., Wagenaar J.P. [et al.] The transcapsular route: a new way for (self-) antigens to by-pass the blood-thymus barrier? // Immunol. Today. 1988. Vol. 9. P. 372–375.
9. Nishino M., Ashiku S. K., Kocher O. N. [et al.] The thymus: a comprehensive review // Radiographics. 2006. Vol. 26. P. 335–348.
10. Pearse G. Normal structure, function and histology of the thymus // Toxicol. Pathol. 2006. Vol. 34. P. 504–514.
11. Pulsford A., Fänge R., Zapata A.G. The thymic microenvironment of the common sole, *Solea solea* // Acta Zoologica. 1991. Vol. 72. P. 209–216.
12. Raviola E., Karnovsky M.J. Evidence for a blood-thymus barrier using electron-opaque tracers // J. Exp. Med. 1972. Vol. 136. P. 466–498.
13. Roberts R.L., Sandra A. Transport of transferrin across the blood-thymus barrier in young rats // Tissue Cell. 1994. Vol. 26. P. 757–766.
14. Sainte-Marie G. Antigen penetration into the thymus // J. Immunol. 1963. Vol. 91. P. 840–845.
15. Takeoka Y., Chen S.Y., Boyd R.L. [et al.] A comparative analysis of the murine thymic microenvironment in normal, autoimmune, and immunodeficiency states // Dev. Immunol. 1997. Vol. 5. P. 79–89.

Поступила в редакцию 21.08.2014.

Динамика морфологических изменений в тимусе мыши после иммунизации

А.В. Полевщиков¹⁻³, О.В. Гурова², М.Д. Засеева², И.С. Старская³, В.В. Гусельникова^{2,3}

¹ Дальневосточный федеральный университет (690950, г. Владивосток, ул. Суханова, 8); ² Санкт-Петербургский государственный университет (199034, г. Санкт-Петербург, Университетская наб., 7–9); ³ НИИ экспериментальной медицины СЗО РАМН (197376, г. Санкт-Петербург, ул. акад. Павлова, 12)

Резюме. Работа посвящена анализу морфологических изменений тимуса мыши после иммунизации белых беспородных мышей и мышей линии СВА. Иммунизацию проводили внутрибрюшинно эритроцитами человека и бычьим сывроточным альбумином. Тимус извлекали до исследования (контроль) и через 24, 48, 72 и 96 часов после иммунизации. Гистологически и иммуногистохимически установлено достоверное повышение клеточности кортекса и медуллы уже через 24 часа, которая достигала максимума через 72 часа и начинала снижаться через 96 часов после иммунизации. При окрашивании пролиферирующих клеток антителами к гистону H3 показана их локализация в кортексе и медулле, а в контроле – только в кортексе. Обнаружен достоверный прирост числа митозов в кортексе. Обсуждаются возможные пути вовлечения тимуса в процесс иммунного ответа.

Ключевые слова: гематотимический барьер, лимфоциты, макрофаги, моноклональные антитела.