

УДК 599.323.4:612.63-114.73

## ИММУНОФЕНОТИПИРОВАНИЕ КЛЕТОК МИКРООКРУЖЕНИЯ ТИМУСА У ПОТОМСТВА САМОК С ВТОРИЧНЫМ ИММУНОДЕФИЦИТОМ

**Драндрова Е.Г.**

*ФГБОУ ВПО «Чувашский государственный университет им. И.Н. Ульянова»,  
Чебоксары, e-mail: drandrov@yandex.ru*

В статье описаны особенности морфологии и цитоархитектоники тимуса потомства крыс с вторичным иммунодефицитом. В качестве модели вторичного иммунодефицита выбрана спленэктомия. Исследования проведены с использованием общегистологических, иммуногистохимических, морфометрического и статистического методов. Выявлено снижение морфометрических показателей (площади мозгового вещества и толщины коркового вещества) и увеличение численности клеток микроокружения (макрофагов, дендритных клеток, ретикулоэпителиоцитов и клеток APUD-серии) в тимусе потомства спленэктомизированных крыс. На основании экспериментальных данных сделан вывод об отрицательном влиянии спленэктомии матери на морфофункциональное состояние тимуса потомства, проявляющемся в раннем запуске в нем инволютивных процессов. На основе анализа современных литературных данных приведены гипотезы причинно-следственных связей между иммунным статусом матери и формированием органов иммунной системы потомства.

**Ключевые слова:** тимус, иммунодефицит, беременность, инволюция

## IMMUNOPHENOTYPING OF THYMIC MICROENVIRONMENTS AT THE POSTERITY OF FEMALE RATS WITH SECONDARY IMMUNODEFICIENCY

**Drandrova E.G.**

*Federal State Budget Educational Institution of Higher Professional Education Chuvash State University  
named after Ulyanov, Cheboksary, e-mail: drandrov@yandex.ru*

The article describes thymic morphofunctional characteristics at the posterity of the female rats with secondary immunodeficiency. Splenectomy was selected as a model of secondary immunodeficiency. Studies were carried out by using histological, immunohistochemical, morphometric and statistical methods. It was revealed that there was a reduction of morphometric parameters of thymus (area of medulla and thickness of cortical substance) and an increase of the number of thymic microenvironments (macrophages, dendritic cells, epithelial and APUD-cells) at the posterity of female rats after splenectomy. It was concluded that splenectomy of the female rats influences negatively onto the morphofunctional state of thymus of the posterity, that consists in early development of involutive processes.

**Keywords:** thymus, immunodeficiency, pregnancy, immunosenescence

Широкое распространение методов вспомогательных репродуктивных технологий и высокий уровень акушерско-гинекологической службы в России и в мире явились причиной того, что беременность и роды на сегодняшний день стали возможными для женщин с тяжелой сопутствующей патологией. Значительный процент беременностей протекает на фоне заболеваний, вызывающих иммунную недостаточность [6]. Ежегодно растет число лиц, инфицированных ВИЧ.

В последние годы, по данным многих исследователей, наблюдается резкое ухудшение состояния здоровья детей и подростков. В Российской Федерации численность абсолютно здоровых детей снизилась до 10%; 75% детской популяции относятся к категории часто болеющих детей; 15–20% имеют хронические заболевания [4]. Несомненно, состояние здоровья матери во время беременности влияет на закладку и созревание органов иммунной системы плода

[7, 9]. Однако в доступной нам литературе мы не встретили данных о последствиях патологии иммунного статуса матери для формирования иммунных органов потомства.

Важнейшую роль в обеспечении иммунного ответа играет тимус, функциональная активность которого обуславливает поддержание гомеостаза в организме и обеспечивает стабильность его антигенных структур [2]. В тимусе происходит антигеннезависимая дифференцировка костномозговых предшественников Т-лимфоцитов в иммунокомпетентные клетки [13]. Нарушение процессов позитивной и негативной селекции приводит к развитию Т-клеточного иммунодефицита. Поэтому изучение морфофункционального состояния тимуса у потомства самок с вторичным иммунодефицитом является актуальным и перспективным и в дальнейшем позволит разработать более эффективные методы прогнозирования и профилактики иммунодефицитных состояний у детей.

**Цель исследования** – оценить морфо-функциональное состояние тимуса потомства крыс с вторичным иммунодефицитом через 3 и 6 месяцев после рождения.

### Материал и методы исследования

Изучен тимус 70 белых нелинейных крыс-самцов. Животные были получены посредством спаривания 4-месячных крыс-самок с вторичным иммунодефицитом. В качестве модели вторичного иммунодефицита выбрана спленэктомия. Кормление, уход и выведение из эксперимента крыс проводились согласно правилам обращения с лабораторными животными. Животные были разделены на 2 группы. Первая (30 крыс) – потомство здоровых самок. Вторая (40 крыс) – потомство спленэктомизированных самок. Тимус забирали через 3 и 6 месяцев после рождения, взвешивали, затем проводили парафиновую заливку и изготавливали срезы толщиной 4 мкм.

Методы исследования:

1. Окраска гематоксилином и эозином – для оценки общегистологической картины и проведения морфометрических измерений коркового и мозгового вещества долек тимуса.

2. Иммуногистохимический метод с использованием моноклональных (МКАТ) и поликлональных антител (ПКАТ) к антигенам крысы фирмы Santa Cruze (США):

а) МКАТ к кластеру дифференцировки 68 типа (CD68) – маркер макрофагов в структурах микроокружения долек тимуса;

б) ПКАТ к белку S-100 – маркер клеток нейроэктодермального происхождения и дендритных клеток;

в) ПКАТ к Synaptophysin – для идентификации клеток нейроэндокринного происхождения, к которым в тимусе относятся клетки APUD серии;

г) МКАТ к Pan-cytokeratin – для неселективной идентификации эпителиальных клеток дольки.

3. Морфометрический метод с использованием программы «Микро-Анализ» (Санкт-Петербург, 2010) для измерения толщины коркового и площади мозгового вещества тимуса, а также количественных характеристик иммуногистохимических реакций.

4. Статистическая обработка полученных цифровых данных с помощью пакета программ Microsoft office (Excel) на компьютере. В работе приводятся следующие показатели:  $M$  – средняя арифметическая величина;  $m$  – средняя ошибка средней арифметической величины. Статистическую достоверность определяли критерием Стьюдента ( $t$ ) [5].

### Результаты исследования и их обсуждение

При окраске препаратов тимуса интактных крысят в возрасте 3-х месяцев гематоксилином и эозином визуализируются дольки округлой или полигональной формы, разделенные между собой междольковыми перегородками (рис. 1).

Паренхима тимуса образована клетками небольшого размера с плотным округлым ядром, окруженным базофильной цитоплазмой в виде тонкого кольца, – лимфоцитами. В корковом веществе клетки расположены более скученно, что придает ему более темную окраску. Мозговое вещество заполнено тимоцитами в меньшей степени и окрашивается менее насыщенно. При проведении морфометрии установлено, что площадь мозгового вещества дольки составляет  $0,43 \pm 0,076 \text{ мм}^2$ , толщина коркового вещества равна  $341,2 \pm 14,7 \text{ мкм}$ .

Дольки тимуса 6-месячных крысят уменьшаются в размерах преимущественно за счёт коркового вещества. Границы между дольками частично стираются. Дольки, расположенные в центре органа, вытягиваются в длину, и форма их приближается к овальной. Площадь мозгового вещества долек равна в среднем  $0,59 \pm 0,013 \text{ мм}^2$ , толщина коркового вещества  $247,5 \pm 19,0 \text{ мкм}$ , что в 1,4 раза меньше соответствующих показателей у 3-месячных крысят ( $p < 0,001$ ).

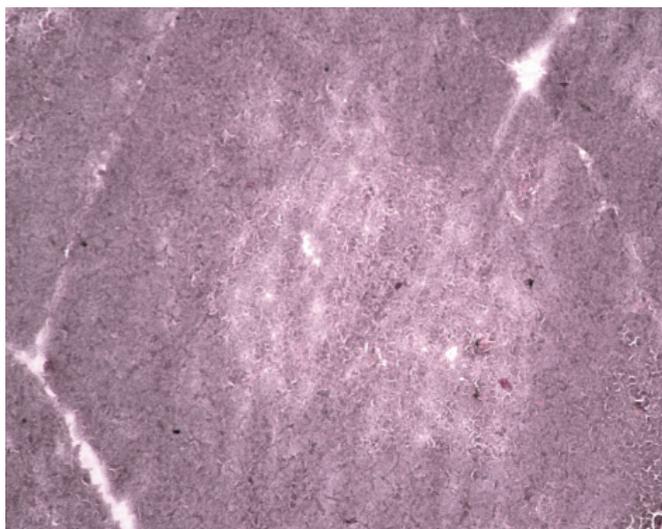


Рис. 1. Тимус. Потомство интактной крысы, 3 месяца. Дольки, разделенные междольковыми перегородками. Окраска гематоксилином и эозином. МИКРОМЕД 3 ЛЮМ. Ув. 100х

Иммуногистохимическая реакция к CD68 использована нами для обнаружения макрофагов. Выявлено, что данные клетки расположены в 1–2 ряда вокруг мозгового вещества дольки, а также встречаются в корковом и мозговом веществе. Число макрофагов увеличивается с возрастом крыс. Так, у 3-месячных крысят в поле зрения определяется  $17,5 \pm 1,4$  клетки, а у 6-месячных крыс их число возрастает более чем в 2 раза и составляет  $41,3 \pm 5,3$  клетки.

Проведение иммуногистохимической реакции к панцитокератину позволило выявить, что число ретикулоэпителиоцитов в тимусе с возрастом меняется незначительно. У потомства интактных крыс на обоих сроках в корковом веществе эпителиоциты занимают около 30% площади, тогда как в мозговом веществе они расположены на 25% площади. Однако меняется расположение медуллярных эпителиальных клеток. У интактных крысят в возрасте трех месяцев они равномерно распределены по всей площади мозгового вещества (рис. 2). В возрасте 6-месяцев эпителиоциты концентрируются на периферии ближе к кортико-медуллярной зоне, оставляя центральную часть свободной. Количество синаптофизин-положительных клеток с возрастом почти не изменяется и составляет  $5,6 \pm 1,2$  клетки в поле зрения. Клетки APUD-серии расположены большей частью в кортико-медуллярной зоне, единичные клетки встречаются в корковом и мозговом веществе. S-100<sup>+</sup>-, дендритные клетки в тимусе 3-месячных крыс обнаруживаются большей частью в мозговом веществе и кор-

тико-медуллярной зоне. Их количество составляет  $24,4 \pm 2,9$  клетки в поле зрения. На сроке 6 месяцев численность дендритных клеток возрастает более чем в 2 раза и равна  $53,2 \pm 2,7$  клетки ( $p < 0,001$ ).

На основании полученных данных можно заключить, что в тимусе 6-месячных крыс наблюдаются явления возрастной инволюции, проявляющиеся уменьшением основных морфометрических показателей и увеличением численности клеток микроокружения. На наш взгляд, это увеличение является относительным и обусловлено недостаточным поступлением в тимус костномозговых предшественников Т-лимфоцитов и уменьшением размеров дольки.

При исследовании срезов тимуса потомства спленэктомированных крыс в возрасте трех месяцев, окрашенных гематоксилином и эозином, установлено, что большая часть долек имеет округлую или полигональную форму. Встречаются дольки продолговатой формы. Четко определяются границы между дольками. При морфометрии окрашенных срезов выявлено, что размер долек меньше по сравнению с группой потомства интактных крыс на данном сроке. Площадь мозгового вещества и толщина коркового вещества меньше в 1,7 и 1,17 раза соответственно. В возрасте 6 месяцев междольковые септы в тимусе почти не визуализируются. Площадь мозгового вещества увеличена на 32% по сравнению с группой потомства интактных крыс. На границе коркового и мозгового вещества, в кортико-медуллярной зоне, отмечается повышенная васкуляризация.

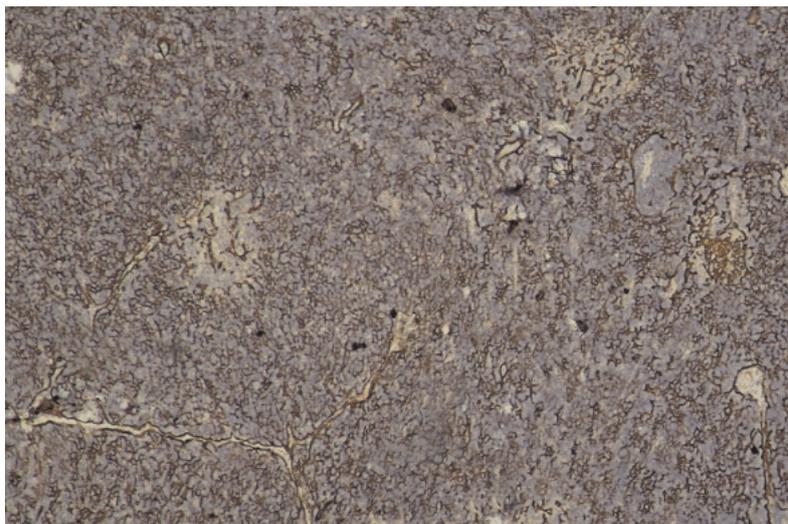


Рис. 2. Тимус. Потомство интактной крысы, 3 месяца.  
Сетевая организация ретикулоэпителиальных клеток.

Иммуногистохимическая реакция к панцитокератину. МИКРОМЕД 3 ЛЮМ. Ув. 100х

Проведение иммуногистохимических реакций позволило выявить, что численность макрофагов и клеток APUD-серии в тимусе потомства самок с вторичным иммунодефицитом в возрасте трех месяцев возрастает и составляет  $27,0 \pm 7,4$  и  $15,0 \pm 1,9$  клетки в поле зрения соответственно (рис. 3).

клетки визуализируются в корковом и мозговом веществе тимической доли, однако распределение их неодинаково. Кортикальные эпителиоциты сохраняют сетевую структуру и занимают  $28,7 \pm 2,6\%$  всей площади. Медуллярные эпителиоциты смещаются на периферию мозгового вещества, их доля составляет  $25,6 \pm 1,2\%$ .



Рис. 3. Тимус. Потомство спленэктомированной крысы, 3 месяца. Увеличение количества клеток APUD-серии. Иммуногистохимическая реакция к синаптофизину. МИКРОМЕД 3 ЛЮМ. Ув. 400х

Расположение ретикулоэпителиальных клеток в корковом веществе не подвергается изменениям. Однако меняется расположение медуллярных эпителиальных клеток. Они заселяют мозговое вещество не равномерно, а небольшими участками, между которыми находятся пространства, свободные от эпителиоцитов. Доля медуллярных эпителиоцитов снижается и составляет  $23,5 \pm 1,3\%$ . В корковом веществе доля эпителиальных клеток, напротив, возрастает на 8% и равна  $38,0 \pm 3,2\%$ . Численность дендритных клеток несколько выше, чем в тимусе потомства интактных крыс, и составляет  $29,2 \pm 2,6$  клеток в поле зрения, что больше на 19,7% ( $p < 0,01$ ).

Меньшие по сравнению с группой интактных крыс величины морфометрических показателей и увеличение численности клеток микроокружения свидетельствуют об инволютивных процессах, не столь выраженных у интактных крысят того же возраста.

У 6-месячных крыс этой группы данные о количестве и локализации клеток микроокружения принципиально не отличаются от данных, полученных нами при исследовании тимуса потомства интактных крыс. В поле зрения встречается  $36,3 \pm 3,4$  макрофага,  $6,2 \pm 1,1$  синаптофизин-положительные клетки. Панцитокератин-позитивные

### Заключение

Таким образом, наши исследования показали, что предшествующая беременности спленэктомия отрицательно сказывается на закладке органов иммунной системы плода. Мы полагаем, что в основе этого влияния лежит стойкое увеличение уровня кортизола в крови, выявляемое даже в отдаленные сроки после операции [8]. Доказано, что пренатальный стресс сильно влияет на гомеостаз развивающегося организма [15]. Выделяемые при активации гипоталамо-гипофизарно-надпочечниковой системы глюкокортикоиды, проникая через плаценту, угнетающе действуют на формирование эндокринной, иммунной и нервной систем плода [10, 12]. Аналогичным образом влияют глюкокортикоиды и в неонатальном периоде.

Еще одним немаловажным фактом является недостаточность как гуморального, так и клеточного звеньев иммунитета матери [1, 3]. Известно, что во внутриутробном и неонатальном периодах плод, а впоследствии – новорожденный приобретает пассивный иммунитет от матери. Через плаценту к плоду поступают антитела, продуцируемые В-лимфоцитами матери [14]. После рождения факторы иммунитета продолжают поступать в организм новорожденного вместе с материнским молоком [11]. Недостаточность пассивной иммунизации плода

и новорожденного в период незрелости его собственной иммунной системы также, по нашему мнению, является причиной запуски в тимусе патологических процессов.

### Список литературы

1. Изменения иммунного статуса у пациентов с повреждениями селезенки в зависимости от выполненной операции / В.В. Масляков [и др.] // Современные проблемы науки и образования. – 2012. – № 4. – С. 1–8.
2. Ковешников В.Г., Бибик Е.Ю. Функциональная морфология органов иммунной системы. – Луганск: Виртуальная реальность, 2007. – 172 с.
3. Павлова И.Е. Особенности функционирования иммунной системы после спленэктомии у пациентов с заболеваниями системы крови и травмами селезенки: Автореф. дис. ... д-ра мед. наук. – СПб., 2007. – 42 с.
4. Расщепкина Н. И., Григанов В.И. Дегидрогеназная активность нейтрофилов крови у часто болеющих детей // Молодой ученый. – 2011. – № 7. Т.2. – С. 131–132.
5. Реброва О.Ю. Статистический анализ медицинских данных. Применение пакета прикладных программ STATISTICA. – М.: Изд-во Медиа Сфера, 2002. – 312 с.
6. Рекалова Е.М. Механизмы формирования вторичной иммунной недостаточности и возможности её коррекции // Астма та алергія. – 2013. – № 1. – С. 13–15.
7. Романова Т.А., Обухова С.В. Влияние течения беременности на размеры тимуса ребенка (по результатам ультразвукового исследования) // Научные ведомости БелГУ Медицина Фармация. – 2013. – № 18 (161), вып. 23. – С. 87–88.
8. Стручко Г.Ю. Морфофункциональное исследование тимуса и иммунобиохимических показателей крови после спленэктомии и иммунокоррекции: дис. ... д-ра мед. наук. – Саранск, 2003. – 236 с.
9. Шаврина Е.Ю. Роль хронического поражения печени самок крыс в нарушении морфофункционального состояния системы мононуклеарных фагоцитов потомства: автореф. дис. ... канд. биол. наук. – Оренбург, 2012. – 26 с.
10. Шайтарова А.В., Храмова Е.Б., Суплотова Л.А. Дискуссионные вопросы влияния глюкокортикоидной терапии беременных на здоровье детей // Вопросы современной педиатрии. – 2011. – № 2. – С. 82–85.
11. Chirico G. Development of the immune system in neonates // J. Arab Neonatal Forum. – 2005. – Vol. 2. – P. 5–11.
12. Dotsch J. Perinatal programming – myths, fact, and future of research // Molecular and cellular pediatrics. – 2014. – 1:2. – P. 1–4.
13. Gordon J., Manley N.R. Mechanisms of thymus organogenesis and morphogenesis // Development. – 2011. – Vol. 138, № 18. – P. 3865–3878.
14. Jauniaux E., Gulbis B. In vivo investigation of placental transfer early in human pregnancy // Eur. J. Obstet. Gynecol. Reprod. Biol. – 2000. – Vol. 92. – P. 45.
15. Moisiadis V.G., Matthews S.G. Glucocorticoids and fetal programming part 2: mechanisms // Nat. Rev. Endocrinol. – 2014. – Vol. 10, № 7. – P. 403–411.

### References

1. Maslyakov V.V., Kirichuk V.F., Gromov M.S., Polyakov A.V. *Sovremennye problemy nauki i obrazovaniya – Modern problems of science and education*, 2012, no.4, pp. 1–8.

2. Koveshnikov V.G., Bibik E.Yu. *Funktsionalnaya morfologiya organov immunoynoy sistemy* [Functional morphology of the immune system]. Lugansk, Virtualnaya realnost, 2007. 172 p.

3. Pavlova I.E. *Osobennosti funktsionirovaniya immunoynoy sistemy posle splenektomii u patsientov s zabolevaniyami sistemy krovi i travmami selezenki: avtoref. dis. ... dokt. med. nauk* [Characteristics of the functioning of the immune system after splenectomy at the patients with blood diseases and spleen injuries. Abstract of PhD thesis]. St. Petersburg, 2007. 42 p.

4. Rasschepkina N.I., Griganov V.I. *Molodoy uchenyy – Young Scientist*, 2011, no.7, pp. 131–132.

5. Rebrova O.Yu. *Statisticheskiy analiz meditsinskikh danykh. Primenenie paketa prikladnykh programm STATISTICA* [Statistical analysis of medical data. The use of the application programmes STATISTICA]. Moscow, Media-Sphera Publ., 2002. 312 p.

6. Rekalova E.M. *Astma ta alerhiya – Asthma and Allergy*, 2013, no.1, pp. 13–15.

7. Romanova, T.A. Obukhova S.V. *Nauchnye vedomosti BelGU Meditsina Farmatsiya – Belgorod State University scientific bulletin Medicine Pharmacy*, 2013, no.18 (161), issue 23, pp. 87–88.

8. Struchko G.Yu. *Morfofunktsionalnoe issledovanie timusa i immunobiokhimicheskikh pokazateley krovi posle splenektomii i immunokorreksii* [Morphofunctional research of thymus and immunobiochemical parameters of blood after splenectomy and immunocorrection. PhD thesis]. Saransk, 2003. 236 p.

9. Shavrina, E.Yu. *Rol khronicheskogo porazheniya pecheni samok krysv v narushenii morfofunktsionalnogo sostoyaniya sistemy mononuklearnykh fagotsitov potomstva: avtoref. dis. ... kand. biol. nauk: 03.03.04.* [Role of chronic liver disease of female rats in pathology of morphofunctional state of the mononuclear phagocytes system of offspring. Abstract of PhD thesis]. Orenburg, 2012, 26 p.

10. Shaytarova A.V., Khramova E.B., Suplotova L.A. *Voprosy sovremennoy pediatrii – Current Pediatrics*, 2011, no.2, pp. 82–85.

11. Chirico G. J. Arab Neonatal Forum, 2005, vol. 2, pp. 5–11.

12. Dotsch J. *Molecular and cellular pediatrics*. 2014. 1:2, P. 1–4.

13. Gordon J., Manley N.R. *Development*, 2011, vol.138, no.18, pp. 3865–3878.

14. Jauniaux E., Gulbis B. *Eur. J. Obstet. Gynecol. Reprod. Biol.*, 2000, vol. 92, p. 45.

15. Moisiadis V.G., Matthews S.G. *Nat. Rev. Endocrinol*, 2014, vol. 10, no.7, pp. 403–411.

### Рецензенты:

Гунин А.Г., д.м.н., профессор кафедры акушерства и гинекологии, ФГБОУ ВПО «Чувашский государственный университет им. И.Н. Ульянова», г. Чебоксары;

Смелов С.В., д.м.н., доцент кафедры нормальной и топографической анатомии с оперативной хирургией, ФГБОУ ВПО «Чувашский государственный университет им. И.Н. Ульянова», г. Чебоксары.