

УДК: 10.18522/2308-9709-2019-30-7
<https://new.jbks.ru/archive/issue-30/article-7>

Иммунологическая характеристика тимуса у морской свинки

[Евстропов В. М.¹](#)

1. кафедра безопасности технологических процессов и производств Ростовского государственного строительного университета

Известно, что разные субклассы клеток тимуса могут выполнять различные иммунологические функции. Это связано в значительной степени и со зрелостью тимоцитов. Учитывая наличие факта возрастной инволюции тимуса и существенную роль вилочковой железы в созревании Т-клеток, а также широкое применение морских свинок в качестве различных экспериментально-иммунологических моделей, целью исследования являлось изучение у морских свинок различного возраста клеток вилочковой железы некоторых субклассов, имеющих иммунологическое значение, у животных разного возраста (первая группа – возраст 3-4 недели, вторая группа – средний возраст 3 месяца). Изучалось содержание в тимусе этих морских свинок тимоцитов с рецепторами к агглютинуину арахиса (PNA⁺-клетки); E-ПОК, идентифицированных спонтанным розеткообразованием с эритроцитами кролика; EAC-ПОК – в розеткообразовании с эритроцитами кролика, покрытых антителами и комплементом; T_μ-timoцитов – розеткообразованием с эритроцитами быка (EA-PO), нагруженными IgM- фракцией специфических антител, а также T_γ клеток – розеткообразованием с эритроцитами быка, нагруженными IgG - фракцией, специфических антител. Показано, что для характеристики возрастных различий тимуса морской свинки могут применяться методы определения в вилочковой железе клеток различных субклассов, имеющих иммунологическое значение, в частности – T_γ-клеток и PNA⁺-клеток.

Введение

В экспериментальном биомоделировании наблюдается некоторая «специализация», т.е. преимущественное использования животных одних видов – для одних целей, животных других видов – для других, что связано с целевым применением этих животных в связи с использованием различных элементов их биосистем. Морских свинок часто используют для изучения аллергических реакций, а также – для изучения авитаминоза С и туберкулеза. Кроме того, статус здоровья лабораторных животных, в том числе и морских свинок, является важным элементом качественного эксперимента [9]. Тимус играет важную роль в статусе здоровья, являясь центральным органом Т- звена иммунной защиты [2,3].

Известно, что с в процессе онтогенеза формируется ассоциированное

с возрастом физиологическое уменьшение количества клеток в тимусе – возрастная инволюция [15]. В частности, у половозрелых крыс породы Вистар относительное содержание CD3⁺ - лимфоцитов в тимусе несколько выше, чем содержание этих клеток в тимусе крыс препубертатного периода. CD3 – один из маркеров Т-лимфоцитов [10].

Вокруг крупных сосудов в тимусе располагаются различные типы клеток, в основном это Т-лимфоциты, но встречаются также В-лимфоциты, плазматические клетки, эозинофилы, нейтрофилы, гистиоциты, тучные клетки [20]. Среди популяций лимфоцитов в тимусе обнаружены гемопоэтические предшественники CD117⁺ и зрелые CD4⁺ и CD8⁺ Т-клетки [27].

Разные субклассы клеток тимуса могут выполнять различные иммунологические функции. Предполагают, что T_γ-лимфоциты являются Т-супрессорами, а T_μ-лимфоциты – Т-хелперами [1]. Другие маркеры Т-лимфоцитов могут свидетельствовать о различной степени зрелости этих клеток. В частности, PNA⁺ - Т-лимфоциты менее зрелые, чем PNA⁻ - Т-лимфоциты [29].

Цель исследования

Учитывая наличие факта возрастной инволюции тимуса и существенную роль вилочковой железы в созревании Т-клеток, а также широкое применение морских свинок в качестве различных экспериментально-иммунологических моделей, целью исследования являлось изучение у морских свинок различного возраста клеток вилочковой железы некоторых субклассов, имеющих иммунологическое значение.

Материалы и методы исследования

Для решения поставленной задачи использовали 2 группы морских свинок. Первая группа включала животных массой 190—225 г. (возраст 3—4 недели), вторая группа – морских свинок массой 410—430 г (средний возраст 3 месяца). Работы проводились в соответствии с рекомендациями по содержанию и использованию в эксперименте лабораторных животных [7].

Извлеченный у эвтаназированных животных тимус гомогенизировали в стеклянном гомогенизаторе, гомогенат фильтровали и отмывали центрифугированием в среде 199.

Тимоциты с рецепторами к агглютинуину арахиса (PNA⁺-клетки) определяли при помощи данного маркера, меченного ФИТЦ. Е-РОК идентифицировали методом спонтанного розеткообразования с эритроцитами кролика, для выявления ЕАС-РОК используемые в розеткообразовании эритроциты кролика предварительно покрывали антителами и комплементом [17]. Для индикации Т_μ и Т_γ-тимоцитов сначала выделяли из суспензии тимоцитов Т-клетки, путем розеткообразования клеток тимуса с эритроцитами кролика с последующим лизисом этих эритроцитов. Полученные Т-клетки использовали для выявления Т_μ-клеток розеткообразованием их с эритроцитами быка (ЕА-РО), нагруженными IgM- фракцией специфических антител, а также – для определения Т_γ клеток (розеткообразованием с эритроцитами быка, нагруженными IgG – фракцией, специфических антител) [1,4].

Процентное содержание Е-, и ЕАС-РОК определяли в клеточной взвеси, нанесенной на предметное стекло [5]. Эти препараты фиксировали этиловым спиртом и окрашивали по Романовскому-Гимза. Полученные при подсчете данные статистически обработаны, достоверность различий показателей определялась в соответствии с t-критерием Стьюдента.

Результаты исследования и их обсуждение

Результаты исследования показали количественное доминирование Е-РОК среди изучаемых тимоцитов (Таблица 1), количество ЕАС-РОК было незначительным. Среди субклассов тимоцитов чаще определялись PNA⁺-клетки. Реже идентифицировались Т_γ- и Т_μ-клетки. Примечательно, что у морских свинок более старшего возраста снижается содержание в тимусе клеток субклассов Т_γ и PNA⁺.

Тимические В-лимфоциты имеют фенотип зрелых или активированных В-клеток и составляют приблизительно лишь 1-2% всех клеток тимуса [26]. Согласно таблице 1 содержание в тимусе морских свинок ЕАС-РОК, характеризуемых как В-клетки, также незначительно. Предполагают, что В-клетки в вилочковой железе участвуют в негативной селекции аутореактивных клонов Т-клеток [22].

Таблица 1. Популяции Т- и В- клеток тимуса у морских свинок различного возраста ($M \pm m$)

| № группы | ЕАС-РОК | Е-РОК | Т _γ -клетки | Т _μ -клетки |
|----------|-----------|-----------|------------------------|------------------------|
| 1 (=6) | 0,83±0,34 | 51,1±1,37 | 3,33±0,61 | 4,3±0,61 |
| 2 (=8) | 1,13±0,13 | 64,1±2,24 | 6,38±0,78* | 4,2±0,61 |

Примечание: * - статистически достоверное отличие показателя второй группы от аналогичного показателя первой группы ($p < 0,05$).

В тимусе происходит формирование пространственных рецепторов Т-лимфоцитов [6]. Для основной субпопуляции Т-лимфоцитов, $\alpha\beta$ Т-клеток, классическим путем дифференцировки является тимический. В тимусе Т-клеточные предшественники приобретают рецептор для антигена (TCR) и, вследствие этого, проходят процессы клональной селекции, связанные с элиминацией потенциально аутореактивных лимфоцитов и обеспечивающие толерантность зрелых периферических Т-клеток к антигенам собственного организма [11]. Мембранным маркером, отражающим осуществленную положительную селекцию, является для CD4⁺ CD8⁺ $\alpha\beta$ Т-клеток экспрессия активационной молекулы CD69. Затем происходит отрицательная селекция, предотвращающая выход в периферический отдел иммунной системы потенциально аутоагрессивных клеток [19].

Тимическая дифференцировка $\alpha\beta$ Т-клеток включает последовательные этапы:

- а) коммитирование полипотентных костномозговых предшественников к Т-ряду;
- б) формирование рецептора для антигена (реаранжировка β -цепи TCR, образование пре-TCR, несколько волн клональной экспансии, инициируемой сигналом с пре-TCR, формирование полноценного TCR);
- в) клональная селекция на основании TCR, предполагающая отбор Т-клеток, распознающих чужеродные антигенные пептиды в контексте собственных

молекул главного комплекса гистосовместимости [21, 22].

Примерно 90–95% Т-лимфоцитов в периферической крови составляют $\alpha\beta$ Т-лимфоциты, которые разделяются на две основные субпопуляции: 1-я – CD4⁺ обеспечивают развитие Т-клеточного иммунного ответа (Т-хелперы), 2-я – CD8⁺ являются преимущественно цитотоксическими [13].

Дифференцировка Т-клеток в тимусе характеризуется их фенотипическими изменениями, прежде всего – изменением экспрессии мембранных молекул CD4 и CD8: у ранних внутритимусных предшественников обе молекулы отсутствуют, на более поздней стадии они экспрессируются одновременно, а последующая дифференцировка сопровождается

утратой одного из маркеров [24,25].

Функциональная роль клеток тимического ряда включает и продукцию цитокинов, причем небольшое количество цитокинов могут секретировать незрелые CD4⁻ и CD8⁻ клетки-предшественники (IL-2, IL-4, IL-7 и др.). Более зрелые тимоциты фенотипа CD4⁺ и CD8⁺ продуцируют больше цитокинов (IL-2, IL-4, IL-5, IL-10, IL-13 и др.), особенно тимоциты CD4⁺ и CD8⁻ (IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-10, IL-13 и др.). Достаточно зрелые тимоциты фенотипа CD4⁺ и CD8⁺ секретируют мало цитокинов (IL-4 и др.), а на завершающей стадии созревания у тимоцитов CD3^{lo} CD4⁺ и CD8⁺ продукция цитокинов прекращается вообще [18, 23]. Установлено, что, в свою очередь сами цитокины, в частности, IL-1 и IL-6 способствуют дифференцировке CD4⁺-Т-клеток в Th17, а IL-2 и IL-23 модулируют дифференцировку Th17, которые продуцируют IL-17, 21, 22 [14].

Онтобиологические процессы старения совпадают с биологическим возрастом. Исходя из этого, процесс старения в целом необходимо рассматривать как изменения, характеризующие уровень адаптации организма к условиям существования в различные возрастные периоды [14].

Экспериментальные и клинические исследования в области геронтологии показали, что первой из функциональных систем, поражающейся при старении, является система иммунитета [12, 27].

При этом следует отметить, что возрастная жировая инволюция вилочковой железы хронологически синхронизирована с возрастной жировой трансформацией костного мозга длинных трубчатых костей. В тимусе, как и в костном мозге, всегда сохраняются стволовые клетки, способные при необходимости пролиферировать. Сходство возрастных изменений тимуса и костного мозга предполагает возможную общность регуляции, обуславливающую оба процесса, и тесную функциональную связь между тимико-лимфатической и кроветворной системой [8,28]. Поэтому можно полагать, что возрастные изменения тимуса в существенной степени отражают и возрастные изменения иммунитета в целом.

Заключение

Таким образом, для иммунологической характеристики тимуса и его возрастных различий у морской свинки могут применяться методы определения в вилочковой железе клеток различных субклассов, имеющих иммунологическое значение и характеризующих его иммунологическую структуру, в частности – T_γ-клеток и PNA⁺-клеток.

Список литературы

1. Джаманова Г.И. Активность бесклеточной надосадочной фракции культуры сенсibilизированных лимфоцитов на P₀ интактных лимфоцитов и их субпопуляций // Вестник Алтайского государственного аграрного университета, 2007. № 7. – С.38—40.
2. Евстропов В.М. Феномен различной реактивности тимуса и костного мозга при локальном воздействии дециметровых волн // Вопросы курортологии, физиотерапии и лечебной физической культуры, 1987. №6. – С. 14—17.
3. Евстропов В.М., Силич И.Н. Фазозависимость иммуномодулирующего эффекта при облучении дециметровыми волнами центральных органов иммунной системы // Иммунология, 1988. Т. 9. № 6. – С. 37—40.
4. Евстропов В.М. Мелихова О.Н., Ковалева Г.В. Костномозговые Т-и В-лимфоциты при локальном воздействии дециметровыми волнами (экспериментальное исследование) // Вопросы курортологии, физиотерапии и лечебной физической культуры, 1986. № 6. – С.24—26.
5. Евстропов В.М. Приготовление клеточной взвеси на стекле //Лабораторное дело, 1983. №.2. – С. 54.
6. Евстропов В.М. Иммуно-эндокринная реакция на локальное воздействие дециметровых волн. Фрунзе: Илим, 1987. –104 с.
7. Западнюк И. П., Западнюк В. И., Захария Е. А., Западнюк Б.В. Лабораторные животные. Разведение, содержание, использование в эксперименте. Киев: Вища школа. Головное изд-во, 1983. – 383 с.
8. Ивановская Т.Е., Катасонова Л.П. Структура тимуса, иммунный статус и патологический процесс //Архив патологии, 1986. Т.48. Вып.1. – С. 3—9.
9. Исламов Р.А. Организация мониторинга здоровья лабораторных животных // Вестник Казахского национального медицинского университета, 2016. №3. – С.174—178.
10. Косырева А.М., Макарова О.В., Осмоловская Е.Ю. Возрастные особенности и половые различия морфофункциональных изменений тимуса у крыс Вистар при системном воспалительном ответе // Клиническая и экспериментальная морфология, 2016. №1. – С.18—26.
11. Куклина Е.М., Глебездина Н.С. Экстратимическая дифференцировка αβT-лимфоцитов // Онтогенез, 2015. Т. 46, № 4. – С. 209—224.
12. Кузьменко Л.Г., Киселева Н.М., Симонова А.В. Старение и тимус // Журнал научных статей «Здоровье и образование в XXI веке», 2013. Т.15, №1—4. – С.170—175.
13. Москалев А.В, Гумилевский Б.Ю., Апчел А.В., Цыган В.Н. Т-лимфоциты – «цензорные» клетки иммунной системы // Вестник Российской Военно-медицинской академии, 2019. №2. – С.191—197.
14. Москалев А.В., Рудой А.С., Цыган В.Н., Апчел В.Я. Аутоиммунные заболевания. Диагностика и лечение. М.: Гэотар-Медиа, 2017. – 218 с.
15. Старская И.С., Полевщиков А.В. Морфологические аспекты атрофии тимуса при стрессе // Иммунология, 2013. №5. – С.271—277.
16. Фролькис В.В., Ступина А.С., Шумский Н.Г. Старость, старение // БМЭ, Изд-е 3-е. Т. 24. – С. 205—213.
17. Шварцман М.Я., Кашкин А.П. Определение количества Т- и В- лимфоцитов у морских свинок // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины, 1982. №9. – С.85—87.
18. Ярилин А.А. Цитокины в тимусе. Выработка и рецепция цитокинов // Цитокины и воспаление, 2003. №1. – С.3—12.
19. Ярилин А.А. Донецкова А.Д. Т-клетки – недавние эмигранты из тимуса // Иммунология, 2012. № 6. – С.326—334.

20. Bearman R.M. The normal human thymic vasculature: An ultrastructural study / R.M. Bearman, K.G. Bensch, G.D. Levine // *Anat. Rec.*, 1975. 183 (4): 485-497.
21. Bellamy D. The Thymus in relation to problems of cellular growth and aging // *Gerontologia*, 1973. Vol. 19. – P. 162–184.
22. Ferrero I., Anjuère F., Martin P. et al. Functional and phenotypic analysis of thymic B cells: role in the induction of T cell negative selection // *Eur. J. Immunol.*, 1999; 29 (5): 1598–609.
23. Hong C., Luckey M.A., Park J.H. Intrathymic IL-7: the where, when, and why of IL-7 signaling during T cell development // *Semin. Immunol.*, 2012. V. 24(3). P. 151–158.
24. Koch U., Radtke F. Mechanisms of T cell development and transformation // *Cell. Immunol.*, 2011. V. 27. P. 539–562.
25. Kondo M., Shah D.K., Zuniga-Pflucker J.C. An overview of the intrathymic intricacies of T cell development // *J. Immunol.*, 2014. V. 192(9). P. 4017–4023.
26. Masrcos M.A., Andreu J.L., Alonso J.M. et al. Physiological significance of thymic B lymphocytes: An appraisal. // *Res. Immunol.*, 1989; 140 (3): 275–279.
27. Mori K., Itoi M., Tsukamoto N. et al. The perivascular space as a path of hematopoietic progenitor cells and mature T cells between the blood circulation and the thymic parenchyma // *Int. Immunol.*, 2007;19 (6): 745–753.
28. Naito T., Tanaka H., Naoe Y. et al. Transcriptional control of T-cell development // *Int. Immunol.*, 2011. V. 23 (11).P. 661–668.
29. Schuurman H. J., Brekelmans P., Daemen T., Broekhuizen R., Kater L. T-cell maturation in the human thymus and tonsil: peanut agglutinin binding T lymphocytes in thymus and tonsil differ in maturation stage // *Clinical immunology and immunopathology*, 1983. V.29. – P.271–281.

Spisok literatury

1. Dzhamanova G.I. Aktivnost' beskletочноj nadosadochnoj frakcii kul'tury sensibilizirovannyh limfocitov na Ro intaktnyh limfocitov i ih subpopulyacij // *Vestnik Altajskogo gosudarstvennogo agrarnogo universiteta*, 2007. № 7. – S.38-40.
2. Evstropov V.M. Fenomen razlichnoj reaktivnosti timusa i kostnogo mozga pri lokal'nom vozdejstvii decimetrovyyh voln // *Voprosy kurortologii, fizioterapii i lechebnoj fizicheskoj kul'tury*, 1987. №6. – S. 14-17.
3. Evstropov V.M., Silich I.N. Fazozavisimost' immunomoduliruyushchego effekta pri obluchenii decimetrovymi volnami central'nyh organov immunoj sistemy // *Immunologiya*, 1988. T. 9. № 6. – S. 37-40.
4. Evstropov V.M. Melihova O.N., Kovaleva G.V. Kostnomozgovye T-i V-limfocity pri lokal'nom vozdejstvii decimetrovymi volnami (eksperimental'noe issledovanie) // *Voprosy kurortologii, fizioterapii i lechebnoj fizicheskoj kul'tury*, 1986. № 6. – S.24-26.
5. Evstropov V.M. Prigotovlenie kletочноj vzvesi na stekle // *Laboratornoe delo*, 1983. №.2. – S 54.
6. Evstropov V.M. Immuno-endokrinnaya reakciya na lokal'noe vozdejstvie decimetrovyyh voln. Frunze: Ilim, 1987. –104 s.
7. Zapadnyuk I. P., Zapadnyuk V. I., Zahariya E. A., Zapadnyuk B.V. Laboratornye zhivotnye. Razvedenie, sodержanie, ispol'zovanie v eksperimente. Kiev: Vishcha shkola. Golovnoe izd-vo, 1983. – 383 s.
8. Ivanovskaya T.E., Katasonova L.P. Struktura timusa, immunnyj status i patologicheskij process // *Arhiv patologii*, 1986. T.48. Vyp.1. – S. 3-9.
9. Islamov R.A. Organizaciya monitoringa zdorov'ya laboratornyh zhivotnyh // *Vestnik Kazahskogo nacional'nogo medicinskogo universiteta*, 2016. №3. – S.174-178.
10. Kosyreva A.M., Makarova O.V., Osmolovskaya E.YU. Vozrastnye osobennosti i polovye razlichiya morfofunktional'nyh izmenenij timusa u krysa Vistar pri sistemnom vospalitel'nom otvete // *Klinicheskaya i eksperimental'naya morfologiya*, 2016. №1. – S.18-26.
11. Kuklina E.M., Glebezdina N.S. Ekstratimicheskaya differencirovka $\alpha\beta$ T-limfocitov // *Ontogenez*, 2015. T. 46, № 4. – S. 209-224.

12. Kuz'menko L.G., Kiseleva N.M., Simonova A.V. Starenie i timus // ZHurnal nauchnyh statej «Zdorov'e i obrazovanie v XXI veke», 2013. T.15, №1-4. – S.170-175.
13. Moskalev A.V., Gumilevskij B.YU., Apchel A.V., Cygan V.N. T-limfocity – «cenzornye» kletki immunnoj sistemy // Vestnik Rossijskoj Voenno-meditsinskoj akademii. – 2019. – №2. – S.191-197.
14. Moskalev A.V. Autoimmunnye zabolevaniya. Diagnostika i lechenie / A.V. Moskalev [i dr.]. M.: Geotar-Media, 2017. – 218 s.)
15. Starskaya I.S., Polevshchikov A.V. Morfologicheskie aspekty atrofii timusa pri stresse // Immunologiya, 2013. №5. – S.271-277.
16. Frol'kis V.V., Stupina A.S., SHumskij N.G. Starost', starenie // BME, Izd-e 3-e. T. 24. – S. 205-213.
17. SHvarcman M.YA., Kashkin A.P. Opredelenie kolichestva T- i V- limfocitov u morskikh svinok // Byulleten' eksperimental'noj biologii i medeciny, 1982. №9. – S.85-87.
18. YArilin A.A. Citokiny v timuse. Vyrabotka i recepciya citokinov // Citokiny i vospalenie, 2003. №1. – S.3-12.
19. YArilin A.A. Doneckova A.D. T-kletki – nedavnie emigranty iz timusa // Immunologiya, 2012. № 6. – S.326-334.
20. Bearman R.M. The normal human thymic vasculature: An ultrastructural study / R.M. Bearman, K.G. Bensch, G.D. Levine // Anat. Rec., 1975. 183 (4): 485-497.
21. Bellamy D. The Thymus in relation to problems of cellular growth and aging // Gerontologia, 1973. Vol. 19. – P. 162-184.
22. Ferrero I., Anjuère F., Martin P. et al. Functional and phenotypic analysis of thymic B cells: role in the induction of T cell negative selection // Eur. J. Immunol., 1999; 29 (5): 1598-609.
23. Hong C., Luckey M.A., Park J.H. Intrathymic IL-7: the where, when, and why of IL-7 signaling during T cell development // Semin. Immunol., 2012. V. 24(3). P. 151-158.
24. Koch U., Radtke F. Mechanisms of T cell development and transformation // Cell. Immunol., 2011. V. 27. P. 539-562.
25. Kondo M., Shah D.K., Zuniga-Pflucker J.C. An overview of the intrathymic intricacies of T cell development // J. Immunol., 2014. V. 192(9). P. 4017-4023.
26. Masrcos M.A., Andreu J.L., Alonso J.M. et al. Physiological significance of thymic B lymphocytes: An appraisal. // Res. Immunol., 1989; 140 (3): 275-9.
27. Mori K., Itoi M., Tsukamoto N. et al. The perivascular space as a path of hematopoietic progenitor cells and mature T cells between the blood circulation and the thymic parenchyma // Int. Immunol., 2007;19 (6): 745-53.
28. Naito T., Tanaka H., Naoe Y. et al. Transcriptional control of T-cell development // Int. Immunol., 2011. V. 23 (11).P. 661-668.
29. Schuurman H. J., Brekelmans P., Daemen T., Broekhuizen R., Kater L. T-cell maturation in the human thymus and tonsil: peanut agglutinin binding T lymphocytes in thymus and tonsil differ in maturation stage // Clinical immunology and immunopathology, 1983. V.29. – R.271-281.