УДК 616.411-089.87-097:616.438

МОРФОЛОГИЯ И ИММУНОГИСТОХИМИЧЕСКИЙ ФЕНОТИП ТИМУСА ПРИ ВТОРИЧНОЙ ИММУННОЙ НЕДОСТАТОЧНОСТИ ПОСЛЕ СПЛЕНЭКТОМИИ

Москвичев Е. В., Меркулова Л. М., Стручко Г. Ю.

ФГБОУВПО «Чувашский государственный университет имени И. Н. Ульянова», медицинский факультет, кафедра нормальной и топографической анатомии с оперативной хирургией (зав. – д.м.н., проф. Л. М. Меркулова) (428000, Чебоксары, Московский проспект, 45 e-mail: anatomy@chuvsu.ru)

С применением иммуногистохимического метода и компьютерной морфометрии исследованы особенности морфологии и молекулярного фенотипа вилочковой железы у крыс через 1 и 4 месяца после удаления селезенки. В работе использованы моно- и поликлональные антитела к мульти-цитокератинам, CD3, синаптофизину, белку S100 и p53. Установлено, что спленэктомия сопровождается атрофией тимуса, схожей по морфологии с возрастной инволюцией, но протекающей значительно быстрее. Кроме того, инволюция тимуса сопровождается существенным изменением молекулярного фенотипа тимической дольки с перестройкой компонентов тимопоэтического микроокружения и изменением соотношения тимоцитов коркового и мозгового вещества. Тем не менее, изменения в структурах железы через четыре месяца после спленэктомии не сопровождаются достоверным повышением экспрессии белка-регулятора апоптоза p-53, что указывает на более сложный механизм инволюции по сравнению со стресс-индуцированной острой атрофией.

Ключевые слова: спленэктомия, дендритные клетки, тимопоэз, инволюция тимуса.

MORPHOLOGY AND THYMIC IMMUNOHISTOCHEMICAL PHENOTYPE IN CONDITION OF SECONDARY IMMUNODEFICIENCY AFTER SPLEENECTOMY

Moskvichev E. V., Merkulova L. M., Struchko G. YU.

"Chuvash State University named after I.N. Ulianov" , The Medicine faculty, chair of normal and regional anatomy with operative surgery (the head of the chair- M.D., professor L. M. Merculova) (428000, Cheboksary, Moscow, Prospect, 45)

Peculiarities of morphology and thymic molecular phenotype of rats in 1 and 4 months after spleenectomy were studied with the help of immune histochemical method and computer morphometry. We used mono-and polyclonal antibodies to the multi-cytokeratin, CD3, synaptophysin, S100 protein and p53. It was found that splenectomy is followed by thymic atrophy similar to age involution, but going much faster. Besides thymic involution is accompanied by the change in molecular phenotype of thymic lobule with component rearrangement and change in correlation of thymocytes. However, the change in the gland in 4 months after spleenectomy is not followed by reliable increase in expression of protein-regulator apoptosis p-53 in gland structure, which points to more complex involutional mechanism as compared with stress-induced acute atrophy.

Key words: spleenectomy, dendritic cells, thymopoesis, thymic involution.

Введение. Тимус – центральный орган иммуногенеза, который является исключительно чувствительным к стрессорному воздействию, а также подвержен значительным возрастным изменениям. Естественная возрастная инволюция сопровождается атрофией лимфоидной ткани и замещением ее жировой клетчаткой с постепенным снижением тимопоэза. До недавнего времени считалось, что тимус является «одноразовым» органом и необходим лишь растущему организму до полового созревания, а в последующем атрофируется. Однако в дальнейшем было показано, что тимопоэз сохраняется в железе, по крайней мере, до восьмого десятилетия жизни [5].

Одной из наиболее изученных моделей является острая стресс-индуцированная атрофия тимуса, при которой ключевое значение принадлежит глюкокортикоидным гормонам.

Известно, что глюкокортикоиды реагируют с рецепторами тимоцитов и запускают их апоптоз [9]. Хронический стресс также вызывает инволюцию тимопоэтического компонента железы с последующей структурной перестройкой органа и его атрофией, при этом изменения в железе схожи с возрастной инволюцией, но протекают значительно быстрее [4]. Ряд авторов указывают на возможность кратковременного, но обратимого негативного влияния хирургического стресса на тимус [1].

Спленэктомия – широко распространенная хирургическая операция, выполняемая при травматических разрывах органа и операциях на органах верхнего этажа брюшной полости. Однако удаление это крупнейшего периферического органа иммуногенеза приводит к перестройке цепи взаимодействия иммунокомпетентных органов и снижению защитных сил, а в ряде случаев – развитием синдрома OPSI (overwhelming post-splenectomy infection) [10].

В предыдущих работах мы установили, что спленэктомия вызывает акцидентальную инволюцию тимуса, признаки которой сохраняются даже через 120 суток после операции. Нами показано, что спленэктомия сопровождается стойким увеличением уровня кортизола в крови, анемией, а также увеличением уровня биогенных аминов в структурах тимуса на фоне инволютивных изменений [2]. Таким образом, было установлено, что влияние спленэктомии на тимус не ограничивается лишь хирургическим стрессом и имеет более сложные механизмы, основанные на нарушениях нейроэндокринных и гуморальных взаимодействий. Тогда же было высказано предположение, что механизм акцидентальной инволюции может быть опосредован через клетки APUD серии и дендритные клетки (ДК) тимопоэтического микроокружения.

Цель исследования – установление морфологических характеристик, иммуногистохимического фенотипа и особенностей цитоархитектоники клеток тимопоэтического компонента вилочковой железы при вторичной иммунной недостаточности после спленэктомии.

Материалы и методы исследования. Работа выполнена на 42 белых нелинейных крысах-самцах массой 180–220 грамм в возрасте 5 месяцев. Уход и содержание животных проводили в соответствии с «Правилами проведения работ с использованием экспериментальных животных». Крысы были разделены на три группы. Животным первой группы (22 крысы) под общей анестезией выполняли спленэктомию с соблюдением правил асептики и антисептики. Животным второй группы – ложнооперированные (10) – выполняли лапаротомию без удаления селезенки. Третью группу составили интактные животные (10) соответствующего возраста. Контролем служили интактные и ложнооперированные крысы. Выведение всех групп животных из эксперимента проводилось

через 30 и 120 суток после операции путем декапитации. Объектом исследования служил тимус. В работе использованы следующие методы:

1. Иммуногистохимический метод с использованием пяти коммерческих моноклональных (МКАТ) и поликлональных (ПКАТ) антител фирм Santa Cruze (США) и NovoCastra (Великобритания):

а) МКАТ к кластеру дифференцировки лимфоцитов 3 типа;

б) ПКАТ к белку S-100 (маркер нейроэктодермы);

в) МКАТ к синаптофизину (маркер нейроэндокринных клеток);

г) МКАТ к мульти цитокератинам (маркер эпителиальных клеток);

д) МКАТ к белку-регулятору апоптоза p53.

Материал для исследования иммуногистохимическими методами фиксировали 10 % нейтральным забуференным формалином в течение 24 ч, заливали в парафин, готовили срезы толщиной 4 мкм. Срезы наносили на высокоадгезивные стекла и высушивали при температуре 37 ^{0}С в течение 18 часов. Демаскировка и иммуногистохимическая окраска проводилась на автостейнере Leica Bond Max (Германия). Контролем иммуногистохимической реакции служила неиммунизированная кроличья и мышиная сыворотка. Результат реакции оценивали с применением микроскопа Leica DM4000B (Германия) путем подсчета позитивно окрашенных клеток на 100 клеток в десяти полях зрения при увеличении х400, выражая результаты в процентах и единицах в поле зрения.

2. Окраска срезов тимуса гематоксилином и эозином для проведения морфометрических измерений.

3. Компьютерная морфометрия с использованием лицензионных программ Leica application suite 3.6.0 (Германия) и Микроанализ (Россия).

4. Статистическая обработка с использованием лицензионного пакета программ MS Office 2003, достоверность определялась t-критерием Стьюдента.

Результаты собственных исследований и обсуждение. Иммуногистохимическое окрашивание препаратов тимуса интактных крыс 6 месяцев антителами к цитокератинам выявляет развитую сеть эпителиальных клеток коркового и мозгового вещества. Эпителиальные клетки занимают 8,3 % площади среза коркового и 21,9 % мозгового вещества дольки (рисунки 1, 2). Окраска антителами к белкам S-100 и синаптофизину выявляет многочисленные клетки нейроэктодермального и нейроэндокринного происхождения, которые локализуются в мозговом веществе и на границе коркового и мозгового вещества. Количество клеток, дающих положительную реакцию с белком S-100, достигает 18,4±2,98 в поле зрения, с синаптофизином – 12,8±3,05. Обработка срезов тимуса антителами к антиапоптотическому белку p-53 выявляет немногочисленные клетки,

локализованные в корковом и мозговом веществе, число которых не превышает 6,04 ±1,7 клетки в поле зрения. Окраска тимуса антителами к CD 3 выявляет многочисленные зрелые тимоциты коркового и мозгового вещества, которые занимают 12,3 % площади коркового и 53,1 % площади мозгового вещества.

В тимусе интактных крыс 9 месяцев выявляются признаки возрастной инволюции, которые выражены в снижении массы железы, уменьшении площади дольки и мозгового вещества, а также толщины коркового слоя, но эти морфологические характеристики меняются недостоверно, тогда как количественные показатели иммуногистохимических реакций подвержены существенным изменениям. Установлено, что в тимусе интактных крыс 9 месяцев достоверно возрастает число кортикальных эпителиоцитов, которые занимают 15,7 % ($P<0,01$) площади дольки. В мозговом же веществе отмечено достоверное уменьшение числа этих клеток до 16,9 % ($P<0,01$). Окраска препаратов тимуса интактных крыс 10 месяцев антителами к белкам S-100 и синаптофизину выявляет существенное увеличение числа клеток, дающих положительную реакцию, до 34,3±5,3 ($P<0,01$) и 22,5±3,45($P<0,01$) соответственно. Обработка тимуса антителами к антиапоптотическому белку p-53 выявляет достоверное увеличение числа клеток, экспрессирующих этот антиген, до 26,8±5,78 ($P<0,001$) в поле зрения, при этом клетки располагаются преимущественно периваскулярно. Количество зрелых кортикальных тимоцитов, дающих реакцию с CD 3, возрастает до 28,76 % ($P<0,01$), тогда как в мозговом веществе снижается до 35,67 % ($P<0,01$). Следует отметить, что изменения в тимусе ложнооперированных крыс на всех сроках достоверно не отличались от значений у интактных животных.

Таким образом, возрастная инволюция сопровождается изменением соотношения эпителиальных клеток в тимической паренхиме с уменьшением их количества в мозговом веществе, повышением экспрессии антиапоптотического белка p-53 в структурах дольки, увеличением количества клеток нейроэктодермального и нейроэндокринного происхождения, а также разнонаправленным изменением количества зрелых тимоцитов в корковом и мозговом веществе.

Через месяц после удаления селезенки отмечается уменьшение средней массы тимуса, а также площади мозгового и толщины коркового вещества по сравнению с интактными крысами. Окраска препаратов тимуса крыс через месяц после спленэктомии антителами к цитокератинам выявляет достоверное уменьшение количества эпителиальных клеток в мозговом веществе до 13,9 ($P<0,01$), тогда как их количество в корковом веществе меняется не достоверно. Обработка срезов антителами к синаптофизину выявляет достоверное увеличение клеток, экспрессирующих этот антиген, до 19,6±0,7 ($P<0,01$) клеток в поле зрения, тогда как число клеток, экспрессирующих S-100, меняется не достоверно. При

исследовании антиапоптотического белка р-53 выявлено его достоверное повышение до 8,62 ±0,24 (P<0,01) клеток в поле зрения. Значимых изменений в количестве зрелых тимоцитов в дольке по сравнению с животными из групп контроля не выявлено.

Через 120 суток после спленэктомии дольки тимуса уменьшены в размерах, в них с трудом прослеживается граница между корковым и мозговым веществом. Междольковые септы расширены и заполнены жировой тканью, на периферии железы определяются скопления крупных клеток с оксифильной цитоплазмой без лимфоцитов. Окраска препаратов тимуса антителами к цитокератинам выявляет густую сеть эпителиальных клеток в сохраненных дольках, а в периферических отделах тимуса – поля эпителиальных клеток без лимфоцитов (рисунки 3,4). При помощи компьютерной морфометрии установлено, что эпителиоциты занимают 20,3 % площади коркового и 22,09 % площади мозгового вещества, однако их количество превышает значения у интактных крыс недостоверно. При обработке препаратов антителами к белкам S-100 и синаптофизину выявляются многочисленные клетки нейроэктодермального и нейроэндокринного происхождения, количество которых достоверно выше (P<0,01), чем у интактных и ложнооперированных животных (рисунок 4). Окраска антителами к белку-регулятору апоптоза р-53 демонстрирует недостоверное увеличение количества клеток, экспрессирующих этот антиген по сравнению с интактными и ложнооперированными крысами. Исследование экспрессии CD 3 выявило достоверное снижение количества зрелых тимоцитов в мозговом веществе тимуса (P<0,01), тогда как количество этих клеток в корковом веществе изменяется не достоверно.

Таким образом, инволюция тимуса после спленэктомии сопровождается увеличением числа эпителиальных клеток, достоверным уменьшением количества зрелых тимоцитов в мозговом веществе, а также достоверным повышением количества клеток нейроэндокринного и нейроэктодермального происхождения. Мы считаем, что увеличение количества эпителиальных клеток и в корковом, и в мозговом веществе дольки, вероятно, является относительным и обусловлено уменьшением числа тимоцитов. Известно, что спленэктомия сопровождается длительным повышением уровня кортизола [2], который нарушает поступление в железу костномозговых предшественников и может усиливать апоптоз [6]. В наших экспериментах показано, что спленэктомия сопровождается достоверным уменьшением количества зрелых тимоцитов в мозговом веществе тимуса, при этом увеличения экспрессии белка-регулятора апоптоза р-53 в его структурах не наблюдается.

Мы также установили, что спленэктомия приводит к увеличению числа клеток тимопоэтического окружения, экспрессирующих белки S-100 и синаптофизин. Известно, что в тимусе позитивную реакцию с маркером нейроэктодермальной дифференцировки S-100

дают медуллярные ДК и некоторые популяции эпителиальных клеток, входящие в состав периваскулярных пространств медуллярной зоны (PVS), а с синаптофизином – нейроэндокринные клетки медуллярной зоны, которые причисляют к клеткам АПУД-серии [3, 7]. Нейромедиаторы, выделяемые нейроэндокринными клетками, регулируют деятельность клеток микроокружения тимоцитов и секрецию ими гормонов и интерлейкинов, которые, в свою очередь, необходимы для созревания и дифференцировки Т-лимфоцитов. Кроме того, нейромедиаторы и белки, выделяемые ДК и клетками APUD-серии, регулируют пролиферацию и апоптоз тимоцитов [8]. Мы считаем, что увеличение числа этих клеток может быть обусловлено как изменением соотношения тимоцитов к компонентам микроокружения вследствие инволюции, так и реакцией этих структур на повышенный уровень кортизола.

Заключение. Таким образом, изменения тимуса в первые четыре месяца после спленэктомии имеют иммунофенотипические и морфологические отличия от возрастной инволюции у крыс соответствующего возраста, при этом они протекают иначе, чем стресс-индуцированная острая атрофия. Вероятно, инволюция тимуса после спленэктомии имеет более сложные патогенетические механизмы, чем стресс-индуцированная атрофия, и реализована через структуры тимопоэтического микроокружения с изменением гормонального и цитокинового профиля и последующим снижением тимопоэза, без прямой стимуляции апоптоза тимоцитов.

Работа выполнена в рамках гос. контракта № 02.740.11.0708 ФЦП «Научные и научно-педагогические кадры инновационной России» на 2009–2013 гг.

Рисунки

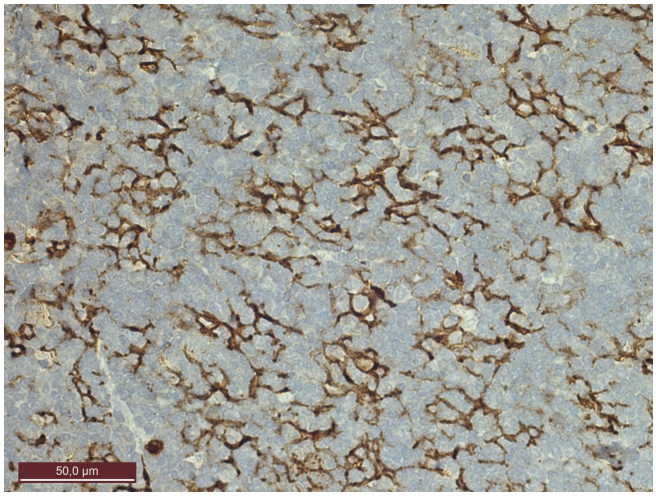

Рисунок 1. Тимус интактной крысы 6 месяцев. Скопления эпителиальных клеток в корковом веществе. Иммуногистохимическая реакция к цитокератинам, ув. 400

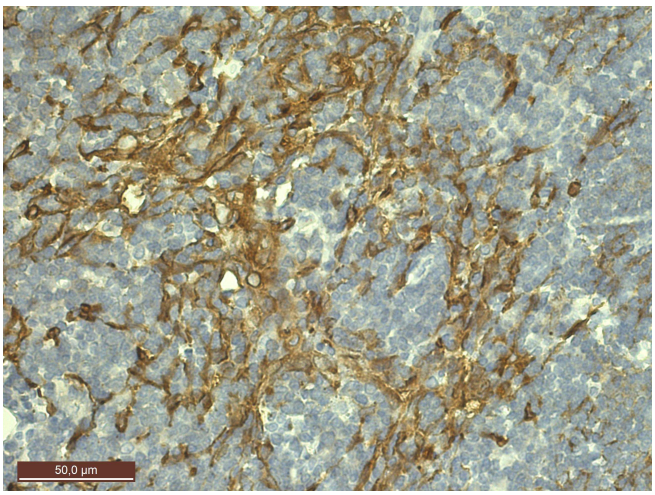

Рисунок 2. Тимус интактной крысы 6 месяцев. Эпителиальные клетки мозгового вещества, формирующие подобие «сети». Иммуногистохимическая реакция к цитокератинам, ув. 400

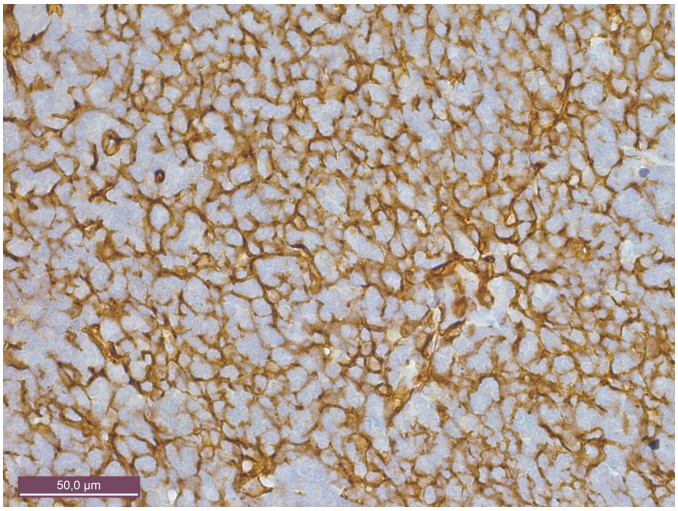

Рисунок 3. Тимус спленэктомированной крысы 9 месяцев. Увеличение числа эпителиальных клеток коркового вещества в сохраненной дольке. Иммуногистохимическая реакция к цитокератинам, ув. 400

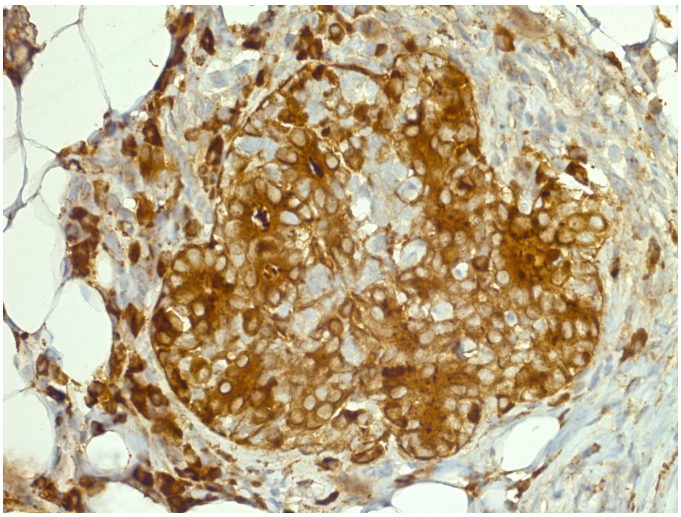

Рисунок 4. Тимус спленэктомированной крысы 9 месяцев. Атрофированная периферическая долька, состоящая из скоплений эпителиальных клеток без лимфоцитов. Иммуногистохимическая реакция к цитокератинам, ув. 400

Список литературы

1. Бабаева А. Г. Реактивные изменения в тимусе и селезенке как ответ на хирургическое вмешательство / А. Г. Бабаева, Е. И. Гиммельфарб, И. И. Калинина // Архив патологии. – 1995. – Т. 2. – № 57. – С. 58-61.
2. Стручко Г. Ю. Морфофункциональное исследование тимуса и иммунобиохимических показателей крови после спленэктомии и иммунокоррекции: автореф. дис... докт. мед. наук. – Саранск, 2003. – 23 с.
3. Bai M. Immunohistochemical expression patterns of neural and neuroendocrine markers, the neural growth factor receptors and the beta-tubulin II and IV isotypes in human thymus // Anticancer Research. – 2008. – Vol. 28, № 1(A). – P. 295-303.
4. Gruver A. L. Cytokines, leptin, and stress-induced thymic atrophy / A.L. Gruver, G. D. Sempowski // Journal of Leukocyte Biology. – 2008. – Vol. 84, № 4. – P. 915–923.
5. Hale L. P. Histologic and molecular assessment of human thymus // Ann Diagn Pathol. – 2004. – Vol. , № 2. 1. – P. 50-60.
6. Herold M. Glucocorticoids in T cell apoptosis and function / M. J. Herold, M. J. McPherson, H. M. Reichardt // Cell Mol Life Science. – 2006. – Vol. 63, № 1. – P. 60–72.
7. Raica M. Structural heterogeneity and immunohistochemical profile of Hassall corpuscles in normal human thymus // Annals of Anatomy. – 2006. – Vol. 188, № 4. – P. 345-352.
8. Savino W. Hematopoiesis / W. Savino, S. Smaniotto, M. Dardenne // Advances in Experimental Medicine and Biology. – 2005. – № 567. – P. 167-185.
9. Smith L. K. Glucocorticoid-induced apoptosis of healthy and malignant lymphocytes / L. K. Smith, J. A. Cidlowski // Prog Brain Research. – 2010. – № 182. – P. 1-30.
10. Takehiro O. Overwhelming postsplenectomy infection syndrome in adults – A clinically preventable disease / O. Takehiro, H. Kazuhiro // World Journal of Gastroenterolgy. – 2008. – Vol. 14, №2. – P. 176-179.

Рецензенты:

Ямщиков Николай Васильевич, доктор медицинских наук, профессор, зав. кафедрой гистологии и эмбриологии ГБОУ ВПО «Самарский государственный медицинский университет» Минздравсоцразвития РФ, г. Самара.

Челышев Юрий Александрович, доктор медицинских наук, профессор, заведующий кафедрой гистологии, цитологии и эмбриологии ГБОУ ВПО «Казанский государственный медицинский университет», г. Казань.