

АНАЛИЗ ГИСТОЛОГИЧЕСКИХ ИЗМЕНЕНИЙ ТИМУСА ПРИ КОМБИНИРОВАННОМ ВВЕДЕНИИ ГИДРОКОРТИЗОНА И АНТИГЕНА

Зассеева М. Д.¹, Полевщиков А. В.²

¹ФГБОУ ВО «Санкт-Петербургский государственный университет», Санкт-Петербург, e-mail: maya-zass@mail.ru;

²ФГАОУ ВПО «Дальневосточный государственный университет», Владивосток, e-mail: ALEXPOL512@yandex.ru

Работа посвящена анализу результатов автоматизированной обработки срезов тимуса мыши после иммунизации, введения 2,5 мг гидрокортизона или при их комбинировании. Всего в работе использовано свыше 100 мышей. Автоматизированный подсчет клеток на гистологических препаратах тимуса мыши производили при помощи лицензионного программного обеспечения «ImageJ» 1.48d. Подсчет клеток проводили на участке препарата площадью 10 000 мкм². Установлено, что иммунизация эритроцитами человека вызывала прирост клеточности кортекса (максимум на сроках 2–4 сутки) и медуллы (на сроках 4–6 сутки). Введение гидрокортизона приводило к выраженному снижению клеточности кортекса, но не медуллы. Клеточность кортекса полностью не восстанавливалась даже на 13 сутки. При комбинированном введении эритроцитов человека и гидрокортизона влияние гормона всегда приводило к опустошению тимуса вне зависимости, предшествовала ли иммунизация введению гормона или наоборот.

Ключевые слова: тимус, гистологическая структура, иммунизация, гидрокортизон, кортекс, медулла.

ANALYSIS OF HISTOLOGICAL CHANGES OF THE THYMUS IN COMBINED ADMINISTRATION OF HYDROCORTISONE AND THE ANTIGEN

Zasseeva M. D.¹, Polevshchikov A. V.²

¹Saint Petersburg State University, Saint Petersburg, e-mail: maya-zass@mail.ru;

²Far Eastern Federal University, Vladivostok, e-mail: ALEXPOL512@yandex.ru

The work is devoted to the analysis of the results of the automated processing of sections of mouse thymus after immunization, injection of 2.5 mg of hydrocortisone or when they are combined. Just used over 100 mice. Automated counting of cells in histological preparations of the thymus of the mouse was performed using licensed software "ImageJ" 1.48 d. The cell counting was carried out in the area of preparation area of 10 000 μm². It was found that immunization with HRBC caused an increase in cellularity of the cortex (maximum at 2–4 days) and medulla (at the time 4–6 days). The administration of hydrocortisone resulted in a marked reduction in cellularity of the cortex, but not medulla. The cellularity of the cortex is not fully recovered even in 13 days. When combined with the introduction of HRBC and the effect of hydrocortisone hormone always led to devastation of the thymus regardless of whether preceded by immunization with the introduction of the hormone, or Vice versa.

Keywords: thymus, histological structure, immunization, hydrocortisone, cortex, medulla.

Тимус, являясь центральным органом иммунной системы, хорошо защищен от воздействия внешних факторов. Наиболее всего распространена теория, согласно которой в тимусе происходит только созревание и дифференцировка Т-лимфоцитов [8]. В ряде экспериментов антиген вводился непосредственно в тимус, чем вызывались определенные гистологические изменения, в частности – появление зародышевых центров и плазматических клеток. При этом морфологические изменения при внутривенном введении антигена еще долгое время показать не удавалось. Ввиду всего этого возникла теория существования гемато-тимического барьера в тимусе, сходного с таковым барьером в центральной нервной системе. Считается, что роль гемато-тимического барьера заключается

в препятствии попаданию антигена в периваскулярное пространство через кровеносные сосуды. В действительности гемато-тимический барьер оказался не столь непроницаемым. Так, при внутривенном введении мышам и кроликам радиоактивно меченого овальбумина была установлено, что меченый антиген попадает во внесосудистое пространство тимуса [9]. В мозговое, но не корковое вещество тимуса молекулы из кровотока проникают через эндотелий венул. В паренхиму мозгового вещества могут проникнуть такие макромолекулы, как каталаза и ферритин, пероксидаза и цитохром С, но дальнейшее их распространение ограничено структурными взаимодействиями элементов паренхимы. При экспериментах с внутривенным введением трансферрина был получен аналогичный результат [10].

После внутрибрюшинного введения эритроцитов барана (ЭБ) у мышей значительно увеличивается синтез РНК в тимусе, а также повышается синтез гемолизинов против ЭБ. В ответ на внутрибрюшинное введение мышам бычьего сывороточного альбумина масса тимуса то уменьшается, то увеличивается. Через 12 ч после инъекции масса тимуса значительно снижается, а через 24 ч масса тимуса иммунизированных животных нормализуется и соответствует контрольным значениям, при этом увеличения числа пикнотических телец или кариорексиса не наблюдалось, что указывает на уменьшение массы тимуса не вследствие массовой гибели лимфоцитов, а в результате их эмиграции из тимуса в ответ на иммунизацию [3]. Новые данные по иммунофизиологии тимуса требуют проведения морфологических исследований, способных подтвердить или поставить под сомнение результаты, полученные с использованием методов молекулярной биологии и проточной цитометрии.

Целью работы является сравнение морфологических изменений тимуса после атрофии, вызванной введением гидрокортизона, иммунизации и их комбинаций с использованием гистологических методов и автоматизированного анализа препаратов для подсчета числа клеток в корковом и мозговом веществах тимуса после указанных воздействий.

Материалы и методы исследования

В эксперименте использовали самок белых нелинейных мышей и мышей линии СВА обоего пола массой тела в среднем 20 г и возрастом 6–8 недель, которых содержали при комнатной температуре, режиме освещения 12/12 ч и неограниченном доступе к корму и воде. Работа с животными проводилась с соблюдением всех правил гуманного обращения с лабораторными животными. Умерщвление животных осуществляли с помощью цервикальной дислокации, после чего тимус немедленно извлекали и фиксировали. Всего в экспериментах было задействовано более 100 животных.

С целью описания морфологии тимуса при стресс-индуцированной атрофии животным проводили внутрибрюшинные инъекции глюкокортикоидных гормонов (Gedeon Richter, Венгрия) в дозировке 2,5 мг на мышь. Интактные животные выступали в качестве контрольной группы. Вскрытие животных и извлечение тимуса проводили на временных точках от 1-х до 13-х суток после инъекции гидрокортизона. На каждую точку брали не менее 5 животных. Для изучения морфологии тимуса при иммунизации животным проводили внутрибрюшинные инъекции 10 % суспензии эритроцитов человека (ЭЧ) в физиологическом растворе (0,14 М раствор NaCl, ФР) по 0,5 мл на мышь. Вскрытие животных и извлечение тимуса проводили от 1-х до 13-х суток после иммунизации. Контрольным животным вводили физиологический раствор без ЭЧ, а также использовали интактных мышей. На каждую точку брали 5 животных.

С целью описания морфологии тимуса при сочетанном введении глюкокортикоидных гормонов и антигенов использовали две схемы опыта. В первой схеме мышей исходно иммунизировали ЭЧ внутрибрюшинно описанным выше способом. На третьи сутки внутрибрюшинно вводили 2,5 мг гидрокортизона. Вскрытие животных осуществляли каждые 24 ч до 8-х суток после иммунизации. На каждую точку брали 5 животных. Интактные животные выступали в качестве контрольных. Во второй схеме мышам внутривенно вводили 2,5 мг гидрокортизона, а через 72 ч животных иммунизировали ЭЧ. Интактные животные выступали в качестве контрольных. Вскрытие животных и извлечение тимуса проводили с 1-х по 8-е сутки после введения гидрокортизона. На каждую точку брали 8 животных.

Для фиксации образцов после извлечения использовали модифицированную смесь этиловый спирт-формалин-уксусная кислота (СФУ) в соотношении 9:3:1 с последующей заменой через 24 ч на 70 %-й этанол, в котором образцы хранили до использования. После заливки в парафин готовили гистологические срезы толщиной 5 мкм и 4 мкм (микротом Reichard, Германия) с использованием предметных и покровных стекол «BioVitrum» (Россия) и «Menzel-Gläser» (Германия). Полученные срезы депарафинировали и окрашивали гематоксилин-эозином по общепринятой методике. Препараты микроскопировали на микроскопах Leica DM 6000B в режиме Battle Field и Carl Zeiss Axioskop 40, фотографии препаратов получали с помощью указанных микроскопов и фотокамер Leica DFC500 и QImaging Micro Publisher 5.0 RTV, соответственно.

Автоматизированный подсчет клеток на гистологических препаратах тимуса мыши производили при помощи лицензионного программного обеспечения «ImageJ» 1.48d (Wayne Rasband, США). Подсчет клеток проводили на участке препарата площадью 10 000 мкм². Уровни контрастности и яркости подбирали таким образом, чтобы максимально отделить

ядра от фона. Изображение сглаживали при помощи фильтра «Гауссово размытие» с последующей бинаризацией изображения. Для разделения ядер использовали опцию «Водораздел». Подсчет ядер осуществляли при помощи опции «Анализ частиц», при этом объекты площадью менее 5 мкм², а также ядра на границах изображения в расчёт не принимали. Неучтенные программой ядра подсчитывали вручную.

В ходе статистического анализа среднее значение ± ошибка среднего определяли по каждой временной точке. Затем средние в разных точках сравнивали со значениями для интактных мышей, используя t-критерий Стьюдента с уровнем значимости $p < 0,05$, с помощью программного обеспечения IBM SPSS Statistics 20.

Результаты исследования и их обсуждение

После иммунизации ЭЧ признаков атрофии тимуса не наблюдалось, что не совпадает с некоторыми данными литературы о снижении числа лимфоцитов тимусе на фоне иммунизации животных [4]. После иммунизации ЭЧ, как и в интактном тимусе, в кортикальной зоне отмечается большое число митотических фигур, которые лишь изредка наблюдаются в медулле. Это полностью подтверждается результатами автоматизированного подсчета числа тимоцитов в разных участках тимической дольки после введения ЭЧ (Табл. 1), что существенно отличается от литературных данных, поскольку согласно общепринятым представлениям тимус является центральным органом иммунной системы, который защищен от внешних воздействий и, следовательно, не вовлечен в процесс иммунного ответа и, следовательно, не должен реагировать на введение антигена. Максимальное число лимфоцитов на 10 000 мкм² в кортексе отмечено на точках 48 и 72 ч после иммунизации, в медулле – на точке 48 ч. На максимуме отмечено повышение содержания лимфоцитов в корковом веществе в 2,26 раза, в мозговом веществе – в 2,36 раза. Даже через 13 сут после иммунизации плотность клеток как в кортексе, так и в медулле достоверно превышает показатели для интактных животных (точка 0 ч, Табл.1). Этот результат наводит на мысль о несовершенстве представлений об иммунопривилегированности тимуса и полном его неучастии в процессе развития иммунного ответа. Тем не менее, и ранее многочисленные исследования показали возможность проникновения антигена в тимус и условность гемато-тимического барьера [2,5-7].

Таблица 1

Динамика удельной численности лимфоидных клеток кортекса и медуллы тимуса мыши (на 10 000 мкм²) в ответ на иммунизацию эритроцитами человека и введение 2,5 мг гидрокортизона, $X \pm s$, $n \geq 5$ по каждой точке

Сутки	Кортекс			Медулла		
	ЗФР (контроль)	ЭЧ	ГК	ЗФР (контроль)	ЭЧ	ГК

0 (интакт)	367 ± 14			282 ± 11		
1	378 ± 18	428 ± 24***	288 ± 28*	295 ± 13	297 ± 13	254 ± 14
2	390 ± 24	552 ± 32***	113 ± 11***	307 ± 19	369 ± 22*	210 ± 34*
3	360 ± 7	542 ± 20***	54 ± 6***	305 ± 14	317 ± 15	175 ± 36***
4	344 ± 16	383 ± 17	145 ± 24**	280 ± 16	267 ± 9	195 ± 15**
7	352 ± 8	364 ± 14	311 ± 25	264 ± 21	256 ± 9	218 ± 8
10	378 ± 26	314 ± 18	365 ± 12	270 ± 18	243 ± 10	242 ± 22
13	382 ± 21	327 ± 12*	346 ± 18	293 ± 24	237 ± 11	260 ± 14

Примечание: * – различия с контролем достоверны по критерию t Стьюдента при $p < 0,05$; ** – $p < 0,01$; *** – $p < 0,001$.

Согласно результатам морфологических исследований введение гидрокортизона вызывало атрофию тимуса, которая проявлялась как в уменьшении линейных размеров, так и в изменении гистологической структуры органа. В табл. 1 приведены результаты автоматизированной обработки микрофотографий коркового и мозгового вещества тимуса на фоне введения 2,5 мг гидрокортизона. Из данных табл.1 видно, что достоверное снижение плотности тимоцитов в корковом веществе формируется через 48 ч после введения гидрокортизона, достигает минимума через 72 ч и начинает восстанавливаться через 96 ч. Однако полного восстановления размеров органа не происходит даже через 13 сут после введения гидрокортизона. В мозговом веществе плотность лимфоцитов изменяется в гораздо меньшей степени, от 282 клеток на 10000 мкм² у интактных животных (точка 0) до 175 ядерных клеток через 72 ч после введения гидрокортизона. Достоверное снижение плотности клеток в мозговом веществе наблюдается только с 3-х до 7-х суток эксперимента, после чего показатели возвращаются к исходному уровню.

Подсчет числа клеток в корковой и мозговой зонах тимуса позволил получить важные данные об изменении морфологии тимуса при последовательном введении антигена и гидрокортизона (табл. 2). В ответ на введение ЭЧ отмечается подъем содержания тимоцитов, прежде всего в корковом веществе. При этом в клеточности медуллы достоверных изменений не наблюдается.

Таблица 2

Динамика удельной численности лимфоидных клеток кортекса и медуллы тимуса мыши (на 10 000 мкм²) в ответ на комбинированное введение эритроцитов человека и 2,5 мг гидрокортизона, $X \pm s$, $n \geq 5$ по каждой точке

Сутки	Кортекст		Медулла	
	ЭЧ + ГК (на 3-и сутки)	ГК + ЭЧ (на 3-и сутки)	ЭЧ + ГК (на 3-и сутки)	ГК + ЭЧ (на 3-и сутки)
0	367 ± 14		282 ± 11	

(интакт)				
1	375 ± 24	288 ± 28*	249 ± 15	254 ± 14
2	385 ± 21	113 ± 11***	264 ± 14	210 ± 34*
3	421 ± 18*	54 ± 6***	304 ± 12	175 ± 36**
4	194 ± 47***	148 ± 28***	275 ± 26	210 ± 15*
5	113 ± 52***	275 ± 41*	270 ± 24	285 ± 48
6	203 ± 34***	265 ± 32*	291 ± 34	325 ± 31
7	218 ± 26***	280 ± 24*	295 ± 11	340 ± 25*
8	256 ± 44*	320 ± 19*	303 ± 21	330 ± 36

Примечание: * - различия с интактом (точка 0) достоверны по критерию t Стьюдента при $p < 0,05$; ** – $p < 0,01$; *** – $p < 0,001$.

Сходная картина наблюдается при иммунизации ЭЧ на фоне предварительного введения гидрокортизона. Так, через 96 ч после иммунизации и 7 суток после введения гидрокортизона кортекс весьма беден клетками, а морфологически тимус имел классический инвертированный вид. В медулле плотность клеток относительно высока и менее восприимчива к такой схеме экспериментального воздействия, что подтверждается результатами подсчета числа клеток в $10\ 000\ \text{мкм}^2$ в кортексе и медулле при такой схеме введения гидрокортизона и иммунизации ЭЧ (Табл. 2). Отчетливо видно, что до иммунизации уровень содержания клеток в корковом и мозговом веществе тимуса ничем не отличается от результатов, приведенных для введения гидрокортизона. Но и последующая иммунизация ЭЧ практически не меняет динамики восстановления содержания тимоцитов на фоне предшествующего введения гидрокортизона. Лишь в мозговом веществе на сроках 6–8 суток после введения гидрокортизона и соответственно 3–5 суток после иммунизации намечается некая тенденция к превышению уровня содержания клеток в интактном тимусе (точка 0). Иными словами, предварительное введение гидрокортизона (или, возможно, стресса) приводит к столь существенной перестройке тимуса и обеднению тимуса клетками, что возможное усиление тимопоэза под влиянием иммунизации остается незаметным.

Ранее многочисленные исследования показали возможность проникновения антигена в тимус и условность гемато-тимического барьера [2,5-7]. Однако практически двукратное повышение содержания тимоцитов в кортексе и в медулле в ходе иммунного ответа на ЭЧ позволяет предполагать, что тем или иным способом тимус связан с процессом иммуногенеза. Тимус не становится периферическим органом иммунного ответа и местом продукции антител, что было многократно показано. Классический анализ работ, доказывающих неучастие клеток тимуса в синтезе антител, как и возможность развития иммунного ответа в тимусе при прямом внутритимическом введении антигена, был проведен в монографии Ф. Бернета [1]. Поэтому повышение числа клеток в тимусе в ходе иммунного

ответа на ЭЧ может иметь два объяснения. Во-первых, нельзя исключить, что усиление пролиферативной активности в тимусе после иммунизации является следствием продукции дифференцировочных цитокинов, управляющих пролиферацией тимоцитов (например, IL-3, IL-7) в ходе иммунного ответа, протекающего в периферических лимфоидных органах. Во-вторых, нельзя полностью исключить и вариант заноса в тимус антиген-презентирующих клеток, нагруженных антигеном вне тимуса, и прямой индукции пролиферации созревающих Т-лимфоцитов. Возможности перемещения в тимус нагруженных антигеном АПК была показана ранее. Тогда тимус может быть местом формирования CD4⁺ T_H2, продуцирующих IL-4 и обслуживающих развитие гуморального ответа в периферических лимфоидных органах, тем более, что ещё Ф. Бернет указывал на пролиферацию во вторичных лимфоидных фолликулах В-лимфоцитов, но Т-клеточных фолликулов в периферических лимфоидных органах за все годы исследований найдено не было [1]. Размножение Т-клеток в ходе иммунного ответа в тимусе и их последующий выход на периферию для реализации регуляторной в отношении В-лимфоцитов функции дает хорошую трактовку полученным в ходе работы результатам, но требует новых экспериментальных доказательств в силу существенного расхождения с наиболее распространенной схемой иммунного ответа. Однако эта гипотеза требует серьезных экспериментальных доказательств, поскольку неминуемо приводит к утверждению о вовлеченности тимуса в процесс иммунного ответа, полностью ставит под сомнение концепцию гемато-тимического барьера и, более того, позволяет предполагать наличие антиген-зависимых этапов дифференцировки Т-лимфоцитов.

Таким образом, полученные результаты полностью соответствуют данным литературы об организации тимуса, его инволюции под действием глюкокортикоидных гормонов. Однако они также указывают на наличие выраженных изменений в тимусе под влиянием иммунизации различными антигенами и существенную недооценку роли тимуса в процессе иммуногенеза. Однако точное значение и механизм выявленного повышения уровня содержания тимоцитов в кортексе и медулле в ответ на введение антигена могут быть раскрыты только в ходе последующих исследований.

Работа выполнена при финансовой поддержке Министерства образования и науки Российской Федерации (проект № 1326), гранта РФФИ №15-04-05093 и гранта ДВФУ №14-08-06-25_и.

Список литературы

1. Бернет Ф. Клеточная иммунология. – М.: Мир, 1971. – 544 с.
2. Васильев К. А. Нелимфоидные клетки тимуса рыб и проблема гематотимического барьера / К. А. Васильев, А. В. Полевщиков // Биология моря. – 2014. – Т.40, № 5. – С. 331–

3. Bryant B. J. Thymus lymphocytes. Efflux and restoration phases after peripheral exposure of mice to phytohaemagglutinin / Bryant B. J., Hess M. W., Cottier H. // *Immunology*. – 1975. – Vol.29. – P. 115–120.
4. Jaffe H. L. The influence of the suprarenal gland on the thymus : III. Stimulation of the growth of the thymus gland following double suprarenalectomy in young rats // *J. Exp. Med.* – 1924. – Vol.40. – P. 753–759.
5. Klein L. Antigen presentation in the thymus for positive selection and central tolerance induction / Klein L., Hinterberger M., Wirnsberger G., Kyewski B. // *Nat. Rev. Immunol.* – 2009. – Vol. 9. – P. 833–844.
6. Martin A. Changes in the blood-thymus barrier of adult rats after estradiol-treatment / Martin A., Casares F., Alonso L., Nieuwenhuis P., Vicente A., Zapata A. G. // *Immunobiology*. – 1995. – Vol.192. – P. 231–248.
7. Michie S. A. Rare peripheral T cells migrate to and persist in normal mouse thymus / Michie S. A., Kirkpatrick E. A., Rouse R. V. // *J. Exp. Med.* – 1988. – Vol.168. – P. 1929–1934.
8. Nieuwenhuis V. The transcapsular route: a new way for (self-) antigens to by-pass the blood-thymus barrier? / Nieuwenhuis V., Stet R. J., Wagenaar J. P., Wubbena A. S., Kampinga J., Karrenbeld A. // *Immunol. Today*. – 1988. – Vol.9. – P. 372–375.
9. Nunes-Alves C. Tolerance has its limits: how the thymus copes with infection / Nunes-Alves C., Nobrega C., Behar S. M., Correia-Neves M. // *Trends Immunol.* – 2013. – Vol. 34. – P. 502–510.
10. Raviola E. Evidence for a blood-thymus barrier using electron-opaque tracers / Raviola E., Karnovsky M. J. // *J. Exp. Med.* – 1972. – Vol.136. – P. 466–498.