

ИММУНОГИСТОХИМИЧЕСКОЕ ВЫЯВЛЕНИЕ СК5+-ЭПИТЕЛИОЦИТОВ ТИМУСА КРЫС РАННЕГО ПОСТНАТАЛЬНОГО ПЕРИОДА ПОСЛЕ ПРЕНАТАЛЬНОГО ГОРМОНАЛЬНОГО ВОЗДЕЙСТВИЯ

АРАВИЦКИЙ Е.О.

Aravitskiyevgeniy@i.ua

Ассистент кафедры нормальной физиологии

Запорожский государственный медицинский университет

г. Запорожье, Украина

АРАВИЦКАЯ ДЖ.Н.

Syegmund94@gmail.com

Запорожский государственный медицинский университет

г. Запорожье, Украина

Актуальность: Существуют тесные взаимоотношения между изменениями строения тимуса и активностью надпочечников. Морфофункциональное состояние вилочковой железы у новорожденных зависит от продолжительности антенатальной активации гипофизарно-надпочечниковой системы. В дальнейшей жизни, определенная роль в развитии острой инволюции тимуса принадлежит стрессовым состояниям, которые также реализуют реактивные сдвиги в гипоталамо-гипофизарно-надпочечниковой системе, приводящие к увеличению содержания кортикостероидов в крови [3, 5]. Таким образом, при условии длительного непрерывного воздействия на организм, вилочковая железа отвечает на стрессорную стимуляцию акцидентальной инволюцией, при которой происходит снижение массы органа за счет уменьшения количества тимоцитов в корковом веществе, что в конце концов приводит к необратимой атрофии органа [4]. Ключевым для развития иммунокомпетентных Т-лимфоцитов

является формирование необходимого клеточного и гуморального микроокружения в тимусе [1,6]. Эпителиоретикулоциты формируют клеточную основу специфического микроокружения, регулирующего процессы пролиферации и дифференцировки предшественников Т-лимфоцитов, разрушения и взаимодействия лимфоцитов, передачи антигенного стимула [7]. Основные функции эпителиоретикулоцитов тимуса основываются на контактных взаимодействиях с тимоцитами. Группа мембранных молекул - интегринов, селектинов, кадгеринив (LFA-1, ICAM-2, ICAM-3, рецепторов семейства L- и E-селектина и т.д.) обеспечивает межклеточную адгезию между эпителиоретикулоцитами и лимфоидными клетками вилочковой железы. Контакты между эпителиоретикулоцитами и лимфоидными клетками важны для передачи ростовых и дифференцировочных сигналов и для осуществления селекции. В цитоплазме эпителиальных клеток тимуса присутствуют цитокератин-промежуточные филаменты, которые синтезируются на этапе дифференцировки. Качество сборки промежуточных филаментов влияет на механическую стабильность и целостность эпителия [2]. Тип эпителиальных клеток определяет набор цитокератинов, который зависит от условий роста и стадий гистогенеза [2].

Дальнейшее становление эпителиальных клеток идет под контролем каскада дифференцировочных факторов (Noxa 3, Pax 1, Pax 9, Eya 1, Six 1, Foxp 1 и Gcm 2), экспрессируемых в глоточной энтодерме. В результате эпителиоретикулоциты одновременно экспрессируют цитокератины СК 5 и 8. В этот период на развитие эпителиальных клеток влияют продукты генов Fgf (Fibroblast growth factors), что определяет дифференцировку в кортикальные (СК8+) и медуллярные (СК5+) эпителиальные клетки.

Логинова Н.П., Четвертных В.А. (2014) отмечают, что механизмы нарушения функционирования вилочковой железы сопровождаются не только гибелью лимфоидного компонента тимуса, но и нарушением архитектоники эпителиальной стромы за счет снижения экспрессии цитокератинов 5 и 8. Это, в свою очередь, влияет на качество развития лимфоцитов на этапе их

антигеннезависимой дифференцировки, поэтому незрелость эпителиального компонента приводит к нарушению продукции цитокинов.

Влияние глюкокортикостероидов на морфо-функциональное состояние тимуса, в частности на морфологию и рецепторный состав эпителиальных клеток тимуса, формирующего микроокружение для тимоцитов, является неоднозначным и требует более детального изучения.

Материалы и методы: Исследования проведены на 144 белых нелинейных крысах на 1, 2, 3, 5, 9, 14, 21, 30 сутки после рождения. Было выделено 3 группы по 48 крыс в каждой: группа 1 – интактные; группа 2 – экспериментальные, которым на 18-ые сутки чрезматочно, чрезоболочечно, внутриплодно было введено 0,05 мл гормона дексаметазона, группа 3 – контрольные, которым вводился 0,05 мл 0,9% NaCl. Микроскопическое исследование проводили с использованием светооптического микроскопа – CarlZeissPrimoStar (Германия). Для изучения распределения рецепторов к цитокератину 5 использовали стандартные наборы моноклональных антицитокератиновых мышинных антител 5 из асцитической жидкости (№ C7785), производства Sigma-Aldrich (St.Louis, USA). Комплексы первичное антитело-цитокератиновый рецептор выявляли с помощью системы визуализации «Мышиная ABC система окраски ImmunoCruz™: sc-2017», производства SantaCruz Biotechnology (California, USA). Содержание рецепторов к цитокератину 5 в цитоплазме эпителиальных клеток оценивалось полуколичественным методом (от + до +++). Интенсивность окраски срезов оценивали следующим образом: +++ - сильная реакция (коричневый цвет), ++ - умеренная реакция (желто-коричневый цвет), + - слабая реакция (светло-коричневый цвет), 0 - отсутствие реакции. Микроскопическое исследование проводили с использованием светооптического микроскопа – Carl Zeiss PrimoStar (Германия). При иммерсионном увеличении микроскопа (x1000).

Цель: изучить особенности распределения и экспрессии цитокератина 5 в цитоплазме эпителиальных клеток тимуса в норме и после пренатального введения гормона дексаметазона.

Результаты и их обсуждение: Введение физиологического раствора контрольной группе животных не вызвало достоверных изменений по сравнению с интактной группой.

Положительная экспрессия СК5 позволяет дифференцировать эпителиальные клетки стромы в пределах коркового вещества дольки тимуса. Положительную экспрессию СК5 наблюдали в клетках субкапсулярной зоны и клетках, прилежащих к базальной мембране. Эпителиальные клетки имеют крупное светлое ядро, которое занимает большую часть цитоплазмы. Отростки эпителиальных клеток контактируют друг с другом, формируя т.н. ретикуло-эпителиальный каркас. Сеть, образованная отростками эпителиоретикулоцитов, имеет выраженный характер в субкапсулярной зоне тимуса. Во внутренней коре СК5⁺-эпителиальные клетки своими отростками не формируют сеть, а представляют собой разрозненные группы клеток или располагаются единично.

На 1-е сутки после рождения в интактной группе выявляется умеренная (++) экспрессия СК5, а в группе крыс, после введения дексаметазона интенсивность экспрессии ниже и определяется на низком уровне (+).

Таблица 1

Распределение СК5⁺-эпителиальных клеток в тимусе крыс в
постнатальном периоде

Сутки	Интактная группа	Экспериментальная группа	Контрольная группа
1-е	++	+	++
2-е	++	++/+	++
3-е	++	++/+	++
5-е	++/+	++/+	++/+
9-е	++/+	+	++/+
14-е	++/+	+	++/+
21-е	+	+	+
30-е	+	+	+

На 2-е сутки после рождения в интактной группе крыс рецепторы СК5 экспрессируются на том же уровне, что и на 1-е сутки после рождения (см. табл. 1). В экспериментальной группе интенсивность экспрессии СК5 незначительно увеличивается (см. табл. 1).

На 3-е сутки постнатального периода интенсивность экспрессии СК5 в интактной и экспериментальной группах сохраняется на прежнем уровне (см. табл. 1).

На 5-е сутки постнатального периода в тимусе интактной группы крыс выявлено незначительное снижение уровня экспрессии СК5, а в экспериментальной группе показатель остается на прежнем уровне по сравнению с предыдущими сутками (см. табл. 1).

На 9-е сутки после рождения в интактной группе выявлена невысокая (++/+), а в экспериментальной группах крыс низкая (+) степень экспрессии СК5.

Через 2 недели после рождения уровень экспрессии СК5 остается на прежнем уровне во всех исследуемых группах животных (см. табл. 1).

На 3-ю неделю постнатального периода в интактной группе крыс уровень экспрессии СК5 незначительно снижается, а в экспериментальной группе остается на прежнем уровне. При этом, во всех группах выявлена низкая степень экспрессии СК5 (см. табл. 1).

На 30-е сутки после рождения интенсивность экспрессии СК5 практически не изменяется по сравнению с предыдущим исследуемым сроком и регистрируется на низком уровне во всех группах.

В корковом веществе тимуса крыс после пренатального введения дексаметазона была прослежена закономерность экспрессии цитокератинов. СК5⁺-эпителиальные клетки определялись преимущественно в субкапсулярной зоне, где формировали своими отростками крупнопетлистую сеть. Во внутренней коре СК5⁺-эпителиоретикулоциты располагались группами по несколько клеток или поодиночке. Во все исследуемые сроки в группе крыс,

которым вводили дексаметазон выявлена тенденция к снижению количества рецепторов к цитокератину 5. С 1-х по 3-и сутки и с 9-х по 14-е постнатального периода интенсивность экспрессии СК5 в корковом веществе выявляется более низкой, чем у животных интактной группы. На 5-е, 21-е и 30-е сутки количество рецепторов СК5 выравнивается между группами и определяется на невысоком уровне.

Таким образом, в тимусе после пренатального введения дексаметазона, в течение первого месяца жизни эпителиальные клетки теряли контакты между собой, нарушая архитектуру эпителиальной сети, особенно во внутренней коре тимуса. Полученные иммуногистохимические и морфологические особенности состояния клеток стромы отражают начальные признаки эпителио-мезенхимальной дистрофии, проявляющиеся репрессией молекул межклеточной адгезии и снижением экспрессии эпителиальных маркеров (цитокератинов), что сопоставляется с результатами работ [3, 5, 7]. В результате пренатального влияния дексаметазона эпителиоретикулоциты коркового вещества не образуют полноценную и дифференцированную сеть.

Таким образом, в силу несостоятельности ретикулоэпителиальной сети, в течение 1 месяца постнатальной жизни эпителиальные клетки изменяли свои морфологические свойства что, по нашему мнению, приведет к нарушению их функции по обеспечению организма Т-клеточным ресурсом и становления приобретенного клеточного иммунитета.

Использованная литература:

1. Бобрышева И.В. Морфологические особенности тимуса крыс периода выраженных старческих изменений при иммуносупрессии, вызванной введением циклофосфида / И.В. Бобрышева// Ульяновский медико-биологический журнал. – 2016. – №2. – С. 125-130
2. Логинова Н.П. Особенности экспрессии цитокератинов (СК) 5 и 8 в клетках эпителиальной стромы тимуса и количество TREC в периферических Т-лимфоцитах у детей с врожденными пороками сердца

- / Логинова Н.П., Четвертных В.А., Семченко В.В., Сайдакова Е.В., Чемурзиева Н.В. // Иммунология – 2014. - № 6. – С. 333-337
3. Cannizzo F.T. Gene expression profiling of thymus in beef cattle treated with prednisolone. / F.T. Cannizzo, S. Pegolo, L. Starvaggi Cucuzza, L. Bargelloni, S. Divari, M. Castagnaro // ResVetSci. – 2013 – Vol.2 – P.540
 4. Dixit V.D. Thymic fatness and approaches to enhance thymopoietic fitness in aging / V.D. Dixit // Curr. Opin. Immunol. – 2010. - V.22. – P.521-528
 5. Laan M. Pregnancy-induced thymic involution is associated with suppression of chemokines essential for T-lymphoid progenitor homing/ M. Laan, U. Haljasorg, K. Kisand, A. Salumets, P. Peterson// Eur. J. Immunol. – 2016 - Vol.8 – P.2008-2017.
 6. Liu Y. Crystal structure of the cysteine-rich domain of mannose receptor complexed with sulfated carbohydrate ligand/ Y. Liu, A.J. Chirino, Ñ. Leteux, Ò. Feizi // J. Experimental Medicine.- 2000.- Vol 191, No 7.- P. 1105-1116.
 7. Mitchell W.A. Thymic output, aging and zinc / W.A. Mitchell, I. Meng, S.A. Nicholson [etal.] // Biogerontology. – 2006. – V.7. – p.461-470