

УДК 611.438-091:618.33

МОРФОГЕНЕЗ ТИМУСА ПЛОДОВ ЧЕЛОВЕКА 22–27 НЕДЕЛЬ РАЗВИТИЯ

© 2015 г. Л. В. Кулида, Л. П. Перетятко, С. Б. Назаров

Ивановский научно-исследовательский институт материнства и детства им. В.Н. Городкова МЗ РФ

153045 Иваново, ул. Победы, д. 20

E-mail: kulida@mail.ru

Поступила в редакцию 08.10.2014 г.

Окончательный вариант получен 02.02.2015 г.

Выявлены особенности морфогенеза тимуса плодов человека в раннем онтогенезе при неосложненном течении беременности. Положительная динамика роста линейных и весовых параметров тимуса сочетается с дифференцировкой морфофункциональных зон органа. Параметры экспрессии CD1, CD2 CD3 антигенов Т-лимфоцитов и ультраструктурные особенности ретикулоэпителиальных клеток (РЭК) I и II типов, формирующих микроокружение для лимфоцитов, отражают процессы дифференцировки клеточного компартмента субкапсулярной и внутренней кортикальной зон долек тимуса. РЭК медуллярной зоны к 22 неделе развития плода формируют подобие петлистого синцития с десмосомальными межэпителиальными контактами. Среди тимоцитов преобладают малые формы лимфоцитов (66%). В тимусах 25–27 недельных плодов доминируют тельца Гассалья, структурно соответствующие фазе морфофункциональной зрелости.

Ключевые слова: морфогенез тимуса, плоды человека, ранний онтогенез, ретикулоэпителиальные клетки, тимоциты.

DOI: 10.7868/S0475145015040047

ВВЕДЕНИЕ

Иммунная система плода человека развивается и функционирует в сложных меняющихся условиях. С одной стороны, система формирует и регулирует внутренний гомеостаз плода. С другой, постоянно испытывая тренировочное антигенное влияние со стороны материнского организма, система обеспечивает быструю ответную реакцию на эндо- и экзогенные воздействия. Установлено, что основные процессы в иммунной системе, такие как пролиферация, дифференцировка, миграция, кооперация и апоптоз, генетически детерминированы (Труфакин, Шурлыгина, 2002; Elmore, 2006; Hayes, Laird, 2012). В то же время морфоиммуногенез является результатом сложного взаимодействия клеток—предшественников тимоцитов и их незрелых форм с различными структурными компонентами стромы, формирующими микроокружение для Т лимфоцитов (Куклина, 2003; Gordon, Manley, 2011; Shitara et al., 2013; Yuan, Malek, 2012). Ответная реакция иммунной системы на антигенные воздействия зависит от морфофункциональной зрелости иммунокомпетентных органов (Palmer, 2013; Yarin, Belyakov, 2004). Знание структурных особенностей развития тимуса в пренатальном онтогенезе определяет своевременную диагностику патологии иммунной системы в виде тканевых пороков

развития или дисхроний. Дисхронии развития тимуса являются структурной основой иммунодефицитных состояний, формирующихся после рождения (Перетятко, Кулида, Проценко, 2005; Cossu, 2010). Исследования, направленные на изучение структурных особенностей развития тимуса человека в раннем онтогенезе при неосложненном течении беременности, немногочисленны. Целью настоящего исследования явился анализ структурных особенностей морфогенеза тимуса плодов человека, полученных в результате индуцированного прерывания беременности по социальным показаниям на 22–27 неделях развития.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Исследуемую группу составили 60 тимусов от плодов человека, полученные в результате индуцированного прерывания беременности по социальным показаниям путем операции малое кесарево сечение (в работе использовался архивный материал, собранный в 2007–2009 гг. на базе ФГБУ “Ивановский НИИ материнства и детства им. В.Н. Городкова МЗ РФ. Заявка на исследование данного материала утверждена на заседании этического комитета Ивановского НИИ материнства и детства им. В.Н. Городкова). Проведено комплексное исследование тимуса, включающее органомерию, обзорную и электронографию микро-

Органометрические параметры тимуса плодов человека с 22 по 27 недели внутриутробного развития

Возраст плодов (недели)	Группы исследования	Масса, г	Объем, см ³	Длина, см	Ширина, см	Высота, см
22–23	I <i>n</i> = 20	••1.21 ± 0.05	••1.20 ± 0.05	••2.22 ± 0.07	•1.55 ± 0.09	0.52 ± 0.07
24–25	I <i>n</i> = 20	••1.93 ± 0.06	••1.89 ± 0.06	••2.63 ± 0.06	••1.83 ± 0.08	•0.52 ± 0.03
26–27	I <i>n</i> = 20	3.17 ± 0.09	3.18 ± 0.09	3.38 ± 0.06	2.48 ± 0.08	0.63 ± 0.02

Группы исследования: I – при неосложненном течении беременности; •*p*, ••*p* – достоверность различий по срокам гестации (22–23 и 24–25 нед.; 24–25 и 26–27 нед.).

пию с окраской парафиновых срезов по методам Ван Гизона, Маллори, Браше и Фельген-Россенбека, гистометрию по Автандилову Г.Г., (1990), цитометрию и трансмиссионную электронную микроскопию. На замороженных срезах, предварительно фиксированных в 4% растворе параформальдегида, оценивали дифференцировку тимоцитов, используя моноклональные антитела с последующим определением индекса экспрессии CD1, CD2, CD3, CD4, CD8 антигенов Т-лимфоцитов. Результаты иммуногистохимических реакций оценивались количественным методом по модифицированному нами способу McCarthy и соавт. (1985). В десяти полях зрения микроскопа при увеличении ×400 подсчитывалось до 100 клеток с различной интенсивностью окрашивания (от 0 до 3 баллов). Индекс экспрессии (ИЭ) изучаемых факторов определялся по формуле:

$ИЭ = \Sigma P(i)/100$, где *i* – интенсивность окрашивания, выраженная в баллах от 0 до 3;

P(i) – процент клеток, окрашенных с разной интенсивностью.

Статистическая обработка полученных результатов выполнена с помощью программного обеспечения “Statistica – 7”.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В ходе комплексного морфологического исследования тимуса 22–27 недельных плодов выявлен ряд структурных особенностей. Органометрические параметры тимуса плодов среднефетального периода увеличиваются прямо пропорционально сроку развития и достигают максимальных показателей к 26–27 неделям (3.17 ± 0.06 г). К 25–26 неделям беременности масса и объем тимуса в три раза превышают подобные параметры органа у 22–23 недельных плодов (таблица). Одновременно с массой увеличиваются и линейные размеры органа. Начиная с 22–23 недель внутриутробного развития выявляется асимметрия долей тимуса, подтвержденная достоверным увеличением линейных параметров левой доли по сравнению с

правой (2.21 ± 0.41 см, *p* < 0.05). К 24–25 неделям беременности увеличиваются поперечные размеры тимуса. В более поздние сроки, к 26–27 неделям, превалирует увеличение органа по длине (таблица).

Динамика линейных и весовых параметров тимуса сочетается с определенной перестройкой паренхиматозно-стромального компартмента органа. Последовательность структурной перестройки прослеживается в дифференцировке морфофункциональных зон долек тимуса: субкапсулярной, внутренней кортикальной и медуллярной. Так, септы, отходящие от соединительнотканной капсулы, достигая кортико-медуллярной границы, делят паренхиму тимуса на дольки. Лишь в отдельных зонах глубина проникновения септ ограничивается 1/3 или 2/3 ширины коркового вещества (рис. 1). В тимусе плодов среднефетального периода преобладают дольки средних и мелких размеров с удельным объемом коркового и мозгового вещества, равным 58.3 ± 0.5 и 23.4 ± 0.7%, соответственно. Следовательно, корковое вещество в 2.5 раза превышает мозговое. С увеличением гестационного срока объем коркового вещества уменьшается. Максимальный показатель (67.51%) данного параметра выявлен у плодов 22–23 недель развития. Увеличение удельного объема мозгового вещества до 30.6 ± 0.5% к 26–27 неделям развития, сопровождающееся более чем двукратным уменьшением объема септ, свидетельствует о росте долек.

Объем сосудистого русла в корковом веществе к 24–25 неделям развития увеличивается до 6.7 ± 0.3%, но снижается в 1.3 раза к 26–27 неделям 5.21 ± 0.22%). При этом объем сосудов в мозговом веществе долек, в отличие от коркового, характеризуется стабильностью показателя и составляет в среднем 2.68%.

Динамика удельного объема коркового и мозгового вещества, а также соотношение лимфоцитов, ретикулярных и эпителиальных клеток в них отражают дифференцировку структур субкапсулярной, внутренней кортикальной и медулляр-

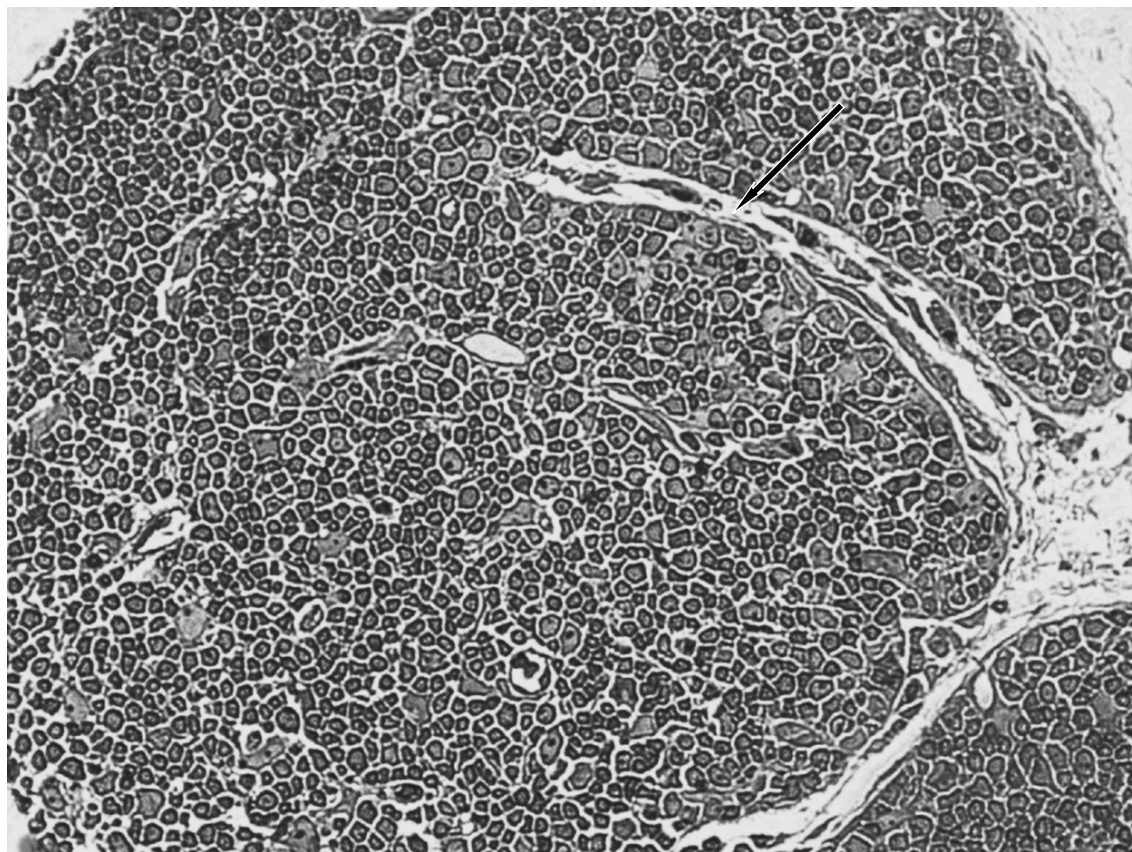


Рис. 1. Тимус плода 25 недель развития при индуцированном прерывании беременности. Септы с единичными сосудами и фибробластами (→). Новообразование долек. Полутонкий срез. Окраска метиленовым синим. СМ $\times 240$.

ной зон тимуса (Ивановская и др., 1996; Куклина, 2003; Перетятко, Кулида, Проценко, 2005).

В тимусах 26–27 недельных плодов эпителиальные клетки субкапсулярной зоны формируют пласт, состоящий из двух слоев. В субкапсулярной зоне долек тимуса определяются два типа ретикулоэпителиальных клеток (РЭК). Клетки первого типа (РЭК I) расположены на непрерывной базальной мембране, имеют вытянутую или треугольную форму, образуют между собой многочисленные анастомозы и отграничивают паренхиму коркового вещества от соединительной ткани.

РЭК I содержат овальное ядро размерами 10×5 мкм с маргинацией гетерохроматина, 1–2 крупными ядрышками и инвагинатами нуклеолеммы (рис. 2). Маргинация хроматина в ядре, развитый гранулярный эндоплазматический ретикулум и большое количество вакуолей, содержащих белковый субстрат в просвете, являются структурным подтверждением гормонсинтезирующей функции РЭК I (Gordon, Manley, 2011; Shitara et al., 2013; Yuan, Malek, 2012). Экспрессия же цитокератина на РЭК I служит одним из маркеров их зрелости.

РЭК второго типа (РЭК II) приобретает звездчатую форму за счет цитоплазматических отростков. Эпителиальные клетки содержат округлое

ядро диаметром 12 мкм с 1–2 ядрышками и мелко конденсированным хроматином. В цитоплазме клеток визуализируются немногочисленные тонofilamenty, мультивезикулярные тельца, вакуоли, короткие профили гранулярной эндоплазматической сети и сформированный пластинчатый комплекс (рис. 3).

На ранних этапах среднефетального периода, т.е. у плодов 22–23 недель развития, эпителиальные клетки мигрируют в окружающую мезенхиму, формируя различные по протяженности клеточные тяжи. Последние, обладая большой потенцией, в тимусах 22–24 недельных плодов, выполняют камбиальную функцию и формируют зоны роста на периферии долек.

Среди лимфоцитов субкапсулярной зоны преобладают лимфобласты, которые по антигенному составу соответствуют пре-Т-лимфоцитам. На мембранах лимфоцитов определяются CD2 антигены, индекс экспрессии которых составляет 2.78. Мембраны ядер лимфобластов формируют глубокие инвагинаты в зонах субмембранно расположенных участков гетерохроматина. Цитоплазма, занимающая минимальную площадь, содержит свободные рибосомы, цистерны гранулярного эндоплазматического ретикулума и митохондрии.

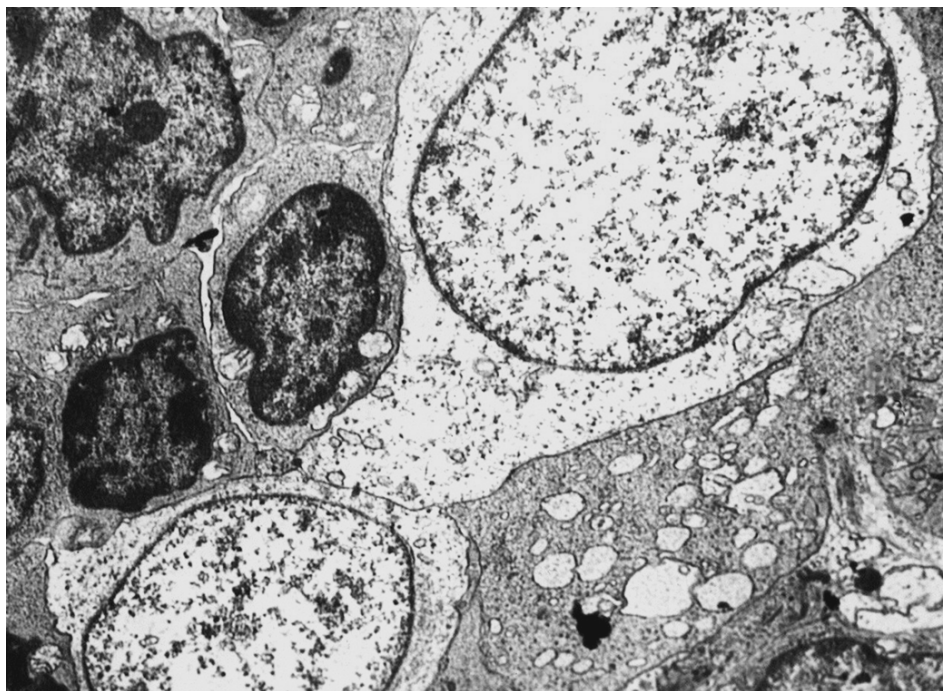


Рис. 2. Тимус плода 23 недель развития при индуцированном прерывании беременности. РЭК I типа. Умеренная маргинация хроматина в ядре, инвагинаты нуклеолеммы. ТЭМ $\times 5000$.

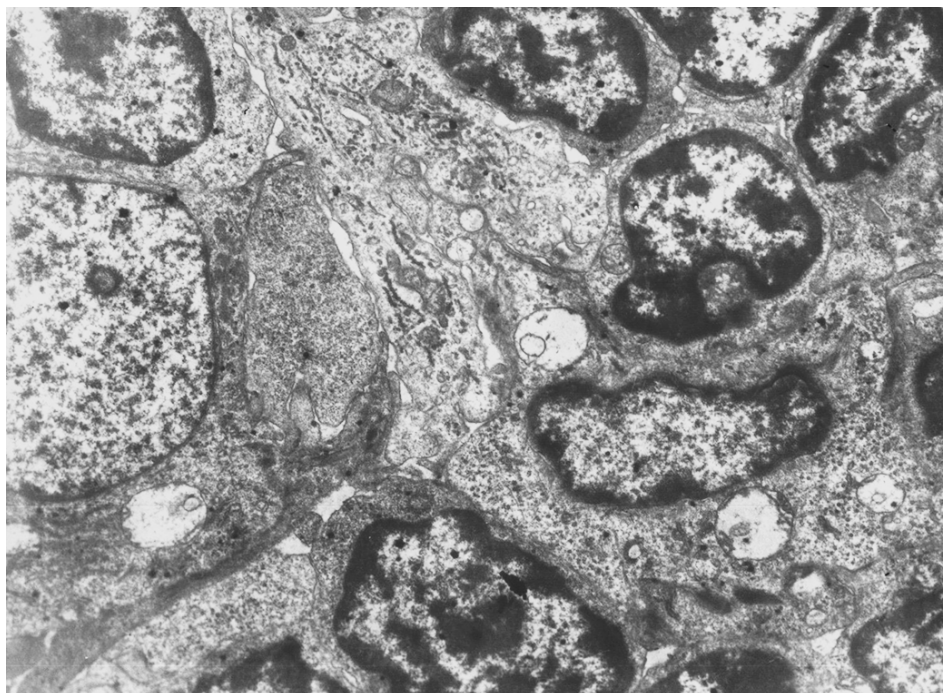


Рис. 3. Тимус плода 27 недель развития. РЭК II типа. Тонифиламенты, мультивезикулярные тельца, вакуоли, короткие профили шероховатой эндоплазматической сети и развитый пластинчатый комплекс. ТЭМ $\times 5200$.

Внутренняя кортикальная зона долек тимуса плодов 22–27 недель развития представлена широкопетливой сетью РЭК, расположенных как

одиночно, так и группами, включающими не более 2–3 клеток. Светооптически в исследуемой зоне обнаружены два типа РЭК: светлые и тем-

ные. Светлые РЭК по ультраструктуре близки к субкапсулярным РЭК I. Это клетки с овальными ядрами, содержащими мелкодисперсный хроматин и одно ядрышко. Из ультраструктур в цитоплазме визуализируются цистерны гранулярного эндоплазматического ретикулума, митохондрии и немногочисленные тонофиламенты. Среди РЭК встречаются темные веретенообразные клетки с длинными отростками. В цитоплазме РЭК выявляются неправильно округлой формы ядра, содержащие различной плотности гетерохроматин. РЭК внутренней кортикальной зоны экспрессируют в минимальном количестве цитокератин.

Структура внутренней кортикальной зоны мозаична, поскольку вокруг расположенной в центре светлой РЭК локализуются группы лимфоциты. Прямой мембранный контакт лимфоцитов и РЭК является основным фактором, определяющим дифференцировку тимоцитов внутренней кортикальной зоны органа (Gordon, Manley, 2011; Hayes, Laird, 2012; Yarinin, Belyakov, 2004).

Популяции лимфоцитов внутренней кортикальной зоны коры гетерогенны и структурно неоднородны. Большая часть из них содержит CD1, CD2 антигены. В исследуемой зоне тимуса 26–27 недельных плодов определяются единичные Т-лимфоциты CD4 и CD8 фенотипа. К особенностям дифференцировки лимфоцитов во внутренней кортикальной зоне долек следует отнести формирование Т лимфоцитов CD3 фенотипа, индекс экспрессии которых в тимусах 25–27 недельных плодов составляет 3.16.

Анализ тимоцитов с учетом их размеров показал, что преобладающими (65%) среди клеток являются средние лимфоциты, диаметр которых не превышает 7–10 мкм, а цитоплазма обеднена митохондриями, полисомами и гранулярным эндоплазматическим ретикуломом.

На долю малых лимфоцитов во внутренней кортикальной зоне приходится 23%. Тимоциты отличаются малыми размерами (до 5 мкм), минимальным объемом цитоплазмы и компактным ядром, содержащим грубодисперсный гетерохроматин. Именно малые лимфоциты, прошедшие через этап антигенной дифференцировки, активно мигрируют в мозговое вещество и периферические органы иммунной системы (Gordon, Manley, 2011; Yuan, Malek, 2012). Помимо лимфоцитов и РЭК во внутренней кортикальной зоне, ближе к кортико-медуллярной границе, располагаются макрофаги, на долю которых приходится 1.2%.

Структура медуллярной зоны тимуса плодов с 22 по 27 недели внутриутробного развития претерпевает следующие изменения. Удельный объем мозгового вещества с 23.4% у 22–23 недельных плодов увеличивается до 30.2% к 26–27 неделям развития. РЭК медуллярной зоны к 22 неделе развития за счет многочисленных отростков формируют подобие петлистого синцития с десмосо-

мальными межэпителиальными контактами. Цитоплазма этих клеток содержит веерообразные тонофиламенты.

По сравнению с корой тимоциты в медуллярной зоне распределены следующим образом. На фоне количественного снижения Т лимфоцитов до 66% увеличивается число малых, и до 34% уменьшается количество средних форм. При этом средняя плотность клеточных элементов, составляющая 15 клеток, не изменяется до 24–25 недель развития. Достоверное ($p < 0.05$) увеличение данного параметра установлено только в тимусе 26–27 недельных плодов.

Отличительной чертой мозгового вещества долек тимуса является наличие телец Гассалья, структура которых к 25–26 неделям внутриутробного развития соответствует фазе морфофункциональной зрелости (рис. 4). Морфологические преобразования телец Гассалья сопряжены с активацией секреторной, эндокринной функций тимуса и апоптозом как одним из механизмов, регулирующих дифференцировку лимфоцитов (Elmore, 2006; Raica et al., 2006; Shitara et al., 2013).

Количество и размеры телец Гассалья отличаются вариабельностью. Удельный объем тимических телец, составляющий у 22–23 недельных плодов $1.42 \pm 0.8\%$, достоверно увеличивается к 26–27 неделям развития и достигает $2.43 \pm 0.08\%$. Средний диаметр тимических телец прогрессивно увеличивается параллельно сроку беременности. Так, в тимусах 22–23 недельных плодов диаметр телец составляет 36 мкм. К 24–25 неделям данный параметр увеличивается до 28 мкм, а к 26–27 неделям достигает 43 мкм.

Пропорционально сроку внутриутробного развития плода в долях тимуса увеличивается не только диаметр, но и количество телец Гассалья. Так, в тимусах плодов 25–26 недель развития увеличивается количество телец с тенденцией формирования групповых скоплений в два раза, по сравнению с 22–23 недельными плодами. Учитывая структурные особенности, в тимусе можно выделить два типа телец Гассалья. Тельца первого типа образованы плотно упакованными РЭК, в цитоплазме которых содержится большое количество тонофиламентов и зерен кератогиалина. Тельца второго типа сформированы из дистрофически измененных или некротизированных эпителиальных клеток. В целом, в мозговом веществе тимуса плодов среднефетального периода преобладают тельца первого типа, структурно соответствующие стадии прогрессирующего развития (Raica et al., 2006).

Зрелые тимические тельца окружены двумя типами РЭК. РЭК I отличаются полигональной формой, диаметром ядер до 15 мкм, маргинально конденсированным гетерохроматином и большим количеством тонофиламентов. РЭК II обнаружены только в мозговом веществе. Цитоплазма

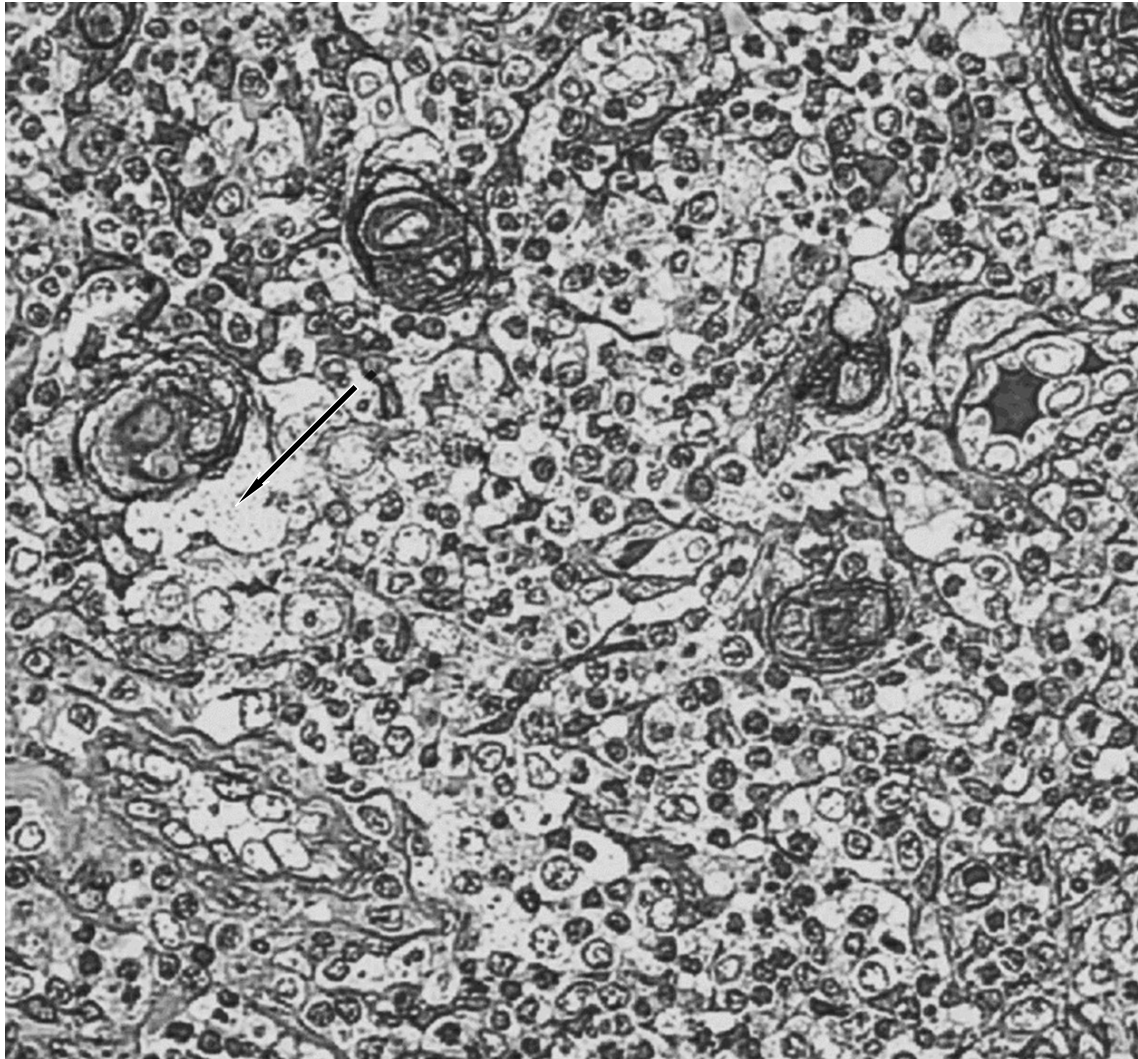


Рис. 4. Тимус плода 25 недель развития. Мозговое вещество: скопления ретикулоэпителиальных клеток вокруг телец Гассалья (→). Полутонкий срез, окраска метиленом-азур II-фуксином. СМ $\times 240$.

РЭК II, в отличие от РЭК I, содержит крупные интрацитоплазматические вакуоли, в которых выявляются гликозаминогликаны. Вероятно, РЭК участвуют в синтезе сиаловых кислот, которые в дальнейшем при созревании Т лимфоцитов встраиваются в их мембраны.

Количество лимфоидных клеток в мозговом веществе долек тимуса достоверно меньше соответствующего показателя в корковом. Плотность клеточного компонента составляет 15.3 клетки, а удельный объем — $64.8 \pm 0.34\%$. В лимфоцитах центрально или несколько эксцентрично расположено округлое ядро с очаговой локализацией гетерохроматина. В узком ободке цитоплазмы визуализируются митохондрии с упорядоченными тубулярными кристами, микровезикулы и полисомы. Лимфоциты образуют перивенулярные группы. Эндотелий вен высоко призматический с большим количеством ультраструктур, среди которых

идентифицируются гранулярный эндоплазматический ретикулум, митохондрии и полисомы.

В отличие от лимфоцитов коры фенотипически зрелые Т лимфоциты медуллярной зоны содержат CD2, CD3 антигены, подтверждающие завершение дифференцировки клеток в исследуемой морфофункциональной зоне тимуса.

Таким образом, в среднефетальном периоде онтогенеза структурные изменения тимуса 22–27 недельных плодов включают увеличение органомерических параметров, снижение удельного объема коры и увеличение объема мозгового вещества в дольках. Кроме того, наблюдается увеличение удельной доли интерстициальной ткани преимущественно за счет сосудистого компонента, способствующего дифференцировке тканевых структур субкапсулярной, внутренней кортикальной и медуллярной морфофункциональных зон долек.

Изменение соотношения лимфоцитов и РЭК в тимусе 22–27 недельных плодов связано с их зональной локализацией. В субкапсулярной зоне из лимфоидных элементов преобладают пре-Т лимфоциты и лимфобласты. Основными компонентами клеточного микроокружения лимфоидных клеток являются два типа РЭК, которые через тимические гормоны и цитокины или путем прямого контакта с клетками-“няньками” контролируют процессы пролиферации и дифференцировки Т лимфоцитов (Ивановская и др., 1996; Shitara et al., Yarilin, Belyakov, 2004).

Подтверждением антиген-независимой дифференцировки тимоцитов у 22–27 недельных плодов является преобладание во внутренней кортикальной зоне тимуса лимфоцитов среднего диаметра, экспрессирующих CD1, CD2, CD3 антигены. Клеточное микроокружение лимфоцитов формируется за счет эпителиальных клеток, ультраструктурная организация которых свидетельствует об их функциональной активности.

Следовательно, период с 22 по 27 недели внутриутробного развития с учетом значимости морфологических и функциональных изменений в органе является важным этапом дифференцировки лимфоцитов, РЭК и мезенхимальных структур тимуса, обеспечивающих иммунологическую защиту организма на последующих этапах онтогенеза.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Ивановская Т.Е., Зайратьянц О.В., Леонова Л.В., Волощук И.Н. Патология тимуса у детей. СПб.: Сотис, 1996. 271 с.
- Куклина Е.М. Молекулярные механизмы дифференцировки тимоцитов // Онтогенез. 2003. Т. 34. № 5. С. 342–357.
- Перетятко Л.П., Кулида Л.В., Проценко Е.В. Морфология плодов и новорожденных с экстремально низкой массой тела. Иваново: ОАО “Издательство “Иваново”, 2005. 384 с.
- Труфакин В.А., Шурлыгина А.В. Проблемы гистопатологии иммунной системы // Иммунология. 2002. № 1. С. 4–7.
- Elmore S.A. Enhanced histopathology of the thymus // Toxicol. Pathol. 2006. V. 34. № 5. P. 656–65.
- Cossu F. Genetics of SCID // Ital. J. Pediatr. 2010. V. 15. P. 36–76.
- Gordon J., Manley N.R. Mechanisms of thymus organogenesis and morphogenesis // Development. 2011. V. 138. № 18. P. 3865–3878.
- Hayes S.M., Laird R.M. Genetic requirements for the development and differentiation of interleukin-17-producing $\gamma\delta$ T cells // Crit. Rev. Immunol. 2012. V. 32. № 1. P. 81–95.
- Palmer D.B. The effect of age on thymic function // Front Immunol. 2013. V. 7. № 4. P. 316.
- Raica M., Encica S., Motoc A. et al. Structural heterogeneity and immunohistochemical profile of Gassall corpuscles in normal human thymus // Ann. Anat. 2006. V. 188. № 4. P. 345–352.
- Shitara S., Hara T., Liang B. et al. IL-7 produced by thymic epithelial cells plays a major role in the development of thymocytes and TCR $\gamma\delta$ + intraepithelial lymphocytes // J. Immunol. 2013. V. 15. № 12. P. 6173–6179.
- Yarilin A.A., Belyakov I.M. Cytokines in the thymus: production and biological effects // Curr. Med. Chem. 2004. V. 11. № 4. P. 447–464.

Morphogenesis of Human Fetal Thymus during Weeks 22–27 of Development

L. V. Kulida, L. P. Peretyatko, and S. B. Nazarov

Gorodkov Research Institute of Maternity and Childhood of the Ministry of Healthcare of the Russian Federation, ul. Pobedy 20, Ivanovo, 153045 Russia

e-mail: kulida@mail.ru

Received October 8, 2014; in final form, February 2, 2015

Distinctive features of human fetal thymus morphogenesis in early ontogeny in the case of uncomplicated pregnancy have been characterized. A steady increase of thymus dimensions and weight occurred concomitantly to differentiation of morphofunctional zones within the organ. Cell differentiation in the subcapsular and inner cortical zones of the thymus lobes was manifested as changes in parameters of expression of T-lymphocyte antigens CD1, CD2, and CD3 and ultrastructural features of reticuloepithelial cells (REC) type I and II forming a microenvironment for lymphocytes. RECs of the medullar zone formed a glomerular synctium with desmosomal interepithelial contacts by week 22 of fetal development. Small lymphocytes predominated among thymocytes (66%). Hassall's corpuscles, the structural correlates of morphological and functional maturity, predominated in the fetal thymuses during developmental weeks 25–27.

Keywords: morphogenesis of the thymus, human fetuses, early ontogeny, reticuloepithelial cells, thymocytes