

**ИММУНОМОРФОЛОГИЧЕСКИЕ ПРОЦЕССЫ В ТИМУСЕ ПРИ ВРОЖДЕННОМ ПОРОКЕ
СЕРДЦА У ДЕТЕЙ**

Н.П. ЛОГИНОВА, В.А. ЧЕТВЕРТНЫХ, Н.В. ЧЕМУРЗИЕВА

*ФГБОУ ВО «ПГМУ им. ак. Е.А. Вагнера» Минздрава России,
Петропавловская ул., д. 26, Пермь, 614990, Россия, e-mail: natalitsa@yandex.ru*

Аннотация. В работе представлены результаты комплексного иммуноморфологического исследования тимуса при врожденных пороках сердца разной степени выраженности. С помощью морфологических, иммуногистохимических и иммунологических методов исследования проведена оценка состояния ретикулоэпителиальной стромы тимуса при врожденном пороке сердца в различные сроки грудного периода детей. Прослежена взаимосвязь структурных изменений в ретикулоэпителиоцитах в зависимости от степени сложности врожденного порока сердца. Установлены эффекты влияния дистрофически измененной стромы на этапы внутритимической дифференцировки тимоцитов. Показано, что нестабильное состояние ретикулоэпителиальной стромы снижает пролиферативные процессы тимоцитов. Методом проточной цитометрии выявлено, что более выраженная гипоксия (синий тип врожденных пороков сердца) препятствует фенотипическому созреванию тимоцитов, способствуя сохранению незрелых форм клеток ($CD4^+ CD8^+$ тимоцитов). Показано, что гипоксия влияет на экспрессию транскрипционных факторов, определяющих дифференцировку тимоцитов в направлении развития регуляторной субпопуляции клеток (*nTreg* и *Th17*). Установлено взаимозависимое влияние основных клеточных дифференцировочных факторов, участвующих в адаптации органа к работе в условиях дефицита кислорода. В основе адаптогенных процессов лежит активация клеток мезенхимального ряда, сопровождающаяся их количественными и качественными изменениями. Полученные результаты важно учитывать для понимания адаптационных процессов в тимусе при гипоксии обусловленной пороками сердца и прогнозирования эффектов формирования адаптивного иммунитета.

Ключевые слова: тимус, врожденный порок сердца, гипоксия, дети.

**IMMUNOMORPHOLOGICAL PROCESSES IN THYMUS IN CONGENITAL HEART DISEASE
IN CHILDREN**

N.P. LOGINOVA, V.A. CHETVERTNYH, N.V. CHEMURZIEVA

*Perm State E. A. Wagner Medical University,
Petropavlovsk Str., 26, Perm, 614990, Russia e-mail: natalitsa@yandex.ru*

Abstract. The results of a complex immunomorphological study of the thymus with congenital heart defects of varying severity are presented. By the morphological, immunohistochemical and immunological methods of research, an assessment of the state of the reticuloepithelial stroma of the thymus with congenital heart disease at different periods of the infants' period was carried out. The interrelation of structural changes in reticuloepithelial cells depends on the degree of difficulty of congenital heart disease. Effects of the influence of the dystrophically altered stroma on the stages of intima-temporal differentiation of thymocytes have been established. It is shown that the unstable state of the reticuloepithelial stroma reduces the proliferative processes of thymocytes. The flow cytometry method revealed that more pronounced hypoxia (blue type) prevents phenotypic maturation of thymocytes, contributing to the preservation of immature cell forms ($CD4 + CD8 +$ thymocytes). It was shown that hypoxia affects the expression of transcription factors that determine the differentiation of thymocytes in the direction of development of the regulatory subpopulation of cells (*nTreg* and *Th17*). An interdependent influence of the main cellular differentials participating in adaptation of the organ to work in conditions of oxygen deficiency is established. The basis of adaptogenic processes is the activation of mesenchymal series cells, accompanied by quantitative and qualitative changes. It is important to take into account the obtained results for understanding the adaptation processes in the thymus during hypoxia of the conditioned congenital heart defect and predicting the effects of the formation of adaptive immunity.

Key words: thymus, congenital heart disease, hypoxia, children.

T-лимфоциты – одни из основных клеток адаптивного иммунитета. Популяция *T*-лимфоцитов гетерогенна. Подавляющее большинство из них формируется в тимусе. В норме тимус, как первичный орган иммунной системы, создает оптимальные условия для антигеннезависимой дифференцировки *T*-лимфоцитов. Но, тимус чрезвычайно чувствителен к различным внешним и внутренним воздействиям [7,

8]. Нарушение структуры тимуса и, как следствие, его функции, при действии многих стрессорных факторов (ишемия, гипоксия, облучение, вирусная и бактериальная инфекции и т.д.) может обусловить дефектное состояние всей иммунной системы, что особенно важно учитывать в детском возрасте.

Одним из наиболее частых патогенетических процессов, лежащих в основе расстройства структуры и функции тимуса, является гипоксия. Гипоксия как стрессорный фактор до сих пор остается объектом пристального изучения специалистами разных направлений, так как при ней развиваются метаболические и структурные сдвиги на клеточном, тканевом и органном уровнях [6].

Наиболее часто гипоксия возникает при развитии пороков сердца. Известно, что большинство врожденных пороков сердца (ВПС) у детей раннего возраста сопровождается изменением системной гемодинамики с нарушением тока крови, как в полостях сердца, так и в большом, и малом кругах кровообращения.

ВПС входят в группу самых частых аномалий развития у детей [2]. По результатам исследований, дети с ВПС часто подвержены различным заболеваниям из-за имеющегося у них иммунного дисбаланса [2, 9, 12, 13]. Актуальность проблемы связана не только с распространенностью, но и с тенденцией роста тяжелых комбинированных ВПС с частым неблагоприятным исходом, особенно в первые месяцы жизни детей [4]. В настоящее время основная часть исследований посвящена оценке послеоперационного состояния иммунной системы детей с ВПС после проведенной тимэктомии [1, 9]. Однако вопрос о морфофункциональном состоянии тимуса как первичного органа иммунитета и обеспечении им развивающегося организма *T*-лимфоцитами в условиях циркуляторной гипоксии на сегодня остается нерешенным.

Цель исследования – изучение морфофункциональных особенностей состояния тканей тимуса у детей с врожденными пороками сердца.

Материалы и методы исследования. Исследован материал тимуса 126 детей в возрасте от 1-го до 11 месяцев при коррекции ВПС. Тимэктомия проводилась в соответствии с существующей хирургической практикой Федерального краевого центра сердечно-сосудистой хирургии г. Перми. Выделены две группы: 1-я ($n=62$) белые типы ВПС (дефект межжелудочковой перегородки, дефект межпредсердной перегородки, коарктация аорты); 2-я группа ($n=64$) – синие типы ВПС (тетрада Фалло, транспозиция магистральных сосудов, аномалия Эбштейна, общий артериальный ствол). Группу сравнения составили тимусы случайно погибших, клинически здоровых детей ($n=11$) в возрасте от 7 месяцев до 1,2 года. Периферическую кровь ($n=31$) забирали из локтевой вены (1,5 мл.) у детей с ВПС ($n=21$) и здоровых детей ($n=10$) в возрасте до 1,5 лет. Проведены гистологические, иммуногистохимические, электронномикроскопические исследования.

Гистологическое исследование. Тимус фиксировали в 10% нейтральном формалине на фосфатном буфере ($pH\ 7,2$) и заливали в парафин «Гистомикс». Срезы толщиной 4-5 мкм, окрашивали гематоксилином и эозином для оценки общей морфологической картины.

Имуногистохимическое исследование тимуса проводили с использованием моноклональных антител (*Dako*, США): для кератинов – 5, 8/18, *PanCK*; *CD3* – маркер зрелых *T*-лимфоцитов; *CD68* – для идентификации макрофагов; *Ki-67* – маркер пролиферации; *S-100* для выявления дендритных клеток; *E-кадгерин* – маркер молекул межклеточной адгезии эпителиальных клеток.

Методом проточной цитометрии определяли поверхностные маркеры тимоцитов ($CD4^+CD8^+$, $CD4^+CD8^+$, $CD4^+CD8^+$); экспрессию транскрипционных факторов в $CD4^+$ тимоцитах (*FOXP3*; *RORγt*).

Электронномикроскопическое исследование. Биоптаты тимуса размером 1-2 мм³ фиксировали в 2,5% растворе глутарового альдегида и 1% растворе четырехоксида осмия. После проводки через спирты восходящей крепости материал заключали в аралдитовые смолы. Приготовленные блоки предварительно затачивали в форме усеченной пирамиды. Ультратонкие срезы, толщиной 60 нм, контрастировали уранилацетатом и цитратом свинца и изучали с помощью трансмиссионного электронного микроскопа *Libra-120* («*Carl Zeiss & MT*», Германия) с цифровой *SSCCD* камерой *UltraScan 950* (4 мпикс.) в диапазоне увеличения 1200-20000.

Результаты исследования показали, что на протяжении первого года жизни в тимусе детей при ВПС развивается комплекс морфологических изменений, выраженность которых зависит от степени гипоксии, обусловленной ВПС. Особое внимание уделено изучению состояния эпителиальной стромы тимуса. Во всех зонах коры определяются дистрофические изменения ретикулоэпителиоцитов. С течением времени (с 1 мес. – 11 мес.) в этих клетках нарушается состояние различных клеточных структур, в частности митохондрий, *эндоплазматического ретикулума* (ЭПР) и ядра. В митохондриях нарушается структура крист, их фрагменты скапливаются в центре. Имеется вакуолизация, просветление матрикса, появление миелиновых структур (рис. 1). Сохранившиеся митохондрии значительно увеличиваются в размере. Мембраны ЭПР также расширены, имеется их фрагментация. В их канальцах скапливаются фрагменты мембран и осмиофильного вещества. В цитоплазме снижено присутствие тонофиламентов. Они единичны и лежат разрозненно. Как правило, такие ретикулоэпителиоциты теряют контакт с другими клетками. Отростки у них укорачиваются и частично фрагментируются.

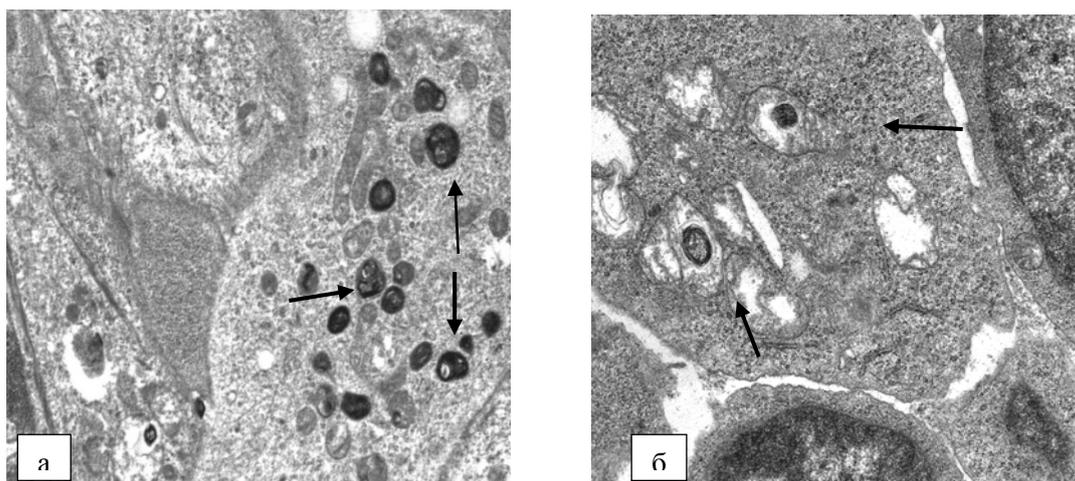


Рис. 1. Отросток ретикулоэпителиоцита III типа: а) выраженная групповая миелинизация митохондрий (показано стрелками). Синий тип ВПС. Возраст 6 месяцев. Ув. $\times 4000$; б) в цитоплазме митохондрии с нарушенной структурой, фрагментация крист, просветление матрикса, наличие в них единичных миелинизированных структур (показано стрелками). Белый тип ВПС. Возраст 6 месяцев. Ув.: $\times 4000$

В корковом веществе наблюдается формирование тимусных телец, при синем типе ВПС с 1-го месяца, в группе с белым типом их формирование происходит с 6-го месяца. В ретикулоэпителиоцитах коркового вещества нарушается структура кератинов. К 11 месяцам в клетках происходит резкое снижение как *PanCK*, так и кератинов 5 и 8/18. Наиболее выражены их изменения в группе с синим типом ВПС. Одновременно с этим идет убывание *E*-кадгерина. К 11 месяцу нарушаются межклеточные связи, контакты с тимоцитами и целостность ретикулоэпителиальной сети. Происходит гибель путем апоптоза одиночно расположенных ретикулоэпителиоцитов, что наиболее выражено в группе с синим типом ВПС. На этом фоне в корковом веществе дольки идет активация клеток производных мезенхимы, особенно в группе детей синего типа ВПС. В этой группе количество фибробластов превышает контроль в 3,5 раза ($p=0,001$). Клетки активны в волокнообразовании и участвуют в неоваскулогенезе. В 1,5 раза ($p=0,05$) увеличивается и количество макрофагов ($CD68^+$). Макрофаги часто присутствуют в участках тканевой деструкции и вблизи формирующихся сосудов. Одновременно во всех зонах дольки тимуса происходит интенсивное развитие *дендритных клеток* (ДК), что определяли иммуногистохимическим методом с помощью *моноклеальных антител* (МКАТ) к белку *S-100*. Так, количество ДК в корковом веществе в 3,8 раза ($p=0,001$) превысило группу контроля. Часто ДК присутствуют вблизи тимусных телец и в контакте с тимоцитами. В норме основным местом пребывания ДК является мозговое вещество, где они участвуют в проведении отрицательной селекции тимоцитов. В контакте с тимусными тельцами они обеспечивают также становление *nTreg* лимфоцитов и формирование центральной аутоtolерантности [11]. Накопление в корковом веществе долек популяции ДК отражает принцип медуллярного строения.

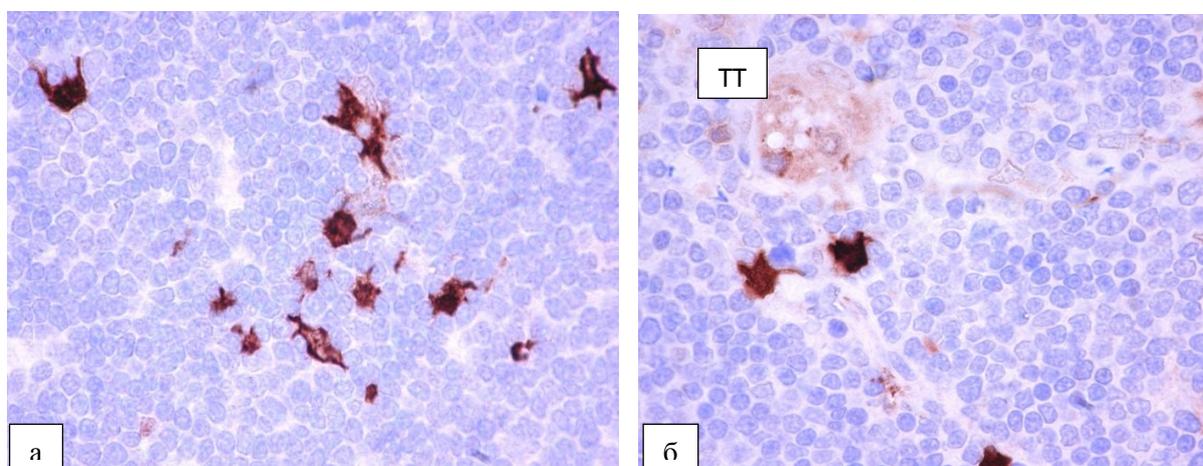


Рис. 2. Присутствие дендритных клеток ($S-100^+$) в корковом веществе дольки тимуса: а) в пределах глубокой коры; б) около образовавшегося тимусного тельца (ТТ). Синий тип ВПС. Возраст 6 месяцев. Ув. $\times 1000$

В результате нарушения структуры ретикулоэпителия тимоциты нередко оказываются в окружении ДК, фибробластов и макрофагов, что, несомненно, влияет на пролиферацию и дифференцировку тимоцитов. На протяжении года жизни во всех зонах коркового вещества снижается пролиферативная активность тимоцитов, оцениваемая по экспрессии *Ki-67*, что является причиной уменьшения в 2 раза ($p=0,05$) количества $CD3^+$ тимоцитов. Анализ субпопуляционного состава тимоцитов показал, что в группе с синим типом ВПС имеется достоверное увеличение незрелых дубль-позитивных клеток ($CD4^+CD8^+$), устойчивых к апоптозу. В условиях *in vitro* при направленной индукции формирования популяции *T*-регуляторных лимфоцитов показано, что в группе детей с синим типом ВПС в $CD4^+$ тимоцитах усиливается экспрессия транскрипционных факторов *FOXP3* и *RORγt*, что повышает количество регуляторной субпопуляции *T*-клеток в тимусе (*nTreg* и *Th17*). Это увеличивает риск развития у детей с ВПС патологий, сопряженных с повышением числа *Th17* тимоцитов (аутоиммунных, хронических воспалительных заболеваний), а увеличение количества *nTreg* лимфоцитов повышает риск развития онкологических заболеваний.

Одним из основных показателей функциональной активности тимуса является его способность продуцировать *T*-лимфоциты, критерием этого является присутствие в периферической крови недавних тимусных мигрантов, содержащих *T*-рецепторные эксцизионные кольца (ТРЭК). Ранее нами было показано, что в крови больных детей независимо от типа ВПС количество ТРЭК снижено ($p=0,001$) по сравнению с группой здоровых детей [5].

Таким образом, в тимусе детей с ВПС развивается комплекс морфологических изменений влияющих на качество внутритимического развития *T*-лимфоцитов и, как следствие, снижение в организме *T*-клеточного ресурса.

Установлены существенные изменения в структуре эпителиальной стромы тимуса у детей с ВПС. Целостность эпителиальной стромы зависит от сложности сердечного порока. Установлено, что в течение года жизни детей регистрировали исчезновение эпителиальных маркеров и как результат нарушение архитектоники эпителиальной сети, что вероятно, связано с особенностью становления эпителиоретикулоцитов на этапе их эмбрионального развития [4]. Известно, что закладку эпителиальной стромы тимуса, контролируют клетки краниального отдела нервного гребня, параллельно участвующие в развитие и становлении соединительнотканых перегородок сердца и крупных сосудов [10]. Установленная нами взаимосвязь, является тому подтверждением. Выявлено, что структурные изменения ретикулоэпителиальной стромы зависят от степени гипоксии, обусловленной типами пороков сердца, и при синем типе ВПС были выражены сильнее, чем при белом. Изменения в структуре ретикулоэпителия вызвали все последующие реакции со стороны основных клеточных дифферонов, участвующих в адаптации органа к работе в условиях дефицита кислорода. При гипоксии, обусловленной ВПС, меняется экспрессия транскрипционных факторов, определяющих дифференцировку тимоцитов в направлении развития регуляторной субпопуляции клеток. Процессы, наблюдаемые в тимусе, показывают, что при гипоксии любой выраженности идет истощение морфофункционального статуса органа, сопряженное с всё большим снижением его потенциальных возможностей. Без сомнений, это является неблагоприятным фактором для деятельности всей иммунной системы организма ребенка, что необходимо учитывать для прогнозирования эффектов формирования адаптивного иммунитета у таких детей.

Литература

1. Донецкова А.Д., Фроленко А.Л., Трошина В.В. Тимусные эксцизионные кольца в лимфоцитах периферической крови. Возрастная динамика и влияние тимэктомии // Иммунология. 2010. №6. С. 293–298.
2. Зиньковский М.Ф. Врожденные пороки сердца. Киев: «Книга плюс», 2009.
3. Кондратьев В.А. Врожденные пороки сердца до и после операции // Таврический медико-биологический вестник. 2005. Т. 8, №2. С. 76–82.
4. Логинова Н.П., Четвертных В.А., Семченко В.В., Чемурзиева Н.В., Хромцова Г.А. Иммуноцитохимические особенности становления дифференцировки эпителиальных клеток тимуса у детей первого года жизни при эмбриональных нарушениях развития сердца // Фундаментальные исследования. 2013. №12. С. 49–53.
5. Логинова Н.П., Четвертных В.А., Семченко В.В., Сайдакова Е.В., Чемурзиева Н.В. Особенности экспрессии цитокератинов 5 и 8 в клетках эпителиальной стромы тимуса и количество ТREC в периферических *T*-лимфоцитах у детей с врожденными пороками сердца // Иммунология. 2014. Т. 35, №6. С. 333–337.
6. Лукьянова Л.Д., Кирова Ю.И., Сукоян Г.В. Новое о сигнальных механизмах адаптации к гипоксии и их роли в системной регуляции // Патогенез. 2011. Т. 9, №3. С. 4–14.
7. Старская И.С., Полевщиков А.В. Морфологические аспекты атрофии тимуса при стрессе // Иммунология. 2013. №5. С. 271–277.

8. Стручко Г.Ю., Меркулова Л.М., Москвичёв Е.В. Морфологическая и иммуногистохимическая характеристика тимуса при химическом канцерогенезе, вызванном введением 1,2-диметилгидразина // *Морфология*. 2014. Т. 146, №5. С. 35–39.
9. Фроленко А.Л. Клинико-иммунологическая характеристика детей после тимэктомии: автореф. дисс. к.м.н. Оренбург, 2011. 26 с.
10. Erickson C.A. Neural Crest: Origin, Migration and Differentiation. *Encyclopedia of life science*. London: nature publishing group, 2011. 2084 p.
11. Martin-Gayo E., Sierra-Filardi E., Corbi A.L., Toribio M.L. Plasmacytoid dendritic cells resident in human thymus drive natural Treg cell development // *Blood*. 2010. Vol. 115. P. 5366–5375.
12. Prelog M., Keller M., Geiger R. Thymectomy in early childhood: Significant alterations of the CD4+CD45RA+CD62L+ T cell compartment in later life // *J.Clinical Immunology*. 2009. Vol. 130. P. 123–132.
13. Van Gent R., Schadenberg A.W.L., Otto S. A., Nievelstein R.A.J., Sieswerda G.T. Long-term restoration of the human T-cell compartment after thymectomy during infancy: a role for thymic regeneration? // *Blood*. 2011. Vol. 118, №3. P. 627–634.

References

1. Doneckova AD, Frolenko AL, Troshina VV. Timusnye ehkscizionnye kol'ca v lim-focitah perifericheskoj krovi [Thymus excisional rings in lim-phocytes of peripheral blood. Age dynamics and influence of thymectomy]. *Vozrastnaya dinamika i vliyanie timehktomii*. Immunologiya. 2010;6:293-8. Russian.
2. Zin'kovskij MF. Vrozhdennye poroki serdca [Congenital heart disease]. Kiev: «Kniga plyus»; 2009. Russian.
3. Kondrat'ev VA. Vrozhdennye poroki serdca do i posle operacii [Congenital heart disease before and after surgery]. *Tavrisheskij mediko-biologicheskij vestnik*. 2005;8(2):76-82. Russian.
4. Loginova NP, CHetvertnyh VA, Semchenko VV, CHemurzieva NV, Hromcova GA. Immunocitohimicheskie osobennosti stanovleniya differencirovki ehpitelial'nyh kletok timusa u detej pervogo goda zhizni pri ehmbriional'nyh narusheniyah razvitiya serdca [Immunocytochemical peculiarities of the formation of differentiation of epithelial cells of the thymus in children of the first year of life when embryonic development disorders of the heart]. *Fundamental'nye issledovaniya*. 2013;12:49-53. Russian.
5. Loginova NP, CHetvertnyh VA, Semchenko VV, Sajdakova EV, CHemurzieva NV. Osobennosti ehkspressii citokeratinov 5 i 8 v kletkah ehpitelial'noj stromy timusa i kolichestvo TREC v perifericheskikh T-limfocitah u detej s vrozhdennymi porokami serdca [Especially expression of cytokeratins 5 and 8 in the epithelial cells of the thymic stroma and the number of TREC in peripheral T-lymphocytes in children with congenital heart disease]. *Immunologiya*. 2014;35(6):333-7. Russian.
6. Luk'yanova LD, Kirova YUI, Sukoyan GV. Novoe o signal'nyh mekhanizmah adaptacii k gi-poksii i ih roli v sistemnoj regulyacii [New about the signaling mechanisms of adaptation to GI-poxie and their role in system regulation]. *Patogenez*. 2011;9(3):4-14. Russian.
7. Starskaya IS, Polevshchikov AV. Morfologicheskie aspekty atrofii timusa pri stresse [Morphological aspects of atrophy of the thymus under stress]. *Immunologiya*. 2013;5:271-7. Russian.
8. Struchko GYU, Merkulova LM, Moskvichyov EV. Morfologicheskaya i immunogistohimicheskaya harakteristika timusa pri himicheskom kancerogeneze, vyzvanom vvedeniem 1,2-dimetilgidrazina [Morphological and immunohistochemical characteristics of the thymus in chemical carcinogenesis caused by the administration of 1,2-dimethylhydrazine]. *Morfologiya*. 2014;146(5):35-9. Russian.
9. Frolenko AL. Kliniko-immunologicheskaya harakteristika detej posle timehktomii [Clinical and immunological characteristics of children after thymectomy] [dissertation]. Orenburg (Orenburg region); 2011. Russian.
10. Erickson CA. Neural Crest: Origin, Migration and Differentiation. *Encyclopedia of life science*. London: nature publishing group; 2011.
11. Martin-Gayo E, Sierra-Filardi E, Corbi AL, Toribio ML. Plasmacytoid dendritic cells resident in human thymus drive natural Treg cell development. *Blood*. 2010;115:5366-75.
12. Prelog M, Keller M, Geiger R. Thymectomy in early childhood: Significant alterations of the CD4+CD45RA+CD62L+ T cell compartment in later life. *J.Clinical Immunology*. 2009;130:123-32.
13. Van Gent R, Schadenberg AWL, Otto SA, Nievelstein RAJ, Sieswerda GT. Long-term restoration of the human T-cell compartment after thymectomy during infancy: a role for thymic regeneration? *Blood*. 2011;118(3):627-34.

Библиографическая ссылка:

Логинова Н.П., Четвертных В.А., Чемурзиева Н.В. Иммуноморфологические процессы в тимусе при врожденном пороке сердца у детей // *Вестник новых медицинских технологий. Электронное издание*. 2018. №4. Публикация 3-15. URL: <http://www.medtsu.tula.ru/VNMT/Bulletin/E2018-4/3-15.pdf> (дата обращения: 13.07.2018). DOI: 10.24411/2075-4094-2018-16134. *

* номера страниц смотреть после выхода полной версии журнала: URL: <http://medtsu.tula.ru/VNMT/Bulletin/E2018-4/e2018-4.pdf>