

УДК 611.438

В.Э. Торбек,

д.м.н., профессор кафедры гистологии, цитологии
и эмбриологии Первого МГМУ им. И.М. Сеченова

С.Л. Кузнецов,

д.м.н., профессор, заведующий кафедрой гистологии,
цитологии и эмбриологии Первого МГМУ
им. И.М. Сеченова

V.E. Torbek,

MD, prof. of the chair of histology, cytology
and embryology of the I.M. Sechenov First MSMU

S.L. Kuznetsov,

MD, prof., head of the chair of histology, cytology
and embryology of the I.M. Sechenov First MSMU

РЕТИКУЛЯРНЫЕ ЭПИТЕЛИОЦИТЫ ТИМУСА И РЕГУЛЯТОРНЫЕ Т-ЛИМФОЦИТЫ

EPITHELIAL RETICULAR CELLS OF THE THYMUS AND THE REGULATORY T-LYMPHOCYTES

КОНТАКТНАЯ ИНФОРМАЦИЯ:

Виктория Эдуардовна Торбек, профессор кафедры
гистологии, цитологии и эмбриологии

Адрес: 117513, г. Москва, ул. Акад. Бакулева, д. 6

Телефон: 8 (495) 629–75–69

E-mail: aakasianenko@mail.ru

Статья поступила в редакцию: 17.12.2014

Статья принята к печати: 22.01.2015

CONTACT INFORMATION:

Viktoriya Eduardovna Torbek, prof. of the chair of histology, cytology
and embryology

Address: 6 Akad. Bakulev str., Moscow, 117513

Tel.: 8 (495) 629–75–69

E-mail: aakasianenko@mail.ru

The article received: 17.12.2014

The article approved for publication: 22.01.2015

Аннотация. Статья имеет обзорный характер. Приводятся литературные данные, касающиеся важной роли ретикулярных эпителиоцитов в формировании специфического микроокружения в корковом и мозговом веществе долек тимуса. Микроокружение играет ключевую роль в процессах Т-клеточной дифференцировки. Обсуждается роль медуллярных эпителиоцитов в формировании толерантности и развитии регуляторных Т-лимфоцитов.

Annotation. The article presents a review of the literature. The article presents the published data on the role of reticular epithelial cells in the formation of specific microenvironment in the cortex and medulla of thymic lobules. Thymic microenvironment plays a key role in T-cell differentiation. Discusses the role of medullary epithelial cells in the development of regulatory T-lymphocytes and induction of tolerance.

Ключевые слова. Тимус, ретикулярные эпителиоциты, регуляторные Т-лимфоциты, толерантность.

Keywords. Thymus, reticular epithelial cells, regulatory T-cells, tolerance.

Эпителиальные клетки тимуса играют ключевую роль в процессах Т-клеточной дифференцировки, создавая различное микроокружение в корковом и мозговом веществе долек тимуса. В корковом веществе тимуса содержатся Т-клеточные прогениторы и происходит позитивная селекция CD4⁺CD8⁺ тимоцитов. Мозговое вещество играет важную роль в рецессивной (негативной) селекции, в результате которой уничтожаются аутореактивные Т-лимфоциты, а также в формировании доминантной толерантности, которая обеспечивается Т-регуляторными лимфоцитами. Т-регуляторные клетки способны пода-

влять пролиферацию, активацию и эффекторную функцию различных иммунокомпетентных клеток на периферии. В настоящее время имеются многочисленные экспериментальные и клинические данные, свидетельствующие о важной роли Т-регуляторных клеток в развитии иммунозависимой патологии [1].

Т-регуляторные лимфоциты предупреждают развитие аутоиммунных заболеваний, аллергических реакций, реакций отторжения трансплантата, участвуют в поддержании иммунного гомеостаза в системе мать-плод. Однако, они могут играть и негативную роль в организме, подавляя противоопу-

холевый иммунитет и тем самым способствуя развитию опухолей [2].

Регуляторные супрессорные клетки были впервые охарактеризованы в 1995 г. при исследовании аутоиммунных заболеваний у мышей, а в 2001 г. были идентифицированы у человека [3].

Известны несколько вариантов регуляторных Т-клеток: естественные (природные — natural), развивающиеся в тимусе (Treg), и адаптивные (индуцированные).

Развитие Treg в тимусе происходит на стадии двойных позитивных клеток или на стадии CD4⁺ лимфоцитов. Во время положительной селекции предшественники Treg взаимодействуют с эпителиальными клетками и экспрессируют молекулу CD25. Но наиболее специфическим внутриклеточным маркером для Treg является FOXP3. В 2003 году описан ген, локализованный в хромосоме X, FOXP3 (forkhead box 3), который контролирует развитие и функционирование Treg у мышей и человека. [2] Ген FOXP3 действует как репрессор транскрипции, выступая антагонистом другого транскрипционного фактора — NFAT (нуклеарного фактора активированных Т-лимфоцитов). Под влиянием FOXP3 наступает ингибирование активации Т-лимфоцитов. Зрелые Treg, способные вырабатывать супрессорные цитокины, мигрируют на периферию [4].

Ретикулярные эпителиоциты тимуса имеют бледное ядро, содержащее немногочисленные глыбки гетерохроматина. В области контактов протяженных отростков эпителиоцитов выявляются десмосомы. В цитоплазме клеток локализуются рибосомы, митохондрии, липидные включения, пучки тонофиламентов, вакуоли.

Эпителиальные клетки тимуса характеризуются выраженным полиморфизмом. Существует множество различных классификаций эпителиоцитов тимуса, в основу которых положены их локализация, ультраструктура, экспрессия определенных цитокератинов и другие признаки. Так, на основании ультраструктурных особенностей и локализации в дольках тимуса выделяют 6 типов эпителиальных клеток. [5] По уровню экспрессии молекул МНС II (Major histocompatibility complex — Главный комплекс гистосовместимости) и Ly5 (антигенная детерминанта эпителиоцитов коркового вещества) все эпителиальные клетки тимуса делят на 4 группы [6]. По экспрессии цитокератинов выделяют две основные популяции тимических эпителиальных клеток: цитокератин 5-14 положительные (K5+) и цитокератин 8-18 положительные (K8+) [7].

На основе иммуногистохимических исследований выделяют 4 основных типа ретикулярных эпителиоцитов: субкапсулярные, кортикальные, медуллярные и клетки тимических телец Гассала.

Ретикулярные эпителиоциты тимуса являются основными клетками, обеспечивающими оп-

тимальное гуморальное микроокружение, необходимое для развития иммунокомпетентных Т-лимфоцитов [8].

Биологически активными веществами в тимусе являются пептидные гормоны, короткоранговые пептидные мессенджеры (цитокины, хемокины, интегрины, молекулы адгезии и др.), биогенные амины.

В экстрактах тимуса преобладают продукты эпителиальных клеток. Это подтверждается их сходством с продуктами, выделяемыми эпителиальными клетками в культуре тканей. Ранее морфологические проявления секреторного процесса в тимусе связывали с эпителиоцитами, в цитоплазме которых имеются гранулы, сходные по ультраструктуре с гранулами пептид-секретирующих клеток [9]. В настоящее время продукцию биологически активных веществ тимусе связывают с ретикулярными эпителиоцитами, содержащими вакуоли. Имеются экспериментальные данные, свидетельствующие о том, что в вакуолях ретикулоэпителиоцитов происходит концентрация продуктов секреции. При ингибировании секреции по принципу обратной связи вакуоли расширяются, в них накапливается электронноплотный материал, миелоноподобные тельца, а иммуногистохимически гормоны перестают выявляться. Основным путем секреции биологически активных веществ является Са-зависимый экзоцитоз, стимулируемый ионами цинка [10].

Под истинными гормонами тимуса понимают пептидные субстанции, отвечающие определенным критериям: они вырабатываются преимущественно или исключительно в тимусе, участвуют в развитии Т-лимфоцитов, присутствуют в кровотоке. К истинным гормонам тимуса относят тимулин, α-тимозин, тимопоэтины I и II. Описаны некоторые биологические эффекты тимусных гормонов. Однако остаются нерешенными многие вопросы, касающиеся их биосинтеза и процессинга. Изучение биологических эффектов гормонов тимуса затруднено из-за отсутствия четких данных относительно их рецепторов. Судя по наличию эффектов *in vitro*, гормоны тимуса регулируют выработку цитокинов, нейроэндокринных факторов внутри тимуса, влияют на созревание тимоцитов.

Эпителиальные клетки тимуса способны без какой-либо активации синтезировать *in vitro* ряд цитокинов, основным из которых является IL-8. [11, 12] Вероятно, эта способность реализуется эпителиоцитами тимуса также *in vivo*. Возможно, «цитокиновая сеть» тимуса исполняет роль вектора, определяющего направление перемещения тимоцитов внутри органа в процессе их развития.

В формировании микроокружения в корковом веществе долек тимуса большое значение имеет субпопуляция ретикулярных эпителиоцитов, именуемых «клетки-няньки» (thymus nurse cells — TNC).

Эти клетки образуют многоклеточные комплексы, в которых происходят уникальные взаимодействия между тимоцитами и эпителиальными клетками.

Первоначально они характеризовались как кератинэкспрессирующие клетки, содержащие тимоциты, заключенные внутри специализированных вакуолей [13]. В последующем было установлено, что эти клетки имеют глубокие инвагинации, в которых, как в колыбели, расположены лимфоциты. Прослойки цитоплазмы TNC между лимфоцитами могут быть очень тонкими и протяженными. Ранее TNC описывали как субкапсулярные клетки. В настоящее время определена их центральная локализация внутри коры [14]. Установлено, что TNC экспрессируют на поверхности антигены MHC I и II. Экспрессия MHC II атипична для эпителиальных клеток. TNC вовлечены в процесс Т-клеточного созревания. Имеются наблюдения, свидетельствующие о проникновении макрофагов в клетки-няньки. Однако, апоптозные тимоциты внутри TNC не содержатся, они ассоциированы с макрофагами [15].

С TNC связывают продукцию нейропептидов — окситоцина и вазопрессина [16]. Таким образом, эти клетки играют важную роль в нейрогормональной регуляции внутри тимуса или во взаимодействии между продукцией нейропептидов и иммунной системой. TNC демонстрируют специфический фенотип нейроэндокринных клеток в центральном органе иммунной системы.

Медуллярные эпителиальные клетки ультраструктурно характеризуются наличием листовидных отростков. В их цитоплазме крупные вакуоли часто располагаются компактными группами. В мозговом веществе тимуса новорожденных животных выявляются эпителиальные клетки, содержащие обширные интрацитоплазматические полости, выстланные короткими микроворсинками. В полостях содержится аморфный материал различной электронной плотности [17, 18]. Такие клетки достаточно редко встречаются в тимусе крыс старше 1 мес.

Эпителиоциты, располагающиеся в области кортико-медуллярной границы, в ходе дифференцировки дают две субпопуляции клеток, участвующих в образовании тимических телец Гассала. Клетки вытянутой уплощенной формы принимают участие в формировании кератинового ядра тельца. С округлыми клетками, имеющими в цитоплазме концентрически расположенные кератиновые филаменты (субпопуляция K5-K8+) связывают функцию синтеза аутоантигенов и презентации их тимоцитам. После включения в состав тимического тельца ядра этих клеток подвергаются специфическому процессу деградации. Они разрушаются путем экстружии в полость тельца [19].

Медуллярные эпителиальные клетки играют

ключевую роль в индукции толерантности. На медуллярных эпителиоцитах экспрессируется Aire — нуклеарный протеин аутоиммунной регуляции. Такие клетки являются Aire-положительными (Aire+mTEC). Ген Aire кодирует белковый транскрипционный фактор, обеспечивающий синтез эктопических тканеспецифических белков. Медуллярные эпителиоциты (Aire+mTEC) регулируют экспрессию большого количества периферических тканевых антигенов. Эти клетки являются своеобразными «транскрипционными машинами» по производству аутоантигенов, что необходимо для обеспечения толерантности [20, 21]. Центральная толерантность формируется путем элиминации Т-лимфоцитов с аутореактивными рецепторами. Толерантность в периферических тканях достигается развитием Т-регуляторных клеток. Доминирует идея о том, что механизмы Т-клеточной толерантности обеспечиваются как медуллярными эпителиальными клетками, так и дендритными клетками, которые действуют совместно в обеспечении развития репертуара Т-клеточных рецепторов [20].

Полагают, что взаимодействия CD70 (белок, подобный фактору некроза опухолей), который экспрессируется медуллярными эпителиоцитами и дендритными клетками, с CD27 (рецептор для CD70), который экспрессируется регуляторными Т-лимфоцитами, обеспечивает выживание Treg вследствие ингибирования митохондриального апоптоза [22].

Имеются данные о том, что медуллярные эпителиоциты индуцируют или усиливают экспрессию транскрипционного фактора FOXP3. В культуре ткани выявлено, что сокультивирование эмбриональных кроветворных клеток и тимуса человека с тимическими эпителиальными клетками способствует развитию Treg. [23].

Медуллярные эпителиальные клетки характеризуются экспрессией цитокератинов 5/14, реактивностью с лектином *Ulex europaeus agglutinin1*, экспрессией ряда маркеров.

Актуальными являются исследования, посвященные изучению дифференцировке ретикулярных эпителиоцитов тимуса. Большинство авторов считает, что ретикулярные эпителиоциты коркового и мозгового компартментов дифференцируются из бипотентных тимических эпителиальных прогениторов [TEPc], которые обнаруживаются как в эмбриональном, так и в постнатальном периодах развития [24, 25]. Фенотипические особенности бипотентных TEPc плохо изучены. У мышей онтогенез тимических эпителиальных клеток начинается на 9–10 день эмбриогенеза из энтодермы третьего фаренгиального кармана. Для инициации ранней дифференцировки TEPc требуется транскрипционный фактор Foxn1. Дифференцировку кортикальных и медуллярных эпителиоцитов в постнатальном

периоде не связывают с экспрессией гена Foxp1. Различия между кортикальными и медуллярными клетками на ранних стадиях органогенеза тимуса прослеживаются плохо и выявляются, в основном в постнатальном онтогенезе.

Высказывается мнение, что Aire-положительные медуллярные эпителиоциты дифференцируются из прогениторов, экспрессирующих $\beta 5t$ (специфическая протеосомальная субъединица) [26].

Имеются данные о том, что медуллярные эпителиоретикулоциты первоначально наделены фенотипическими свойствами, обычно ассоциируемыми с кортикальными клетками. Предполагается наличие «переходных» прогениторов, обладающих значительной пластичностью, на более поздней стадии дифференцировки бипотентной клетки [27].

Таким образом, несмотря на существенный прогресс в исследовании ретикулярных эпителиоцитов тимуса, многие вопросы остаются недостаточно изученными. Важно знать какие эпигенетические факторы способствуют детерминации (спецификации) тимических эпителиальных клеток, какие механизмы регулируют дифференцировку кортикальных и медуллярных эпителиоретикулоцитов и существуют ли в тимусе «переходные» прогениторы в постнатальном онтогенезе. Необходимы дальнейшие исследования, направленные на понимание самого главного вопроса — как мозговое вещество контролирует баланс между негативной селекцией и продукцией регуляторных Т-лимфоцитов, что в конечном итоге приводит к статусу собственной толерантности. Такие исследования являются перспективными и могут иметь большое значение для разработки вопросов клеточной иммунотерапии.

Список литературы

1. Жулай Г.А., Олейник Е.К. Регуляторные Т-лимфоциты CD4+CD25+FOXP3+. Перспективы применения в иммунотерапии // *Труды Карельского научного центра РАН*. 2012. №2. С.3-17.
[Zhulaj G.A., Olejnik E.K. Regulatory T-lymphocytes CD4 + CD25 + FOXP3 +. Prospects for use in immunotherapy // *Trudy Karelskogo nauchnogo tsentra RAS*. 2012; 2: 3-17.]
2. Sakaguchi S., Sakaguchi N., Asano M. Immunologic self-tolerance by activated T cells expressing IL-2 receptor α -chains (CD25). Breakdown of a single mechanism of self-tolerance causes various autoimmune diseases // *J. Immunol.* 1995. Vol. 155. P. 1151-1164.
3. Yang Z. Z. Ansell S. M. The role of Treg cells in the cancer immunological response // *Am. J. Immunol.* 2009. Vol. 5-1. P 17-28.
4. Shevach E. M. Mechanisms of Foxp3+ T-regulatory cell-mediated suppression // *Immuniti*. 2009. Vol 30. P. 636-645.
5. Ross M.H. Histology: a text and atlas /M.H. Ross, G.I. Kaye, P. Wojciech. Baltimor, Lippincott Williams, Wilkins. 2003. 875 p.
6. Ileana P., Zubcova I., Medvedovic M. Regeneration of the adult thymus is preceded by the expansion of K5+K8 epithelial cell progenitors and by increased expression of Trp 63, cMyc and Tcf3 transcription factors in the thymic stroma // *International Immunology*. 2008. Vol. 19, Issue 11. P. 1249-1260.
7. Eun N.L., Kyeong P.J., Lee J. Characterization of the expression of cytokeratins 5, 8 and 14 in mouse thymic epithelial cells during thymus regeneration following acute thymic involution // *Anatomy and Cell Biology*. 2011. Vol. 44(1). P.14-24.
8. Anderson G., Takahama Y. Thymic epithelial cells: working class heroes for T cell development and repertoire selection // *Trends Immunol.* 2012. №33. P. 256-263.
9. Singh J. The ultrastructure of epithelial reticular cells // *The thymus gland*. 1981. P. 133-150.
10. Nabarra B., Andrianarison J. Ultrastructural study of thymic reticulum 1. Epithelial component // *Thymus*. 1987. V.1. №2. P.95-121.
11. Ярилин А.А., Шарова Н.И., Дзутев А.Х. Взаимодействие Т-лимфоцитов и эпителиальных клеток в тимусе // *Russian J. Immunol.* 1999. №4. P. 15-20.
[Yarilin A.A., Sharova N.I., Dzutsev A.Kh. The interaction of T-lymphocytes and epithelial cells in thymus // *Russian J. Immunol.* 1999. №4. P. 15-20.]
12. Yarilin A.A., Sharova N.I., Bulanova E. C., Kotchergina N.I., Mitin A.A. Hormone production by epithelial cells of human thymus in vitro // *Russian J. Immunol.* 1996. 1. P. 18-22.
13. Wekerle H., Ketelson U.P. Thymic nurse cells — Ia bearing epithelium involved in T-lymphocyte differentiation // *Nature*. 1980. 283. P.402-404.
14. Pezzano M., Samms M., Martinez M., Guyden J. Questionable Thymic Nurse Cells // *Microbiology and molecular biology reviews*. 2001, V.65. № 3. P. 390-403.
15. Ezaki T., Matsuno K., Kotani M. Thymic nurse cells (TNC) in spontaneous thymoma BUF/Mna rats as a model to study their role in T-cell development // *Immunology*. 1991. V. 73. P. 151-158.
16. Geenen Y., Defresne M., Robert F., et al. The neurohormonal thymic microenvironment: immunocytochemical evidence that thymic nurse cells are neuroendocrine cells // *Neuroendocrinology*. 1988. V. 47. P. 365-368.
17. Торбек В.Э. Морфогенез тимуса. М. Изд-во РУДН. 1995. 114 с.
[Torbek V.E. Morphogenesis of the thymus. M. RUDN. 1995. 114 p.]
18. Торбек В.Э., Юрина Н.А. Ультраструктура эпителиоцитов тимуса потомства при изменении гормонального фона в функциональной системе мать-плод // *Вестник Российского Университета дружбы народов. Сер. «Медицина»*. 2000. № 2. С. 45-49.
[Torbek V.E., Yurina N.A. The ultrastructure of thymic epithelial progeny during hormonal changes in the func-

- tional system of the mother-fetus // *Vestnik RUDN*. 2000; 2: 45–49.]
19. Беловешкин А.Г. Ультраструктура кератинового ядра телец Гассалья тимуса человека // Сборник научных работ «Труды молодых ученых» БГМУ. 2011. С. 9–13. [Beloveshkin A.G. Ultrastructure of keratin core of Hassall corpuscles of human thymus // Scientific publication «Proceedings of young scientists» of BSMU. 2011: 9–14.]
 20. Anderson G, Song Baik, Cowan J., Holland A., McCarthy N., Kyoko Nakamura et al. Mechanisms of Thymus Medulla. Development and Function. // *Current Topics in Microbiology and Immunology*. 2014. V. 373. P. 19–47. Published Online: 24 April 2013.
 21. Yano M, Kuroda N, Han H, Meguro-Horike M, Nishikawa Y, Kiyonari H. et al. Aire controls the differentiation program of thymic epithelial cells in the medulla for the establishment of self-tolerance // *J. Exp. Med.* 2008. V. 205. P. 2827–2838.
 22. Coquet J.M. Ribot J. C., Babala N, Middendorp S., van der Horst G., Xiao Y., Neves J.F., Fonseca-Pereira D., Pennington D.J., Silva-Santos B., Borst J. Epithelial and dendritic cells in the the thymic medulla promote CD4+Foxp3+ regulatory T cell development via the CD27-CD70 pathway // *J. Exp. Med.* 2013. V. 210(4). P. 715–728.
 23. Донецкова А.Д., Шарова Н.И., Никонова М.Ф., Ярилин А.А. Индукция экспрессии транскрипционного фактора FOXP3 в кроветворных клетках-предшественниках и тимоцитах человека in vitro // *Иммунология*. 2010. № 5. С. 232. [Donetskova A.D., Sharova N.I., Nikonova M.F., Yarilin A.A. Induction of the transcription factor FOXP3 expression in hematopoietic progenitor cells and human thymocytes in vitro // *Immunolgiya*. 2010; 5: 232.]
 24. Gordon J., Wilson V. A., Blair N.F., Sheridan J. et al. Functional evidens for a singl endodermal origin for the thymic epithelium // *Nat. Immunol.* 2004. 5. P. 546–553.
 25. Nehls M., Kyewski B., Messerle M. et al. Two genetically separable steps in the differentiation of thymic epithelium // *Science*. 1996. V. 272. P. 886–889.
 26. Ohigashi I., Zuklys S., Sakata M., Mayer C.E. et al. Aire-expressing thymic medullary epithelial cells originate from $\beta 5t$ -express progenitor cells // Published on line May 29, 2013.
 27. Alves N., Takahama Y., Ohigashi I., Ribeiro A. et al. Serial progression of cortical and medullary thymic epithelial microenvironments // *Europ. Journal of Immunology*. 2014. v. 44. P. 16–22. Article first published on line 4 dec. 2013.