

А.Г. Беловешкин

## МОРФОГЕНЕЗ ЭПИТЕЛИАЛЬНЫХ КЛЕТОК ТЕЛЕЦ ГАССАЛЯ ТИМУСА ЧЕЛОВЕКА

УО «Белорусский государственный медицинский университет»

Выявлена гетерогенность эпителиальных клеток телец Гассаля. Установлено, что предшественники ( $K5^+K8^+$  эпителиальные клетки) расположены на кортикомедуллярной границе долики тимуса и в ходе дифференцировки дают две субпопуляции эпителиоцитов.  $K5^+K8^-$  субпопуляция выполняет преимущественно опорные функции. После включения в состав тельца они приобретают вытянутую уплощенную форму и принимают участие в формировании кератинового ядра тельца. Округлые клетки телец происходят из  $K5 - K8^+$  субпопуляции эпителиоцитов и выполняют функцию синтеза аутоантигенов и презентации их тимоцитам. После включения в состав тельца ядра  $K5 - K8^+$  клеток подвергаются специфическому процессу дегенерации, и они разрушаются путем экстррузии в полость тельца.

**Ключевые слова:** тимус, тельца Гассаля, эпителиальные клетки, дифференцировка

А.Г. Beloveshkin

### MORPHOGENESIS OF EPITHELIAL CELLS OF HASSALL'S CORPUSCLES IN HUMAN THYMUS

In current research we find out the heterogeneity of epithelial cells of Hassall's corpuscles. It was determined that cells-progenitors are located at corticomedullary border of thymic lobe and originate two subpopulations of epithelial cells.  $K5^+K8^-$  subpopulation has mainly supporting functions. Being included in thymic corpuscles,  $K5^+K8^-$  subpopulation became a flattened form and participate in genesis of keratin core of corpuscle. Round cells originate from  $K5 - K8^+$  subpopulation of epithelial cells and produce autoantigens for thymocytes. Being included in thymic corpuscles,  $K5 - K8^+$  subpopulation undergone specific degeneration and extrusion in cavity of corpuscle.

**Key words:** thymus, Hassall's corpuscles, epithelial cells, differentiation

Тимус является первичным органом иммунной системы, в котором происходит дифференцировка костномозговых предшественников в зрелые Т-лимфоциты [5]. Известно, что процесс дифференцировки во многом обеспечивается сложным микроокружением, одной из важнейших клеточных популяций которого являются эпителиальные клетки. Эпителиоциты тимуса образуют трехмерный опорный каркас органа, секретируют ряд биологически активных веществ, участвуют в формировании гемато-тимического барьера, синтезируют и презентуют тканеспецифические антигены [10].

Тимусные эпителиальные клетки представляют собой гетерогенную клеточную популяцию. Существует много различных классификаций эпителиоцитов, в основу которых положено их происхождение, морфологические признаки, ультрамикроскопические и гистохимические особенности [4,5].

Так, по морфологическим признакам выделяют светлые и темные клетки [5], в классификации по ультрамикроскопическим признакам [4] выделяют 6 типов эпителиальных клеток: клетки типа 1 ограничивают капсулу и перегородки и окружают периваскулярные пространства капилляров коркового вещества; клетки типа 2, 3 и 4 локализируются в корковом веществе; клетки типа 5 представляют собой неспециализированные эпителиальные клетки мозгового вещества, а клетки 6 типа формируют основную популяцию клеток мозгового вещества и участвуют в образовании телец Гассаля. В настоящее время большинство авторов на основе результатов иммуногистохимических исследований выделяет четыре основных типа эпителиальных клеток: субкапсулярные (парасептальные, периваскулярные), кортикальные, медуллярные и клетки телец Гассаля [8].

Также существует ряд функциональных классификаций, в основе которых положен уровень экспрессии молекул МНС II (Major histocompatibility complex – главный комплекс гистосовместимости), секреции тимических гормонов, активности транскрипционного фактора Aire (аутоиммунный (Ai) регулятор (re)) и прочих молекул. Так, используя уровни экспрессии молекул МНС II и Ly51 (антигенная детерминанта

эпителиоцитов коркового вещества) было предложено разделить все эпителиальные клетки на 4 группы: МНС II<sup>hi</sup>/Ly51<sup>+</sup> (hi(gh) – высокий уровень экспрессии, lo(w) – низкий) и МНС II<sup>lo</sup>/Ly51<sup>+</sup> в корковом веществе и МНС II<sup>hi</sup>/Ly51<sup>-</sup> и МНС II<sup>lo</sup>/Ly51<sup>-</sup> в мозговом веществе тимуса [6,8].

Ни одна из перечисленных классификаций не позволяет связать функциональные и морфологические особенности клеток и показать участие тех или иных эпителиоцитов в строении тимусных телец. В последнее время появились данные [7] о том, что все эпителиальные клетки тимуса происходят из клеток-предшественников, экспрессирующих маркер MTS 24+. При их дифференцировке образуются различные субпопуляции эпителиоцитов, которые предлагаются [6] классифицировать по экспрессии цитокератинов 5 или 14 и цитокератинов 8 или 18 (пары кератинов, которые экспрессируются совместно). Согласно этой классификации, выделяют две основные популяции тимических эпителиальных клеток – цитокератин 5-14-положительных ( $K5^+$ ) и цитокератин 8-18-положительных ( $K8^+$ ) [6,10]. Эта классификация позволяет сопоставить морфологические и функциональные особенности эпителиоцитов тимуса, отнести эпителиальные клетки либо к различным клеточным популяциям, либо к различным стадиям развития внутри определенного дифферона.

Что касается телец Гассаля, то вклад различных субпопуляций эпителиальных клеток мозгового вещества тимуса в морфогенез телец остается недостаточно изученным. Тем более, что в последнее время обнаружена важная роль что тимических телец как в ряде физиологических процессов (созревание Т-регуляторов, синтез цитокинов и т.п.), так и в патогенезе ряда заболеваний (ревматоидный артрит, сахарный диабет 1 типа и т.п. [5]).

Целью исследования является изучение особенностей морфогенеза различных субпопуляций эпителиальных клеток мозгового вещества тимуса, выявление основных морфологических и функциональных характеристик их дифференцировки и участия в формировании телец Гассаля.

#### Материал и методы

В исследовании использовали фрагменты тимусов (30

## Оригинальные научные публикации

случаев), удаленных в Минском детском кардиохирургическом центре при вмешательствах по поводу минимальных сердечно-сосудистых пороков у детей в возрасте 1-4 месяца, в анамнезе которых отсутствовали инфекционные заболевания, иммунодефицитные состояния, прием стероидных гормонов, иммунодепрессантов. Забирались фрагменты органов, удаленных только по хирургическим показаниям (кровотечение, размножение и др.) с учетом существующих этических и юридических норм.

Кусочки тимуса (30 случаев) фиксировали в нейтральном формалине, заливали в парафин, готовили серийные срезы толщиной 7 мкм. Окраска препаратов проводилась гематоксилин-эозином, по Романовскому-Гимзе, кислым фуксин-альциановым синим-гематоксилином (выявление кислых мукополисахаридов) и по методу Пачини (выявление кератинового ядра телец Гассалья). Проводилось иммуногистохимическое исследование с антителами к НМСК (высокомолекулярные цитокератины), СК 10 (цитокератин 10), СК 6 (цитокератин 6), СК-Multi (мультицитокератин), СК 8 (цитокератин 8), СЕА (карциозембриональный антиген) (Производство Daco, USA). Ядра клеток докрасивались гематоксилином.

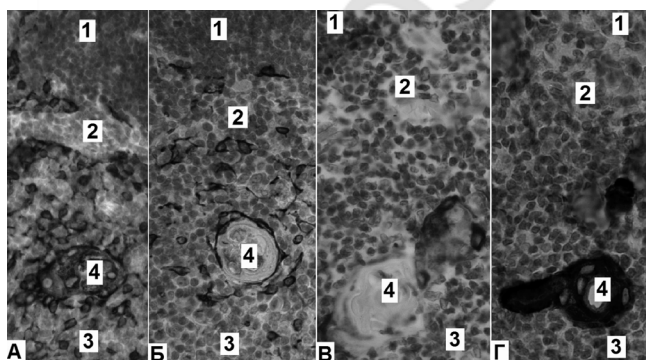
Съемка проводилась с использованием цифровой камеры-окуляра UMD-300 («Gsmserver», Тайвань), установленной на микроскопе Zeiss Axiolab («Carl Zeiss AG», Германия). Микроскопическое исследование проводилось с помощью компьютерного анализатора изображения на базе цифровой камеры UMD-300 («Gsmserver», Тайвань) и микроскопа Zeiss Axiolab («Carl Zeiss AG», Германия).

Для электронно-микроскопического исследования образцы фиксировались в 2,5% растворе глутаральдегида и 1% растворе четырехоксида осмия, заливались в аралдит. Срезы готовились на ультратоме марки ЛБК (Швеция), контрастировались цитратом свинца. Съемка проводилась на электронном микроскопе JEM 100 CX (Япония).

### Результаты и обсуждение

Тельце Гассалья состоит из эпителиальных клеток двух различных типов, отличающихся друг от друга по ряду признаков (рис. 2). Исследование эпителиоцитов мозгового вещества показало, что гетерогенность эпителиальных клеток тельца обусловлена их происхождением из различных субпопуляций эпителиальных клеток мозгового вещества тимуса, различающихся по морфологии и экспрессии ряда цитокератинов.

Это цитокератин 5-14-положительные ( $K5^+K8^-$ ) и цито-



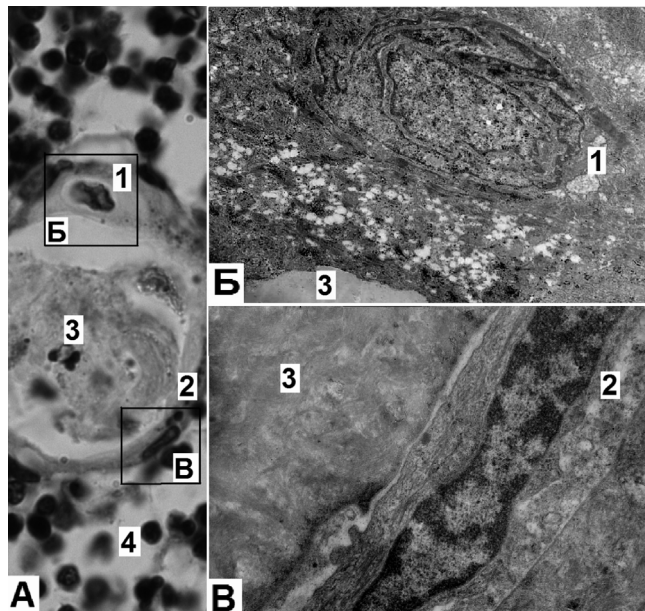
**Рис. 1.** Цитокератиновые профили эпителиоцитов мозгового вещества тимуса. Иммуногистохимическая реакция на: А-панцитокерантин, Б – цитокератин 14, В – цитокератин 8, Г – цитокератин 10. Обозначения: 1 – корковое вещество тимуса, 2 – корково-мозговая граница, 3 – мозговое вещество тимуса, 4 – тельца Гассалья. Увеличение 200, докраска ядер гематоксилином.

кератин 8-18-положительные ( $K5^-K8^+$ ) клетки, которые являются потомками клеток-предшественников с фенотипом  $K5^+K8^+$ , расположенных на кортикомедулярной границе. Так,  $K5^+K8^-$  клетки имеют вытянутую, отростчатую либо звездчатую форму и равномерно распределены в мозговом веществе долек тимуса (рис. 1). Часть клеток из данной субпопуляции прилежит к периферическому слою телец Гассалья, образуя непрерывный слой.

При дальнейшей дифференцировке эти клетки утрачивают экспрессию цитокератинов 5 и 14, перемещаются вглубь и начинают экспрессировать во внутреннем слое телец цитокератины 1 и 10, которые являются маркерами более дифференцированных клеток (рис. 1В). В составе тельца Гассалья эпителиоциты данной субпопуляции имеют уплощенную форму, вытянутое ядро с преобладанием гетеромероматина, сетчатый характер расположения тонофиламентов. При гистохимическом исследовании в клетках выявляется накопление высокомолекулярных цитокератинов. Клетки данного типа плотно прилегают друг к другу, образуя до 5 слоев, затем, подвергаясь корнификации, эпителиальные клетки образуют кератиновое ядро тельца (рис. 2В). Отметим, что данная субпопуляция клеток количественно преобладает и составляет до 80% эпителиоцитов тельца Гассалья.

Популяция  $K5^-K8^+$  клеток представлена значительно меньшим числом клеток, характеризующихся более округлой формой (рис. 1) и ядрами с преобладанием эухроматина. По характеру экспрессии К8, их можно разделить на две группы. Первая представлена менее дифференцированными клетками, расположенными на периферии мозгового вещества и демонстрирующими умеренную интенсивность иммуногистохимической реакции на цитокератин 8. Другая группа представлена более крупными дифференцированными клетками, расположенными в центре мозгового вещества дольки или в составе телец Гассалья.

Эпителиоциты данной субпопуляции в ставе телец Гассалья также имеют овальную форму и проявляют интенсивную иммуногистохимическую реакцию на цитокератин 8 (в



**Рис. 2.** Различные типы эпителиоцитов в составе телец Гассалья. А – гистохимическая реакция на нуклеиновые кислоты (метод Эйнарсона), Б, В – электронная микроскопия. Обозначения: 1 – округлые клетки с дегенерацией ядра, 2 – уплощенные клетки, 3 – полость тельца, 4 – мозговое вещество тимуса. Увеличение: А – 1000, Б, В – 6.000

виде «пояска», что соответствует концентрически расположенным тонофиламентам в эпителиоцитах при электронно-микроскопическом исследовании). Отметим, что дегенерация этих клеток начинается с ядра: образуются глубокие инвагинации кариолеммы, ядро приобретает сегментированный вид, а затем распадается на множество мелких фрагментов. Центральная часть клетки увеличивается в размерах, накапливая альциан-положительные субстанции, и опорожняется путем экструзии в полость тельца.

Различия субпопуляций эпителиальных клеток не ограничиваются их морфологическими особенностями. При изучении экспрессии одного из тканеспецифических аутоантигенов – карциозембрионического антигена СЕА – было обнаружено, что СЕА-положительные клетки локализованы преимущественно в составе тимусных телец, и значительно реже – в округлых эпителиоцитах мозгового вещества. В тельцах Гассалья экспрессия СЕА наблюдалась в центре тельца и преимущественно в округлых клетках как внутреннего, так и наружного слоев. Морфологические особенности СЕА-положительных клеток и характер их разрушения аналогичны таковым в популяции  $K5^-K8^+$  клеток в составе телец Гассалья.

На основании полученных нами результатов сделан вывод о гетерогенности эпителиальных клеток тимусных телец, что объясняется неоднородностью эпителиальных клеток мозгового вещества тимуса, принимающих участие в морфогенезе телец Гассалья. Показано, что уплощенные клетки телец происходят из субпопуляции  $K5^+K8^-$ , а округлые клетки – из  $K5^-K8^+$  субпопуляции эпителиоцитов.

$K5^+K8^-$  субпопуляция однородна и представлена клетками с низким уровнем экспрессии МНС II, что указывает на низкий уровень вовлеченности данной субпопуляции в процессы презентации антигенов [8]. Эти данные, а также сетчатый характер распределения клеток в мозговом веществе, свидетельствуют о преимущественно опорных функциях клеток данной популяции. Выполнение  $K5^+K8^-$  клетками преимущественно опорной функции подтверждается и особенностями их дифференцировки. По мере перемещения в глубь тельца эти клетки прекращают экспрессию цитокератина 5. Аналогичный процесс наблюдается в эпидермисе: клетки базального слоя эпидермиса экспрессируют цитокератины 5-14, а экспрессия высокомолекулярных цитокератинов 1-10 отсутствует. В клетках вышележащих слоев экспрессия цитокератинов 5-14 снижается, а цитокератинов 1-10 – нарастает. Таким, образом, дифференцировка  $K5^+K8^-$  популяции эпителиоцитов тимуса иммуногистохимически и морфологически весьма схожа с дифференцировкой кератиноцитов [5], что может свидетельствовать и о схожих функциях.

Популяция  $K5^-K8^+$  клеток мозгового вещества неоднородна как по расположению клеток, так и по проявлению иммуногистохимической реакции на цитокератин 8. Так, менее дифференцированные  $K5^-K8^+$  клетки расположены на периферии мозгового вещества и характеризуются умеренной интенсивностью иммуногистохимической реакции. Другая часть  $K5^-K8^+$  клеток, более дифференцированных,

расположена в центре мозгового вещества и в составе телец Гассалья, характеризуется интенсивной иммуногистохимической реакцией с выявлением цитокератинов в виде «пояска» и более крупными размерами. Известно, что субпопуляция  $K5^-K8^+$  гетерогенна также и функционально [9]. Так, 30% клеток имеют высокие уровни экспрессии молекул МНС II, что указывает на их активное участие в процессах антигенпрезентации, а 70% клеток имеют низкий уровень экспрессии молекул МНС II, однако по мере дифференцировки  $K5^-K8^+$  клеток он повышается [8,9].

Из функциональных характеристик  $K5^-K8^+$  клеток наибольшее внимание обращает на себя экспрессия продуктов Aire гена. Сопоставив полученные данные с результатами ряда авторов [5], мы убедились в совпадении топографии  $K5^-K8^+$  МНС II<sup>hi</sup> и Aire-положительных клеток, что с высокой степенью вероятности свидетельствует об их идентичности. Ген Aire кодирует белковый транскрипционный фактор, обеспечивающий синтез эктопических тканеспецифических белков (аутоантигенов) в тимусе, создавая в нем как бы иммунологический портрет всего организма, что является важным условием формирования иммунологической толерантности. Затем эти антигены захватываются дендритными клетками для последующей презентации тимоцитам в мозговом веществе тимуса. Таким образом, Aire-положительные клетки являются своеобразными «транскрипционными машинами» по производству тканеспецифических антигенов, которые необходимы для создания и поддержания иммунологического гомеостаза [5]. Одним из таких аутоантигенов является карциозембрионический антиген (СЕА). Поэтому экспрессия СЕА, которая имеет Aire-зависимый механизм [3], может служить моделью для изучения распределения тканеспецифических аутоантигенов в тимусе. Интересно, что паттерны экспрессии Aire и зависимых от него антигенов не совпадают. Если Aire-положительные клетки расположены преимущественно в мозговом веществе возле телец Гассалья, то экспрессия Aire-зависимого антигена СЕА максимально выражена в тельцах Гассалья. Мы считаем, что это можно объяснить накоплением аутоантигенов на более поздних этапах дифференцировки клеток, когда экспрессия гена Aire уже прекратилась. Следовательно, одной из важнейших функций субпопуляции  $K5^-K8^+$  МНС II<sup>hi</sup> клеток является синтез тканеспецифических белков, что было нами изучено на примере карциозембрионического антигена.

Обобщив полученные результаты и данные литературы, мы предложили следующую последовательность дифференцировки популяции  $K5^-K8^+$  клеток (рис. 3)

1. Образование  $K5^-K8^+$  клеток происходит из общих  $K5^+K8^+$  предшественников, расположенных на кортикомедулярной границе.

2. Незрелые  $K5^-K8^+$  клетки располагаются на периферии мозгового вещества долек, зачастую формируя небольшие кластеры, и характеризуются низкой экспрессией молекул МНС II.

3. Зрелые  $K5^-K8^+$  клетки перемещаются в центр мозгового вещества, располагаясь около тимусных телец или в составе их периферических слоев. Клетки этой субпопуляции имеют высокие уровни экспрессии молекул МНС II, что указывает на их активное участие в процессах антигенпрезентации. Как мы писали выше, именно эти клетки экспрессируют ген Aire.

4. Конечная стадия развития  $K5^-K8^+$  клеток характеризуется накоплением аутоантигенов и выключением гена Aire, что было показано на примере Aire-зависимого антигена СЕА.

Таким образом, в результате исследования установле-



Рис. 3. Схема дифференцировки субпопуляций эпителиальных клеток мозгового вещества тимуса.

## ■ Оригинальные научные публикации

на гетерогенность эпителиальных клеток мозгового вещества тимуса и образующихся из них телец Гассала. Клетки различаются по происхождению, строению, по степени выраженности ряда гистохимических и иммуногистохимических реакций. Их общий предшественник –  $K5^+K8^+$  эпителиальные клетки – расположены на кортикомедуллярной границе тимуса.

В ходе дифференцировки они дают две субпопуляции эпителиоцитов. Одна группа представлена субпопуляцией  $K5^+K8^-$  клеток и выполняет преимущественно опорную функцию. В составе телец они имеют вытянутую уплощенную форму, вытянутое ядро, сетчатый характер расположения тонофиламентов и принимают участие в формировании кератинового ядра тельца. Вторая группа образована из субпопуляции  $K5^-K8^+$  эпителиоцитов. В тельцах Гассала они имеют округлую или овальную форму и концентрически расположенные тонофиламенты.

Нами установлено соответствие между субпопуляциями  $K5^-K8^+$  МНС II<sup>hi</sup> клеток и Aire-положительными клетками и выдвинуто предположение, что одной из важнейших функций субпопуляции  $K5^-K8^+$  клеток является синтез тканеспецифических белков, что было нами изучено на примере карциозембрионического антигена. Таким образом, эпителиальные клетки телец Гассала участвуют в поддержании иммунологической толерантности организма.

### Литература

1. Беловешкин, А. Г. Морфология постклеточных структур телец Гассала тимуса человека в норме / Беловешкин А. Г., Студеникина Т. М. //

Медицинский журнал, 2010, 4, стр. 26-28

2. Беловешкин, А. Г. Ультраструктура кератинового ядра телец Гассала тимуса человека / Беловешкин А.Г. // Сборник научных работ «Труды молодых ученых» БГМУ, 2011, стр. 9-13

3. Беловешкин, А. Г. Участие эозинофилов в морфогенезе телец Гассала. / Беловешкин А. Г., Студеникина Т. М. // Известия Национальной академии наук Беларуси, 2011, 2, стр. 93-97

4. Харченко, В. П., Саркисов Д. С., Ветшев П. С. и др. Болезни вилочковой железы // Триада-X 1998, 252 стр.

5. Anderson, M. Projection of an immunological self shadow within the thymus by the aire protein / Anderson M., Venanzi E., Klein L. et al. // Science. 2002. vol. 298 (5597) pp. 1395 – 401.

6. Bodey, B., Siegel S. E. Immunological aspects of neoplasia. The role of the thymus // Springer Science. 2004. p. 567.

7. Eun, N. L. Characterization of the expression of cytokeratins 5, 8, and 14 in mouse thymic epithelial cells during thymus regeneration following acute thymic involution / Eun N. L., Kyeong P. J., Lee J. // Anatomy and Cell Biology 2011. vol. 44(1) pp. 14-24.

8. Gill, J. Generation of a complete thymic microenvironment by MTS24(+) thymic epithelial cells / Gill J., Malin M., Hollander G. // Nat Immunol 2002 vol. 3(7) pp. 635-42.

9. Ileana, P. Regeneration of the adult thymus is preceded by the expansion of  $K5+K8+$  epithelial cell progenitors and by increased expression of Trp63, cMyc and Tcf3 transcription factors in the thymic stroma / Ileana P., Zubkova I., Medvedovic M. // International Immunology 2008 vol. 19. Issue 11 pp. 1249-1260.

10. Hamazaki, Y. Medullary thymic epithelial cells expressing Aire represent a unique lineage derived from cells expressing claudin / Hamazaki Y., Fujita H., Kobayashi T. // Nat Immunol. 2007 vol. 8(3) pp. 304-11

11. Shezen, E. Cytokeratin expression in human thymus: immunohistochemical mapping / Shezen E., Elimelech O. // Cell Tissue Res 1995 vol. 279 pp. 221-231

Поступила 08.03.2012г.