

СПОСОБ БЫСТРОЙ АКТИВАЦИИ ЛИМФОЦИТОПОЭЗА В ТИМУСЕ

С.С. Обернихин, Н.В. Яглова, С.В. Назимова, Е.П. Тимохина, В.В. Яглов

НИИ морфологии человека ФГБНУ «РНЦХ им. ак. Б.В. Петровского», Москва, Россия

Тимус является центральным органом иммунной системы, обеспечивающим процесс образования Т-лимфоцитов. На функционирование тимуса влияют различные факторы, начиная с возрастной инволюции, нарушения питания, инфекций, заканчивая вредными ятрогенными воздействиями, таких как химиотерапия и облучение [1,2,13,14]. Снижение или утрата нормальной функции тимуса значительно увеличивает риск инфекционных заболеваний и малигнизации из-за ограниченной способности иммунного надзора.

В последние годы разрабатываются регенеративные и защитные стратегии для усиления функции тимуса у пожилых людей, а также у лиц, перенесших трансплантацию органов, химио- и радиотерапию. Такой подход к решению данной проблемы требует значительных финансовых ресурсов, что значительно ограничивает область его применения. Однако имеется большое количество работ о влиянии смещения баланса стабильных изотопов водорода в организме на пролиферативную активность клеток [4, 5]. Существуют данные, что снижение содержания дейтерия приводит к активации лимфоцитов, обладает протекторным действием при гамма- и рентгеновском облучении, предотвращая лимфопению [5]. Механизм такого явления до конца не выяснен и обусловлен отсутствием фундаментальных представлений о роли дейтерия, стабильного изотопа водорода, в биохимических реакциях живых организмов.

Цель исследования – разработать быстрый способ активации лимфоцитопоэза в тимусе половозрелых особей, то есть после начала возрастной инволюции органа.

Методы исследования

В эксперименте были использованы половозрелые самцы крыс породы Вистар в возрасте 6 месяцев, массой 340–370 г. Крысы контрольной группы потребляли воду (n=9) с обычным содержанием дейтерия [D]=146 ppm. Крысы опытной группы потребляли воду с пониженным содержанием дейтерия [D]=10 ppm. (n=7) (ИП Селиваненко) ad libitum в течение 1 сут. Для определения содержания дейтерия в воде использовали изотопный анализатор T-LWIA-45-EP (LOS Gatos Gatos Research, Inc.), с точностью до 1 ppm.

Животных выводили из эксперимента передозировкой золетила через 24 часа после начала потребления воды с пониженным содержанием дейтерия. Измеряли массу тела до и после эксперимента. Масса тела статистически значимо не изменялась. Тимус взвешивали на аналитических весах («Сартогосм») и рассчитывали относительную массу органа. Объём потреблённой жидкости в контрольной группе составил $8,90 \pm 0,35$, а в опытной – $8,55 \pm 0,30$ мл на 100 г. массы тела. Для получения культуры клеток для цитофлюорометрического исследования тимус гомогенизировали в среде RPMI 1640 и отделяли клетки от стромы путём продавливания через сетки с диаметром 40 мкм. Клеточную взвесь дважды отмывали путём центрифугирования в течение 5 мин при 1000 об/мин в среде RPMI 1640. Полученные тимоциты доводили до концентрации 10^7 клеток в 1 мл. Проводили цитофлюорометрическое исследование лимфоцитов тимуса с использованием антител к CD3, CD4, CD8, конъюгированных с флюорохромами (eBioscience). После 30 минутной инкубации дважды отмывали вышеописанным способом. Для исследования использовали проточный цитофлюориметр FC500 (Beckman Coulter). Определяли процентное соотношение CD3-позитивных клеток, включая трипозитивные (CD3+CD4+CD8+) и монопозитивные (CD3+CD4-CD8+ и CD3+CD4+CD8-) клетки, а также дубль-позитивные (CD3-CD4+CD8) и тринегативные (CD3-CD4-CD8-) лимфоциты.

Статистическую обработку полученных данных проводили при помощи программы Statistica 7.0 (Statsoft, Inc.). Количественные данные, имеющие нормальное распределение, описывали средним значением и ошибкой среднего ($M \pm m$). Для сравнения групп использовали тест Манна-Уитни. Значимыми считали различия при $p < 0.05$.

Результаты исследования

Исследование фенотипа тимоцитов крыс контрольной группы показало, что большинство клеток представляют собой дубль-позитивные клетки, экспрессирующие молекулы CD4 и CD8. Гораздо в меньшей степени были представлены CD3-позитивные клетки, среди которых Т-цитотоксические (CD3+CD4-CD8+) составляли четверть, Т-хелперы (CD3+CD4+CD8-) приблизительно две трети, остальные приходились на трипозитивные клетки (CD3+CD4+CD8+). Тринегативные (CD3-CD4-CD8-) тимоциты были немногочисленны, а их количество было в 2 раза меньше, чем CD3-позитивных клеток.

У крыс, потреблявших воду с пониженным содержанием дейтерия через сутки, отмечалось значительное увеличение относительной массы тимуса. Субпопуляционный состав клеток тимуса претерпел значительные изменения. Цитофлюорометрическое исследование фенотипа тимоцитов показало четырёхкратное увеличение дубль-негативных клеток при почти двукратном уменьшении количества дубль-позитивных клеток. При этом отмечалось двукратное увеличение CD3-позитивных клеток, преимущественно за счёт Т-цитотоксических лимфоцитов, нежели Т-хелперов. Численность трипозитивных клеток оставалась неизменной.

Физиологические и патологические изменения функции тимуса могут возникать в различных ситуациях. Дефекты микроокружения тимуса нарушают адаптивную иммунную систему и, следовательно, могут вызывать опасные для жизни иммунодефициты, аутоиммунитет и повышенный риск рецидива опухоли вследствие нарушения иммунологического надзора [7]. Результаты исследований демонстрируют, что при резком уменьшении поступления дейтерия в организм уже через 24 часа развиваются реактивные изменения в тимусе. Тимус, являющийся основным органом образования новых Т-лимфоцитов, не содержит самообновляющихся клеток-предшественников. [10,11]. Эти клетки-предшественники постоянно рекрутируются из крови и маркируются как тройной негативный фенотип (CD3-CD4-CD8-). Их количество в нашем исследовании значительно возросло, следовательно реактивные изменения, происходящие в органе, могут быть связаны как с их ускоренным заселением, так и изменениями микроокружения в самом тимусе.

Тимус чрезвычайно чувствителен к стрессу, а временная потеря клеток, возникающая вследствие инфекций, лечения глюкокортикоидами, химиотерапии и облучения порой достигает 90 % [6,9]. В настоящее время идет активный поиск средств для улучшения и омоложения функций тимуса. Среди них цитокины и факторы роста, которые поддерживают популяции стромальных клеток некроветворной линии и развивающихся тимоцитов. Например, дифференцировку и экспансию тимических ретикулярных эпителиоцитов можно улучшить с помощью ИЛ-22, фактора роста кератина KGF, эпидермального фактора роста EGF, костного морфогенетического белка-4 BMP4, лиганда из семейства фактора некроза опухоли RANKL и двух микроРНК, miR-205 или miR-29a [3,8,12,15]. У крыс, потреблявших воду с пониженным содержанием дейтерия, через 24 часа наблюдалось увеличение массы тимуса. Это свидетельствует об изменении баланса пролиферации, дифференцировки и миграции лимфоцитов. Исследование фенотипа тимоцитов показало, что в опытной группе происходит одновременно увеличение числа как зрелых Т-клеток, так и дубльнегативных клеток, что свидетельствует об активации процессов пролиферации. Это данные подтверждают результаты, указывающие на стимуляцию лимфопоэза при снижении поступления дейтерия у животных, подвергавшихся ионизирующему облучению [5]. Вместе с тем происходит неравномерное увеличение субпопуляций среди CD3+ – клеток за счёт увеличения в наибольшей степени Т-цитотоксических лимфоцитов, что свидетельствует о влиянии понижения содержания дейтерия на позитивную селекцию и дифференцировку тимоцитов.

Выводы

Кратковременное понижение содержания дейтерия в организме является способом быстрой стимуляции лимфопоэза в центральном органе иммунной системы – тимусе после начала его возрастной инволюции.

Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ в рамках научного проекта № 20-015-00236 А.

Литература

1. Яглова Н.В., Обернихин С.С. Морфофункциональные изменения тимуса у потомства мышей в период полового созревания и у взрослых особей после однократного иммуностимулирующего воздействия на материнский организм в ранние сроки беременности // Иммунология. 2013. Т.34. № 1. С. 15–19.
2. Яглова Н.В., Тимохина Е.П., Яглов В.В. Влияние низких доз дихлордифенилтрихлорэтана на морфофункциональное состояние тимуса крыс // Бюлл. экпер. биол. мед. 2013. Т.155. № 5. С. 657–660.
3. Bhalla P., Su D.M., van Oers N.S.C. Thymus Functionality Needs More Than a Few TECs // Front. Immunol. 2022. Vol.13. 864777.
4. Bild W., Năstasă V., Haulică I. In vivo and in vitro research on the biological effects of deuterium-depleted water: 1. Influence of deuterium-depleted water on cultured cell growth // Rom. J. Physiol. 2004. Vol. 41, № 1–2. P. 53–67.
5. Bild W., Stefanescu I., Haulica I., Lupuşoru C., Titescu G., Iliescu R. et al. Research concerning the radioprotective and immunostimulating effects of deuterium-depleted water // Rom. J. Physiol. 1999. Vol. 36. P. 205–218.
6. Gruver A.L., Sempowski G.D. Cytokines, Leptin, and Stress-Induced Thymic Atrophy // J. Leukoc. Biol. 2008. Vol. 84. N. 4. P. 915–923.
7. Holländer G.A., Krenger W., Blazar B.R. Emerging strategies to boost thymic function // Curr. Opin. Pharmacol. 2010. Vol. 10. N. 4. P. 443–453.
8. Hoover A.R., Dozmorov I., MacLeod J., Du Q., de la Morena M.T., Forbess J., et al. MicroRNA-205 Maintains T Cell Development Following Stress by Regulating Forkhead Box N1 and Selected Chemokines // J. Biol. Chem. 2016. Vol. 291. N. 44. P. 23237–23247.
9. Kinsella S., Dudakov JA. When the Damage Is Done: Injury and Repair in Thymus Function // Front. Immunol. 2020. Vol. 11. 1745.
10. Petrie H.T., Zúñiga-Pflücker J.C. Zoned out: functional mapping of stromal signaling microenvironments in the thymus // Annu. Rev. Immunol. 2007. Vol. 25. P. 649–679.
11. Rodewald H.R. Thymus organogenesis // Annu. Rev. Immunol. 2008. Vol. 26. P. 355–388.
12. Satoh R., Kakugawa K., Yasuda T., Yoshida H., Sibilia M., Katsura Y., et al. Requirement of Stat3 Signaling in the Postnatal Development of Thymic Medullary Epithelial Cells // PLoS Genet. 2016. Vol. 12. N. 1. e1005776.
13. Savino W. The thymus is a common target organ in infectious diseases // PLoS Pathol. 2006. Vol. 2. e62.
14. Wagner A., Garner-Spitzer E., Jasinska J., Kollaritsch H., Stiasny K., Kundi M., et al. Age-related differences in humoral and cellular immune responses after primary immunisation: indications for stratified vaccination schedules // Sci. Rep. 2018. Vol. 8. 9825.
15. Wertheimer T., Velardi E., Tsai J., Cooper K., Xiao S., Kloss C.C., et al. Production of BMP4 by Endothelial Cells Is Crucial for Endogenous Thymic Regeneration // Sci. Immunol. 2018. Vol. 3, N. 19. eaal2736.