

УДК 612.438:57.017.642:632.938

## РАЗВИТИЕ ТИМУСА В РАННЕМ ОНТОГЕНЕЗЕ: СРАВНИТЕЛЬНЫЙ АСПЕКТ

© 2015 г. К. А. Васильев<sup>2,3</sup>, А. В. Полевщиков<sup>1,2,3</sup>

<sup>1</sup>Научно-исследовательский институт экспериментальной медицины Северо-Западного отделения РАМН  
197376 Санкт-Петербург, ул. академика Павлова, д. 12

<sup>2</sup>Санкт-Петербургский государственный университет  
199034 Санкт-Петербург, Университетская наб., д. 7/9

<sup>3</sup>Дальневосточный федеральный университет  
690950 Владивосток, ул. Суханова, д. 8

E-mail: ALEXPOL512@yandex.ru

Поступила в редакцию 14.08.2014 г.

Окончательный вариант получен 30.12.2014 г.

Обзорная статья посвящена сравнительному анализу ранних стадий онтогенеза тимуса у рыб, земноводных и млекопитающих. Рассматриваются морфологические и молекулярно-генетические аспекты формирования тимической стромы, заселения органа предшественниками Т-лимфоцитов, взаимодействия различных клеточных популяций в процессе органогенеза. Особое внимание уделено гемопоэтической роли тимуса на эмбриональной стадии и новым данным о происхождении клеток-предшественников Т-лимфоцитов. Обсуждается гипотеза о возможном наличии в органе самоподдерживающейся популяции стволовых клеток, формирующейся независимо от участков фетального гемопоэза.

*Ключевые слова:* эмбриогенез, тимус, гемопоэтические стволовые клетки, рыбы, амфибии, млекопитающие.

DOI: 10.7868/S0475145015030088

### ВВЕДЕНИЕ

Эмбриональное развитие тимуса представляет собой многостадийный процесс, предполагающий взаимодействие между производными трех зародышевых листков. Большое количество публикаций, посвященных изучению данного процесса у позвоночных животных, указывает на необходимость систематизации накопленных сведений и целесообразность сравнительного анализа эмбриогенеза тимуса с целью выявления базовых механизмов, обеспечивающих его формирование и во многом определяющих план организации иммунной системы у всех позвоночных (Charlemagne, 1976; Boehm et al., 2003; Blackburn, Manley, 2004; Bowden et al., 2005; Buse et al., 2006). Особое значение подобным исследованиям придает наличие противоречивых данных о ключевых этапах процесса (Le Douarin N, 1977; Kendall, 1995; Allman et al., 2003). В частности, долгое время неразрешенными оставались вопросы о роли эктодермы в формировании кортикальной и медуллярной зоны, о функциональном значении клеток нервного гребня, локализующихся в области зачатка органа, а также о путях иммиграции пред-

шественников Т-лимфоцитов (Т-лф). Современные методические возможности во многом прояснили механизмы тимического органогенеза, однако некоторые аспекты данного процесса до сих пор остаются дискуссионными.

Сравнительный подход к исследованию органогенеза позволяет сделать важные выводы о функциональном значении и эволюционной роли многих элементов этого процесса, поэтому целью настоящей работы стало сопоставление данных о ранних этапах онтогенеза тимуса у позвоночных животных различных классов, выявление его ключевых этапов и анализ ряда вопросов, касающихся участия тимуса в эмбриональном гемопоэзе и происхождения клеток-предшественников лимфоидного ряда.

### РЫБЫ

В пределах надкласса рыб особенности строения и эмбриогенеза тимуса могут существенно варьировать, что объясняется как большим разнообразием видов, составляющих данную таксономическую группу, так и разным уровнем их эволюционного развития. Результаты сравнительно-

## Сравнительный анализ ранних стадий развития тимуса костных рыб

Вид и ссылки			Морфологические особенности
закладка	появление Т-лф	завершение	
<i>D. rerio</i> (Chen, Zon, 2009; Boehm, 2012)			Имеет мешочкообразную форму, выпуклую дорзомедиально и постепенно сужающуюся к краям. В ходе развития значительно увеличивается и приобретает коническую форму. Кортекс и медулла разделены только на ранних стадиях
54 ЧПО	65 ЧПО	42 ДПО	
<i>D. puntazzo</i> (Romano, Fanelli, 1999)			Исходно состоит из клеток, ассоциированных с глоточным эпителием, отделяющим зачаток от жаберной камеры. Кортекс и медулла разделяются с 66 ДПВ. В кортексе локализованы мелкие, а в медулле – крупные Т-лф. Тимические дольки формируются к 91 ДПО. У молоди и взрослых рыб тимус имеет 1 см в длину
20 ДПО	51 ДПО	91 ДПО	
<i>S. chuatsi</i> (Xie et al., 2006)			Имеет мешочкообразную форму, подразделяется на кортекс и медуллу. Ограничивается от жаберной камеры посредством одиночного слоя клеток
?	7 ДПВ	35 ДПВ	
<i>P. olivaceus</i> (Chantanachookhin et al., 1991; Liu et al., 2004)			Развивается в ассоциации с глоточным эпителием, на поздних стадиях инкапсулируется. На 21 ДПВ на срезах виден клеточный тяж между тимусом и пронефросом (органом гемопоэза). Разделение на медуллу и кортекс происходит на поздних стадиях. Отмечается быстрая возрастная инволюция (к 7 мес. после вылупления)
10 ДПВ	21 ДПВ	90 ДПВ	
<i>C. carpio</i> (Botham, Manning, 1981)			На ранних стадиях клетки упакованы рыхло и активно пролиферируют. Инкапсуляция завершается к 6-му, а трабекулы формируются к 30 ДПВ. Медулла и кортекс разделяются только у взрослых организмов
2 ДПВ	4 ДПВ	30 ДПВ	
<i>S. gairdneri</i> (Grace, Manning, 1980)			Развивается из фарингального эпителия в области 1-ой и 2-ой жаберной дуги. Наиболее ранние этапы протекают еще до вылупления. К моменту вылупления малька начинается увеличение размера органа, формирование капсулы и пролиферация Т-лф. Отмечен клеточный тяж между тимусом и пронефросом
5 дней до вылупления	3 ДПВ	6 ДПВ	
<i>S. aurata</i> (Jósefsson, Tatner, 1993)			Отделен от жаберной полости тонким однослойным эпителием. Разделение на кортекс и медуллу происходит на поздних этапах развития. После 54 ДПВ выявляются Т-лф и макрофаги, мигрирующие между тимусом и пронефросом
29 ДПВ	47 ДПВ	77 ДПВ	
<i>S. guinqueradiata</i> , <i>P. major</i> (Chantanachookhin et al., 1991)			Детали развития сходны с <i>P. olivaceus</i> , но формирование трабекул происходит раньше. В тимусе 3-месячного малька обнаруживаются макрофаги и слизистые клетки
11 ДПВ	20 ДПВ	90 ДПВ	

Примечание. ЧПО/ДПО – часов/дней после оплодотворения; ДПВ – дней после вылупления.

го анализа ранних стадий развития тимуса у таких видов костных рыб, как *Danio rerio* (Chen, Zon, 2009; Boehm, 2012), *Diplodus puntazzo* (Romano, Fanelli, 1999), *Siniperca chuatsi* (Xie et al., 2006), *Paralichthys olivaceus* (Chantanachookhin et al., 1991; Liu et al., 2004), *Cyprinus carpio* (Botham, Manning, 1981), *Salmo gairdneri* (Grace, Manning, 1980), *Sparus aurata* (Jósefsson, Tatner, 1993), *Seriola guinqueradiata* (Chantanachookhin et al., 1991), *Pagrus major* (Chantanachookhin et al., 1991) представлены в табл. 1.

На основании данных таблицы можно составить единый план развития тимуса у всех костных рыб. У большинства видов оно начинается после вылупления и на ранних этапах включает в себя образование скопления недифференцированных

клеток в области 2–4-ого глоточных карманов. Второй глоточный карман всегда вовлечен в процесс формирования тимуса, связанного с взаимодействием всех трех зародышевых листков. У рыб тимус в течение жизни локализован в области глотки и покрыт снаружи однослойным глоточным эпителием, отделяющим орган от внешней среды. Инкапсуляция органа идет на ранних этапах с участием клеток нервного гребня (КНГ), для которых также показана роль в формировании соединительно-тканых трабекул, которые появляются на более поздних этапах развития и с которыми в дальнейшем связана тимическая иннервация (Bowden et al., 2005). Васкуляризация тимуса развивается на поздних этапах развития, уже после формирования трабекул. Разделение на

медуллярную и кортикальную зоны происходит не у всех видов и обычно имеет место на поздних личиночных стадиях.

Особого внимания заслуживает вопрос о проникновении в тимус предшественников лимфоцитов. В наиболее ранних работах, посвященных проблеме развития тимуса рыб, активно обсуждалась гипотеза, согласно которой лимфоциты имеют энтодермальное происхождение и возникают в результате трансформации клеток глоточного эпителия (Maurer, 1886; Beard, 1894; Nusbaum 1901; Deanesly, 1927; Von Hagen, 1936; Grace, Manning, 1980). Однако эта гипотеза не нашла в дальнейшем экспериментального подтверждения, а более широкое распространение получило предположение о пронефросе как источнике ГСК, дающих начало лимфоцитам. Пронефрос играет ключевую роль в гемопоэзе рыб, у которых отсутствует красный костный мозг (ККМ). Впервые предположение о роли пронефроса в формировании предшественников Т-лф высказал Эллис в 1977 году (Ellis, 1977), однако подтверждающих экспериментальных данных также не было получено. Тем не менее, известно, что между тимусом и пронефросом происходят определенные взаимодействия, выражающиеся в образовании “клеточного моста”, сформированного мигрирующими клетками, обнаруженного у многих видов рыб (таблица). Предположение Эллиса базировалось на данных, по которым пронефрос является первой структурой, где появляются ГСК (Ellis, 1977). На основании этого был сделан вывод о том, что предшественники всех клеток крови формируются в данной области, а затем мигрируют в тимус и селезенку. Однако недавние детальные исследования ГСК *D. rerio*, проведенные *in vivo* с использованием рыб, экспрессирующих зеленый флуоресцирующий белок GFP в составе наиболее раннего маркера ГСК у рыб и млекопитающих CD41, показали, что именно зачаток тимуса, а не область пронефроса, является первой областью, куда мигрируют данные клетки. ГСК обнаруживаются в тимусе *D. rerio* уже через 56 ч после оплодотворения, сразу после формирования зачатка органа (Kissa et al., 2008). Более того, если возникновение В-лимфоцитов у *D. rerio* связано с ГСК, локализованными в эмбриональной или дефинитивной почке, то возникновение предшественников Т-лф, заполняющих тимус, оказывается напрямую никак не связанным с участками эмбрионального или дефинитивного гемопоэза и по сути дела остается неизученным (Chen, Zon, 2009).

### АМФИБИИ

Данные об эмбриональном развитии тимуса амфибий, как и о его структурных особенностях, были получены преимущественно в результате электронно-микроскопических исследований,

проведенных на таких видах как *Xenopus laevis*, *Pleurodeles waltlii*, *Rana pipie*, *Rana temporaria*. Изучение тимуса амфибий представляет значительный интерес также в виду сезонной инволюции органа в период спячки с последующим полным его восстановлением. Особенно важным в данном аспекте представляется изучение процесса возобновления лимфопоэза в тимусе и установление источника предшественников Т-лф, заселяющих орган, поскольку амфибии, как и рыбы, лишены ККМ, служащего по существующей теории местом образования мультипотентных ГСК, мигрирующих в тимус млекопитающих и дающих начало пулу Т-лф. Сопоставление процессов, происходящих в органе во время эмбриогенеза и после сезонной инволюции, может существенно прояснить механизмы обоих явлений.

В результате многочисленных исследований показана высокая степень гомологии иммунной системы амфибий (на примере *X. laevis*) и млекопитающих (Du Pasquier et al., 1989; Marr et al., 2007; Robert, 2009; Robert, Ohta, 2009). В онтогенезе *X. laevis* тимус возникает через 3 ДПО (стадия 40) в результате инвагинации дорсального эпителия II глоточного кармана. При этом у хвостатой амфибии *Pleurodeles waltlii* он развивается из материала III кармана, формируя на стадии 38 энтодермальный зачаток, который до стадии 42 остается соединенным с жаберным эпителием посредством тонкого клеточного мостика (Charlemagne, 1976). У *X. laevis* на стадии 45 орган отделяется от жаберного эпителия и занимает позицию между глазом и барабанной перепонкой. Через 6–8 дней после оплодотворения (стадия 48) тимус приобретает разделение на кортекс и медуллу, происходит васкуляризация и инкапсуляция органа, а также его интенсивное заполнение предшественниками Т-лф. Эпителиоциты характеризуются экспрессией антигенов главного комплекса гистосовместимости (ГКГ) класса II, которая на стадии 48 имеет низкие значения, но быстро возрастает в течение последующих стадий. При этом уровень экспрессии этих антигенов в медулле всегда выше, чем в кортексе, где они практически не выявляются, что указывает на преимущественное расположение антигенпрезентирующих клеток в медулле (Du Pasquier, Flajnik, 1990). Стоит отметить, что и молекулы МНС I на стадии 48 в тимусе не выявляются (Pasquier et al., 1989). Тем не менее, отсутствие молекул ГКГ I и II на кортикальных эпителиоцитах находится в существенном противоречии с существующей моделью внутритимической селекции созревающих Т-лф. Возможно, это касается только ранних этапов онтогенеза, когда формируются  $\gamma\delta$ Т-лимфоциты, не требующие селекции по ходу своего созревания.

Кортекс, в свою очередь, характеризуется устойчивой экспрессией кортикального тимо-

цит-специфического антигена *Xenopus*'а (СТХ) – фактора, с которым связывают процесс селекции Т-лимфоцитов у земноводных (Robert, Cohen, 1998). На стадии 48 выявляются также лимфоцит-специфические факторы, такие как  $\beta$ -цепь Т-клеточного рецептора (TCR), антиген CD8 и  $\epsilon$ -цепь корецептора CD3 (Robert, Ohta, 2009). Тимус личинки на стадии 58–63 достигает наибольшего размера и содержит около  $10^6$  лимфоцитов. При этом в кортесе преобладают пролиферирующие лимфоциты, взаимодействующие с отростками ретикулоцитов. В то же время в медулле преобладают эпителиальные клетки с большим числом гранул и развитой эндоплазматической сетью (ЭПС). В отличие от млекопитающих, у *X. laevis* кортикально-медуллярная граница четко выявляется благодаря наличию барьера в виде слоя уплощенных эпителиальных клеток (Nagata, 1977). Данная зона богата кровеносными сосудами, а также плазматическими клетками, синтезирующими иммуноглобулины (IgM), что указывает на участие тимуса не только в клеточном, но и гуморальном иммунном ответе у амфибий.

Вопрос об эмбриональных источниках предшественников Т-лимфоцитов поднимался неоднократно. В работах 1960–70-х годов и ранее с использованием световой и электронной микроскопии были получены свидетельства внутритимического эпителиального генеза лимфоидных клеток тимуса, как это предполагалось для рыб (Sanel, 1967; Tachibana et al., 1974). Однако в более поздних работах эти результаты были поставлены под сомнение. На данный момент установлено, что в формирующийся тимус мигрируют ГСК, которые предположительно дают начало Т-лф. При этом на эмбриональной и личиночной стадии существует три этапа заселения тимуса ГСК. У *X. laevis* они выявляются в тимусе на стадии 46 (4 дня после оплодотворения), обеспечивая начало первой волны тимопоэза, достигающей пика через 20 дней после оплодотворения и завершающейся перед метаморфозом (Hansen, Zapata, 1998). Вторая волна иммиграции и следующий этап тимопоэза начинаются через 21 день после оплодотворения и продолжается после метаморфоза с гораздо меньшей интенсивностью, поскольку до 90% клеток погибает. Последняя волна иммиграции начинается одновременно с метаморфозом и обеспечивает основной вклад в поддержание популяции Т-лф у ювенильных и взрослых особей (Turpen, Smith, 1989; Bechtold et al., 1992; Hansen, Zapata, 1998).

В настоящее время обнаружено два источника, которые могут давать начало волнам колонизации тимуса. У *Xenopus* ГСК формируются из мезодермы дорзолатеральной пластинки и вентрального кровяного островка (DLP и VBI соответственно) (Hansen, Zapata, 1998, Ciau-Uitz, 2010), откуда перемещаются в дорзальную аорту, печень

и пронефрос, формируя там функционирующие на разных стадиях участки гемопоэза. VBI также играет роль источника эмбриональных эритроцитов и других клеток миелоидного ряда (т.е. VBI амфибий – аналог желточного мешка млекопитающих), а также источника ГСК. Последнее характерно для специфического региона в пределах VBI – заднего вентрального кровяного островка (pVBI) (Ciau-Uitz et al., 2000; Ciau-Uitz, 2010).

Реальным источником клеток-предшественников, заселяющих тимус, может быть эмбриональная печень (Robert, Ohta, 2009). Несмотря на одновременное заселение тимуса клетками из двух зачатков, вклад VBI и DLP в колонизацию эмбрионального тимуса неодинаков, и большая часть предшественников связана с DLP. При этом выход в циркуляцию производных DLP наступает позднее: если производные VBI обнаруживаются в кровяном русле на эмбриональных и ранних личиночных стадиях (40–49), то клетки из DLP выявляются в крови только после стадии 49 (Kau, Turpen, 1983; Bechtold et al., 1992). Тем не менее, и DLP и VBI вносят свой вклад в дефинитивный тимопоэз (Bechtold et al., 1992). В этом заключается существенное отличие процесса формирования Т-лф у амфибий и млекопитающих, поскольку у последних предполагается происхождение Т-клеток от единого предшественника.

В ходе метаморфоза, затрагивающего и тимус, количество тимоцитов резко снижается под действием высоких концентраций глюкокортикоидных гормонов в крови. Тимус инволюирует и смещается в область барабанной перепонки, после чего масса органа вновь восстанавливается за счет третьей волны иммиграции предшественников Т-лф с их последующей пролиферацией. На основании аналогии с млекопитающими предполагается, что инволюция тимуса необходима для предотвращения аутоиммунных реакций после появления новых аутоантигенов. Поэтому в ходе метаморфоза происходит полная смена пула развивающихся тимоцитов (Pasquier et al., 1989; Robert, Ohta, 2009). В тимусе жабы *Rana pipie* в период метаморфоза появляются новые типы эпителиальных клеток тимуса, которые не отмечались на личиночной стадии. Данные клетки имеют очень длинные цитоплазматические выросты и по ультраструктуре напоминают базофильные гранулоциты (Turpen et al., 1982).

Таким образом, у амфибий можно отметить значительное усложнение отдельных стадий развития тимуса при сохранении общей схемы, сформировавшейся у рыб. Основным отличием является наличие трех волн колонизации органа клетками-предшественниками и двух источников их формирования. Данное обстоятельство приводит к постановке вопроса о функциональных различиях дифферонов, берущих начало от разных предшественников. Открытым остается

вопрос о дефинитивных источниках прогениторных Т-клеток. Не исключено, что третья волна колонизации тимуса приводит к формированию самоподдерживающейся популяции Т-лимфоцитов, функционирующей в течение взрослой жизни животного.

### МЛЕКОПИТАЮЩИЕ

Тимус млекопитающих развивается из зародышевых листков III глоточного кармана совместно с парашитовидной железой, отделение которой от общего зачатка произойдет позднее (Cordier, Naumont, 1980; Gordon, Manley, 2011). Процесс предполагает взаимодействие между тремя зародышевыми листками. Дискуссии о роли каждого из трех зачатков в развитии органа не прекращались долгое время (Anderson et al., 1996). В настоящее время известно, что строма тимуса формируется из клеток, имеющих энтодермальное происхождение (Blackburn, Manley, 2004; Gordon, Manley, 2011), а капсула и трабекулы — при участии КНГ (Nakamura, Ayer, 1986). КНГ также обеспечивают разделение общего тимического и парашитовидного зачатка на два домена.

Основные исследования были проведены на мышах, хотя имеются сведения о развитии тимуса у крыс, морских свинок, кроликов, свиней и обезьян (Good et al. 1962; Buse et al., 2006). Первые морфологические свидетельства формирования тимуса отмечены на 10.5 день эмбриогенеза мыши, хотя молекулярные маркеры общего зачатка тимуса и парашитовидной железы выявляются на 9.5 день, а его формирование завершается к 13.5 дню, когда орган полностью отделяется от зачатка парашитовидной железы и глоточной энтодермы и мигрирует в область своей дефинитивной локализации, расположенной за грудиной (Manley, 2000; Manley, Blackburn, 2003; Holländer et al., 2006). На первом этапе органогенеза (10.5 день) энтодерма III глоточного кармана контактирует с эктодермой шейного пузырька (остатка шейного синуса). Трудности морфологического различения клеток энтодермального и эктодермального генеза на ранних этапах развития привели к формированию ошибочного представления о том, что эктодерма дает начало кортикальной зоне тимуса. Это предположение было опровергнуто исследованиями Ле Дюрана (Le Douarin, 1977), в которых было показано, что энтодерма глоточного кармана достаточно для формирования стромы тимуса (Manley, 2000).

На 11.5 день эмбрионального развития происходит разделение тимического и парашитовидного домена. Определение границ обоих доменов стало возможным благодаря выявлению соответствующих молекулярных маркеров (Gcm2 для парашитовидного домена и Vmр4 и Foxp1 для клеток тимического зачатка), которые отсутствуют

на эпителии глотки, характеризующемся экспрессией Shh и не участвующий в формировании тимуса (Liu et al., 2007). Процесс отделения зачатка тимуса от глоточного эпителия на данной стадии требует участия КНГ, которые окружают формирующийся орган, запускают процесс апоптоза в клетках энтодермы, соединяющих тимус с глоткой, а также обеспечивают миграцию долей органа в область средостения. На поздних стадиях эмбриогенеза КНГ участвуют в формировании капсулы органа (Manley, 2000; Manley, Blackburn, 2003; Holländer et al., 2006; Gordon, Manley, 2011). Отсутствие сигналов от КНГ приводит к тому, что тимус остается прикрепленным к глотке (O'Keefe et al., 2002).

Тимус 12-дневного эмбриона мыши представляет собой скопление эпителиальных клеток, окруженных тонкой капсулой, в котором отсутствует разделение на дольки и не выявляются лимфоидные клетки (Auerbach, 1961). Отдельного рассмотрения заслуживает формирование стромы кортикальной и медуллярной зоны органа. Показано, что в закладке кортекса и медуллы участвуют бипотентные тимические эпителиальные клетки (бТЭК), экспрессирующие маркеры эпителиоцитов обоих компартов (Anderson et al., 2009). На 12 день идентификация бТЭК осуществляется по маркерам EpCAM1<sup>+</sup>CD40<sup>-</sup>CD205<sup>-</sup>МНСII<sup>-</sup>. При этом EpCAM1 является распространенной адгезионной молекулой, характерной для эпителиальных клеток, что затрудняет выделение бТЭК по экспрессии данного фактора. Под действием транскрипционного фактора Foxp1 и сигналов от предшественников Т-лф (их роль будет рассмотрена ниже) бТЭК дают начало популяциям предшественников кортикальных (кТЭК: EpCAM1<sup>+</sup>CD40<sup>+</sup>CD205<sup>+</sup>МНСII<sup>-</sup>) и медуллярных (мТЭК: EpCAM1<sup>+</sup>CD40<sup>+</sup>CD205<sup>-</sup>МНСII<sup>+</sup>) эпителиальных клеток, пролиферация которых приводит к формированию стромы тимуса (Shakib et al., 2009). Поскольку основную часть кТЭК составляют клетки-няньки, нельзя не обратить внимания на отсутствие на их поверхности (по меньшей мере, на ранних эмбриональных стадиях) молекул ГКГ класса II, наличие которых согласно наиболее распространенной гипотезе является важнейшим условием процесса селекции. В дефинитивном тимусе кТЭК и мТЭК различаются по профилю экспрессируемых кератинов. Если для кТЭК показано наличие кератина К8, то у мТЭК обнаруживается К5 (Anderson, Jenkinson, 2001). Недавние исследования показали наличие стадии, на которой происходит коэкспрессия маркеров кТЭК и мТЭК у общего предшественника (Baik et al., 2013).

Первые общие лимфоидные предшественники (ОЛП) появляются в тимусе к 11.5 дню эмбриогенеза, то есть до начала васкуляризации органа, которая начнется только после 14.5 дня раз-

вития (Liu, 2006, Holländer et al., 2006). Поэтому данные клетки должны либо мигрировать в тимус напрямую через окружающую мезенхиму, либо формироваться непосредственно в тимусе. Последняя версия применительно к млекопитающим высказывалась в ранних работах (Auerbach, 1961), но позже была отвергнута, хотя согласовывалась с ранними результатами изучения эмбриогенеза тимуса рыб (Mauger, 1886; Beard, 1894; Nusbaum 1901; Deanesly, 1927; Von Hagen, 1936; Grace, Manning, 1980) и амфибий (Sanel, 1967; Tachibana et al., 1974). Тем не менее, ряд новых данных последних лет заставляют вновь серьезно рассмотреть вопрос о формировании ОЛП непосредственно в тимусе и у млекопитающих (Allman et al., 2003; Kissa et al., 2008; Peaudecerf et al., 2012). Более того, сам по себе факт миграции клеток-предшественников Т-лимфоцитов в тимус оставляет множество вопросов. Остается совершенно неясным, как происходит перенос ОЛП в тимус, поскольку васкуляризация органа развивается гораздо позднее, чем начинается его заполнение клетками. Миграция стволовых клеток, лишенных признаков специализации и, следовательно, локомоторного аппарата также не выглядит правдоподобной. Следовательно, вопрос об источниках стволовых клеток и путях их проникновения в тимус (если не допустить их интратимическое возникновение) остается открытым.

Тем не менее, считается, что иммиграция предшественников лимфоцитов контролируется набором хемокинов, основными из которых являются CXCL12, CCL25 и CCL21 (Liu, 2005; Wugbel, 2006). При этом исследования на мышах, дефектных по генам рецепторов данных хемокинов, показали, что миграция ОЛП осуществляется и при отсутствии сигналов от них, однако число проникающих в тимус предшественников существенно снижается. Данное обстоятельство указывает на необходимость проведения дополнительных исследований, посвященных изучению механизмов миграции ОЛП и их проникновения в тимусе (Holländer et al., 2006).

Источником ОЛП на ранних стадиях считается эмбриональная печень, хотя и в этом случае поставленные выше вопросы остаются открытыми. На 11.5 день развития гемопоэз осуществляется также в желточном мешке, области аорта-гонада-мезонефрос и плаценте, хотя данные участки не могут участвовать в дефинитивном гемопоэзе (Orkin, Zon, 2008). Заполнение тимуса ОЛП осуществляется в два этапа, напоминая волны заполнения тимуса у амфибий. Первые предшественники возникают в тимусе в небольшом количестве, они не способны к активной пролиферации и, как предполагается, полностью замещаются во время второй волны иммиграции большего количества клеток на более поздних

стадиях (Owen, Ritter, 1969; Ritter, 1978; Gordon, Manley, 2011). Между двумя этапами заселения присутствует рефрактерный период, совпадающий по срокам с периодом миграции долей тимуса в область средостения. Учитывая, что первый этап колонизации не вносит вклада в формирование пула дефинитивных Т-лф, логичной представляется постановка вопроса о его биологическом смысле. В последнее время появилось большое количество исследований, посвященных вопросам взаимодействия эпителиоцитов фетального тимуса и предшественников Т-лф, заселяющих развивающийся орган. На линиях мышей, у которых нарушено развитие лимфоцитов, показано, что формирование тимуса и дифференцировка ТЭК протекает нормально вплоть до 13.5 дня, то есть до начала второй волны колонизации (Klug et al., 2002). Это указывает на важную роль лимфоцитов в формировании тимуса, но при этом оставляет открытым вопрос о функциональном значении клеток, проникающих в орган во время первой волны колонизации. Не исключено, что первый этап является рудиментом, сохранившимся в эмбриогенезе млекопитающих от предковых форм, например, амфибий, у которых наличие нескольких волн колонизации тимуса объяснялось особенностями эмбрионального развития.

Проникающие в тимус ОЛП взаимодействуют с мезенхимными клетками и эпителиоцитами через цитокиновые сигналы. Под воздействием Т-лф, прошедших этап позитивной селекции, происходит формирование мТЭК из общего для всех ТЭК предшественника. Со стороны Т-лф в процессе участвуют цитокины суперсемейства фактора некроза опухоли (RANKL, CD40L, LT), в то время как ТЭК продуцируют лиганды для CCR7, обеспечивая миграцию Т-лф в медуллу. Такие взаимодействия характерны не только для фетального тимуса, но сохраняются и во взрослом состоянии (Nitta et al., 2011).

ТЭК также дифференцируются под действием сигналов созревающих Т-лф. На ранних стадиях дифференцировки, в процессе смены фенотипа с CD44<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> на CD44<sup>-</sup>CD25<sup>+</sup> лимфоциты продуцируют сигнальные факторы, влияющие на морфогенез кортикальной зоны, в том числе обеспечивающие формирование клеток-нянек, которые в дальнейшем будут принимать непосредственное участие в созревании и дифференцировке Т-лф (van Ewijk et al., 2000). Тем не менее, основной целью взаимодействий в кортикальной зоне является создание особой архитектуры тимической стромы. Только в период эмбриогенеза предшественники Т-лф обеспечивают ориентацию кТЭК перпендикулярно капсуле органа, что облегчает миграцию Т-лф между кортексом и медуллой (van Ewijk et al., 1999; Anderson, Jenkinson, 2001).

Важной особенностью тимуса является его функционирование в качестве полноценного гемопоэтического органа на эмбриональной стадии развития млекопитающих. Среди органов, вносящих вклад в дефинитивный гемопоэз, тимус приобретает эту функцию одним из первых, практически сразу после начала формирования ГСК в эмбриональной печени (10 день эмбриогенеза мыши) и задолго до формирования ККМ и перемещения туда гемопоэтических предшественников (20 день эмбриогенеза мыши) (Orkin, Zon, 2008). В тимусе на ранних стадиях развития обнаруживаются незрелые В-клетки, эритроциты (Albert et al., 1965, 1966) и созревающие гранулоциты, а также незрелые тучные клетки. Орган сохраняет кроветворную функцию после того, как ее утрачивает печень и на протяжении оставшегося периода эмбриогенеза. Тимус, наряду с ККМ, обеспечивает формирование клеток как лимфоидного, так и миелоидного рядов. Похоже, эта функция выполняется также и в постнатальный период (Kendall, 1995). Указанные обстоятельства приводят к постановке вопроса об истинной роли тимуса в процессе кроветворения, поскольку экспериментальные свидетельства указывают на недооценку данной функции. Вероятно, нового анализа заслуживают классические представления о взаимодействии тимуса и ККМ. Эмбриональные ГСК появляются в тимусе гораздо раньше, чем в ККМ, и обладают высокой способностью к самоподдержанию. Исследования тимуса взрослых животных показали сохранение способности к лимфопоэзу, не требующего участия костномозговых иммигрантов (Allman et al., 2003; Boehm, 2012; Peaudecerf et al., 2012).

Обращает на себя внимание также чрезвычайно высокая потентность тимических клеток. Помимо способности к продуцированию всех элементов лимфоидного и миелоидного ряда, показано формирование тучных клеток из лимфоидных предшественников при усилении экспрессии гена *gata-3* (Taghon et al., 2007). Учитывая, что источник данной популяции до сих пор не идентифицирован, но тучные клетки выявляются в эмбриональном и постнатальном тимусе, это обстоятельство представляется чрезвычайно важным (Юшков и др., 2011; Гусельникова и др., 2012; Гусельникова, Полевщиков, 2013).

В литературе содержится множество данных о колонизации тимуса костномозговыми предшественниками (Liu, 2006; Holländer et al., 2006; Gordon, Manley, 2011). В ККМ выявляются разные субпопуляции мультипотентных ГСК, способных при переносе в тимус давать Т-лф CD4<sup>+</sup> и CD8<sup>+</sup> фенотипа. Вопрос о том, какая именно костномозговая популяция потенциальных Т-клеточных предшественников проникает в тимус и дает начало зрелым лимфоцитам не решен окончательно. Эту роль приписывают подгруппе

ОЛП-2, имеющую фенотип CD117<sup>-/low</sup> B220<sup>+</sup> (Martin et al., 2003) и способную давать начало как В-, так и Т-лимфоцитам. При этом идентификация ОЛП по двум указанным антигенам не является безукоризненной, поскольку маркер CD117 вообще не характерен для циркулирующих стволовых клеток и появляется только в тимусе или ККМ, а B220 является маркером В-лимфоцитов. Поэтому вопрос о характере стволовых клеток, проникающих в тимус, реально остается открытым.

В других работах описана популяция предшественников, коммитированных к дифференцировке по лимфоидному пути (ПКЛП). Она характеризуется экспрессией генов Rag и IL7 $\alpha$ , характерных для лимфоцитов (Igarashi et al., 2002; Adolffson et al., 2005). Популяции ПКЛП и ОЛП-2 способны формировать зрелые Т-лф при переносе в тимус, тогда как их предшественники (ГСК), обнаруживающиеся в ККМ и предположительно дающие начало лимфоидному и миелоидному рядам, при внесении в тимус оказываются неспособными к дифференцировке в Т-лф (Schwarz, Bhandoola, 2006). Возможно, функцию костномозговых предшественников тимоцитов выполняют как ПКЛП, так и ОЛП, имеющие рецепторный аппарат для миграции в тимус (Kueger et al., 2010; Zlotoff et al., 2010). Однако смена поверхностных рецепторов при переходе от ОЛП к внутри тимическому раннему лимфоидному предшественнику (РЛП) вновь заставляет вернуться к вопросу о родстве ОЛП и Т-лимфоцитов (Allman et al., 2003). Все это указывает на нерешенность вопроса о клетках-предшественниках Т-лф. Более того, учитывая факт гемопоэза в эмбриональном, а частично и дефинитивном тимусе, возникает вопрос о связи эмбрионального гемопоэза с миграцией ГСК из эмбриональной печени, принимая во внимание их неспособность формировать в тимусе Т-лф? Другой вопрос состоит в том, не является ли гемопоэз в тимусе результатом дифференцировки стволовых клеток тимического происхождения? В этом случае совершенно другое объяснение получает феномен акцидентальной трансформации (стресс-индуцированной атрофии) тимуса, когда через 6 ч после подъема концентрации глюкокортикоидов незрелые клетки тимического происхождения обнаруживаются в ККМ (Зимин, Хаитов, 1975). Придание тимусу функций еще одного источника ГСК не противоречит существующим представлениям о гемопоэзе, но подчеркивает тесную связь всех источников ГСК (стенка желточного мешка, эмбриональная печень, тимус) с энтодермой.

Таким образом, сложные взаимоотношения между тимусом и ККМ, миграция предшественников из которого не является ни достаточным, ни необходимым условием для протекания тимического лимфопоэза, до сих пор остаются слабо изученными, и дальнейшие исследования в данной об-

ласти могут серьезно изменить существующие представления о гемопоэтической роли тимуса.

### КОНТРОЛЬ ЭМБРИОНАЛЬНОГО РАЗВИТИЯ ТИМУСА

Успешное формирование зачатка органа, а также его разделение на тимический и парашитовидный домен, миграция, заселение предшественниками лимфоцитов и другие важные процессы обеспечиваются скоординированным действием различных факторов, многие из которых чрезвычайно консервативны и присутствуют даже у тех организмов, которые не обладают оформленным тимусом, но имеют скопления лимфоидной ткани, ассоциированной со слизистыми оболочками (ланцетник, миноги). К числу факторов, имеющих ключевое значение для эмбрионального развития тимуса, относятся *Foxn1*, *BMP4*, *Wnt*, *Ноха3*, *Rax1*, *Rax9*, *Tbx1*.

*Foxn1* — эволюционно-консервативный фактор, гомологи которого обнаруживаются у ланцетника и круглоротых, у которых экспрессия генов связана с глоточным эпителием (Bajoghli et al., 2009). У рыб экспрессия данного гена осуществляется в эпителии энтодермального происхождения, выстилающем третью жаберную дугу (Boehm et al., 2003). Амфибии, в отличие от рыб и млекопитающих, характеризуются более поздним началом экспрессии данного гена (Lee et al., 2013). У млекопитающих экспрессия *foxn1* ассоциирована исключительно с тимическим эпителием и начинается на ранних стадиях развития. Мутации по данному гену приводят к формированию nude-фенотипа, выражающегося в отсутствии тимуса (Boehm et al., 2003). Функции *Foxn1* связывают с обеспечением формирования тимической стромы и взаимодействий между ТЭК и гемопоэтическими предшественниками (Boehm et al., 2003; Bowden et al., 2005; Ma et al., 2013).

Фактор *BMP* принадлежит к семейству фактора роста опухолей (*TGF-β*) и принимает участие в определении структуры тимуса и парашитовидной железы (Hauri-Hohl et al., 2008; Jeker et al., 2008; Gordon et al., 2010). У *D. rerio* подавление *BMP4*-опосредованных сигнальных путей блокирует экспрессию *foxn1*, что говорит о древней связи данных факторов и важной роли в формировании тимической стромы (Soza-Ried et al., 2008).

В семейство *Wnt* объединяются консервативные факторы, найденные как у рыб, так и у млекопитающих (Balciunaite et al., 2002). Гены *Wnt*-семейства кодируют небольшие секреторные белки, участвующие в контроле пролиферации мультипотентных предшественников и асимметрии их делений. Экспрессия данных генов ассоциирована с II, III и IV глоточными карманами. При этом в эпителии III глоточного кармана происходит ко-экспрессия *wnt* и *foxn1*. Функция *Wnt*

заключается в формировании тимической стромы и усилении экспрессии *foxn1* посредством передачи сигнала через путь, опосредованный фосфатидилинозитол-3-киназой (*PI3K*) (Balciunaite et al., 2002).

Фактор *Ноха3* экспрессируется в энтодерме III кармана и в окружающих зачаток тимуса КНГ. Мутации по гену приводят к нарушению формирования всех производных глоточного эпителия. Факторы *Ноха3*, *Rax1* и *Rax9* совместно влияют на рост и дифференцировку эпителиальных клеток (Manley, Capocchi, 1995; Manley, 2000; Bowden et al., 2005; Boehm et al., 2003; Ma et al., 2013). Предполагается, что сигналы от КНГ через *Ноха3* и *Rax1* обеспечивают позиционирование тимического зачатка, а также его отделение от глоточного эпителия (Boehm et al., 2003; Gordon, Manley, 2011).

Гены *Rax*-семейства широко экспрессируются в глоточных карманах, при этом мутанты по *rax1* характеризуются гипоплазией тимуса и практически полным отсутствием тимоцитов, тогда как при мутации по *rax9* происходит полная блокировка развития тимуса и парашитовидной железы (Trede et al., 2001; Ma et al., 2013). Наконец, *Tbx1* является одним из наиболее ранних транскрипционных факторов, связанных с формированием тимуса и парашитовидной железы. Мутации по *tbx1* блокируют формирование данных органов (Ma et al., 2013).

Таким образом, анализ литературы показывает, что основные гены-регуляторы тимического эмбриогенеза, без которых невозможны ранние этапы формирования стромы и заселение органа лимфоцитами, по-видимому, идентичны у всех челюстноротых. Данный факт еще раз подтверждает формирование общей схемы развития тимуса на ранних этапах эволюции позвоночных животных, что значительно повышает важность работ, выполненных на таких модельных объектах, как рыбы и амфибии, поскольку позволяет экстраполировать некоторые результаты на высших позвоночных.

### ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Обобщая приведенный выше анализ, можно указать, что общая схема эмбрионального развития тимуса формируется на ранних этапах филогенеза позвоночных животных, поэтому у рыб, амфибий и млекопитающих обнаруживается как несомненное гистологическое сходство органа, так и основные механизмы его формирования, включая набор регуляторных генов. У позвоночных животных эмбриональным источником формирования стромы тимуса и значительной части его клеток является энтодерма глоточных карманов. Клетки нервного гребня вносят существенный вклад в формирование капсулы, трабекул,

сосудов, а также перемещение зачатка тимуса. Клетки кортикального и медуллярного эпителия имеют общего предшественника энтодермально-го происхождения.

Однако ключевой вопрос эмбриогенеза тимуса об источнике происхождения предшественников Т-лимфоцитов остается нерешенным. Наиболее распространенная гипотеза формирования клеток-предшественников в ККМ, либо эмбриональной печени содержит ряд внутренних противоречий. К их числу относится отсутствие ККМ у низших позвоночных, что на фоне сходной системы генетической регуляции формирования тимуса тем не менее не препятствует его заполнению Т-лф. Весьма уязвимым является тезис о миграции клеток-предшественников в тимус из эмбриональной печени, поскольку заполнение тимуса Т-лф завершается до начала его васкуляризации, а потенциальные предшественники лишены локомоторного аппарата, необходимого для миграции. У рыб, амфибий и млекопитающих эмбриональный тимус является органом не только тимо-, но, по-видимому, и гемопоэза, который начинается до формирования сети сосудов в органе.

В этой связи новое обоснование получает гипотеза о возможности формирования Т-лф в тимусе за счет неких автономных, независимых от ККМ предшественников, которая дает вторую жизнь представлениям о субкапсулярном тимическом эпителии как предшественнике клеток тимуса. Она позволяет по-новому взглянуть на сравнительно-гистологические свидетельства формирования Т-лф из тимических производных глоточных карманов, полученные независимо для рыб, амфибий и млекопитающих. Более того, предположение о наличии внутритимических стволовых клеток объясняет феномен формирования в нем тучных клеток, роль эмбрионального тимуса как органа гемопоэза, а также придает биологический смысл феномену акцидентальной трансформации. Так или иначе, вопрос происхождения клеток-предшественников в тимусе еще далек от разрешения, однако результаты исследований последних лет наводят на мысль о необходимости новых подходов к анализу этого процесса.

Работа выполнена при финансовой поддержке грантов Дальневосточного федерального университета (программа № 1326 и проект № 14-08-06-25\_и и гранта РФФИ № 15-04-05093).

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Гусельникова В.В., Полевщиков А.В. Изменения популяции тучных клеток тимуса после акцидентальной трансформации // Цитокины и воспаление. 2013. Т. 12. № 1–2. С. 125–131.
- Гусельникова В.В., Сеницина В.Ф., Королькова Е.Д. и др. Локализация тучных клеток в тимусе мыши на разных этапах онтогенеза // Морфология. 2012. Т. 141. № 2. С. 40–45.
- Зимин Ю.И., Хаитов Р.М. Миграция Т-лимфоцитов в костный мозг в начальный период стресс-реакции // Бюлл. эксп. биол. мед. 1975. № 12. С. 68–70.
- Юшков Б.Г., Черешнев В.А., Климин В.Г. и др. Тучные клетки. Физиология и патофизиология. М.: Медицина, 2011. 240 с.
- Adolfsson J., Månsson R., Buza-Vidas N. et al. Identification of Flt3+ lympho-myeloid stem cells lacking erythro-megakaryocytic potential: a revised road map for adult blood lineage commitment // Cell. 2005. V. 121. № 2. P. 295–306.
- Albert S., Wolf P.L., Pryjma I. et al. Erythropoiesis in the human thymus // Am. J. Clin. Pathol. 1966. V. 45. № 4. P. 460–464.
- Albert S., Wolf P.L., Pryjma I. et al. Variations in morphology of erythroblasts of normal mouse thymus // J. Reticuloend. Soc. 1965. V. 2. № 2. P. 158–171.
- Allman D., Sambandam A., Kim S. et al. Thymopoiesis independent of common lymphoid progenitors // Nat. Immunol. 2003. V. 4. № 2. P. 168–174.
- Anderson G., Jenkinson E.J. Lymphostromal interactions in thymic development and function // Nat. Rev. Immunol. 2001. V. 1. № 1. P. 31–40.
- Anderson G., Jenkinson E.J., Rodewald H.R. A roadmap for thymic epithelial cell development // Eur. J. Immunol. 2009. V. 39. № 7. P. 1694–1699.
- Anderson G., Moore N.C., Owen J.J. et al. Cellular interactions in thymocyte development // Ann. Rev. Immunol. 1996. V. 14. № 1. P. 73–99.
- Auerbach R. Experimental analysis of the origin of cell types in the development of the mouse thymus // Dev. Biol. 1961. V. 3. № 3. P. 336–354.
- Baik S., Jenkinson E.J., Lane P.J. et al. Generation of both cortical and Aire+ medullary thymic epithelial compartments from CD205+ progenitors // Eur. J. Immunol. 2013. V. 43. № 3. P. 589–594.
- Bajoghli B., Aghaallaei N., Hess I. et al. Evolution of genetic networks underlying the emergence of thymopoiesis in vertebrates // Cell. 2009. V. 138. № 1. P. 186–197.
- Balciunaite G., Keller M.P., Balciunaite E. et al. Wnt glycoproteins regulate the expression of FoxN1, the gene defective in nude mice // Nat. Immunol. 2002. V. 3. № 11. P. 1102–1108.
- Beard J. The origin and histogenesis of the thymus in *Rajabatis* // Zool. Jahrb. 1902. V. 26. P. 403–480.
- Bechtold T.E., Smith P.B., Turpen J.B. Differential stem cell contributions to thymocyte succession during development of *Xenopus laevis* // J. Immunol. 1992. V. 148. № 10. P. 2975–2982.
- Blackburn C.C., Manley N.R. Developing a new paradigm for thymus organogenesis // Nat. Rev. Immunol. 2004. V. 4. № 4. P. 278–289.
- Boehm T. Self-renewal of thymocytes in the absence of competitive precursor replenishment // J. Exp. Med. 2012. V. 209. P. 1397–1400.

- Boehm T., Bleul C.C., Schorpp M.* Genetic dissection of thymus development in mouse and zebrafish // *Immunol. Rev.* 2003. V. 195. № 1. P. 15–27.
- Botham J.W., Manning M. J.* The histogenesis of the lymphoid organs in the carp *Cyprinus carpio* L. and the ontogenetic development of allograft reactivity // *J. Fish Biol.* 1981. V. 19. № 4. P. 403–414.
- Bowden T.J., Cook P., Rombout J.* Development and function of the thymus in teleosts // *Fish Shellfish Immunol.* 2005. V. 19. № 5. P. 413–427.
- Buse E., Habermann G., Vogel F.* Thymus development in *Macaca fascicularis* (Cynomolgus monkey): an approach for toxicology and embryology // *J. Molec. Histol.* 2006. V. 37. № 3–4. P. 161–170.
- Chantanachookhin C., Seikai T., Tanaka M.* Comparative study of the ontogeny of the lymphoid organs in three species of marine fish // *Aquaculture.* 1991. V. 99. № 1. P. 143–155.
- Charlemagne J.* Thymus development in amphibians: colonization by thymic endodermal rudiments by lymphoid stem-cells of mesenchymal origin in the urodele *Pleurodeles waltlii* Michah // *Annales d'immunologie.* 1976. V. 128. № 4–5. P. 897–904.
- Chen A.T., Zon L.I.* Zebrafish blood stem cells // *J. Cell. Biochem.* 2009. V. 108. № 1. P. 35–42.
- Ciau-Uitz A., Liu F., Patient R.* Genetic control of hematopoietic development in *Xenopus* and zebrafish // *Int. J. Dev. Biol.* 2010. V. 54. № 6. P. 1139.
- Ciau-Uitz A., Walmsley M., Patient R.* Distinct origins of adult and embryonic blood in *Xenopus* // *Cell.* 2000. V. 102. № 6. P. 787–796.
- Cordier A.C., Haumont S.M.* Development of thymus, parathyroids, and ultimo-branchial bodies in NMRI and nude mice // *Am. J. Anat.* 1980. V. 157. № 3. P. 227–263.
- Deanesly R.* The structure and development of the thymus in fish, with special reference to *Salmo fario* // *Quart. J. Micro. Sci.* 1927. V. 71. P. 113–145.
- Du Pasquier L., Flajnik M.F.* Expression of MHC class II antigens during *Xenopus* development // *J. Immunol. Res.* 1990. V. 1. № 2. P. 85–95.
- Ellis A.E.* Ontogeny of the immune response in *Salmo salar*. Histogenesis of the lymphoid organs and appearance of membrane immunoglobulin and mixed leucocyte reactivity // in *Developmental Immunobiology* / Eds. Solomon J.B., Horton J.D. Elsevier, 1977. P. 225–331.
- Good R.A., Dalmaso A.P., Martinez C. et al.* The role of the thymus in development of immunologic capacity in rabbits and mice // *J. Exp. Med.* 1962. V. 116. № 5. P. 773–796.
- Gordon J., Manley N.R.* Mechanisms of thymus organogenesis and morphogenesis // *Development.* 2011. V. 138. № 18. P. 3865–3878.
- Gordon J., Patel S.R., Mishina Y. et al.* Evidence for an early role for BMP4 signaling in thymus and parathyroid morphogenesis // *Dev. Biol.* 2010. V. 339. № 1. P. 141–154.
- Grace M.F., Manning M.J.* Histogenesis of the lymphoid organs in rainbow trout, *Salmo gairdneri* Rich. 1836 // *Dev. Comp. Immunol.* 1980. V. 4. P. 255–264.
- Hansen J.D., Zapata A.G.* Lymphocyte development in fish and amphibians // *Immunol. Rev.* 1998. V. 166. № 1. P. 199–220.
- Hauri-Hohl M.M., Zuklys S., Keller M.P. et al.* TGF- $\beta$  signaling in thymic epithelial cells regulates thymic involution and postirradiation reconstitution // *Blood.* 2008. V. 112. № 3. P. 626–634.
- Holländer G. et al.* Cellular and molecular events during early thymus development // *Immunol. Rev.* 2006. V. 209. № 1. P. 28–46.
- Igarashi H., Gregory S.C., Yokota T. et al.* Transcription from the RAG1 locus marks the earliest lymphocyte progenitors in bone marrow // *Immunity.* 2002. V. 17. № 2. P. 117–130.
- Jeker L.T., Barthlott T., Keller M.P. et al.* Maintenance of a normal thymic microenvironment and T-cell homeostasis require Smad4-mediated signaling in thymic epithelial cells // *Blood.* 2008. V. 112. № 9. P. 3688–3695.
- Jósefsson S., Tatner M. F.* Histogenesis of the lymphoid organs in sea bream *Sparus aurata* L. // *Fish Shellfish Immunol.* 1993. V. 3. № 1. P. 35–49.
- Kau C.L., Turpen J.B.* Dual contribution of embryonic ventral blood island and dorsal lateral plate mesoderm during ontogeny of hemopoietic cells in *Xenopus laevis* // *J. Immunol.* 1983. V. 131. № 5. P. 2262–2266.
- Kendall M.D.* Hemopoiesis in the thymus // *J. Immunol. Res.* 1995. V. 4. № 3. P. 157–168.
- Klug D.B., Carter C., Gimenez-Conti I.B. et al.* Cutting edge: thymocyte-independent and thymocyte-dependent phases of epithelial patterning in the fetal thymus // *J. Immunol.* 2002. V. 169. P. 2842–2845.
- Kissa K., Murayama E., Zapata A. et al.* Live imaging of emerging hematopoietic stem cells and early thymus colonization // *Blood.* 2008. V. 111. № 3. P. 1147–1156.
- Le Douarin N.* Thymus ontogeny studied in interspecific chimeras // in *Development of Host Defenses* / Eds. Cooper M., Dayton D. NY. Raven Press, 1977. P. 107–114.
- Lee Y.H., Williams A., Hong C.S. et al.* Early development of the thymus in *Xenopus laevis* // *Dev. Dyn.* 2013. V. 242. № 2. P. 164–178.
- Liu C.* Coordination between CCR7- and CCR9-mediated chemokine signals in prevascular fetal thymus colonization // *Blood.* 2006. V. 108. P. 2531–2539.
- Liu C., Ueno T., Kuse S. et al.* The role of CCL21 in recruitment of T-precursor cells to fetal thymi // *Blood.* 2005. V. 105. № 1. P. 31–39.
- Liu Y., Zhang S., Jiang G. et al.* The development of the lymphoid organs of flounder, *Paralichthys olivaceus*, from hatching to 13 months // *Fish Shellfish Immunol.* 2004. V. 16. № 5. P. 621–632.
- Liu Z., Yu S., Manley N.R.* Gcm2 is required for the differentiation and survival of parathyroid precursor cells in the parathyroid/thymus primordia // *Dev. Biol.* 2007. V. 305. № 1. P. 333–346.

- Ma D., Wei Y., Liu F.* Regulatory mechanisms of thymus and T cell development // *Dev. Comp. Immunol.* 2013. V. 39. № 1. P. 91–102.
- Maéno M., Todate A., Katagiri C.* The localization of precursor cells for larval and adult hemopoietic cells of *Xenopus laevis* in two regions of embryos // *Dev. Gr. Diff.* 1985. V. 27. № 2. P. 137–148.
- Manley N.R.* Thymus organogenesis and molecular mechanisms of thymic epithelial cell differentiation // *Sem. Immunol.* 2000. V. 12. № 5. P. 421–428.
- Manley N.R., Blackburn C.C.* A developmental look at thymus organogenesis: where do the non-hematopoietic cells in the thymus come from? // *Curr. Op. Immunol.* 2003. V. 15. № 2. P. 225–232.
- Manley N.R., Capecci M.R.* The role of Hoxa-3 in mouse thymus and thyroid development // *Development.* 1995. V. 121. № 7. P. 1989–2003.
- Marr S., Morales H., Bottaro A. et al.* Localization and differential expression of activation-induced cytidine deaminase in the amphibian *Xenopus* upon antigen stimulation and during early development // *J. Immunol.* 2007. V. 179. № 10. P. 6783–6789.
- Martin C.H., Aifantis I., Scimone M.L. et al.* Efficient thymic immigration of B220+ lymphoid-restricted bone marrow cells with T precursor potential // *Nat. Immunol.* 2003. V. 4. № 9. P. 866–873.
- Maurer F.* Schilddrüse und Thymus der Teleostier // *Morph. Jahrb.* 1886. Bd. 11. S. 129–175.
- Nagata S.* Electron microscopic study on the early histogenesis of thymus in the toad, *Xenopus laevis* // *Cell. Tiss. Res.* 1977. V. 179. № 1. P. 87–96.
- Nakamura H., Ayer L.L.* Neural crest and thymic myoid cells // *Curr. Top. Dev. Biol.* 1986. V. 20. P. 111–115.
- Nitta T., Ohigashi I., Nakagawa Y. et al.* Cytokine crosstalk for thymic medulla formation // *Curr. Op. Immunol.* 2011. V. 23. № 2. P. 190–197.
- Nusbaum J., Prymak T.* Zur Entwicklungsgeschichte der lymphoiden Elemente der Thymus bei dem Knochenfischen // *Anat. Anz.* 1901. Bd. 19. S. 6–19.
- O'Keefe M., Hochrein H., Vremec D.* Mouse plasmacytoid cells: long-lived cells, heterogeneous in surface phenotype and function, that differentiate into CD8+ dendritic cells only after microbial stimulus // *J. Exp. Med.* 2002. V. 196. P. 1307–1319.
- Orkin S.H., Zon L.I.* Hematopoiesis: an evolving paradigm for stem cell biology // *Cell.* 2008. V. 132. № 4. P. 631–644.
- Owen J.J.T., Ritter M.A.* Tissue interaction in the development of thymus lymphocytes // *J. Exp. Med.* 1969. V. 129. № 2. P. 431–442.
- Pasquier L.D., Schwager J., Flajnik M.F.* The immune system of *Xenopus* // *Ann. Rev. Immunol.* 1989. V. 7. № 1. P. 251–275.
- Peaudecerf L., Lemos S., Galgano A.* Thymocytes may persist and differentiate without any input from bone marrow progenitors // *J. Exp. Med.* 2012. V. 209. P. 1401–1408.
- Ritter M.A.* Embryonic mouse thymus development: stem cell entry and differentiation // *Immunol.* 1978. V. 34. № 1. P. 69.
- Robert J., Cohen N.* Ontogeny of CTX expression in *Xenopus* // *Dev. Comp. Immunol.* 1998. V. 22. № 5. P. 605–612.
- Robert J., Ohta Y.* Comparative and developmental study of the immune system in *Xenopus* // *Dev. Dyn.* 2009. V. 238. № 6. P. 1249–1270.
- Romano N., Fanelli M. et al.* Histological and cytological studies on the developing thymus of sharpnose seabream, *Diplodus puntazzo* // *J. Anat.* 1999. V. 194. № 1. P. 39–50.
- Sanel F.T.* Ultrastructure of differentiating cells during thymus histogenesis // *Zeitschrift Zellforsch. Mik. Anat.* 1967. V. 83. № 1. P. 8–29.
- Schwarz B.A., Bhandoola A.* Trafficking from the bone marrow to the thymus: a prerequisite for thymopoiesis // *Immunol. Rev.* 2006. V. 209. № 1. P. 47–57.
- Shakib S., Desanti G.E., Jenkinson W.E. et al.* Checkpoints in the development of thymic cortical epithelial cells // *J. Immunol.* 2009. V. 182. № 1. P. 130–137.
- Soza-Ried C., Bleul C.C., Schorpp M. et al.* Maintenance of thymic epithelial phenotype requires extrinsic signals in mouse and zebrafish // *J. Immunol.* 2008. V. 181. № 8. P. 5272–5277.
- Taghon T., Yui M.A., Rothenberg E.V.* Mast cell lineage diversion of T lineage precursors by the essential T cell transcription factor GATA-3 // *Nat. Immunol.* 2007. V. 8. № 8. P. 845–855.
- Trede N.S., Zapata A., Zon L.I.* Fishing for lymphoid genes // *Trends Immunol.* 2001. V. 22. № 6. P. 302–307.
- Turpen J.B., Knudson C.M.* Ontogeny of hematopoietic cells in *Rana pipiens*: Precursor cell migration during embryogenesis // *Dev. Biol.* 1982. V. 89. № 1. P. 138–151.
- Turpen J.B., Smith P.B.* Precursor immigration and thymocyte succession during larval development and metamorphosis in *Xenopus* // *J. Immunol.* 1989. V. 142. № 1. P. 41–47.
- Van Ewijk W., Hollander G., Terhorst C. et al.* Stepwise development of thymic microenvironments *in vivo* is regulated by thymocyte subsets // *Development.* 2000. V. 127. № 8. P. 1583–1591.
- Van Ewijk W., Wang B., Hollander G. et al.* Thymic microenvironments, 3-D versus 2-D? // *Sem. Immunol.* 1999. V. 11. № 1. P. 57–64.
- Von Hagen F.* Die wichtigsten Endokrinen organem des Flussaals // *Zool. Jahrb.* 1936. Bd. 61. S. 467–538.
- Wurzel M.A., Malissen B., Campbell J.J.* Complex regulation of CCR9 at multiple discrete stages of T cell development // *Eur. J. Immunol.* 2006. V. 36. № 1. P. 73–81.
- Xie H.X., Nie P., Zhang Y.A. et al.* Histological and cytological studies on the developing thymus of mandarin fish *Siniperca chuatsi* (Perciformes: Teleostei) // *J. App. Ichth.* 2006. V. 22. № 2. P. 125–131.
- Zlotoff D.A., Sambandam A., Logan T.D. et al.* CCR7 and CCR9 together recruit hematopoietic progenitors to the adult thymus // *Blood.* 2010. V. 115. № 10. P. 1897–1905.

**Thymus Development in Early Ontogeny: A Comparative Aspect****K. A. Vasil'ev<sup>a, b</sup> and A. V. Polevshchikov<sup>a, b, c</sup>**<sup>a</sup> *Research Institute of Experimental Medicine, Northwestern Academy of Medical Sciences,  
ul. Pavlova 12, St. Petersburg, 197376 Russia*<sup>b</sup> *St. Petersburg State University, Universitetskaya nab. 7–9, St. Petersburg, 199034 Russia*<sup>c</sup> *Far Eastern Federal University, ul. Sukhanova 8, Vladivostok, 690950 Russia**e-mail: ALEXPOL512@yandex.ru*

Received August 14, 2014; in final form, December 30, 2014

This review is dedicated to comparative analysis of the early stages of thymus ontogeny in fish, amphibians, and mammals. Morphological and molecular-genetic aspects of the formation of thymic stroma, colonization of this organ with T-cell progenitors, and interaction of different cell populations in the course of organogenesis are considered. Particular attention is given to the hematopoietic role of the thymus during embryogenesis and new data on the origin of T-cell progenitors. The hypothesis about the possible presence in the organ of a self-sustaining population of stem cells, formed regardless of fetal hematopoiesis areas, is discussed.

*Keywords:* embryogenesis, thymus, hematopoietic stem cells, fish, amphibians, mammals