

© БОБРЫШЕВА И.В., 2014

## МОРФОФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ ОСОБЕННОСТИ ТИМУСА КРЫС РАЗЛИЧНЫХ ВОЗРАСТНЫХ ПЕРИОДОВ ПОСЛЕ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ ИММУНОСУПРЕССИИ

БОБРЫШЕВА И.В.

ГЗ «Луганский государственный медицинский университет», Украина

---

### Резюме.

Цель работы - изучить морфофункциональные особенности тимуса белых беспородных крыс-самцов различных возрастных периодов в условиях экспериментальной иммуносупрессии.

Материалом для исследования послужили 180 животных трех возрастных периодов: полового созревания, репродуктивного периода и периода выраженных старческих изменений. Подопытным животным однократно внутримышечно вводили циклофосфамид в дозе, приводящей к иммунной депрессии (200 мг/кг массы тела животного). Контролем служили крысы, получавшие 0,9% раствор натрия хлорида в эквивалентном объеме. Животных выводили из эксперимента путем декапитации под эфирным наркозом через 1, 7, 15, 30 и 60 суток после введения препарата. Содержание и манипуляции над животными проводили с соблюдением норм национального и международного законодательства, с учетом принципов биоэтики, изложенных в Хельсинской декларации. Особенности гистологического строения тимуса изучали с помощью анализатора изображений на базе микроскопа Olympus CX-41. Определяли площади субкапсулярной зоны, глубокой коры и мозгового вещества долек; общее количество клеток, лимфоцитов и ретикулярных эпителиоцитов на условной стандартной площади ( $10^4$  мкм<sup>2</sup>) морфофункциональных зон; вычисляли лимфоэпителиальное отношение.

Результаты свидетельствуют о том, что для тимуса крыс характерна высокая степень реактивности в ответ на введение циклофосфамида в высокой дозировке. Введение подопытным животным иммуносупрессора приводит к акцидентальной инволюции тимуса, выражающейся в значительных изменениях морфометрических показателей и цитоархитектоники органа в течение 30 суток. Максимальные изменения изучаемых параметров наблюдаются через 1 сутки после введения препарата. Для крыс репродуктивного периода и периода выраженных старческих изменений характерно сочетание возрастной (замещение паренхимы органа жировой тканью, увеличение содержания соединительнотканых структур) и акцидентальной инволюции органа, проявляющейся делимфатизацией морфофункциональных зон тимической паренхимы.

*Ключевые слова:* тимус, крысы, циклофосфамид.

### Abstract.

Objectives. To study morphofunctional features of the thymus of white mongrel male rats of different age periods under the conditions of experimental immunosuppression.

180 animals of three age periods (pubertal, reproductive and that of marked age-related changes) served as a material for investigation. Cyclophosphamide was administered to experimental animals once intramuscularly in the dosage leading to immunodepression (200 mg/kg of body weight of an animal). Control animals received 0.9% soluble sodium chloride. Animals were killed by means of decapitation under the ethereal anaesthesia in 1, 7, 15, 30 and 60 days after drug introduction. The care of and the manipulations on animals were exercised in compliance with the norms of national and international law and the principles of bioethics set out in the Helsinki Declaration. The features of the histological structure of the thymus were studied using an image analyzer based on Olympus CX-41 microscope. The areas of the subcapsular zone, deep cortex and medulla of the thymic lobules, the total number of cells, lymphocytes and epithelial reticular cells on a standard area ( $10^4$   $\mu\text{m}^2$ ) of morphofunctional zones, lymphoepithelial index were determined.

The results obtained indicate that rats' thymus has a high degree of reactivity in response to the administration of cyclophosphamide in high doses. Cyclophosphamide administration to experimental animals results in accidental involution of the thymus, which is expressed in significant changes of morphometric parameters and cytoarchitectonics of the organ within 30 days. Maximum changes of the morphometric parameters are observed in 1 day after cyclophosphamide administration. The animals of the reproductive period and the period of marked age-related changes are characterized by a combination of age (substitution of organ parenchyma by adipose tissue, increase of connective tissue structures) and accidental involution of the organ manifested by delymphotization of the thymic parenchyma morphofunctional zones.

*Key words:* thymus, rats, cyclophosphamide.

Тимус как первичный орган иммунной системы во многом определяет не только состояние периферических органов иммуногенеза, но и выраженность защитных реакций всего организма. Вместе с тем, тимус активно реагирует на экзогенные и эндогенные воздействия, что проявляется изменениями в его строении и функциях [1, 2, 3].

Для лечения злокачественных опухолей, аутоиммунных заболеваний в трансплантологии возникает необходимость проведения иммуносупрессивной терапии, оказывающей негативное воздействие на различные органы и ткани, в частности на органы иммунной системы [4].

Несмотря на то, что исследования ряда авторов посвящены изучению строения органов иммунной системы при действии различных иммуноотропных препаратов [2, 5], данные о строении тимуса белых крыс при экспериментальной иммуносупрессии в возрастном аспекте представлены лишь в единичных публикациях [7]. Циклофосфамид – цитостатический препарат, который широко применяется при лечении онкологических, аутоиммунных заболеваний [8, 9], используется для профилактики отторжения трансплантатов. Вместе с тем, он обладает большим количеством побочных эффектов, особенно в отношении клеток с высокой митотической активностью [10].

Целью исследования было изучение морфофункциональных особенностей тимуса белых беспородных крыс-самцов различных возрастных периодов в условиях экспериментальной иммуносупрессии.

## Методы

В эксперименте использованы белые беспородные крысы-самцы, органы иммунной системы которых по строению принципиально не отличаются от аналогичных органов человека. Материалом для исследования послужили 180 животных трех возрастных периодов: полового созревания, репродуктивного периода и периода выраженных старческих изменений [6], полученные из вивария лабораторных животных ГЗ «Луганский государственный медицинский университет».

Подопытным животным однократно внутримышечно вводили циклофосфамид в дозе, приводящей к иммунной депрессии (200

мг/кг массы тела животного) [7]. Контролем служили крысы, получавшие 0,9% раствор натрия хлорида в эквивалентном объеме. Животных выводили из эксперимента путем декапитации под эфирным наркозом через 1, 7, 15, 30 и 60 суток после введения препарата. Содержание и манипуляции над животными проводили с соблюдением норм национального и международного законодательства в соответствии с положением «Общие этические принципы экспериментов на животных» (Киев, 2001), требованиями Европейской конвенции о защите позвоночных животных, которые используются для экспериментальных и других научных целей (Страсбург, 1986), и принципами Хельсинской декларации о гуманном отношении к животным.

Забор, фиксацию материала и изготовление парафиновых блоков выполняли согласно общепринятым методикам работы с лимфоидными органами [11]. Для изучения структурных компонентов тимуса парафиновые срезы толщиной 4-6 мкм окрашивали гематоксилин-эозином, для идентификации клеток использовали окраску азуром II-эозином [11].

Детали гистологического строения изучали с помощью анализатора изображений на базе микроскопа Olympus CX-41 с использованием компьютерной программы «Morpholog» [12]. Определяли относительную площадь, занимаемую субкапсулярной зоной, глубиной корой и мозговым веществом (в %); общее количество клеток, лимфоцитов и эпителиоцитов, на условной стандартной площади (104 мкм<sup>2</sup>) каждой морфофункциональной зоны; вычисляли лимфоэпителиальный индекс, представляющий собой отношение количества лимфоцитов к количеству ретикулярных эпителиоцитов на единице площади. Производили подсчет гистоструктур на шести полях зрения каждого среза, анализировались шесть срезов с каждого объекта. Проводили статистическую обработку цифрового материала. Достоверными считали данные с погрешностью меньше 5% ( $p < 0,05$ ).

## Результаты и обсуждение

Тимус белых крыс периода полового созревания состоит из двух долей, покрытых снаружи тонкой соединительнотканной капсулой. От капсулы отходят перегородки, разде-

ляющие паренхиму тимуса на дольки разного размера и формы. В паренхиме дольки различаются более темное корковое и центрально расположенное светлое мозговое вещество, содержащее тельца Гассала. В корковом веществе различаются две части: наружная (субкапсулярная зона) и внутренняя (глубокая кора). Дифференцировка структурных компонентов тимической паренхимы определяется различной плотностью распределения лимфоцитов на единице площади гистологического среза.

После применения циклофосфамида в течение всего периода наблюдения тимус сохраняет основные морфологические особенности. Вместе с тем, в корковом веществе в ранние сроки наблюдения (1 и 7 суток) определяется картина «мозаичности», при этом светлые участки чередуются с темными, имеющими компактное расположение лимфоцитов. Субкапсулярная зона коркового вещества сужена, представлена 1-2 слоями больших лимфоцитов. На многих препаратах отмечается размытость корково-мозговой границы. Через 30 суток в тимусе на фоне делимфатизации коркового и мозгового вещества формируются мелкие дольки.

С помощью морфометрического исследования установлено, что площади субкапсулярной зоны и глубокой коры, а также мозгового вещества тимической паренхимы

подопытных животных существенно изменяются по сравнению с аналогичными показателями животных групп сравнения на протяжении всего периода наблюдения (табл. 1). Достоверные отличия площади субкапсулярной зоны и глубокой коры в сторону уменьшения в группе животных, получавших циклофосфамид, от данных группы контрольных животных наблюдаются через 1, 7, 15 и 30 суток после применения препарата.

Площадь мозгового вещества тимуса крыс подопытной группы, выраженная в процентном отношении к площади дольки, увеличивается соответственно степени уменьшения площади субкапсулярной зоны и глубокой коры. На 60-е сутки наблюдения статистически значимых отличий между сравниваемыми параметрами не установлено.

Результаты проведенного исследования свидетельствуют также, что изменения плотности расположения клеток во всех морфофункциональных зонах носят статистически значимый характер на 1–30-е сутки наблюдения. Так, общее количество клеток на единицу площади глубокой коры ниже контрольных показателей на 44,02%, 32,16%, 25,16% и 4,55% соответственно указанным срокам наблюдения. При этом количество лимфоцитов уменьшается на 46,29%, 33,29%, 25,90% и 5,05% от 5,61% (рис. 1). Лимфоэпителиальное отноше-

Таблица 1 – Площади (%) морфофункциональных зон тимуса крыс периода полового созревания контрольной и экспериментальной групп (M+m, n=60)

Группа	Сроки в сутках	Морфофункциональные зоны тимуса		
		Корковое вещество		Мозговое вещество
		Субкапсулярная зона	Глубокая кора	
Контроль	1	6,34±0,54	72,15±2,30	21,51±2,41
	7	6,30±0,59	72,21±2,56	21,49±1,49
	15	6,22±0,23	71,23±2,43	22,55±1,53
	30	6,14±0,77	70,97±2,57	22,89±2,18
	60	5,90±0,28	70,16±2,76	23,94±2,11
Циклофосфамид	1	5,60±0,88*	57,85±2,19*	36,55±2,23*
	7	5,58±0,62*	61,01±2,33*	33,41±1,24*
	15	5,52±0,58*	63,98±2,11*	30,50±1,43*
	30	5,61±0,51*	67,98±2,26*	26,41±2,20*
	60	5,61±0,17	70,04±2,54	24,35±2,28

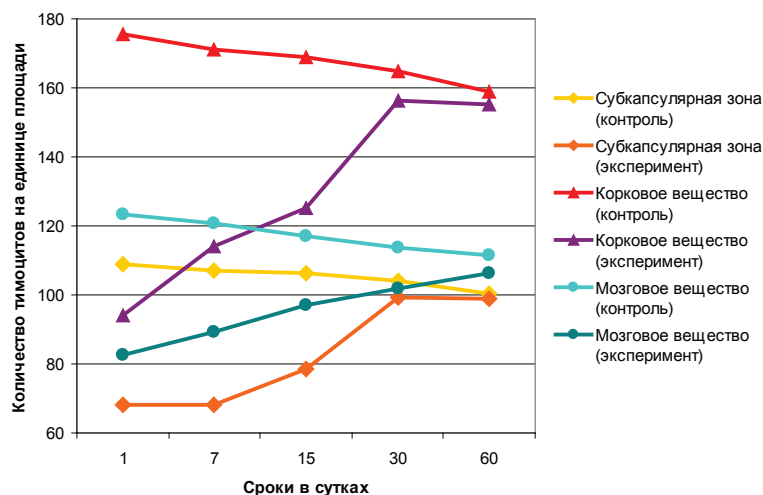


Рисунок 1 – Динамика изменения количества лимфоцитов в морфофункциональных зонах тимуса крыс периода полового созревания в контроле и после введения циклофосфамида в разные сроки наблюдения ( $M \pm m$ ,  $n=60$ ).

ние ниже контрольных показателей на 1-е, 7-е, 15-е и 30-е сутки на 39,23%, 20,5%, 12,79% и 6,07% соответственно. Через 60 суток после введения циклофосфамида статистически значимых различий между показателями крыс экспериментальной и контрольной групп не выявлено.

Динамика общего количества клеток, лимфоцитов и ретикулярных эпителиоцитов на единице площади субкапсулярной зоны и мозгового вещества тимуса имеет ту же тенденцию.

Тимус животных репродуктивного периода покрыт тонкой соединительнотканной капсулой и состоит из двух долей. От капсулы вглубь паренхимы органа отходят соединительнотканые перегородки, делящие его на дольки. Дольки содержат корковое и мозговое вещество, хорошо различимые на светооптическом уровне. Капсула и соединительнотканые междольковые перегородки утолщены, содержат жировую ткань.

При морфометрическом исследовании выявляются начальные признаки возрастной инволюции органа, о чем свидетельствует уменьшение площадей субкапсулярной зоны и глубокой коры с одновременным расширением площади мозгового вещества по сравнению с показателями животных периода полового созревания (табл. 1, 2). Отмечается также некоторое снижение количества клеток на единицу площади в субкапсулярной зоне (в интервале от

4,5% до 6,61%), глубокой коре (0,99% - 3,24%) и мозговом веществе (0,79% - 4,71%) в разные сроки наблюдения относительно аналогичных показателей более молодых животных.

После введения циклофосфамида на протяжении всего периода наблюдения тимус животных репродуктивного периода сохраняет основные морфологические черты. Однако отмечается статистически значимое уменьшение относительных площадей субкапсулярной зоны и глубокой коры на 1–30-е сутки наблюдения (табл. 2).

Соотношение клеточных элементов в морфофункциональных зонах тимуса крыс репродуктивного периода после введения циклофосфамида также существенно изменяется. Статистически значимые негативные отличия между показателями плотности расположения клеток в субкапсулярной зоне тимуса животных экспериментальной и контрольной групп составляют 19,2%, 17,62%, 10,12% и 8,00% соответственно 1, 7, 15 и 30 суткам наблюдения. Достоверные отличия количества лимфоцитов на единицу площади препарата от контрольных данных составляет 19,88%, 18,91%, 10,99% и 9,06% (рис. 2), а ретикулярных эпителиоцитов - 15,34% (1-е сутки), 10,51% (7-е сутки) и 5,45% (15-е сутки). Лимфоэпителиальное отношение снижено относительно контрольных показателей на 1-е, 7-е, 15-е и 30-е сутки.

Динамика изменений общего количества клеток, тимоцитов и ретикулярных эпи-

Таблица 2 – Площади (%) морфофункциональных зон тимуса крыс репродуктивного периода контрольной и экспериментальной групп (M+m, n=60)

Группа	Сроки в сутках	Морфофункциональные зоны тимуса		
		Корковое вещество		Мозговое вещество
		Субкапсулярная зона	Глубокая кора	
Контроль	1	6,05±0,26#	67,79±2,31#	26,16±1,54#
	7	5,77±0,35#	65,24±2,34#	28,99±2,47#
	15	5,50±0,38#	62,96±2,42#	31,54±2,30#
	30	5,25±0,25#	60,72±2,71#	34,03±2,18#
	60	5,12±0,19#	57,42±2,45#	37,46±2,33#
Циклофосфамид	1	5,58±0,12*	58,02±2,38*	36,40±1,19*
	7	5,28±0,22*	58,13±2,50*	36,59±1,88*
	15	5,12±0,14*	57,99±2,32*	36,89±2,50*
	30	5,03±0,18*	57,68±2,63*	37,29±2,21*
	60	5,02±0,20	55,47±2,12	39,51±1,45

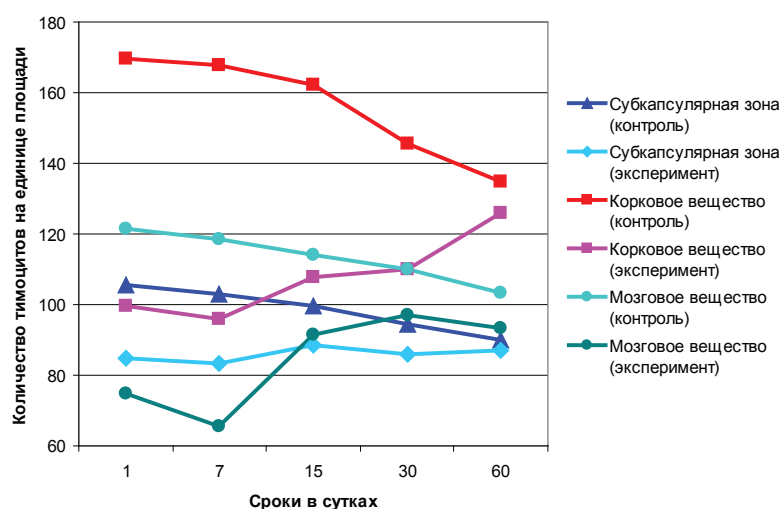


Рисунок 2 – Динамика плотности расположения лимфоцитов в морфофункциональных зонах тимуса крыс репродуктивного периода в контроле и после введения циклофосфамида в разные сроки наблюдения (M±m, n=60).

телиоцитов на единице площади глубокой коры аналогична таковой в субкапсулярной зоне коркового вещества. В мозговом веществе в сравнении с контролем на 1-е, 7-е и 15-е сутки после введения циклофосфамида показатель общего количества клеток на единице площади у подопытных животных достоверно меньше на 35,26%, 40,14% и 12,3%. Статистически значимые различия между показателями количества тимоцитов на площади  $10^4$  мкм<sup>2</sup> в экспериментальной и контрольной группах

животных выявлены через 1, 7, 15 и 30 суток наблюдения. Они составляют 38,42%, 44,46%, 19,9% и 11,8% соответственно. Лимфоэпителиальное отношение снижено по отношению к контрольным показателям в аналогичные сроки на 28,44%, 38,86%, 41,60% и 39,73%. Значимых отличий между параметрами через 60 суток эксперимента не установлено.

При исследовании тимуса животных периода выраженных старческих изменений контрольных групп выявлены признаки возраст-

ных инволютивных процессов. Орган состоит из долек, в которых определяется корковое и мозговое вещество. Размеры тимических долек визуальнo меньше, чем у животных предыдущих возрастных периодов. Дольки разделяются перегородками, образованными толстыми прослойками соединительной ткани. Отмечается сглаженность корково-мозговой границы. В мозговом веществе определяются тельца Гассала небольших размеров. Наблюдается замещение паренхимы долек жировой тканью, при этом процесс замещения идет с периферических отделов органа.

Морфометрическое исследование тимуса подтвердило данные, полученные с помощью световой микроскопии. Площади субкапсулярной зоны и глубокой коры уменьшены по сравнению с аналогичными показателями животных репродуктивного периода. Резко возрастает площадь мозгового вещества (табл. 2, 3). Клеточность тимической паренхимы снижена за счет уменьшения количества как лимфоцитов, так и ретикулярных эпителиоцитов.

После применения циклофосфана тимус состоит из небольших долек, которые разделяются перегородками, образованными толстыми прослойками соединительной ткани. Паренхима части долек замещена жировой тканью, в массиве которой в виде островков расположена лимфоидная ткань. В сохранных дольках отмечается сглаженность корко-

во-мозговой границы. Мозговое вещество местами достигает субкапсулярной зоны, в нем наблюдается большое количество мелких тимических телец.

На 1-е, 7-е, 15-е и 30-е сутки после применения циклофосфамида наблюдается статистически значимое снижение площадей субкапсулярной зоны по сравнению с данными группы контрольных животных, которое составляет соответственно 11,71%, 10,74%, 10,06% и 9,15%. Достоверное снижение площади глубокой коры тимуса крыс подопытной группы по сравнению с контрольными данными также отмечается в течение двухмесячного периода наблюдения и составляет 19,99% (1-е сутки), 23,65% (7-е сутки) 20,76% (15-е сутки) и 9,91% (30-е сутки). Площадь мозгового вещества увеличивается соответственно степени уменьшения площади субкапсулярной зоны и глубокой коры на 23,22% через 1-и сутки, 24,18% на 7-е сутки, 19,97% на 15-е сутки и на 8,95% на 30-е суткам наблюдения. На 60-е сутки наблюдения статистически значимых отличий между сравниваемыми параметрами не установлено. Наиболее выраженные отличия показателей сравниваемых групп наблюдаются на 1-е, 7-е и 15-е сутки после введения препарата.

Применение циклофосфамида вызывает выраженные изменения соотношения клеток в морфофункциональных зонах тимуса крыс

Таблица 3 – Площади (%) морфофункциональных зон тимуса крыс периода выраженных старческих изменений контрольной и экспериментальной групп (M+m, n=60)

Группа	Сроки в сутках	Морфофункциональные зоны тимуса		
		Корковое вещество		Мозговое вещество
		Субкапсулярная зона	Глубокая кора	
Контроль	1	4,10±0,38	50,42±2,35	45,48±2,78#
	7	3,63±0,33#	47,90±2,78#	48,47±2,35#
	15	3,58±0,09#	46,39±2,97#	50,03±2,12#
	30	3,17±0,22#	44,42±2,07	52,41±2,47#
	60	3,09±0,02#	41,85±2,26	55,06±2,49#
Циклофосфамид	1	3,62±0,08*	40,34±2,76*	56,04±2,14*
	7	3,24±0,09*	36,57±2,28*	60,19±2,40*
	15	3,22±0,01*	36,76±2,16*	60,02±2,35*
	30	2,88±0,05*	40,02±2,15*	57,10±2,76*
	60	2,88±0,05*	40,38±2,30	56,59±2,21

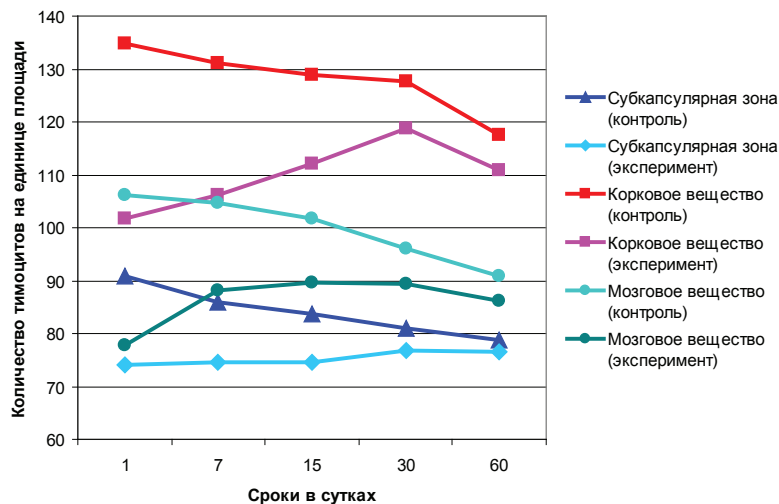


Рисунок 3 – Динамика изменения количества лимфоцитов в морфофункциональных зонах тимуса крыс периода выраженных старческих изменений в контроле и после введения циклофосфамида в разные сроки наблюдения ( $M \pm m$ ,  $n=60$ ).

периода выраженных старческих изменений. Наблюдается уменьшение плотности клеток в тимусе животных, которым вводили цитостатик, по сравнению с данными контрольных групп крыс. В субкапсулярной зоне отличия показателей плотности клеток являются статистически значимыми на 1-е, 7-е, 15-е и 30-е сутки наблюдения и составляют 16,95%, 11,9%, 9,00% и 4,6%. Уменьшается также численность лимфоцитов (рис. 3), что подтверждается снижением лимфоэпителиального отношения на 11,6%, 8,27%, 1,03% и 3,18% на 1-30-е сутки соответственно. В глубокой коре и мозговом веществе наблюдается похожая тенденция изменения плотности расположения клеток.

### Заключение

1. Для тимуса крыс характерна высокая степень реактивности в ответ на введение циклофосфамида в высокой дозировке.

2. Введение подопытным животным иммуносупрессора приводит к акцидентальной инволюции тимуса, выражающейся в значительных изменениях морфометрических показателей и цитоархитектоники тимуса в течение 30 суток. Максимальные изменения изучаемых параметров наблюдаются через 1 сутки после введения препарата.

3. Для крыс репродуктивного периода и периода выраженных старческих изменений

характерно сочетание возрастной (замещение паренхимы органа жировой тканью, увеличение содержания соединительнотканых структур) и акцидентальной инволюции органа, проявляющейся делимфатизацией морфофункциональных зон тимической паренхимы.

### Перспективы дальнейших разработок

В дальнейшем планируется изучить особенности цитоархитектоники морфофункциональных зон паренхимы тимуса крыс различных возрастных периодов после экспериментальной иммуносупрессии.

### Литература

1. Мельник, Н.О. Реактивні зміни органів імунного захисту за умов демієлінізації та ремієлінізації / Н.О. Мельник, Ю.Б. Чайковський // Морфологія. – 2007. – Т. 1, № 1. – С. 89–93.
2. Кашенко, С.А. Органометрические особенности строения тимуса белых крыс после иммуностимуляции и иммуносупрессии / С.А. Кашенко, А.А. Захаров // Україн. журн. клін. та лаборатор. медицини. – 2009. – Т. 4, № 3. – С. 50–52.
3. Морфологические изменения тимуса после применения полиоксидония / Г. Ю. Стручко [и др.] // Фундам. исследования. – 2012. – № 5. – Ч. 1. – С. 197–202.
4. Colvin, O. M. Alkylating agents. Encyclopedia of Cancer / O. M. Colvin ; ed. J. Bertino. – 2 nd ed. –

- Acad. Press, 2003. – P. 35–42.
5. Effect of intrauterine exposure of murino fetus to cyclophosphamide on development of thymus / G. V. Prakash [et al.] // Immunopharmacol Immunotoxicol. – 2007. – Vol. 29, issue 1. – P. 17–30.
  6. Западнюк, И. П. Лабораторные животные. Разведение, содержание, использование в эксперименте / И. П. Западнюк, В. И. Западнюк, В. А. Захария. – К.: Вища школа, 1983. – 383 с. Кашенко, С.А. Особенности ультрамикроскопического строения вилочковой железы крыс после введения циклофосфана // Україн. мед. альм. – 2003. – Т. 6, № 3. – С. 66–69.
  7. High-dose cyclophosphamide for moderate to severe refractory multiple sclerosis / D. E. Gladstone [et al.] // Arch Neurol. – 2006. – Vol. 63, № 10. – P. 1388–93.
  8. Cyclophosphamide enhances immunity by modulating the balance of dendritic cell subsets in lymphoid organs / T. Nakahara [et al.] // Blood. – 2010. – Vol. 115, № 22. – P. 4384–92.
  9. Некоторые особенности фармакодинамики циклофосфана у экспериментальных животных / Л.Ф. Лосева [и др.] // Мед. иммунология. – 2011. – Т. 13, № 4–5. – С. 52.
  10. Волошин, М.А. Основи імунології та імуноморфології / М.А. Волошин, Ю.Б. Чайковський, О.Г. Куш. – Запоріжжя-Київ, 2010. – 170 с.
  11. Овчаренко, В.В. Комп'ютерна програма для морфометричних досліджень «Morpholog» : свідоцтво про реєстрацію авторського права на твір / В.В. Овчаренко, В.В. Маврич. – № 9604. – Дата реєстрації 19.03.2004.

*Поступила 23.12.2013 г.*

*Принята в печать 05.03.2014 г.*

**Сведения об авторах:**

Бобрышева И.В. – к.м.н., доцент кафедры гистологии, цитологии и эмбриологии ГЗ «Луганский государственный медицинский университет», Украина.

**Адрес для корреспонденции:** 91016, Украина, г.Луганск, ул. 15 линия, д.18, кв. 8. E-mail: inessa\_lug@mail.ru – Бобрышева Инесса Венидиктовна.