

В.М.Волошин

ДЗ «Луганський державний медичний університет»

Ключові слова: тимус, щур, гістологія, толуол.

Надійшла: 14.12.2012

Прийнята: 21.01.2012

УДК 611.438.061:613.632.4

МОРФОЛОГІЧНІ ЗМІНИ ТИМУСУ СТАТЕВОНЕЗРІЛИХ ЩУРІВ ПІСЛЯ ІНГАЛЯЦІЙНОГО ВПЛИВУ ТОЛУОЛУ

Дослідження виконано в рамках науково-дослідної роботи «Морфогенез органів ендокринної, імунної та кісткової систем під хронічним впливом летучих компонентів епоксидних смол» (номер державної реєстрації 0109U004615).

Резюме. Метою презентованого дослідження було встановити особливості гістологічної будови тимусу щурів після інгаляційного впливу толуолу у концентрації 500 мг/м³ протягом 2 місяців. В експерименті використані білі лабораторні щури з початковою масою тіла 40-50 г. Вивчали площу кори та мозкової речовини тимусу та їх співвідношення. Підраховували кількість клітин лімфоїдної популяції органу в різні терміни після припинення дії чинника, що вивчався. Встановлено, що інгаляційний вплив толуолу викликає явища акцидентальної інволюції тимусу. За умов дії толуолу в різних ділянках тимусу спостерігаються явища інтоксикації та компенсаторно-адаптаційні зміни. Збільшення терміну після припинення дії толуолу зменшує розбіжність між гістоморфометричними показниками експериментальної та контрольної груп.

Морфологія. – 2012. – Т. VI, № 1. – С. 25-30.

© В.М.Волошин, 2012

Voloshin V.N. Morphological changes of thymus in immature rats following inhalation exposure of toluene.

Summary. The aim of this study was to determine characteristics histological structure of the thymus of rats following inhalation exposure to toluene concentrations of 500 mg/m³ for 2 months. The experiment used white laboratory rats with initial body weight of 40-50 g, the studied area of the cortex and medulla of the thymus and their relationship. We calculated quantitatively in lymphoid cell populations of the body at different times after termination of the action of the studied factors. It is established that the effect of inhalation of toluene causes accidental thymus involution phenomena. In the action of toluene in different parts of the thymus observed phenomena toxicity and compensatory-adaptive changes. Longer after pre-reduction of toluene reduces the differences between histological performance of the experimental and control groups.

Keywords: thymus, rat, histology, toluene.

Вступ

Тимус (загруднинна залоза) – лімфоїдний орган, який у людини розташований у грудній порожнині, відомий з кінця першого сторіччя нашої ери. Рослина з такою ж назвою декілька століть до цього використовувалася древніми єгиптянами у якості лікарського засобу. За однією з версій вважається, що назву орган отримав завдяки подібності своєї форми до рослини. Згідно іншої гіпотези назва тимус походить від грецького **θύμος**, що можна перекласти, як дим або дух, звідси – душа, доблесть, мужність. Напевно, греки, у зв'язку з ореолом таємничості, що оточувала тимус, а також через його безпосередню близькість до серця, вважали цей орган місцем знаходження душі людини. Назву органу та перше описання тимусу приписують перу Руфуса з Ефесу, грецькому лікарю, який жив у Олександрії та деякий час у Римі за імперії Трояна.

На початку 60-х років XX століття були

отримані факти, що доводили участь тимусу у процесах імуногенезу. За сучасними уявленнями тимус – це центральний орган імунної системи, що контролює дозрівання та функціональну активність лімфоцитів, що здійснюють імунний нагляд в організмі (Ковешников В.Г., Бирик Е.Ю., 2007; Кащенко С.А., Захаров А.А., 2010). Тимоти за своїми морфологічними особливостями практично не відрізняються від звичайних лімфоцитів та характеризуються круглими ядрами з глибокою будовою хроматину та невеликою ділянкою цитоплазми. Тимус є лімфоепітеліальним органом, епітеліальна частина якого – складова, що має місцеве походження. Лімфоїдні елементи тимусу походять від попередників, що надходять до органу з кісткового мозку, а більша частина тимоцитів, що дозріли, мігрує до периферійних органів імунної системи (Blackburn C.C., Manley N.R., 2004). Особливістю тимоцитів є висока мітотична активність та підвищена чут-

ливість до дії іонізуючого випромінювання, хімічних речовин та стероїдних гормонів.

Значний інтерес серед науковців викликають зміни структури цього органу у відповідь на екзогенний вплив різних екополутантів. Одним з таких є толуол. Толуол (CAS RN 108-88-3), відомий також як фенілметан, метілбензол та метацид широко використовується у якості промислового розчинника. Ця хімічна сполука використовується у виробництві епоксидних смол і може стати джерелом надходження у навколишнє середовище з готової продукції. Толуол використовується також як домішка до бензину для збільшення октанового числа, у виробництві бензолу та як розчинник фарб.

Мета

Зважаючи на поширеність у побуті та виробництві толуолу та незначну кількість робіт, які присвячені вивченню його впливу на органогенез тимуса метою презентованого дослідження стало вивчення гістологічної будови тимуса щурів, які зазнавали впливу цієї хімічної речовини.

Матеріали та методи

Робота виконана на 60 білих лабораторних щурах-самцях з початковою масою тіла 40-50 г. Тварин отримували з віварію ДЗ «Луганський державний медичний університет». Дослідження проводилося у відповідності до етичних норм та рекомендацій щодо гуманізації роботи з лабораторними тваринами, які відображені у «Європейській конвенції по захисту хребетних тварин, що використовуються для експериментальних та інших цілей» (Страсбург, 1985), законі України «Про захист тварин від жорстокого поводження». Тварини були розділені на контрольну (К) та експериментальну (І) серії (по 30 тварин в кожній). Контрольні тварини знаходилися в стандартних умовах віварію. Щури І серії зазнавали впливу толуолу у концентрації 500 мг/м³ протягом 60 днів (5 годин/добу, 5 днів/тиждень). Такі умови створювалися за допомогою спеціальної установки, яка складається з (1) затравочної камери, (2) камери, у якій створювалася необхідна концентрація діючої речовини, (3) датчика толуолу та (4) допоміжного оснащення. Після закінчення вказаного терміну тварин виводили з експерименту шляхом декапітації під ефірним наркозом через 1, 7, 15, 30 та 60 днів (1, 2, 3, 4 та 5 групи відповідно), дотримуючись «Методичних рекомендацій з виведення лабораторних тварин з експерименту». Забір, фіксацію тимусу та виготовлення парафінових блоків з розміщеними в них шматочками органу виконували у відповідності до загальноприйнятих методик. Виготовляли зрізи тимусу товщиною 4-6 мкм в горизонтальній площині посередині органу. Для вивчення структурних компонентів тимусу гістологічні зрізи забарвлювали гематоксиліном та еозином. Деталі гістологічної будови органу вивчали за допомогою цитоморфологічного комплексу на

базі мікроскопа Olympus BX 41. Визначали кількість клітин лімфоїдної популяції у субкапсулярній та глибокій зонах кори, а також у мозковій речовині тимусу. Підрахунок клітин проводили на кожному гістологічному препараті (при збільшенні – окуляр $\times 10$ та об'єктив $\times 100$) в шести різних полях зору. Перераховували кількість клітин на 1 мм². У клітинному складі лімфоїдної популяції тимуса визначали кількість великих лімфоцитів, великих лімфоцитів з ознаками деструкції, середніх лімфоцитів, середніх лімфоцитів з ознаками деструкції, малих лімфоцитів, малих лімфоцитів з ознаками деструкції та лімфоцитів у стадії апоптозу. Площу кори та мозкової речовини тимусу визначали за допомогою програми «Master of Morphology» (Овчаренко В.В., Маврич В.В., 2004), після чого знаходили кірково-мозковий індекс. Кількісні показники обробляли з застосуванням методів варіаційної статистики за допомогою програми «Statistica 6.0». Достовірною вважали статистичну похибку менше 5% ($p < 0,05$). Критичним вважали t-критерій Стьюдента – 2,23.

Результати та їх обговорення

На гістологічних препаратах тимусу щурів контрольної серії спостерігається чіткий розподіл органу на часточки, що відрізняються одна від іншої за розміром. Орган вкритий сполучнотканинною капсулою, яка віддає в товщу тимусу міжчасточкові перегородки, що містять кровоносні судини. Кожна часточка тимусу складається з кіркової та мозкової речовини, межа між якими досить помітна (рис. 1). В контролі частка кіркової речовини складала від 77,83% в 1 групі тварин до 74,09% – через 60 днів після виведення тварин з експерименту. У відповідних групах щурів мозкова речовина становила 22,17% та 25,91%. Клітинний склад кори тимусу представлений лімфоцитами на різних стадіях дозрівання, епітеліоретикулярними клітинами, макрофагами, плазматичними клітинами, та тучними клітинами. Загальна кількість клітин лімфоїдної популяції у субкапсулярній зоні тимусу становила 13827,33/мм², 13869,50/мм² та 13803,67/мм² відповідно в 1, 2 та 3 групах тварин. В цій ділянці тимусу спостерігалися численні великі лімфоцити, розташовані декількома шарами. Між ними зустрічали епітеліоретикулярні клітини, навколо яких спостерігали скупчення лімфоцитів. Деінде зустрічали макрофаги та лімфоцити на стадії апоптозу (рис. 2). В глибокій ділянці кори численність клітин лімфоїдної популяції через 7 та 15 днів після виведення тварин з експерименту становила 17911,50/мм² та 17734,33/мм². Переважна більшість клітин цієї ділянки кори представлена малими та середніми лімфоцитами, що тісно лежали один до одного. Крім того спостерігалися витягнутої форми епітеліоретикулоцити. Деінде зустрічалися макрофаги, апоптотичні клітини та клітини з проявами деструкції.

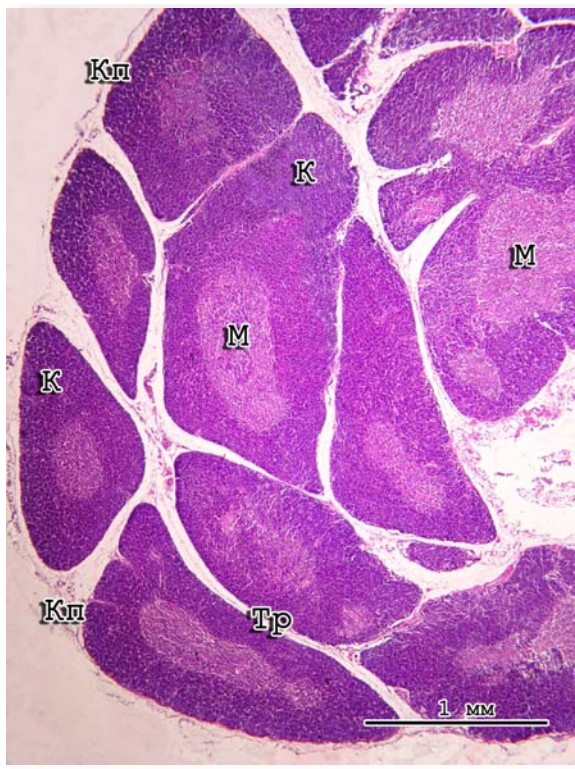


Рис. 1. Тимус щура 1 групи контрольної серії. К – кора; М – мозкова речовина; Кп – капсула; Тр – трабекула. Об'єктив – $\times 4$. Забарвлення гематоксиліном та еозином.

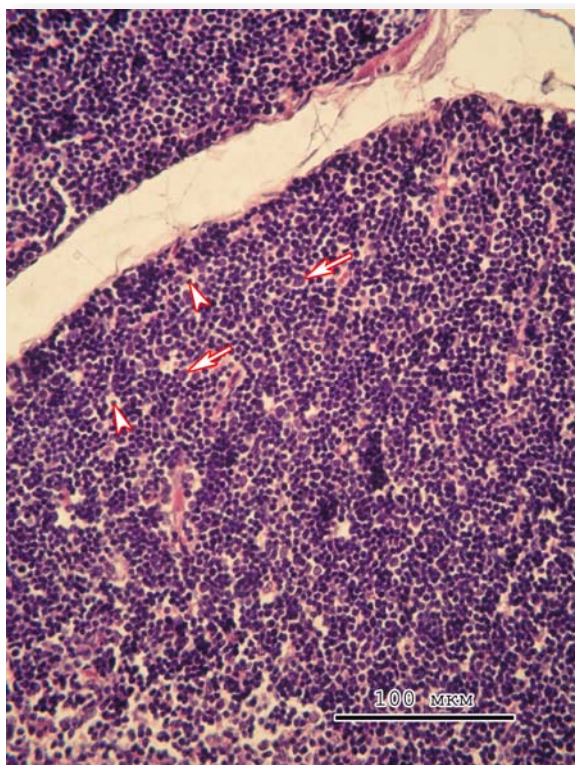


Рис. 2. Ділянка кори тимусу щура 3 групи контрольної серії. Довгі стрілки вказують на кіркові епітеліоретикулоцити; короткі стрілки – апоптотичні тіла. Об'єктив – $\times 40$. Забарвлення гематоксиліном та еозином.

Більш світле забарвлення мозкової речовини тимусу зумовлене меншою щільністю розташування клітин взагалі та меншою кількістю тут малих тимоцитів. Загальна кількість клітин лімфоїдної популяції у цій ділянці тимусу становив в 3, 4 та 5 групах щурів $15256,33/\text{мм}^2$, $15208,50/\text{мм}^2$ та $15140,83/\text{мм}^2$ відповідно.

У щурів, які зазнавали впливу толуолу, гістологічна будова тимусу взагалі нагадувала структуру органу у контрольних тварин, проте мала при цьому деякі характерні ознаки. Так, добре було видно розподіл загруднинної залози на кіркову та мозкову речовину. Часточки тимусу на гістологічних препаратах мають різний розмір. Капсула, що вкриває орган, віддає трабекули, товщина яких відрізняється в різних ділянках тимусу. Помітно, що площа, яку займає кіркова речовина зменшується по відношенню до площі мозкової речовини (рис. 3).

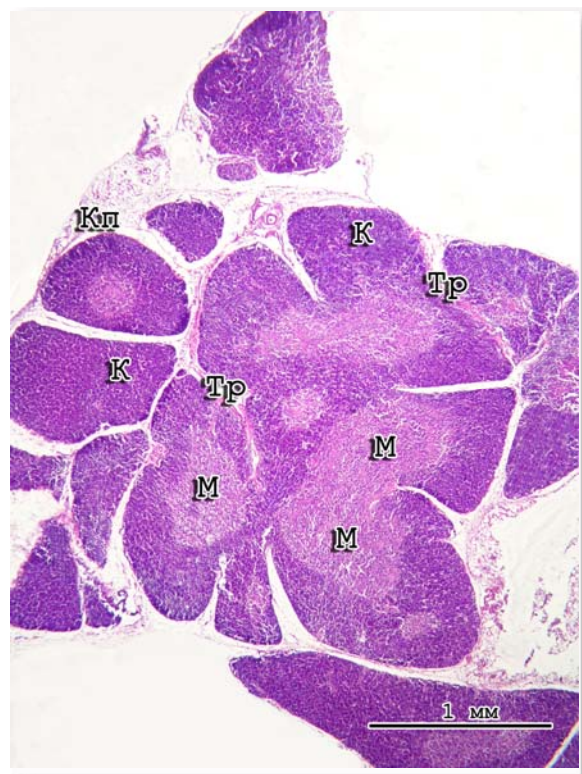


Рис. 3. Тимус щура 1 групи, що зазнавав впливу толуолу. К – кора; М – мозкова речовина; Кп – капсула; Тр – трабекула. Об'єктив – $\times 4$. Забарвлення гематоксиліном та еозином.

Так, показник площі кори тимусу через 1, 7 та 15 днів після припинення дії толуолу становив відповідно 64,39%, 65,26% та 63,43%. Ці значення відрізнялися від контрольних значень на 17,27% ($p=0,025$), 15,49% ($p=0,060$) та 16,24% ($p=0,001$) відповідно. Таке ж співвідношення ми спостерігали через 30 та 60 днів після припинення дії чинника, що вивчався. В останній групі тварин розбіжність середніх значень контролю та експериментальних щурів виявилася статистично

невірогідною. Звичайно, такі дані знайшли своє відображення у змінах кірково-мозкового індексу. Цей показник у щурів, які зазнавали впливу толуолу, був нижче за дані контрольної серії у всіх групах спостереження. Так, в 1, 2 та 3 групах контролю він склав 3,19, 3,09 та 3,18, в той час, як в експериментальній серії зазначений показник становив відповідно 1,92, 1,89, та 1,78.

У тварин, які зазнавали впливу толуолу, ми спостерігали зменшення кількості клітин лімфоїдної популяції як в корі, так і в мозковій речовині тимусу (рис. 4).

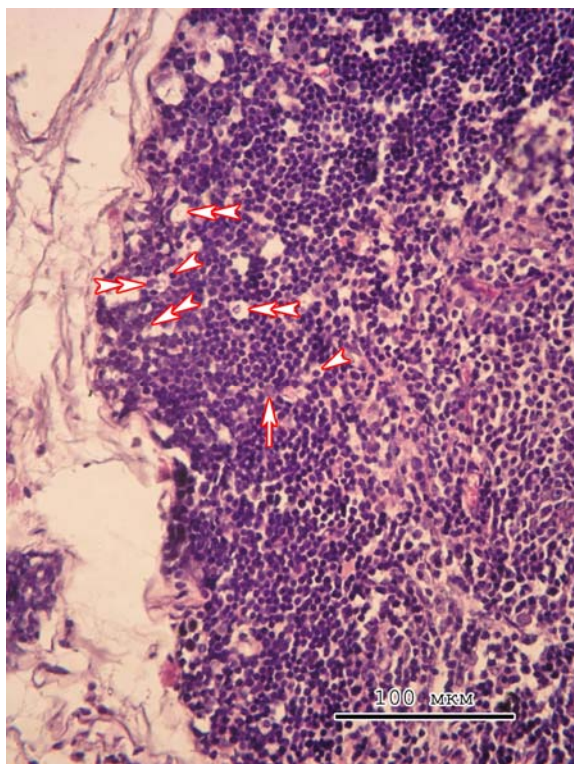


Рис. 4. Ділянка кори та мозкової речовини тимусу щура 3 групи, що зазнавав впливу толуолу. Довга стрілка вказує на кірковий епітеліоретикулоцит; короткі стрілки – апоптотичні тіла; подвійні стрілки – макрофаги з уламками тимоцитів. Об'єктив – $\times 40$. Забарвлення гематоксилином та еозином.

Так, в субкапсулярній зоні зазначений показник становив $11825,83/\text{мм}^2$, $12151,67/\text{мм}^2$ та $12303,17/\text{мм}^2$ відповідно через 1, 7 та 15 днів після припинення дії чинника, що вивчався. Це відрізнялося від контрольних значень на 14,47% ($p < 0,001$), 12,39% ($p < 0,001$) та 10,87% ($p = 0,009$). Кількість тимоцитів у глибоких ділянках кори після впливу на організм щурів толуолу також знижувалася. В цій ділянці тимусу у щурів 1 та 2 груп кількість клітин становила відповідно $14676,50/\text{мм}^2$ та $14612,67/\text{мм}^2$, а це на 18,30 % ($p < 0,001$) та 18,42 % ($p < 0,001$) нижче за показники відповідних груп контрольної серії. При вивченні будови кори тимусу звертає на себе увагу збільшення кількості макрофагів та тимоцитів з проявами деструкції. Загальна кількість клітин

лімфоїдної популяції в субкортикальній зоні кори у щурів, які були виведені з експерименту через 1 день після припинення дії толуолу, виглядала наступним чином. Великі лімфоцити – $3018,83/\text{мм}^2$ (25,53%), великі лімфоцити з проявами деструкції – $214,83/\text{мм}^2$ (1,82%), середні лімфоцити – $2558,67/\text{мм}^2$ (21,64%), середні лімфоцити з проявами деструкції – $506,00/\text{мм}^2$ (4,28%), малі лімфоцити – $4175,67/\text{мм}^2$ (35,31%), малі лімфоцити з проявами деструкції – $1107,00/\text{мм}^2$ (9,36%), лімфоцити в стадії апоптозу – $239,00/\text{мм}^2$ (2,06%).

Загальна кількість клітин лімфоїдної популяції в глибокій ділянці кори у щурів 1 групи експериментальної серії виглядала наступним чином. Великі лімфоцити – $3579,50/\text{мм}^2$ (20,57%), великі лімфоцити з проявами деструкції – $226,17/\text{мм}^2$ (1,46%), середні лімфоцити – $2619,17/\text{мм}^2$ (17,43%), середні лімфоцити з проявами деструкції – $4813,00/\text{мм}^2$ (3,45%), малі лімфоцити – $5755,50/\text{мм}^2$ (28,45%), малі лімфоцити з проявами деструкції – $1530,50/\text{мм}^2$ (7,54%), лімфоцити в стадії апоптозу – $482,83/\text{мм}^2$ (1,66%). Співвідношення вищезазначених показників з даними контрольної серії продемонстровано на рисунку 5. Також звертає на себе увагу збільшення кількості тучних клітин в капсулі тимусу (рис. 6).

Таким чином, інгаляційний вплив толуолу викликає достовірні зміни в гістологічній будові тимусу щурів, які були введені в експеримент з початковою масою тіла 40-50 г. Протягом експерименту ми спостерігали зменшення кількості клітин лімфоїдної популяції, яка до 60 доби після припинення дії толуолу максимально наближалася до показників контролю. Зазначений факт може бути пояснений активацією під дією хімічної сполуки, що вивчалася, механізмів загального адаптаційного синдрому. Стимуляція структур гіпоталамо-гіпофізарно-надниркової системи, що виникає при цьому, приводе до підвищеного рівня глюкокортикоїдів в крові, що зменшують кількість тимоцитів. Результати нашого дослідження заперечують дані, отримані всередині та наприкінці минулого століття (NTP, 1990), які показували відсутність змін у морфології тимусу після інгаляційного впливу толуолу. Кількість клітин кіркової речовини тимусу на різних етапах стресу зменшується, однак інтерпретація цього явища, як наслідку загибелі тимоцитів навряд чи відповідає дійсності, тому що кількість клітинного детриту, що був знайдений в тимусі у вільному стані або захопленому макрофагами не був пропорційним зменшенню кількості клітин. Тому, на нашу думку, за умов інгаляційної дії толуолу має місце міграція тимоцитів до периферійних органів лімфоїдної системи. Крім того стрес може викликати гіпоксію, пов'язану з розростанням сполучної тканини у стінці кровонесних судин (порушення гемомікроциркуляції), що

в свою чергу приведе до дистрофічних процесів у лімфоцитарному та епітеліальному компонентах тимусу (Мороз Г.А., 2010). Гіпоксія викликає акцидентальну інволюцію загруднинної залози,

що проявляє себе порушенням дозрівання та диференціювання лімфоцитів, делімфатизації органу (Кузьменко Л.Г., 2011).

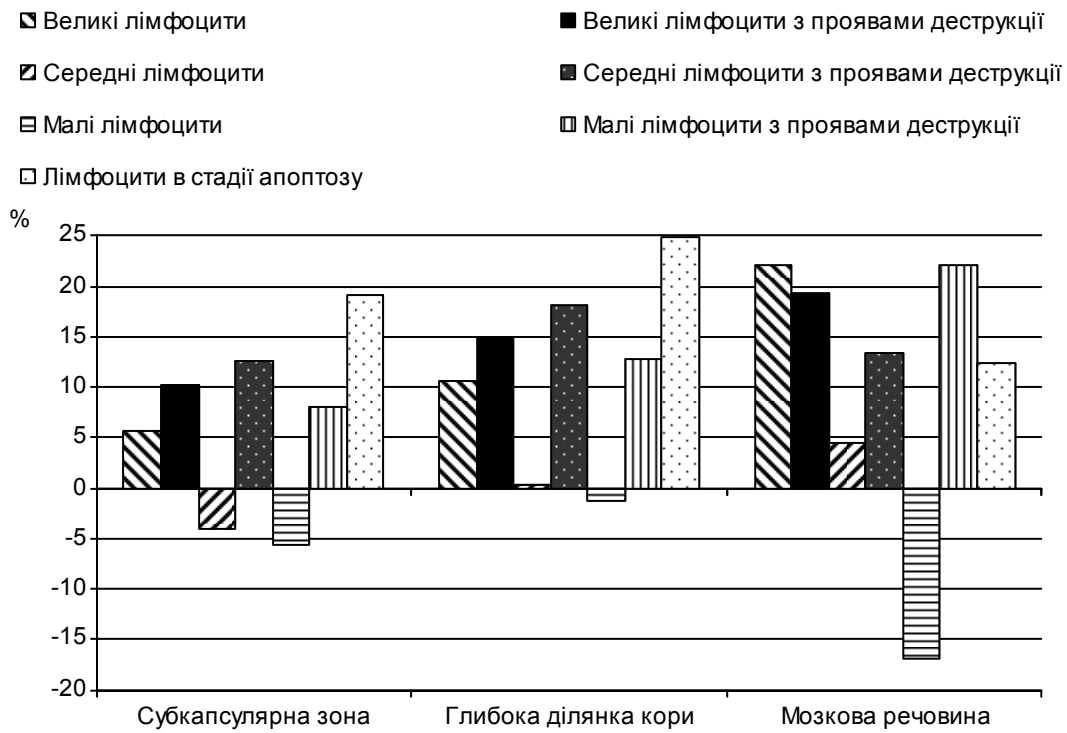


Рис. 5. Відхилення відсоткового вмісту клітин лімфоїдної популяції тимусу щурів 1 групи, які зазнавали впливу толуолу, від контролю.

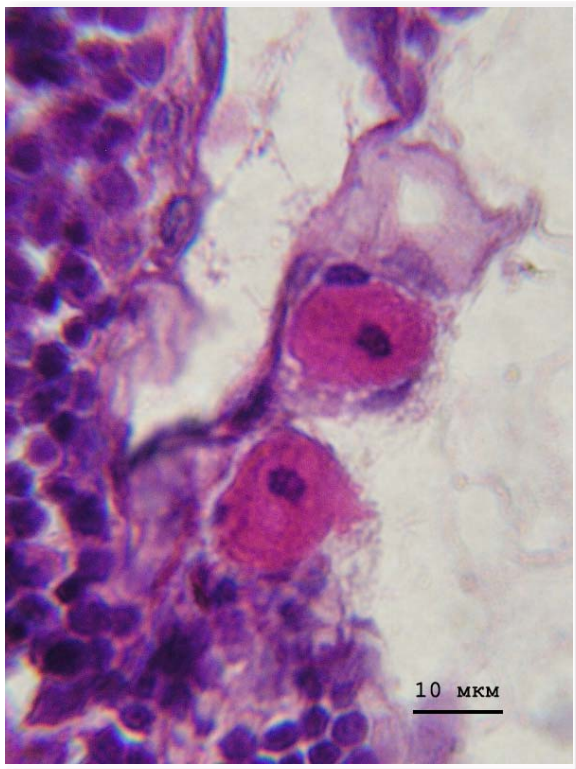


Рис. 6. Тучні клітини в капсулі тимусу щура 2 групи, який зазнавав впливу толуолу. Об'єктив – $\times 100$. Забарвлення гематоксиліном та еозином.

Висновки

1. Двохмісячний інгаляційний вплив толуолу у концентрації 500 мг/м³ приведе до значних змін у клітинному складі тимусу.

2. Інгаляційний вплив толуолу викликає явища акцидентальної інволюції тимусу.

3. За умов дії толуолу в різних ділянках тимусу спостерігаються явища інтоксикації та компенсаторно-адаптаційні зміни.

4. Збільшення терміну після припинення дії толуолу зменшує розбіжність між гістоморфометричними показниками експериментальної та контрольної груп.

Перспективи подальших розробок полягають у вивченні гістологічної будови тимусу щурів за умов інгаляційного впливу толуолу у поєднанні з застосуванням лікарських препаратів з антиоксидантною дією.

Літературні джерела

Кашенко С. А. Морфологические особенности строения тимуса крыс после иммунотропных воздействий / С. А. Кашенко А. А. Захаров // Перспективы медицины та біології. – 2010. - Т. 2, № 1. - С. 40.

Ковешников В. Г. Функциональная морфология органов иммунной системы // В. Г. Ковешников, Е. Ю. Бибик. – Луганск : «Виртуальная реальность», 2007. – 172 с.

Кузьменко Л. Г. Тимус и стресс в клинике и эксперименте / Л. Г. Кузьменко // Вестник Российского университета дружбы народов. – 2011. - № 3. - С. 89-94.

Мороз Г. А. Морфофункциональные осо-

бенности тимуса двенадцатимесячных крыс при многократно повторяющемся гипергравитационном воздействии / Г. А. Мороз // Морфология. – 2010. – Т. 4. - № 3. – С. 23-27.

Овчаренко В. В. Комп'ютерна програма для морфометричних досліджень «Master of Morphology» / В. В. Овчаренко, В. В. Маврич // Свід. про реєстрацію авт. права на винахід № 9604, дата реєстрації 19.03.2004.

Blackburn C. C. Developing a new paradigm for thymus organogenesis / C. Clare Blackburn, Nancy R. Manley // Nature Review Immunology. – 2004. – Vol. 4. – P. 278-289.

Волошин В.Н. Морфологические изменения тимуса неполовозрелых крыс после ингаляционного воздействия толуола.

Резюме. Целью представленного исследования было установить особенности гистологического строения тимуса крыс после ингаляционного воздействия толуола в концентрации 500 мг/м³ в течение 2 месяцев. В эксперименте использованы белые лабораторные крысы с начальной массой тела 40-50 г. Изучали площадь коры и мозгового вещества тимуса и их соотношение. Подсчитывали количество клеток лимфоидной популяции органа в различные сроки после прекращения действия изучаемого фактора. Установлено, что ингаляционное влияние толуола вызывает явления акцидентальной инволюции тимуса. В условиях действия толуола в различных участках тимуса наблюдаются явления интоксикации и компенсаторно-адаптационные изменения. Увеличение срока после прекращения действия толуола уменьшает различия между гистоморфометрическими показателями экспериментальной и контрольной групп.

Ключевые слова: тимус, крыса, гистология, толуол.