

УДК: 611.41:061

**В.М. Волошин****ГІСТОЛОГІЧНІ ПЕРЕТВОРЕННЯ ТИМУСУ БІЛИХ ЛАБОРАТОРНИХ ЩУРІВ, ЯКІ НА ТЛІ ІНГАЛЯЦІЙНОГО ВПЛИВУ ТОЛУОЛУ ОТРИМУВАЛИ ТІОТРИАЗОЛІН***Державний заклад «Луганський державний медичний університет»*

**Волошин В.М.** Гістологічні перетворення тимусу білих лабораторних щурів, які на тлі інгаляційного впливу толуолу отримували тіотриазолін // Український морфологічний альманах. – 2014. – Том 12, № 1. – С. 45-48.

Метою даного дослідження було вивчення впливу тіотриазоліну на морфогенез тимусу білих лабораторних щурів, які зазнавали інгаляційного впливу толуолу. В експерименті були використані білі лабораторні щури самці з початковою масою тіла 130-150 г. Щури першої експериментальної серії зазнавали 60 експозицій толуолу у концентрації 500 мг/куб.м. Експозиції здійснювалися 5 годин на добу, 5 днів на тиждень. Щури другої експериментальної серії на тлі дії толуолу отримували розчин тіотриазоліну у дозі 117 мг/кг на добу. В результаті дослідження встановлено, що деструктивні зміни тимусу, які викликані інгаляційним впливом толуолу, зменшуються при застосуванні тіотриазоліну в обраній дозі. При поданні дії толуолу та тіотриазоліну вірогідної різниці гістоморфометричних показників з даними, отриманими у контрольних тварин, не встановлено.

**Ключові слова:** тимус, толуол, тіотриазолін, гістологія.

**Волошин В.Н.** Гистологические преобразования тимуса белых лабораторных крыс, которые на фоне ингаляционного влияния толуола получали тиотриазолин // Украинский морфологический альманах. – 2014. – Том 12, № 1. – С. 45-48.

Целью данного исследования было изучение влияния тиотриазолина на морфогенез тимуса белых лабораторных крыс, которые подвергались ингаляционному воздействию толуола. В эксперименте были использованы белые лабораторные крысы самцы с начальной массой тела 130-150 г. Крысы первой экспериментальной серии подвергались 60 экспозициям толуола в концентрации 500 мг/куб.м. Экспозиции осуществлялись 5 часов в сутки, 5 дней в неделю. Крысы второй экспериментальной серии на фоне действия толуола получали раствор тиотриазолина в концентрации 117 мг/кг в сутки. В результате исследования установлено, что деструктивные изменения тимуса, вызванные ингаляционным воздействием толуола, уменьшаются при применении тиотриазолина в выбранной дозе. При сочетании действия толуола и тиотриазолина достоверной разницы гистоморфометрических показателей с данными, полученными в контроле, не установлено.

**Ключевые слова:** тимус, толуол, тиотриазолин, гистология.

**Voloshin V.N.** Influence of thiotriazoline on histological change of the thymus of white laboratory rats exposed to toluene inhalation // Украинский морфологический альманах. – 2014. – Том 12, № 1. – С. 45-48.

The purpose of this study was to investigate the influence of thiotriazoline on the morphogenesis of the thymus of white laboratory rats that were exposed to inhalation of toluene. We used male white laboratory rats with an initial body weight 130-150 g. First experimental series of rats had 60 exposures of toluene in a concentration of 500 mg/m<sup>3</sup>. Exposure is provided 5 hours per day, 5 days per week. Second experimental series rats were exposed both to toluene and to thiotriazoline 117 mg/kg per day. The study results that the destructive changes in the thymus caused by inhalation exposure to toluene were reduced upon the application of thiotriazoline in the selected dose. There is no significant difference between histomorphometry indicators of thymus of the second series rats and control animals.

**Key words:** thymus, toluene, thiotriazoline, histology.

Тимус - первинний лімфоїдний орган, у якому з віком відбуваються динамічні морфологічні зміни, пов'язані з процесом дозрівання Т-лімфоцитів [1, 4, 7]. Цей орган є надзвичайно чутливим до стресових чинників, у тому числі – до впливу різного роду токсикантів. Зазвичай, тимус – це перший орган серед органів імунної системи, у якому відбуваються морфологічні зміни у відповідь на вплив імуноотоксичних ксенобіотиків. В першу чергу такі зміни мають наслідком різного ступеня зменшення кількості кіркових лімфоцитів. Це призводить до того, що межа між корою та мозковою речовиною тимусу стає мало помітною, а в деяких випадках зникає зовсім. Таким чином, гістологічна будова загруднинної залози, архітектура її компартментів

за умов впливу на організм токсичних чинників має велике значення для скринінгу речовин, що мають імуноотоксичні властивості.

Відомо, що будова тимусу зазнає значних перетворень протягом життя (вікова інволюція) та у відповідь на вплив різноманітних факторів [6]. Встановлено, що експозиції легких органічних компонентів призводить крім іншого до оксидативного стресу та модуляції імунної відповіді [8]. Однією з таких речовин є толуол, значне розповсюдження якого у навколишньому середовищі спостерігається протягом останніх десятиріч. У своїх попередніх роботах нами були показані морфологічні зміни тимусу у відповідь на інгаляційний вплив толуолу [2]. Важливою проблемою сучасної морфології є пошук

лікарських препаратів, що володіють властивостями цитопротекторів та імунomodуляторів. Незважаючи на широкий спектр таких лікарських препаратів, розробка ефективних засобів для запобігання або пом'якшення імунотоксичного впливу різного роду токсикантів лишається актуальною проблемою сьогодення. Тіотриазолін – це синтетичний лікарський препарат з групи аза гетероциклічних сполук, який володіє мембрано стабілізуючими та регенеративними властивостями. Останніми роками опубліковані праці, що підтверджують імуномодельючі властивості тіотриазоліна [3]. Показано, що цей препарат здатен активувати механізми утворення антитіл та підвищувати фагоцитарну активність, що дозволило розширити уявлення про імунomodуючу дію тіотриазоліну.

**Мета дослідження** полягає у вивченні впливу тіотриазоліну на морфогенез тимусу білих лабораторних щурів, які зазнавали інгаляційного впливу толуолу. Робота виконана у відповідності з планом наукових досліджень ДЗ «Луганський державний медичний університет» та є частиною наукової теми кафедри анатомії людини «Морфогенез органів ендокринної, імунної та кісткової систем під хронічним впливом летючих компонентів епоксидних смол» (№ держреєстрації – 0109U004615).

**Матеріал і методи дослідження.** Робота виконана на 90 (по 30 у кожній серії) білих лабораторних щурах-самцях статевозрілого віку з початковою масою тіла 130-150 г. Експозиції толуолу (щури серії I) здійснювалися 5 годин/добу, 5 днів/тиждень. Загальна кількість експозицій становила 60 разів. Контрольні тварини склали серію К (знаходилися в умовах, відповідних до таких, що були створені для щурів I серії за виключенням контакту з толуолом). Щури серії I-T3 на тлі впливу толуолу отримували тіотриазолін.

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, 1986), яка вступила в силу 1 січня 1991 року, та при дотриманні «Загальних етичних принципів експериментів на тваринах», що затверджені I Національним Конгресом з біоетики (Київ, 2001), Закону України «Про захист тварин від жорстокого поводження» (2006). Комісією з етичних питань ДЗ «Луганський державний медичний університет» (протокол № 6 від 01.06.2012) встановлено, що утримання тварин та маніпуляції, які проводилися з ними, відповідали Закону України № 3447-IV від 21.02.2006. Дослідження не дублює жодну роботу.

*Толуол.* В експерименті використовували толуол, вироблений на ЗАТ «Макрохім» (Київ, Україна), ГОСТ 5789-78. Концентрація толуолу складала 500 мг/м<sup>3</sup>. Згадана концентрація толуолу створювалася за допомогою спеціальної установки, яка складається з (1) затравочної камери, де містилися тварини, (2) камери, у якій створювалася необхідна концентрація діючої речовини, (3) датчика толуолу та (4) допоміжного оснащення.

*Тіотриазолін.* Вивчали дію тіотриазоліну (виробництво АТ «Галичфарм», м. Львів, розробка НВО «Фарматрон», м. Запоріжжя), затвердженого наказом МОЗ України №641 від 18.10.2007 (реєстраційний № UA/2931/01/02). Препарат вводився в порожнину очеревини у дозі 117 мг/кг за 30 хвилин перед експозицією.

Після закінчення останньої експозиції тварин виводили з експерименту шляхом дислокації шийних хребців 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». Виведення тварин з експерименту здійснювали в один і той же час – з 10.00 до 11.00.

*Світлова мікроскопія.* Тимус фіксували у 10% розчині формаліну. Перед проведенням гістологічного дослідження органи зневоднювали в етиловому спирті з концентрацією, яка збільшувалася, проводилися через хлороформ та хлорофому-парафінову суміш і парафін з додаванням воску та заливалися у парафіново-воскові блоки. Після виготовлення на санному мікротомі зрізів завтовшки близько 4 мкм їх забарвлювали гематоксиліном та еозином і розміщували у канадському бальзамі під покривним склом. Кожне предметне скло відповідним чином маркували. Крім зазначеного вище метода забарвлення використовували забарвлення гістологічних препаратів тимусу толуїдиновим синім для візуалізації тучних клітин (мастоцитів). Після цього вивчали будову органів за допомогою мікроскопа Olympus BX-41, використовуючи різне збільшення.

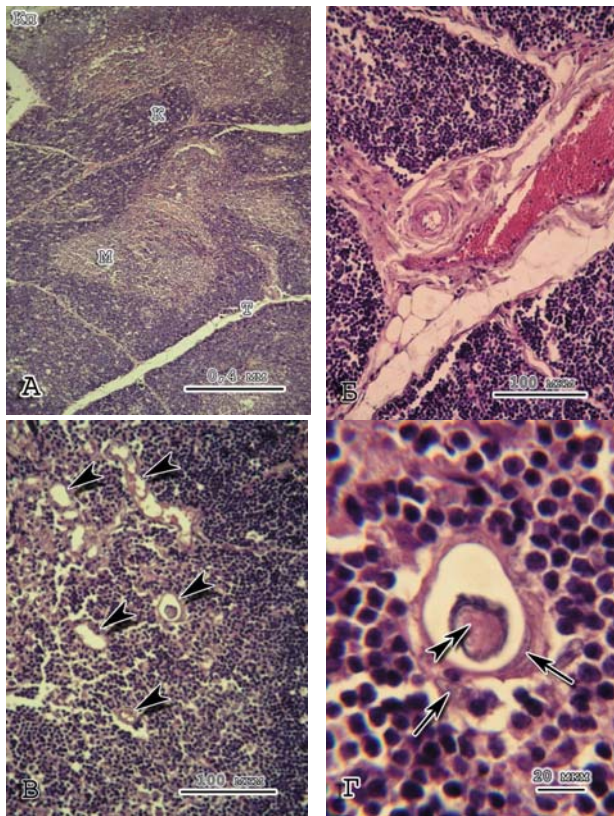
*Гістоморфометрія.* Гістоморфометричні показники тимусу (площа кори та мозкової речовини) вимірялися за допомогою програми «Master of Morphology» [5], після чого отримували відносні величини згаданих показників. Крім того, вивчався клітинний склад субкапсулярній та глибокій ділянках кори тимусу і його мозковій речовині.

*Статистичний аналіз.* Отримані цифрові дані були статистично опрацьовані за допомогою програми STATISTICA 6.0. Різницю між середніми показниками вибірок оцінювали за критерієм Ст'юдента (t). Достовірно вважали похибку при p<0,05.

**Результати дослідження.** На малому збільшенні, як і у щурів I серії, добре розрізняють-

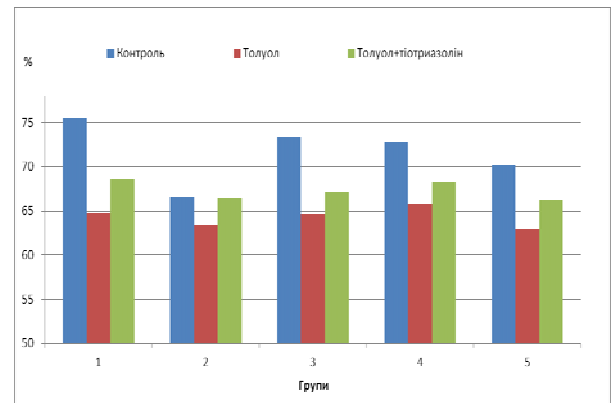
ся між собою кора та мозкова речовина тимусу. Межа між ними у щурів, які зазнавали поєднаного впливу толуолу та тіотриазоліну, була досить вираженою. На препаратах капсула, що оточує орган, виглядає стовщеною та має ознаки розволокнення колагенових структур. В трабекулах, які відходять від внутрішнього шару капсули, в товщі органу спостерігаються кровоносні судини. Навколо артерій ми спостерігали простори, що містили тимоцити. Часточки органу, переважно розміщені на периферії, різною мірою були заміщені жировою тканиною. Макрофагальна реакція в ділянці кори тимусу була вираженою. Клітини мали відносно велику площу цитоплазми, у якій знаходилися уламки ядер клітин.

Деінде зустрічалися трубчасті структури, стінка яких була утворена одношаровим епітелієм. В ранні терміни після припинення поєднаної дії толуолу та тіотриазоліну спостерігали незначне збільшення периваскулярних просторів у ділянці кірково-мозкового з'єднання. В мозковій речовині їх частина формувала тільця Гассала, що склалися з 5-7 клітин (рис. 1).



**Рис. 1.** (А) Зріз тимусу щура 3 групи серії І-Т3; (Б) збільшення ширини трабекул; адипоцити між часточками тимусу; поперечний розтин однієї з тимічних артерій; поздовжній розтин вени. (В) епітеліальні каналі та тільця Гассала; (Г) збільшення тільця Гассала, зображеного на фото (В); довгі стрілки – епітеліоретикулоцити; подвійна стрілка – детрит. Забарвлення – гематоксилін та еозин. К – кора; Кп – капсула; М – мозкова речовина; Т – трабекула.

Частка кори тимусу у щурів 1 групи серії І-Т3 становила 68,67%, що було нижче контрольних значень на 9,02% ( $p=0,133$ ), але перевищувало значення, отримані у тварин, що на тлі дії толуолу одержували тіотриазолін, - на 6,05% ( $p=0,384$ ). Через 7 та 15 днів після припинення дії чинників, що вивчалися, зазначений показник становив відповідно 66,47% та 67,08%. Це було нижче контролю на 0,21% ( $p=0,982$ ) та 8,50% ( $p=0,054$ ) відповідно, але вище значень відповідних груп І серії на 4,83% ( $p=0,449$ ) та 3,77% ( $p=0,494$ ). В 4 та 5 групах тварин серії І-Т3 частка мозкової речовини тимусу складала відповідно 31,74% та 33,76%, що перевищувало контрольні значення на 16,82% ( $p=0,281$ ) та 13,10% ( $p=0,473$ ), але було нижче значень І серії щурів на 7,33% ( $p=0,555$ ) та 8,93% ( $p=0,383$ ) відповідно (рис. 2).



**Рис. 2.** Показники частки кори тимусу за різних умов експерименту.

**Обговорення.** В літературі мають місце різні погляди на механізм післястресової імуносупресії у людей та лабораторних тварин. Головним серед них одні автори вважають прискорення та збільшення виходу тимоцитів з загруднинної залози у кров та периферійні органи імунної системи, що пов'язано з різким підвищенням рівня глюкокортикоїдів в крові внаслідок активації гіпоталамо-гіпофізарно-надниркової осі. На думку інших науковців, це може бути викликано гальмуванням процесів міграції клітин-попередників тимоцитів з червоного кісткового мозку у тимус, а також надлишковою загібеллю подвійно позитивних тимоцитів, чутливих до глюкокортикоїдів [10]. У відповідності до сучасних уявлень, молекулярні механізми впливу глюкокортикоїдів на клітинні мішені базуються на їх взаємодії з цитоплазматичними мембранами цих клітин з наступною активацією відповідних генів. На теперішній час встановлено, що деякі стероїдні гормони (андрогени, естрогени, мінералокортикоїди) здатні здійснювати активність мембранних рецепторів (серотонінових, ГАМК), а також моделювати ферментативну активність тирозинкінази, аденілатциклази, фосфоліпази С та відповідних з

ними системами вторинних месенджерів. Дослідження багатьох дослідників показують вплив глюкокортикоїдів на зміну аденілатциклазної активності клітин. Дія цих гормонів на клітинному рівні є багатоетапною. Вона складається з (1) проникнення через мембрану; (2) зв'язку з фосфорильованим глюкокортикоїдним рецептором (3) трансформації утворившого комплексу внаслідок конформаційних змін в активну його форму, що володіє високим ступенем афінності до ядерних структур; (4) переміщенням його до ядра; (5) зв'язку зі специфічними акцепторними ділянками ДНК, що приводить до синтезу специфічних мРНК. Посередник, що утворився, передається рибосомам, де активує синтез специфічних білків, що руйнують Т-рецепторний комплекс і, як наслідок, переривають сигнал від тимоцитів [9]. В результаті проведеного дослідження показано, що інгаляційний вплив толуолу викликає явища деструкції в корі тимусу. Введення тваринам тіотриазоліну на тлі дії толуолу сприяє менш вираженим деструктивним змінам, що виявлені на світлооптичному рівні.

#### **Висновки:**

1. Деструктивні зміни тимусу, що викликані інгаляційним впливом толуолу, зменшуються при застосуванні тіотриазоліну.

2. При поєднаній дії толуолу та тіотриазоліну вірогідної різниці гістоморфометричних показників з даними, отриманими у контрольних тварин, не встановлено.

**Перспективи подальших досліджень** полягають у вивченні дії тіотриазоліну при інгаляційному впливі толуолу більшої концентрації.

#### **СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ:**

1. Волошин Н.А. Тимус новорожденных / Н.А. Волошин, Е.А. Григорьева. – Запорожье, 2011. – 154 с.
2. Волошин В.М. Морфологічні зміни тимусу статевонезрілих щурів після інгаляційного впливу толуолу / В.М. Волошин // Морфологія. – 2012. – Т.6, №1. – С. 25-29.
3. Заболотный Д.И. Экспериментальное обоснование применения тиотриазолина при аллергическом рините у лиц, профессионально контактирующих с угольной пылью / Д.И. Заболотный, О.Ф. Мельников, М.Г. Александрова // Журн. вушних, носових і горлових хвороб. – 2004. – №2. – С. 18-23.
4. Ковешников В.Г. Функциональная морфология органов иммунной системы / В.Г. Ковешников, Е.Ю. Бибик. – Луганск: Виртуальная реальность, 2008. – 187 с.
5. 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.
6. Сікора В.З. Уразливість органів імунної системи гризунів до експозиції токсикантів протягом онтогенезу / В.З. Сікора // Український морфологічний альманах. – 2012. – Т.10, №2. – С. 133-136.
7. Agus D.B. Re-entry of T cells to the adult thymus is restricted to activated T cells / D.B. Agus, C.D. Surh, J. Sprent // The Journal of Experimental Medicine. – 1991. – Vol.173. – P. 1039-1046.
8. Fan Wang. Effects of exposure to volatile organic compounds (VOCs) on airway inflammatory response in mice / Fan Wang, Chonglei Li, Wei Liu, Yihe Jin // The journal of toxicological sciences. – 2012. – Vol.37, №4. – P. 739-748.
9. Glucocorticoid signaling: a nongenomic mechanism for T-cell immunosuppression / M. Lowenberg, A.P. Verhaar, G.R. van den Brink [et al.] // Trends in Molecular Medicine. – 2007. – Vol.13. – P. 158-163.
10. Mittelstadt P.R. Thymocyte responsiveness to endogenous glucocorticoids is required for immunological fitness / P.R. Mittelstadt, J.P. Monterio, J.D. Ashwell // J. of Clinical Investigation. – 2012. – Vol.122(7). – P. 2384-2394.

*Надійшла 12.11.2013 р.  
Рецензент: проф. С.М. Федченко*