

МОРФОЛОГІЧНІ ЗМІНИ ТИМУСА СТАТЕВОЗРІЛИХ БІЛИХ ЩУРІВ ПІСЛЯ ІНГАЛЯЦІЙНОГО ВПЛИВУ ТОЛУОЛУ

Державний заклад «Луганський державний медичний університет»

(м. Луганськ)

Презентована 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 летучих компонентів епоксидних смол», № державної реєстрації 0109U004615.

Вступ. Останніми роками на наукових форумах та у часописах все більше з'являється повідомлень про особливості будови органів імунної системи, як в нормі, так і за умов дії різноманітних факторів в експерименті [1, 3, 4]. Така увага дослідників до проблем, пов'язаних з морфологією зазначених органів, є цілком зрозумілою, так як імунна система є дуже вразливою до будь-яких змін стану навколишнього середовища [7, 8, 9, 10]. У структурі екологічних факторів велика частка належить аеротехногенним забруднювачам, джерелом яких є промислові підприємства, енергетичні об'єкти, транспорт. Контакт людини з хімічними сполуками спостерігається також у побуті при використанні деяких споживчих товарів та при знаходженні у нових помешканнях або у приміщеннях, у яких нещодавно було зроблено ремонт (захворювання «нової будівлі») [2], коли в атмосфері приміщення накопичуються летючі компоненти будівельних матеріалів.

Одним з таких забруднювачів повітря є толуол (від ісп. *Tolu*, толуанський бальзам) – прозора, безбарвна рідина з характерним запахом. Толуол – гарний розчинник, який використовується у виробництві синтетичних матеріалів. Його додають до бензину (для підвищення октанового числа), бензолу і ксилолу, використовують для виготовлення вибухівки (тринітролуол) та при синтезі деяких фармацевтичних препаратів [5]. Він виробляється в процесі виробництва бензину та інших видів палива з сирої нафти, коксуванні вугілля і, як побічний продукт, при виробництві стиролу. Толуол використовується при виготовленні фарби, розчинників для фарби, лаку для нігтів, лаків, клеїв, виробів з гуми, взуття, в деяких процесах у типографській справі та при дубленні шкіри.

Незважаючи на значну кількість робіт щодо морфології тимуса при впливі на організм лабораторних тварин різних чинників, нам не вдалося знайти роботи, які б демонстрували гістологічну будову органу після інгаляційного впливу толуолу.

Мета дослідження. 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.

Об'єкт і методи дослідження. Робота виконана на 60 білих лабораторних щурах-самцях з початковою масою тіла 130-150 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). Тварини були розділені на контрольну (К₁) та експериментальну (І) серії (по 30 тварин в кожній). Серія І була створена для вивчення інгаляційного впливу толуолу. Контрольні тварини знаходилися в умовах, відповідних до таких, що були створені для щурів І серії (за виключенням контакту з толуолом).

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 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». Забір, фіксацію тимуса та виготовлення парафінових блоків з розміщеними в них шматочками органу виконували у відповідності до загальноприйнятих методик. Виготовляли зрізи тимуса товщиною 4-6 мкм в горизонтальній площині посередині органу. Для вивчення структурних компонентів тимуса гістологічні зрізи забарвлювали гематоксиліном та еозином. Деталі гістологічної будови органу вивчали за допомогою цитоморфологічного комплексу на базі мікроскопа Olympus VX 41. Площу кори та мозкової речовини тимуса визначали за допомогою програми «Master of Morphology» [6], після чого визначали кірково-мозковий індекс. У клітинному складі лімфоїдної популяції тимуса визначали кількість великих лімфоцитів, великих лімфоцитів з ознаками деструкції, середніх лімфоцитів,

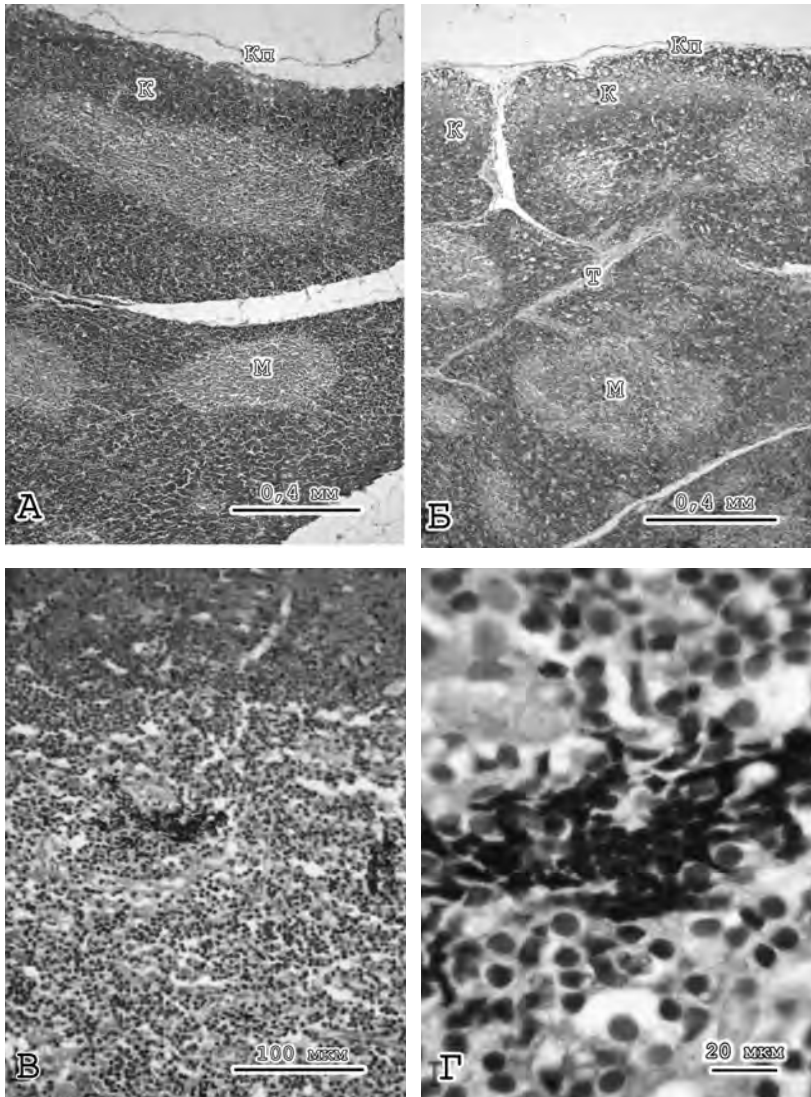


Рис. (А) Зріз тимуса щура 2 групи контрольної серії; **(Б)** зріз тимуса щура 2 групи I серії. Зменшення площі кори. Виразене зменшення кількості тимоцитів в корі;. **(В)** епітеліальна тимома в мозковій речовині тимуса щура 3 групи серії I. Скупчення веретеноподібних клітин; **(Г)** збільшена ділянка з фото **(В)**. К – кора; Кп – капсула; М – мозкова речовина; Т – трабекула; Забарвлення – гематоксилін та еозин.

середніх лімфоцитів з ознаками деструкції, малих лімфоцитів, малих лімфоцитів з ознаками деструкції. Для цього використовували об'єктив $\times 100$ (масляна імерсія) Підрахунок клітин проводили у 6 полях зору на площі 3500 мкм^2 , після чого отримували середнє значення для одного органу. Кількість клітин відповідної субпопуляції перераховували на площу 1 мм^2 . Кількісні показники обробляли з застосуванням методів варіаційної статистики за допомогою програми «Statistica 6. 0». Достовірно вважали статистичну похибку менше 5% ($p < 0,05$). Критичним вважали t-критерій Ст'юдента – 2,23.

Результати досліджень та їх обговорення. Дослідження тимуса щурів I серії показало наявність проявів акцидентальної інволюції органу. На малому збільшенні, як і у контрольних щурів, чітко розрізняються між собою кора та мозкова речовина тимуса. Більш інтенсивне забарвлення кори викликане більшою щільністю розташування в цій ділянці тимоцитів та більшим відсотком малих форм останніх. Межа між кірковою та мозковою речовинами у щурів, які зазнавали впливу толуолу, була досить вираженою. Деякі гістологічні препарати мали

виражену інверсію кори та мозкової речовини. На препаратах капсула, що оточує орган, виглядає стовщеною по відношенню до контролю та має ознаки розволокнення колагенових структур. В трабекулах, які відходять від внутрішнього шару капсули в товщу органу спостерігаються кровеносні судини. Стінка артерій має більшу товщину, ніж у контрольних тварин, за рахунок проліферації ендотеліоцитів. Навколо судин спостерігали простори, що містили тимоцити. Деінде зустрічалися крововиливи у паренхіму тимуса. Часточки органу, переважно розміщені на периферії, різною мірою були заміщені жировою тканиною. Деінде адипоцити зустрічалися і в трабекулах. По відношенню до показників контролю ми спостерігали збільшену кількість макрофагів у корі. Ці клітини мали відносно велику площу цитоплазми, у якій знаходилися уламки ядер клітин. Кількість популяції епітеліоретикулоцитів зазнавала значних змін та протягом експерименту мала фазний характер. З'являлися активовані клітини з дуже світлим ядром та великою площею цитоплазми. В мозковій речовині їх частина формувала тільки Гассалю, що складалася з 5-7 клітин. Епітеліальні каналці у щурів, які зазнавали впливу толуолу, виявлялися частіше за контроль як у корі, так і в мозковій речовині тимуса.

Частка кори тимуса щурів, які зазнавали впливу толуолу, у структурі його паренхіми зменшувалася по відношенню до контрольних показників (**рис. А, Б**). В 1, 2 та 3 групах тварин I серії зазначений показник становив 64,75%, 63,41% та 64,64% відповідно. Це на 14,22% ($p=0,045$), 4,80% ($p=0,513$) та 11,83% ($p=0,009$) менше за показники відповідних груп контролю. Відповідно, частка мозкової речовини зростала, що знайшло своє відображення у зменшенні показника кірково-мозкового індексу у щурів, які знаходилися за умов інгаляційного впливу толуолу. Статистично вірогідну різницю зазначеного індексу з показниками контрольної серії ми спостерігали через 1 та 15 днів після припинення дії чинника, що вивчався.

У тварин, які зазнавали впливу толуолу, спостерігалось зменшення кількості клітин лімфоїдної популяції як в корі, так і в мозковій речовині тимуса. Загальна кількість клітин лімфоїдної популяції у субкапсулярній ділянці кори щурів, які зазнавали впливу толуолу, відрізнялася від контрольних значень у бік зменшення на 10,51 % ($p=0,010$), 8,67 % ($p=0,104$) та 9,45 % ($p=0,084$) – через 1, 7 та 15 днів після припинення дії чинника, що вивчався. В 4 та 5 групах тварин ця розбіжність склала 5,83 % ($p=0,054$) та 4,76 % ($p=0,309$) відповідно. Більш виражений вплив інгаляційної дії толуолу ми спостерігали при вивченні кількості тимоцитів у глибокій ділянці кори органу, де зазначений показник також був менше контролю. В 1 та 2 групах розбіжність з даними контрольної серії становила 15,33 % ($p<0,001$) та 12,44 % ($p=0,002$), а через 15, 30 та 60 днів після припинення дії толуолу – 10,28 % ($p=0,012$), 9,34 % ($p=0,002$) та 7,84 % ($p=0,022$) відповідно.

У мозковій речовині тимуса через 1, 7 та 15 днів після припинення дії толуолу загальна кількість тимоцитів по відношенню до контрольних значень склала 87,53 % ($p<0,001$), 89,05 % ($p=0,013$) та 90,27 % ($p=0,030$). Загальна кількість клітин лімфоїдної популяції в мозковій речовині тимуса щурів 2 групи експериментальної серії виглядала наступним

чином. Великі лімфоцити – 2593,17/мм² (18,64%), великі лімфоцити з проявами деструкції – 254,67/мм² (1,83%), середні лімфоцити – 3280,67/мм² (23,58%), середні лімфоцити з проявами деструкції – 553,67/мм² (3,98%), малі лімфоцити – 5390,00/мм² (38,74%), малі лімфоцити з проявами деструкції – 1394,17/мм² (10,02%), лімфоцити в стадії апоптозу – 446,67/мм² (3,21%). У цій групі щурів серед перерахованих показників контроль перевищували кількість великих лімфоцитів, малих лімфоцитів з деструкцією та апоптотичних клітин. В одному випадку було зафіксовано явища епітеліальної тимоми у щура I серії (рис. В, Г).

Висновки.

1. У тварин, які зазнавали впливу толуолу, спостерігалось зменшення кількості клітин лімфоїдної популяції як в корі, так і в мозковій речовині.

2. Після впливу толуолу в різних морфофункціональних ділянках тимуса поруч з проявами інтоксикації зустрічаються компенсаторні зміни.

Перспективи подальших досліджень. Подальші дослідження будуть пов'язані з визначенням гістологічної будови тимуса після інгаляційного впливу толуолу на організм щурів інших вікових груп та більш детальним вивченням морфології тимічних тілець.

Література

1. Волошин Н. А. Тимус новорожденных / Н. А. Волошин, Е. А. Григорьева. – Запорожье, 2011. – 154 с.
2. Долина Л. Ф. Загрязнение воздушной среды помещений неприятными запахами и методы их устранения / Л. Ф. Долина, Т. Т. Данько, В. В. Беляева // *Екологія і природокористування*. – 2008, Вип. 11. – С. 143-152
3. Кашченко С. А. Современные представления о строении тимуса / С. А. Кашченко, А. А. Захаров // *Перспективы медицины та біології*. – 2010. – Т. II., №1. – С. 22-32.
4. Ковешников В. Г. Функциональная морфология органов иммунной системы / В. Г. Ковешников, Е. Ю. Бибики. – Луганск: «Виртуальная реальность», 2007. – 172 с.
5. Мерзликин С. И. Разработка методики газохроматографического определения остаточных количеств этанола и толуола в диакамфе / С. И. Мерзликин, А. А. Зинченко // *Фармаком*. – 2003. – №2. – С. 1-4.
6. 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.
7. 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.
8. Blackburn C. Clare. Developing a new paradigm for thymus organogenesis / C. Clare Blackburn, Nancy R. Manley // *Nature Review Immunology*. – 2004. – Vol. 4. – P. 278-289.
9. Elmore S. A. Enhanced Histopathology of the Thymus / S. A. Elmore // *Toxicologic Pathology*. – 2006. – Vol. 34. – P. 656-665.
10. Koveshnikov V. Peculiarities of the structure of spleen under the influence of toluene / V. Koveshnikov, V. Luzin, V. Voloshin, I. Voloshina // *Joint meeting of anatomical societies (Bursa-Turkey, 19-22 May 2011)*. – Posters A. – P. 56.

УДК 611.41:061

МОРФОЛОГІЧНІ ЗМІНИ ТИМУСА СТАТЕВОЗРІЛИХ БІЛИХ ЩУРІВ ПІСЛЯ ІНГАЛЯЦІЙНОГО ВПЛИВУ ТОЛУОЛУ

Волошин В. М.

Резюме. У презентованій статті наводяться дані про гістологічну будову тимуса білих лабораторних щурів самців після інгаляційного впливу толуолу. У дослідженні використовували тварин з початковою масою тіла 130-150 г. Щури знаходилися в умовах впливу толуолу у концентрації 500 мг/м³ протягом 60 днів (5 днів на тиждень / 5 годин на добу). Результати дослідження вказують на зменшення кількості клітин лімфоїдної популяції як в корі, так і в мозковій речовині тимуса після впливу вказаного чинника. Частка кори тимуса щурів, які зазнавали впливу толуолу, зменшувалася по відношенню до контрольних показників. Через 1, 7 та 15 днів після припинення дії толуола зазначений показник становив 64,75 %, 63,41 % та 64,64 % відповідно, що на 14,22 % ($p=0,045$), 4,80 % ($p=0,513$) та 11,83 % ($p=0,009$) менше за показники відповідних груп контролю.

Ключові слова: тимус, гістологія, толуол, токсичність.

УДК 611. 41:061

МОРФОЛОГИЧЕСКИЕ ИЗМЕНЕНИЯ ТИМУСА ПОЛОВОЗРЕЛЫХ БЕЛЫХ КРЫС ПОСЛЕ ИНГАЛЯЦИОННОГО ВЛИЯНИЯ ТОЛУОЛА

Волошин В. Н.

Резюме. В статье представлены данные о гистологическом строении тимуса белых лабораторных крыс самцов после ингаляционного влияния толуола. В исследовании использовали животных с исходной массой 130-150 г. Крысы находились в условиях влияния толуола в концентрации 500 мг/м³ в течение 60 дней (5 дней в неделю / 5 часов в сутки). Результаты исследования указывают на снижение количества клеток лимфоидной популяции как в коре, так и в мозговом веществе тимуса после влияния указанного фактора. Часть коры тимуса животных, которые подвергались действию толуола, уменьшалась по отношению к контрольным показателям. Через 1, 7 и 15 дней после прекращения действия толуола этот показатель составил 64,75%, 63,41% и 64,64% соответственно, что на 14,22% ($p=0,045$), 4,80% ($p=0,513$) и 11,83% ($p=0,009$) меньше показателей соответствующих групп контроля.

Ключевые слова: тимус, гистология, толуол, токсичность.

UDC 611. 41:061

Morphological Changes in Thymus of the Adult White Rats after Inhalation of Toluene

Voloshin V. N.

Abstract. Toluene (methylbenzene, toluol, phenylmethane) is an aromatic hydrocarbon commonly used as an industrial solvent for the manufacturing of paints, chemicals, pharmaceuticals, and rubber. In this study, we aimed to investigate the histology of thymus of rats exposed to inhalation of toluene. The toxicity of toluene vapor was evaluated in male albino rats (6/group) via inhalation exposure.

Sixty adult male laboratory albino rats (*Rattus norvegicus*) were obtained from Lugansk State Medical University Laboratories (Lugansk, Ukraine). When received, the subjects were 88-92 days of age and weighed 130-150 g. Subjects were caged (6/cage) in polycarbonate cages with hardwood bedding. Stainless steel wire mesh cages were used in the exposure chambers. Temperatures were maintained at $22^{\circ}\text{C} \pm 3^{\circ}\text{C}$, with a relative humidity of 40-60%. Lighting was timer-controlled to provide a 12-h light-dark cycle, with light onset at 7:00 a. m.

The test animals were exposed to target concentrations of 0 (air control) and 500 mg/m³ or 133 parts per million (ppm) of toluene in air for 5 hours/day, 5 days/week, for 2 month. Day one, seven, sixteen, thirty one and sixty one, after the last administration of test toluene, rats were weighted and decapitated. Thymus sections were stained with haematoxylin and eosin.

Thymuses from toluene exposed and control rats were fixed with 4% paraformaldehyde in 0.01 M PBS. After fixation, one middle cross-section from the spleen was embedded in paraffin wax. A section from each paraffin block was stained with haematoxylin and eosin for histopathological evaluation by light microscope (Olympus BX-41). There were determined number of (1) large lymphocytes, (2) large lymphocytes with signs of destruction, (3) medium lymphocytes, (4) lymphocyte medium with signs of degradation, (5) small lymphocytes, (6) small lymphocytes with signs of degradation in the cortex and medulla of the thymus. To do this, we used the lens x100 (oil immersion). Calculation of cells was performed in 6 fields of view on the area of 3500 μm^2 , then the average value obtained for a single organ. The number of cells was counted in the relevant subpopulation area of 1 mm². Statistical analyses were performed using one-way analysis of variance (ANOVA) followed by a post hoc test. The distribution of data was checked for normality by the Kolmogorov-Smirnov test. Numeric data for each series A p value of <0.05 was regarded as significant. Statistical analysis was performed by the Statistica for Windows 6.0 software. Study of rat thymus showed the presence of a series of manifestations of accidental involution of the organ. At low magnification, as well as in control rats, clearly differ cortex and medulla of the thymus. More intense staining of the cortex is produced by higher density thymocytes in this area and larger percentage of small forms of the latter. The boundary between cortex and medulla in rats exposed to toluene, was quite severe. Some histological preparations were pronounced inversion of the cortex and medulla.

Thymic cortex area of rats exposed to toluene decreased in relation to the control. These data were 64.75%, 63.41% and 64.64% after finish of exposure (1, 7 and 15 days respectively). These were 14.22% ($p=0.045$), 4.80% ($p=0.513$) and 11.83% ($p=0.009$) lower than in the corresponding control groups. It was shown decrease of the number of lymphoid cell populations in both the cortex and medulla of the thymus of animals exposed to toluene.

Total number of lymphoid cell populations in the subcapsular region of the cortex of rats exposed to toluene was decreased in relation to control at 10.51% ($p=0.010$), 8.67% ($p=0.104$) and 9.45% ($p=0,084$) – 1, 7 and 15 days after finish of exposure. The 4 and 5 groups of animals, this difference was 5.83% ($p=0.054$) and 4.76% ($p=0.309$), respectively. A more pronounced effect of inhalation of toluene we observed in the study of thymocytes in the deep area of the cortex, where the data was also less control. In the animal groups 1 and 2, the difference with the data of control was 15.33% ($p<0.001$) and 12.44% ($p=0.002$). There were 10.28% ($p=0.012$), 9.34% ($p=0.002$) and 7.84% ($p=0.022$), respectively, 15, 30 and 60 days after finish of toluene exposure. In conclusion, inhalation of toluene causes atrophic effects in the rat thymus.

Key words: thymus, histology, toluene, toxicity.

Рецензент – проф. Костиленко Ю. П.

Стаття надійшла 7. 10. 2013 р.