

© Бочарова Т. В.

УДК 616.438 – 001.14/.15 – 036.12 – 091.8 – 092.9 : 613.863

**Бочарова Т. В.**

## **МОРФОМЕТРИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ СТРУКТУРНЫХ ИЗМЕНЕНИЙ В ТИМУСЕ КРОЛИКОВ ПОД ВЛИЯНИЕМ ХРОНИЧЕСКОГО СВЕТОВОГО СТРЕССА**

**Харьковский национальный медицинский университет (г. Харьков)**

**bochata@ukr.net**

Исследование выполнено в рамках академической НИР «Дослідити механізми прискороеного старіння при гіпопінеалізмі: хронобіологічні аспекти» (№ государственной регистрации 0113U001282).

**Вступление.** Особенностью физиологии иммунной системы является ее чрезвычайная динамичность за счет постоянных процессов пролиферации, дифференцировки, миграции, кооперации и апоптоза, что обуславливает необходимость ее рассмотрения в пространственно-временном аспекте. Характер структурно-временной организации иммунной системы является генетически обусловленным и отражает ее функциональное состояние. Различным заболеваниям, которые сопровождаются иммунными нарушениями, может предшествовать рассогласование суточных ритмов. Это происходит в первую очередь в результате нарушений синтеза гормона эпифиза мелатонина, который обеспечивает сохранность биоритмов всего организма на протяжении суток. При нарушении циркадных ритмов в эксперименте на животных наблюдаются расстройства функции иммунокомпетентных клеток, выражающиеся в иммунодефицитных, аутоиммунных и аллергических состояниях [6].

История изучения вилочковой железы насчитывает более 2000 лет. Однако до сих пор не ясны многие функции гормонов и полипептидов, которые она продуцирует. В настоящее время тимус считается центральным органом иммунной системы, где происходит дифференцировка и созревание лимфоцитов. В тоже время доказана его эндокринная функция. Получены доказательства общности пептидной регуляции нейронов и иммунокомпетентных клеток [9]. Известно, что выключение функции гипофиза, приводит к аплазии тимуса, снижению секреции гормонов эпителиальными клетками и ускорению возрастной инволюции вилочковой железы [8].

Вся живая материя живет и развивается, подчиняясь сложным ритмическим структурам различных полей космического пространства. Микроорганизмы, так же как животные и растения, чутко реагируют на изменения внешних условий существования. Нарушения суточных ритмов и различные колебания геомагнитного поля Земли приводят к развитию в организме человека состояния, характеризующегося несоответствием между функциональными возможностями и

уровнем его активности, что может создать условия для развития патологических состояний. Результаты научных исследований свидетельствуют о несомненной роли структурно-функциональных нарушений иммунной системы млекопитающих, в том числе человека, развивающихся при длительном воздействии периодических гелиогеофизических изменений [5].

**Целью исследования** явилось обнаружение структурно-функциональных нарушений в вилочковой железе под действием хронического светового стресса.

**Объект и методы исследования.** Эксперимент проведен на половозрелых кроликах породы «Шиншилла», которые содержались в условиях вивария на стандартном рационе. Контрольные кролики (n=7) находились в условиях естественной смены дня и ночи. Подопытные животные (n=28) днем находились под естественным освещением, ночью – под электрическим (интенсивность света составила 30-40 люкс). Экспериментальные животные выводились из эксперимента через 2, 4 и 6 месяцев (группа 2м, 4м, 6м). После извлечения тимус взвешивали и определяли процентное отношение массы тимуса к массе кролика. Кусочки органа фиксировали в формалине. После стандартной гистологической проводки изготавливались срезы толщиной 5 мкм, которые окрашивались гематоксилин-эозином и по методу ван Гизон. Микроскопические и морфометрические измерения проводились на микроскопе Olympus BX-41 с использованием программы Olympus DP-Soft (Version 3:1). Определяли относительные объемы основных структурных компонентов тимуса (стромы и сосуды, корковое и мозговое вещество, стромально-паренхиматозное отношение (СПО)) с использованием сетки на 100 точек [1]. Кроме того, определялась плотность клеток в коре и мозговом веществе (количество клеток на 100 мкм<sup>2</sup>). Полученные цифровые данные обрабатывались с использованием методов вариационной статистики, вероятность отличий в малых выборках вычисляли с помощью критерия Стьюдента. Математический анализ полученных данных проводился с помощью программы Microsoft «EXCEL».

Эксперимент проведен в соответствии с положением Европейской конвенции о защите позвоночных животных, используемых в экспериментальных и других научных целях (Страсбург, 1986 г.), Директивы Совета Евро-

пы 86/609/ЕЕС (1986 г.), Законом Украины № 3447 – IV «Про захист тварин від жорсткого поводження», общими этическими принципами проведения экспериментов на животных, одобренных Первым национальным конгрессом Украины по биоэтике (2001 г.).

**Результаты исследования и их обсуждение.** Через 2 месяца эксперимента определяется увеличение массы тимуса, по сравнению с контрольной группой. Увеличено также процентное отношение массы тимуса к массе кролика (**табл. 1**). Морфометрические показатели указывают на увеличение относительного объема коры и стромы и уменьшение относительного объема мозгового вещества. При этом СПО также увеличено, по сравнению с группой контроля (**табл. 2**). Плотность клеточных элементов оказалась достоверно больше лишь в корковом веществе, тогда как в мозговом – плотность клеток не отличалась от контроля (**табл. 3**). Отдельные исследователи отмечали подобную картину в тимусе в первой стадии инфекционного процесса, для которой характерным было усиление функциональной активности эпителиальных клеток, увеличение пролиферативной активности лимфоцитов коркового вещества, сопровождающееся увеличением массы органа [4].

После 4 месяцев эксперимента масса тимуса достоверно выше, чем у контрольных животных (**табл. 1**). Относительный объем коркового вещества увеличен по сравнению с контрольной группой, но несколько ниже, чем в предыдущей. Относительный объем мозгового вещества, как и в предыдущей группе, ниже аналогичных показателей контрольной группы. Относительный объем стромы в два раза больше, чем в контроле. Показатели СПО также выше, чем в контрольной группе (**табл. 2**). Плотность клеточных элементов в корковом веществе снизилась, по сравнению с предыдущей группой и приблизилась к показателям контроля. Тогда как плотность лимфоцитов в мозговом веществе достоверно выше, чем у интактных животных (**табл. 3**). Подобные изменения характерны для первой стадии акцидентальной трансформации тимуса, когда происходит активация функции вилочкой железы за счет пролиферации лимфобластов и макрофагов с появлением так называемой картины «звездного неба» [3]. Волкова Л.В. считает, что подкапсульное пространство и корковое вещество являются наиболее уязвимыми зонами тимуса при стрессовом воздействии. На фоне структурной дезорганизации этих отделов имеет место стимуляция процессов дифференцировки лимфоцитов и миграция последних из коркового слоя в

Таблица 1.

**Масса кролика, тимуса и отношение массы тимуса к массе кролика в контрольной и экспериментальных группах (M±m)**

Группы	Масса кролика (МК), г	Масса тимуса (МТ), г	МТ/МК, %
Контроль	3676±146,9	5,08±0,39	0,13
Группа 2 м	3583,75±216,3	5,55±0,39	0,16
Группа 4 м	3948,57±301,1	6,01±0,46**	0,15
Группа 6 м	4306,15±164,6*	3,98±0,25*	0,09

Примечание: \*p<0,05, \*\*p<0,01 (в сравнении с группой контроля).

мозговой и далее в кровотока [2]. Считается также, что постпубертатная инволюция тимуса начинается с коркового слоя и характеризуется лимфоцитарным истощением, усилением склеротических процессов и жировой трансформацией паренхимы [10].

Спустя 6 месяцев эксперимента масса тимуса резко уменьшается, при этом отношение массы органа к массе кролика достоверно меньше, по сравнению с контролем и предыдущими группами (**табл. 1**). В первую очередь это связано с уменьшением паренхимы органа и замещением ее жировой и соединительной тканью. Относительные объемы коркового и мозгового вещества ниже, чем в группе контроля, а объемы стромы увеличены практически в 3 раза. СПО соответственно выше, чем в предыдущих группах и в группе контроля (**табл. 2**). Плотность лимфоцитов резко снижена как в корковом веществе, так и в мозговом (**табл. 3**).

Согласно исследованиям Сергиевича Л.А. и соавт., в механизмах развития патологических процессов в иммунной системе большое значение принадлежит угнетению функции тимуса. Авторы показали, что в результате постоянного гамма-излучения в малых дозах у большинства животных отмечалось снижение функции тимоцитов, что свидетельствует о депрессии синтетических процессов в клетках, связанных как со снижением пролиферативной активности клеток, так и с усилением гибели клеток [7].

Таблица 2.

**Относительные объемы основных структурных компонентов тимуса кроликов в контрольной и экспериментальных группах (M±m), %**

Группы	Строма	Сосуды	Корковое вещество	Мозговое вещество	СПО
Контроль	4,77±0,14	2,07±0,1	60,21±0,4	32,95±0,4	0,07±0,02
Группа 2 м	7,83±0,17*	2,06±0,07	69,78±0,37*	20,33±0,32*	0,11±0,001*
Группа 4 м	8,05±0,18*	2,02±0,08	66,4±0,57*	23,53±0,5*	0,11±0,002*
Группа 6 м	12,21±0,26*	2,18±0,74	57,82±0,88*	27,79±0,81*	0,17±0,004*

Примечание: \*p<0,001 (в сравнении с группой контроля).

**Выводы.** Реакция вилочковой железы на хроническое световое раздражение не однозначна и зависит от продолжительности воздействия. Через 2 месяца эксперимента отмечается увеличение массы органа, связанное с гиперплазией коркового вещества и увеличением плотности клеточных элементов коры. Через 4 месяца длительной световой нагрузки на фоне гиперплазии коры наблюдается перераспределение лимфоцитов в сторону мозгового вещества. В более поздние сроки (через 6 месяцев) в вилочковой железе наблюдается гипоплазия как коркового, так и мозгового вещества с резким обеднением клеточного состава паренхимы. Следует обратить внимание на усиление склеротических процессов уже с первых месяцев эксперимента, что проявляется в виде увеличения относительных объемов стромального компонента и стромально-паренхиматозного отношения.

Таблица 3.

**Плотность клеток тимуса кроликов в контрольной экспериментальных группах ( $M \pm m$ ), ед. в 100 мкм<sup>2</sup>**

Группы	Корковое вещество	Мозговое вещество
Контроль	510,83±2,19	397,58±1,05
Группа 2 м	532,73±2,72*	393,57±2,63
Группа 4 м	504,15±3,19	441,12±2,92*
Группа 6 м	399,74±1,24*	293,65±1,98*

**Примечание:** \* $p < 0,001$  (в сравнении с контрольной группой).

**Перспективы дальнейших исследований.**

В дальнейшем необходимо проведение комплексного исследования с использованием иммуногистохимических методик с целью определения качественного состава тимоцитов, оценки их пролиферативной активности и определения степени интенсивности апоптоза для выявления негативного влияния хронического светового стресса на функциональную активность всей иммунной системы в целом.

**Литература**

1. Автандилов Г.Г. Основы количественной патологической анатомии / Г.Г. Автандилов. – М.: Медицина, 2002. – 240 с.
2. Волкова Л.В. Морфофункциональные изменения в тимусе и селезенке при стрессовых воздействиях (экспериментально-морфологическое исследование): автореф. на соискание ученой степени доктора мед. наук: спец. 14.00.02 «Анатомия человека» / Л.В. Волкова. – Москва, 1996. – 42 с.
3. Ивановская Т.Е. Патология тимуса у детей / Т.Е. Ивановская, О.В. Зайратьянц, Л.В. Леонова [и др.]. – СПб.: Сотис, 1996. – 270 с.
4. Киселева Н.М. Возможная роль тимуса в работе стресс-лимитирующей системы / Н.М. Киселева, А.Н. Иноземцев // Иммунология, аллергология, инфектология. – 2010. – № 3. – С. 13-20.
5. Кострюкова Н.К. Некоторые патогенетические механизмы биотропных эффектов слабых физических полей / Н.К. Кострюкова, В.А. Карпин, А.Б. Гудков // Экология человека. – 2006. – № 8. – С. 52-57.
6. Литвиненко Г.И. Морфофункциональные изменения в клетках иммунной системы при нарушении светового режима и иммунопатологии: автореф. дис. на соискание ученой степени доктора мед. наук: спец. 03.03.04 «Клеточная биология, цитология, гистология» / Г.И. Литвиненко. – Новосибирск, 2011. – 35 с.
7. Сергиевич Л.А. Изменение функциональной активности синтетического аппарата тимоцитов крыс под действием острого и хронического гамма-излучения / Л.А. Сергиевич, Н.А. Карнаухова // Радиационная биология. Радиоэкология. – 2002. – Т. 42, № 1. – С. 48-53.
8. Ярилин А.А. Тимус как орган эндокринной системы / А.А. Ярилин, И.М. Беляков // Иммунология. – 1996. – № 1. – С. 4-10.
9. Garber S.L. Peptide hormones and their receptors in the immune system: immunomodulation and the neuro-immune axis / S.L. Garber // Einstein Quart. – 2006. – V. 4, № 3. – P. 112-116.
10. Raica M. Involution of the thymus: a possible diagnostic pitfall / M. Raica, A.M. Cimpean, S. Encica, R. Cornea // Romanian Journal of Morphology and Embryology. – 2007. – V. 48, № 2. – P. 101-106.

УДК 616.438 – 001.14/.15 – 036.12 – 091.8 – 092.9 : 613.863

**МОРФОМЕТРИЧНИЙ АНАЛІЗ СТРУКТУРНИХ ЗМІН В ТИМУСІ КРОЛІВ ПІД ВПЛИВОМ ХРОНІЧНОГО СВІТЛОВОГО СТРЕСУ**

**Бочарова Т. В.**

**Резюме.** Порушення світлового режиму приводить до різних захворювань, які супроводжуються імунними порушеннями. Експеримент проведений на молодих статевозрілих кролях (n=28), що утримувалися в умовах цілодобового освітлення. Контрольні тварини (n=7) знаходилися в умовах природної зміни дня та ночі. Проведено морфометричне дослідження тканини тимуса з визначенням основних структурних компонентів та щільності клітин. Встановлено, що реакція тимуса на тривале світлове подразнення залежить від тривалості дії. В перші місяці експерименту спостерігалось посилення активності тимуса зі збільшенням маси органу, гіперплазією кори та підвищенням щільності клітин з подальшою міграцією лімфоцитів з коркового шару до мозкового. Наприкінці експерименту спостерігалось виснаження паренхіми тимуса з вираженою гіпоплазією коркового та мозкового шару, зниженням клітинності та посиленням склеротичних процесів.

**Ключові слова:** тимус, цілодобове освітлення, світловий стрес, морфометрія.

УДК 616.438 – 001.14/.15 – 036.12 – 091.8 – 092.9 : 613.863

### МОРФОМЕТРИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ СТРУКТУРНЫХ ИЗМЕНЕНИЙ В ТИМУСЕ КРОЛИКОВ ПОД ВЛИЯНИЕМ ХРОНИЧЕСКОГО СВЕТОВОГО СТРЕССА

Бочарова Т. В.

**Резюме.** Нарушения светового режима приводят к различным заболеваниям, которые сопровождаются иммунными нарушениями. Эксперимент проведен на молодых половозрелых кроликах (n=28), которые удерживались в условиях длительного круглосуточного освещения. Контрольные животные (n=7) находились в условиях природной смены дня и ночи. Проведено морфометрическое исследование ткани вилочковой железы с определением относительных объемов основных структурных компонентов и плотности клеток. Установлено, что реакция тимуса на длительное световое раздражение зависит от продолжительности воздействия. В первые месяцы эксперимента наблюдается усиление активности вилочковой железы с увеличением массы органа, гиперплазией коры, усилением плотности клеток и последующей миграцией лимфоцитов из коркового слоя в мозговой. В конце эксперимента происходит истощение паренхимы тимуса с выраженной гипоплазией коркового и мозгового слоев, снижением клеточности и усилением склеротических процессов.

**Ключевые слова:** тимус, круглосуточное освещение, световой стресс, морфометрия.

UDC 616.438 – 001.14/.15 – 036.12 – 091.8 – 092.9 : 613.863

### STRUCTURAL CHANGES OF THE RABBIT'S THYMUS DUE TO THE INFLUENCE OF A CHRONIC LIGHT STRESS: A MORPHOMETRIC ANALYSIS

Bocharova T. V.

**Abstract.** The characteristic of an immune system is an extremely dynamic due to permanent processes of the proliferation, the differentiation, the migration and the cooperation of all immune components. The disorders of a circadian rhythm lead to different disease, combined with an immune dysfunction. The causes of these disorders are a hypopinealism and a deficient production of melatonin.

Aim of the study – to establish the structural peculiarities of the thymus under a chronic light stress using morphometric criteria.

**Material and methods.** 35 adult rabbits were used. Animals were kept in different light models. Control animals (7 rabbits) were under a natural day and night lightening condition. Test animals (28 rabbits) were kept under a natural lightening in the day period and under an electric lightening in the night. Observations were made using a microscope Olympus BX-41. The histological sections stained with Hematoxylin and Eosin and van Gieson were examined by morphometry using program Olympus DP-Soft (Version 3:1). In each field the number of points lying over each structural component was counted. As the grid consists of 100 points, each count represented the percentage of the total area occupied by a specific component. The areas of the stromal-vascular component, the cortex and the medullar part, the stromal-parenchymatous ratio were directly measured and calculated as a percent of the total area examined. The density of the cells in the different structural-functional zones of the thymus (N/100  $\mu$ ml) was calculated.

The great increase of the thymus's weight was recorded after the second and the fourth month of all-day illumination. Morphometric analysis showed that the compartment occupied by the cortex and the stroma of the thymus was greater in these experimental groups. The number of the cells in the cortex was statistically increased in the rabbit's thymus after 2 month of the experiment but after 4 month the increase of the cell density was found only in the medullar part of the thymus. These changes showed the intensification of the lymphocytic migration from the cortex into the medullar part. At the end of the experiment the thymus's weight was decreased. The compartment occupied by the cortex and the medullar part was decreased too but the compartment occupied by stroma was increased by 3 times. The cell density was greatly reduced in all part of the thymus after 6 month of the experiment.

The reaction of the thymus on a chronic light irritation is ambiguous and depends on duration of the exposure. The increase of the thymus's weight due to the hyperplasia of the cortex and the increase of the cell density was found after 2 month of all-day illumination. The redistribution of the lymphocytes in the thymus's cortex was observed after 4 month of the experiment. A hypoplasia of the cortex and the medullar part of the thymus in combinations with a sharp depletion of the cellular composition of the parenchyma were revealed at the end of the experiment. The decrease of the sclerotic processes had been found since the very first month of all-day illumination. These changes indicate both a premature aging of the thymus and probably of all immune system.

**Keywords:** thymus, all-day illumination, light stress, morphometry.

Рецензент — проф. Шерстюк О. О.

Статья надійшла 15.05.2016 року