

УДК 576.3/7:591.147.3:599.323.41:533.6.013.8

© Г.А. Мороз, 2012.

## МОРФОФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ ИЗМЕНЕНИЯ В ТИМУСЕ КРЫС ЗРЕЛОГО ВОЗРАСТА ПРИ ПОВТОРЯЮЩЕМСЯ ВОЗДЕЙСТВИИ ГИПЕРГРАВИТАЦИИ И НА ФОНЕ ПРИМЕНЕНИЯ ГЛУТАРГИНА

Г.А. Мороз

*Кафедра лечебной физкультуры и спортивной медицины, физиотерапии с курсом физвоспитания (зав. кафедрой – д.мед.н., доц. Г.А. Мороз), Государственное учреждение «Крымский государственный медицинский университет им. С. И. Георгиевского», г. Симферополь.*

### MORPHO-FUNCTIONAL CHANGES IN MATURE RAT THYMUS UNDER REPEATED HYPERGRAVITY AND GLUTARGIN USE

G.A. Moroz

## SUMMARY

Mature male Wistar rats were exposed to hypergravity (9 g, 10 minutes, daily, 10 times). Morphology of thymus was investigated by light and transmission electron microscopy. Clashing of accidental involution and disturbances of microcirculation, caused by systematic hypergravity, with age-related changes were revealed. Use of glutargin as an adaptogen helps in development less marked circulatory and involutive alterations. Glutargin increases adaptive potential of thymus.

### МОРФОФУНКЦІОНАЛЬНІ ЗМІНИ В ТИМУСІ ЩУРІВ ЗРІЛОГО ВІКУ ПРИ ПОВТОРЮВАНІЙ ДІЇ ГІПЕРГРАВІТАЦІЇ ТА НА ФОНІ ЗАСТОСУВАННЯ ГЛУТАРГІНУ

Г.О. Мороз

## РЕЗЮМЕ

За допомогою світлової і електронної мікроскопії вивчені морфофункціональні зміни в тимусі щурів-самців лінії Вістар зрілого віку, яких щодня впродовж 10 днів піддавали 10-хвилинній дії гіпергравітації (9 g). Виявлені морфофункціональні перетворення, що характеризуються накладенням процесів акцидентальної інволюції та мікроциркуляторних порушень, викликаних систематичною дією гравітаційних перевантажень, на вікові зміни. Застосування глутаргіну як адаптогену сприяє розвитку менш виражених циркуляторних розладів та інволютивних змін, що забезпечує підвищення адаптаційного потенціалу тимуса.

**Ключевые слова:** морфология тимуса, крыса, гипергравитация, глутаргин.

Реакция организма на внешние воздействия во многом зависит от морфофункционального состояния одного из центральных органов иммуногенеза – тимуса, отвечающего за Т-клеточное звено иммунитета и выступающего связующим звеном во взаимодействии нейроэндокринной и иммунной систем в поддержании гомеостаза. Тимус в течение жизни претерпевает возрастную инволюцию [1], а при стрессорных воздействиях развивается акцидентальная инволюция органа. Оба вида инволюции характеризуются снижением массы тимуса, сокращением лимфоцитарной популяции и замещением паренхимы соединительной и жировой тканью [5]. В молодом возрасте умеренная экстремальная ситуация мобилизует приспособительные возможности организма, тогда как в стареющем организме, на фоне развивающегося стресс-возраст-синдрома, дополнительные стрессы могут привести к возникновению вторичного иммунодефицита, вызванного быстрой инволюцией органа [6]. Однако на сегодняшний день в научных работах, посвященных изучению тимуса при действии экстремальных факторов, зачастую освещаются вопросы морфофункционального состояния

органа без акцента на возраст [3]. И практически отсутствуют данные о возрастных особенностях реактивности тимуса на систематические гравитационные перегрузки. Также остаются не реализованными возможности фармакологической коррекции, возникающих при этом, дезадаптивных изменений.

Цель исследования – изучить морфофункциональные преобразования в тимусе крыс зрелого возраста при повторяющемся гипергравитационном воздействии и возможность их коррекции глутаргином.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Исследование проведено на 24 крысах-самцах линии Вистар с исходной массой 260-280 г. Животные были разделены на 4 серии: две контрольные (К-1 и К-2) и две экспериментальные (ГП и Гл), по 6 крыс в каждой. Крыс серии ГП ежедневно на протяжении 10 дней подвергали 10-минутному воздействию поперечно-направленных гравитационных перегрузок величиной 9 g. Гипергравитация моделировалась путем вращения животных в периферических контейнерах центрифуги Ц-2/500. Крысы серии Гл испытывали аналогичные перегрузки на фоне внутри-

брюшинного введения глутаргина в дозе 100 мг/кг массы животного [4]. Контрольные крысы серии К-1 не подвергались гравитационным перегрузкам, во время опыта они находились в однотипных контейнерах, размещенных на наружной плоскости центрифуги. Крысы серии К-2 так же не подвергались перегрузкам, но за 30 мин до начала опыта им вводили стерильный физиологический раствор в эквивалентной дозе. Животных выводили из эксперимента на следующий день после последнего сеанса гипергравитации методом декапитации под эфирным наркозом. Эксперимент был проведен с соблюдением действующих биоэтических норм.

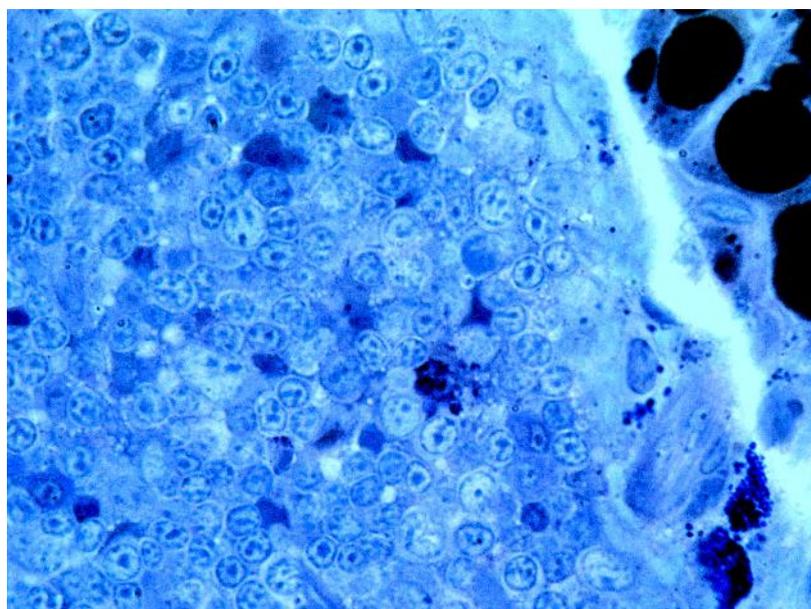
Забор, фиксацию материала и изготовление парафиновых блоков выполняли согласно общепринятым методикам работы с лимфоидными органами. Изготавливали серийные срезы толщиной 4-6 мкм. Для изучения структурных компонентов тимуса срезы окрашивали гематоксилином и эозином, по ван Гизону. Для идентификации клеток лимфоидного ряда использовали окраску азур II-эозином и ШИК-реакцию с докраской ядер гематоксилином Караци. Детали гистологического строения изучали с помощью цитоморфологического комплекса на базе микроскопа Olympus CX31. Определяли соотношение относительных площадей коркового и мозгового вещества, вычисляли корково-мозговой индекс (К/М). Для

трансмиссионной электронной микроскопии материал фиксировали в глутаровом альдегиде на фосфатном буфере с дофиксацией в 1% растворе четырехоксида осмия, заливали в эпон-812. Полутонкие срезы, окрашенные толуидиновым синим, изучали светооптическим методом, производили подсчет клеточных элементов на площади 1000 мкм<sup>2</sup>. Ультратонкие срезы, после контрастирования по Рейнольдсу изучали на электронном микроскопе ПЭМ-125К Сумского ПО «Электрон».

Количественные показатели обрабатывали с использованием методов вариационной статистики. Показатели серии ГП сравнивали с данными К-1, а серии Гл – с К-2. Достоверными считали данные с погрешностью меньше 5% ( $p < 0,05$  в тексте обозначено \*).

#### РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

После 10-кратного воздействия перегрузок небольшие по размерам дольки тимуса приобретали волнистые очертания. Встречали дольки с участками, замещенными жировой тканью (рис. 1), при этом сохраненная лимфоидная ткань имела явные признаки акцидентальной инволюции. Относительная площадь коркового вещества уменьшалась на 17,88%\*, мозгового – увеличивалась на 19,63%\*, что приводило к снижению кортико-медулярного индекса с 1,97 – в контроле, до 1,35 (табл. 1).



**Рис. 1.** Полутонкий срез тимуса крысы после 10-кратного воздействия гипергравитации. Толуидиновый синий. Об. 100 $\times$ , ок. 10 $\times$ . 1 – расширенная междольковая перегородка, 2 – апоптотные тела, 3 – тучные клетки, 4 – адипоцит, 5 – цитоплазма макрофага.

Капсула и соединительнотканые перегородки были утолщены, отечны, содержали вкрапления жировой ткани и отсева лимфоцитов. Сосуды расширены и полнокровны, отмечали признаки периваскулярного отека. В окологородочных сосудах и в периаартериальных щелях выявляли скопления лим-

фоцитов. Численная плотность клеток в коре в сравнении с контролем снижалась.

Отмечали высокую макрофагальную активность, что светооптически подтверждалось картиной «звездного неба». Уменьшалось относительное содержание малых и, особенно, больших лимфоцитов,

соответственно, на 6,72%\* и 29,33%\*. При этом субкапсулярная зона выглядела суженной и была пред-

ставлена лишь 1-2 слоями больших форм клеток. Митозы встречали редко.

Таблица 1

Соотношение (в %) структурных компонентов тимуса крыс (M±m)

Серия опытов	Кора	Мозговое в-во	Кортико-медул. зона	Капсула и трабекулы	Индекс К/М
К-1	35,23±0,14	27,76±0,24	19,57±0,19	17,44±0,14	1,97
ГП	29,64±0,24*	33,21±0,14*	15,36±0,24*	21,79±0,19*	1,35
К-2	35,00±0,19	28,57±0,24	19,29±0,24	17,14±0,14	1,90
Гл	31,79±0,29*	35,00±0,24*	14,64±0,14*	18,57±0,24*	1,33

Примечание. \* –  $p < 0,05$  относительно контроля.

В сравнении с контролем возрастало относительное содержание клеток с признаками деструкции (на 23,80%\*). На электронограммах наряду с апоптозными лимфоцитами встречали клетки с некротическими изменениями (отечная цитоплазма, распад оргanelл, ядра). В цитоплазме активных макрофагов выявляли фагоцитированные апоптозные тела и вторичные лизосомы. Эпителиальный компонент визуализировался лучше, чем в контрольных препаратах, давал выраженную ШИК-положительную реакцию. Кортиково-мозговая граница размыта, сосуды и периваскулярные пространства переполнены лимфоцитами. Выявляли единичные активные плазмоциты с расширенными канальцами эндоплазматической сети (рис. 2). Выявляли функционирующие эпителиальные канальцы.

зировался лучше, чем в контрольных препаратах, давал выраженную ШИК-положительную реакцию. Кортиково-мозговая граница размыта, сосуды и периваскулярные пространства переполнены лимфоцитами. Выявляли единичные активные плазмоциты с расширенными канальцами эндоплазматической сети (рис. 2). Выявляли функционирующие эпителиальные канальцы.

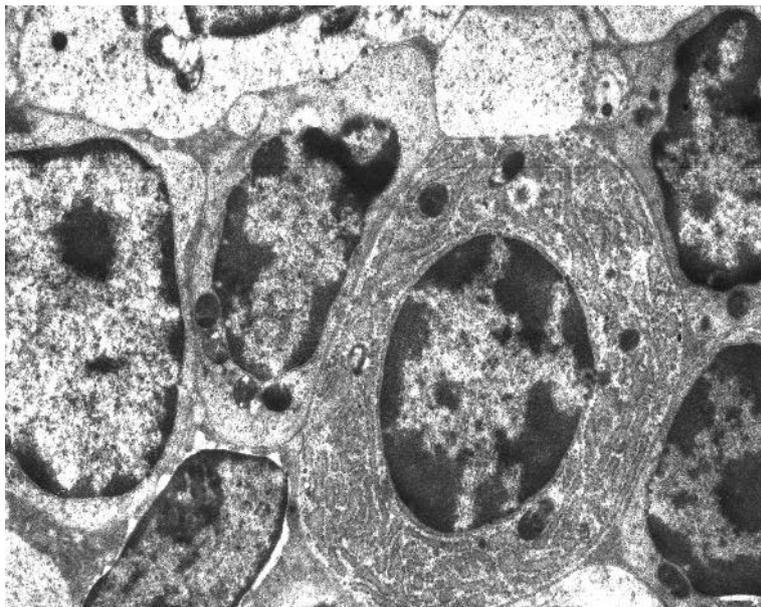


Рис. 2. Активный плазмоцит на границе кортико-медуллярной зоны тимуса крысы после 10-кратного воздействия гипергравитации. ТЭМ. Ув. 5000×. 1 – ядро плазмоцита, 2 – ядро лимфоцита.

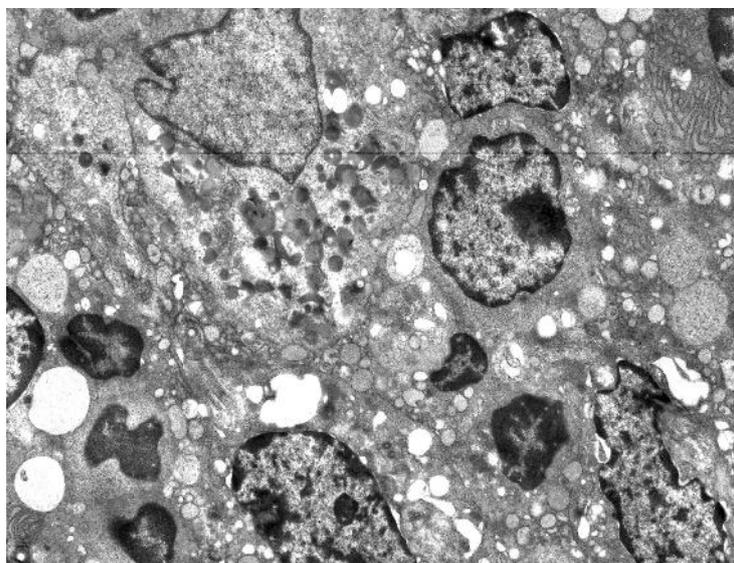
В мозговом веществе плотность распределения клеток относительно контроля возрастала на 11,76%\*. Лимфоцитарная популяция характеризовалась достоверным снижением относительного содержания малых и больших лимфоцитов при увеличении процента средних. Возрастало количество макрофагов и эпителиальных клеток, переполненных интенсивно ШИК-положительным содержимым. Выявляли много (до 5 в поле зрения) телец Гассала разного размера. На электронограммах некоторые эпителиорети-

кулоциты имели вакуолизированную цитоплазму, укороченные канальцы ЭПС, набухшие митохондрии с дезориентированными кристами. Эпителиальные клетки, находящиеся на разных этапах дегенерации, принимали участие в образовании тимических телец. Встречали как отдельные активные макрофаги, так и их скопления (рис. 3).

На гистологических препаратах тимуса крыс, подвергавшихся воздействию гравитационных перегрузок на фоне применения глутаргина контуры до-

лек имели неровные очертания. Как и в предыдущей серии опытов выявляли дольки с частичным замещением лимфоидной ткани жировой тканью. В сохранных дольках определяли уменьшение на

9,17%\*, в сравнении с контролем, относительной площади коркового вещества и увеличение мозгового (на 22,51%\*), при этом кортико-медуллярный индекс составлял 1,33 (см. табл.).



**Рис. 3. Мозговое вещество тимуса крысы после 10-кратного воздействия гипергравитации. ТЭМ. Ув. 3000 $\times$ . 1 – ядро макрофага, 2 – апоптотное тело, 3 – цитоплазма плазмоцита.**

Капсула и междольковые перегородки были утолщены и отчетно разрыхлены, имели повышенное содержание клеток фибробластического дифферона и волокнистого компонента. Интракапсулярные и трабекулярные кровеносные сосуды выглядели расширенными и полнокровными, особенно, вены, в некоторых обнаруживали стаз и сладж эритроцитов, перивазальный отек. Вдоль сосудов отмечали повышенное содержание тучных клеток. В расширенных околососудистых пространствах выявляли скопления лимфоцитов. Встречали эпителиальные клетки, единичные макрофаги и функционально активные плазмоциты.

Архитектоника лимфоидной ткани была нарушенной. В корковом веществе отмечали чередование светлых участков и темных – с компактным расположением лимфоцитов. В целом, плотность распределения клеток хотя и снижалась относительно контроля, но в меньшей степени, чем в сериях опытов без фармакоррекции. Менее значимые отклонения от контроля отмечали и в изменении соотношения клеточных элементов. Так, относительное содержание малых лимфоцитов снижалось на 5,11%\*, а средних увеличивалось на 6,38%\*. При этом доля клеток с признаками деструкции, в сравнении с контролем, возрастала лишь на 14,79%\*. Отмечали повышенную фагоцитарную активность макрофагов. Клетки с фигурами митоза встречали редко. Выявляли единичные уплощенные ШИК-положительные эпителиальные клетки и активно секретирующие эпителиальные каналцы, проникающие в мозговое вещество. Электронномикроскопически отмечали ди-

строфические изменения как в эпителиоцитах, так и в лимфоцитах. В то же время, в отдельных участках коры клетки, особенно лимфоциты, были малоизмененными, о чем свидетельствовало нормальное ядерно-цитоплазматическое соотношение и повышение электронной плотности цитоплазмы.

В мозговом веществе плотность распределения клеток превышала данные контроля на 4,23%\*, прежде всего, за счет повышенного содержания средних лимфоцитов и хорошо контурирующих эпителиоретикулоцитов. Встречали отдельные вакуолизированные эпителиальные клетки с ярко выраженным ШИК-положительным содержимым. Выявляли эпителиальные каналцы средних и крупных размеров, выстланные эпителиальными клетками с секреторным содержимым в центре. Их базальная мембрана давала интенсивную ШИК-положительную реакцию. В просвете некоторых каналцев находились слущенные клетки. Чаше, чем в контроле, выявляли мелкие и средние тельца Гассала, некоторые из них имели вид кистоподобных структур.

#### ВЫВОДЫ

Анализ изменений в тимусе крыс зрелого возраста при систематическом воздействии гипергравитации выявил морфофункциональные преобразования, характеризующиеся наложением процессов акцидентальной инволюции и микроциркуляторных нарушений, вызванных систематическим действием гравитационных перегрузок, на возрастные изменения. Такие возрастные преобразования тимуса, как разрастание соединительнотканых структур, замещение паренхимы жировой тканью, дегенерация эпи-

телиального компонента являются характерными для крыс зрелого возраста, однако в условиях гипергравитационно-индуцированного стресса интенсивность инволютивных процессов возрастает.

Применение глутаргина в качестве адаптогена способствует развитию менее выраженных, чем в опытах без фармакоррекции, циркуляторных расстройств и инволютивных изменений, что обеспечивает повышение адаптационного потенциала тимуса. Иммуностабилизирующее свойство глутаргина в условиях систематического гипергравитационного воздействия, по-видимому, реализуется благодаря его мембраносохраняющему и антиоксидантному действию [2].

В дальнейшем планируются иммуногистохимические исследования тимуса крыс, подвергавшихся воздействию гравитационных перегрузок на фоне разных способов защиты.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Возрастные изменения структуры и ультраструктуры тимуса : тезисы докладов V международного симпозиума [«Биологические механизмы ста-

рения»], Харьков, 30 мая – 1 июня 2002 г. – X., 2002. – С. 89.

2. Клинико-экспериментальное изучение нового гипоаммониемического и гепатопротекторного препарата – глутаргина / Л.А. Чайка., В.И. Матяш, Н.В. Харченко [и др.] // Сучасні інфекції. – 2000. – № 4. – С. 43-49.

3. Пасюк А.А. Вилочковая железа белой крысы в постнатальном онтогенезе / А.А. Пасюк // Белорусс. мед. журн. – 2006. – № 1 (15). – С. 9-11.

4. Пат. на корисну модель 35792 Україна, МПК А61В 5/145. Спосіб корекції несприятливої дії гравітаційних перевантажень в експерименті / Пикалюк В.С., Кутя С.А., Мороз Г.О., Коняєва О.І.; винахідники і власники В.С. Пикалюк, С.А. Кутя, Г.О. Мороз, О.І. Коняєва. – № u 200803985; заявл. 31.03.2008; опубл. 10.10.2008, Бюл. № 19, 2008 р.

5. Сапин М.Р. Иммуная система, стресс и иммунодефицит / М.Р. Сапин, Д.Б. Никитюк. – М. : Джангар, 2000. – 184 с.

6. Фролькис В.В. Старение, эволюция и продление жизни / В.В. Фролькис, Х. К. Мурадян. – Киев : Наукова думка, 1992. – 336 с.