

УДК 616-003.282+611.438+611.018

© М.А.Кривенцов, 2013.

ГИСТОМОРФОМЕТРИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ТИМУСА КРЫС ЗРЕЛОГО И ПРЕДСТАРЕЧЕСКОГО ВОЗРАСТОВ ПРИ ПАРЕНТЕРАЛЬНОМ ВВЕДЕНИИ СПИННОМОЗГОВОЙ ЖИДКОСТИ

М. А. Кривенцов

Кафедра нормальной анатомии (зав. кафедрой – проф. В.С. Пикалюк), Государственное учреждение «Крымский государственный медицинский университет им. С.И. Георгиевского», г. Симферополь.

HISTOMORPHOMETRIC CHARACTERISTICS OF THE THYMUS OF MATURE AND PRESENILE RATS AFTER PARENTERAL ADMINISTRATION OF THE CEREBROSPINAL FLUID

M.A. Kriventsov**SUMMARY**

Histomorphometric changes of the thymus of mature and presenile rats after parenteral administration of the cerebrospinal fluid have been studied. On the 7th, 30th and 90th days of the experiment, the rats were sacrificed and the thymuses were histomorphometrically analyzed (the relative area of the cortex, medulla, capsule and trabeculae, the cortico-medullary index). The data were subjected to a statistical analysis, including two-way ANOVA. Histomorphometric changes in mature and presenile rat thymus are generally characterized by an increase in the relative area of the cortex and reduction in the relative area of the medulla. The degree of these changes varied depending on the terms of the experiment (7th, 30th and 90th day), reaching in most cases, the level of statistical significance. In presenile rats, the extent of changes increased and reached a maximum value on the 30th day of the experiment (increasing the relative area of the cortex to 54.71%, decreasing in the relative area of the cortex to 40.90%, and 2.6 times increasing in the cortico-medullary index). Two-way ANOVA of the cortico-medullary index demonstrated a predominant influence of the experiment duration (the multiplicity of the administration of CSF), constituting 30.13% of variation of the total.

ГИСТОМОРФОМЕТРИЧНА ХАРАКТЕРИСТИКА ТИМУСА ЩУРІВ ЗРІЛОГО І ПЕРЕДСТАРЕЧОГО ВІКІВ ПРИ ПАРЕНТЕРАЛЬНОМУ ВВЕДЕННІ СПИННОМОЗКОВОЇ РІДИНИ

М.А. Кривенцов**РЕЗЮМЕ**

Вивчені гістоморфометричні зміни тимуса щурів зрілого і передстаречого віків в умовах парентерального введення спинномозкової рідини. На 7-у, 30-у і 90-у добу щури виводилися з експерименту, з подальшим гістоморфометричним аналізом тимуса (відносна площа кіркової речовини, мозкової речовини, капсули і трабекул, кортико-медулярний індекс). Отримані дані піддавали статистичному аналізу, включаючи двофакторний дисперсійний аналіз. Зміни гістоморфометричних показників тимуса щурів зрілого і передстаречого віків від контрольних значень, в цілому, характеризувалися збільшенням відносної площі кіркової речовини і зменшенням відносної площі мозкової речовини. Міра вираженості даних змін варіювала залежно від термінів експерименту (7-а, 30-а і 90-а доба), досягаючи в більшості випадків рівня статистичної достовірності. У щурів передстаречого віку вираженість змін наростала і досягала максимальних значень при збільшенні тривалості експерименту до 30 діб (збільшення відносної площі кіркової речовини на 54,71%, зменшення відносної площі кіркової речовини на 40,90%, збільшення КМІ в 2,6 раза). Двофакторний дисперсійний аналіз показника КМІ продемонстрував переважаючий вплив тривалості експерименту (кратності введення СМР), що становить 30,13% в долі варіації показника.

Ключевые слова: спинномозговая жидкость, тимус, гистология, крысы.

Учитывая широкий спектр биологических реакций спинномозговой жидкости (СМЖ), обширную сырьевую базу и относительную простоту получения и обработки ликвора в качестве приоритетного направления выступает разработка биогенного препарата, который найдет применение при различных патологических состояниях, сопряженных с функциональным нарушением иммунного статуса организма [5, 7, 9]. Перспективы использования ксеногенной СМЖ в качестве лекарственного сырья, ставят перед исследователями задачи выяснения её био-

логических эффектов, а также определения возможного профиля безопасности в условиях острого, подострого и хронического экспериментов. В настоящее время, данные всестороннего морфологического изучения органов иммуногенеза в условиях парентерального введения СМЖ отсутствуют. В качестве объекта исследования нами был выбран тимус, как ключевой орган иммуногенеза, выступающий в качестве возможного органа-мишени в отношении биологических эффектов ксеногенной СМЖ. Помимо этого, тимус обладает строгой зональнос-

тью гистологической структуры, что требует проведения анализа гистоморфометрических показателей для подтверждения и количественной оценки возможных преобразований. Результаты данного исследования можно будет экстраполировать на геронтологическую практику, а также состояния, сопровождающиеся акцидентальной инволюцией тимуса.

Цель исследования – выявить гистоморфометрические изменения тимуса крыс зрелого и предстарческого возрастов в условиях парентерального введения СМЖ.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Спинномозговую жидкость получали от коров путем субокципитальной пункции с дальнейшей криоконсервацией в жидком азоте при температуре -196°C [6]. В качестве экспериментальных животных использовали самцов белых крыс линии Вистар, которые были объединены в экспериментальную и контрольную серию опытов. В эксперименте использовали крыс зрелого и предстарческого возрастов (возраст крыс на момент начала эксперимента составлял 6 и 20 месяцев после рождения, соответственно). Количество животных в экспериментальной и контрольной серии опытов составляло по 6 крыс.

Крысам экспериментальной серии опытов парентерально вводили спинномозговую жидкость из расчета 2 мл/кг массы животного (внутрибрюшинно). Кратность введения СМЖ составляла один раз в 3 дня. Крысам контрольной серии опытов аналогичным образом, с аналогичной кратностью и дозой вводили физиологический раствор. Животных выводили из эксперимента на 7-е, 30-е и 90-е сутки эксперимента путем декапитации под эфирным наркозом. Сроки эксперимента, согласно международным рекомендациям, соответствуют острому, подострому и субхроническому эксперименту, соответственно [11]. Экспериментальное исследование было проведено в соответствии с принципами международного права [4].

После декапитации крыс и вскрытия грудной клетки производили выделение тимуса, с последующей фиксацией в 10% нейтральном формалине. Проводка и заливка материала в парафиновые блоки осуществлялась по общепринятым методикам [3]. Изготавливали серийные срезы толщиной 4-6 мкм с последующей окраской гематоксилином и эозином. Просмотр, гистологическое описание и получение цифровых фотографий микропрепаратов осуществляли с помощью цитоморфометрического комплекса «Olympus CX-41». С использованием программного обеспечения ImageJ измеряли площадные размеры основных структурно-функциональных зон тимуса: капсулы и трабекул, коркового вещества и мозгового вещества [1, 12]. Полученные результаты выражали в виде значений относительной площади в процентах от общей площади гистологичес-

кого среза. Вычисляли кортико-медулярный индекс в виде соотношения относительной площади коркового вещества и относительной площади мозгового вещества.

Статистическую обработку полученных данных осуществляли с использованием лицензионного программного обеспечения Microsoft Office Excel и Statistica 10.0 [2, 10]. Статистический анализ включал в себя построение вариационных рядов полученных данных, вычисление среднего арифметического значения, среднеквадратического отклонения, ошибки средней, коэффициента вариации и величины отклонения показателя от контроля в процентах. Полученные количественные данные подвергали предварительному анализу на нормальность распределения с использованием критерия Колмогорова-Смирнова [8]. Оценку статистической достоверности отклонений осуществляли с использованием параметрического метода сравнения двух независимых выборок – критерия Стьюдента. Различие считали статистически достоверным при значении P (вероятность ошибки) $< 0,05$ [1]. С целью выявления факта и степени влияния контролируемых факторов (возрастной период крыс и продолжительность эксперимента) на результирующий признак (кортико-медулярный индекс) осуществляли двухфакторный дисперсионный анализ [2, 10].

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Изменения гистоморфометрических показателей тимуса крыс зрелого и предстарческого возрастов от контрольных значений, в целом, характеризовались увеличением относительной площади коркового вещества и уменьшением относительной площади мозгового вещества, свидетельствуя о повышении иммунологической реактивности. Степень выраженности данных изменений варьировала в зависимости от сроков эксперимента (7-е, 30-е и 90-е сутки), достигая в большинстве случаев уровня статистической достоверности (табл. 1 и табл. 2).

Так, у крыс зрелого возраста при парентеральном введении ксеногенной СМЖ по сравнению с контролем на 30-е сутки эксперимента отмечено статистически достоверное увеличение относительной площади коркового вещества (на 15,31%), уменьшение доли мозгового вещества (на 14,53%) и соответствующее увеличение КМИ (на 38,10%), сопровождающееся уменьшением относительной площади капсулы и трабекул (на 7,69%). Отклонения от контроля в данной возрастной группе на 7-е и 90-е сутки эксперимента носили аналогичную направленность, однако не достигали уровня статистической достоверности. Исключением является статистически достоверное увеличение показателя КМИ на 90-е сутки (на 28,95%, $p < 0,05$, по сравнению с контролем). В отличие от крыс зрелого возраста, у экспериментальных крыс предстарческого возраста статистически достоверные отклонения морфометри-

ческих показателей были выявлены на всех сроках эксперимента. Степень выраженности изменений, в целом, нарастала и достигала максимальных значений при увеличении продолжительности эксперимента до 30 суток (увеличение относительной пло-

щади коркового вещества на 54,71%, уменьшение относительной площади коркового вещества на 40,90%, увеличение КМИ в 2,6 раза), с уменьшением выраженности отклонений от контроля к 90-м суткам.

Таблица 1

Гистоморфометрические показатели крыс зрелого возраста контрольной и экспериментальной серий (M±m)

Серия Срок (сутки)	Контроль				Эксперимент			
	К, %	М, %	К+Тр, %	КМИ	К, %	М, %	К+Тр, %	КМИ
7	48,96 ±0,72	32,17 ±0,58	18,87 ±0,34	1,54± 0,05	49,78 ±0,72	30,49 ±0,63	19,72 ±0,27	1,65± 0,06
30	43,47 ±0,80	33,69 ±0,55	22,83 ±0,46	1,30± 0,04	50,12 ±1,29 *	28,79 ±0,93 *	21,08 ±0,66 *	1,80± 0,09*
90	40,32 ±1,11	37,21 ±0,60	22,46 ±0,62	1,10± 0,04	44,08 ±1,56	34,15 ±1,85	21,76 ±0,87	1,41± 0,12*

Примечания: К – корковое вещество, М – мозговое вещество, К+Тр – капсула и трабекулы, КМИ – кортико-медуллярный индекс, * – $p < 0,05$.

Таблица 2

Гистоморфометрические показатели крыс предстарческого возраста контрольной и экспериментальной серий (M±m)

Серия Срок (сутки)	Контроль				Эксперимент			
	К, %	М, %	К+Тр, %	КМИ	К, %	М, %	К+Тр, %	КМИ
7	37,82 ±1,43	35,81 ±0,58	26,37 ±1,22	1,07± 0,05	43,12 ±1,22 *	32,38 ±0,97 *	24,50 ±0,87	1,35± 0,07*
30	30,33 ±1,79	44,13 ±1,63	25,53 ±0,59	0,73± 0,07	46,93 ±2,48 *	26,08 ±1,75 *	26,98 ±1,01	1,90± 0,22*
90	25,21 ±1,38	47,29 ±0,87	27,50 ±0,62	0,54± 0,04	33,80 ±1,49 *	36,77 ±1,18 *	29,43 ±0,54 *	0,97± 0,08*

Примечания: К – корковое вещество, М – мозговое вещество, К+Тр – капсула и трабекулы, КМИ – кортико-медуллярный индекс, * – $p < 0,05$.

Выявленные отклонения гистоморфометрических показателей тимуса в сравнении с контролем, в особенности у крыс предстарческого возраста, свидетельствуют об иммуностимулирующем эффекте СМЖ, развивающемся на фоне возрастной инволюции тимуса. Фактически, показатели КМИ у крыс предстарческого возраста на всех сроках эксперимента превосходили аналогичные показатели у крыс зрелого возраста в контрольной серии. Данный эффект может быть обусловлен стимулирующим воздействием СМЖ на костномозговую лимфопоэз

предшественников Т-лимфоцитов или активацией внутритимической пролиферации.

Как указывалось ранее, изменения гистоморфометрических показателей тимуса крыс экспериментальной серии носили односторонний характер у крыс зрелого и предстарческого возрастов, однако проявлялись в различной степени в зависимости от продолжительности эксперимента. Это было подтверждено в рамках проведения двухфакторного дисперсионного анализа. Был установлен факт влияния обеих контролируемых факторов (возрастной

период крыс на момент начала эксперимента и продолжительность эксперимента), а также их взаимодействия на результирующий признак (кортико-медулярный индекс). Вместе с тем, распределение степени влияния контролируемых факторов продемонстрировало преобладающее значение фактора продолжительности эксперимента (выборочный коэффициент детерминации – 30,13%), при значительно меньшей степени влияния фактора возрастного периода (4,19%) и взаимодействия факторов (6,29%). Это свидетельствует о том, что изменения показателя КМИ, в первую очередь, детерминировано продолжительностью эксперимента (кратностью введения СМЖ). Показатель внутригрупповой вариации составлял 59,38%, свидетельствуя о значительной случайной вариации, т.е. той части вариации, которая обусловлена влиянием неучтенных факторов и не зависит от контролируемых факторов, положенных в основу вариационных рядов. Частично, это объясняется значительной величиной коэффициента вариации показателя КМИ, как у крыс контрольной серии опытов, так и крыс экспериментальной серии опытов (у крыс зрелого возраста – 14–28%, у крыс предстарческого возраста – 30–34%).

ВЫВОДЫ

Изменения гистоморфометрических показателей тимуса крыс зрелого и предстарческого возрастов от контрольных значений, в целом, характеризовались увеличением относительной площади коркового вещества и уменьшением относительной площади мозгового вещества. Степень выраженности данных изменений варьировала в зависимости от сроков эксперимента (7-е, 30-е и 90-е сутки), достигая в большинстве случаев уровня статистической достоверности. У крыс предстарческого возраста выраженность изменений нарастала и достигала максимальных значений при увеличении продолжительности эксперимента до 30 суток (увеличение относительной площади коркового вещества на 54,71%, уменьшение относительной площади коркового вещества на 40,90%, увеличение КМИ в 2,6 раза). Двухфакторный дисперсионный анализ показателя КМИ продемонстрировал преобладающее влияние продолжительности эксперимента (кратности введения СМЖ), составляющее 30,13% в доле вариации показателя.

ПЕРСПЕКТИВЫ ДАЛЬНЕЙШЕГО ИССЛЕДОВАНИЯ

В дальнейшем, с целью подтверждения выявленных изменений и установления возможных механизмов их развития планируется проведение ци-

томорфометрического и иммуногистохимического анализов.

ЛИТЕРАТУРА

1. Автандилов Г. Г. Основы количественной патологической анатомии: Учебное пособие. – М.: Медицина, 2002. – 240 с.
2. Васильев А. Н. Научные вычисления в Microsoft Excel / А. Н. Васильев. – М.: Издательский дом «Вильямс», 2004. – 512 с.
3. Меркулов Г. А. Курс патогистологической техники / Г. А. Меркулов. – Л.: Медицина, 1969. – 423 с.
4. Науково-практичні рекомендації з утримання лабораторних тварин та роботи з ними / [Ю. М. Кожемякін, О. С. Хромов, М. А. Філоненко та ін.]. — К.: Авіцена, 2002. — 156 с.
5. Пат. 2101774РФ G09B23/28 Способ лечения острой лучевой болезни у экспериментальных животных: Пат. 2101774РФ G09B23/28 [В. В. Ткач, О. М. Атаманова, И. Е. Андрианова и др.] № 3182147 15.10.87; Опубл. 10.01.98; Бюл. № 1. — 46 с.
6. Пат. на корисну модель 65154 Україна, МПК А 61К 35/24, А 61К 35/12 Спосіб отримання біологічного препарату ліквору / Пикалюк В. С., Ткач В. В., Кривенцов М. А., Шаймарданова Л. Р., Бессалова Є. Ю., Кисельов В. В., Зайвий Ю. П., Лесковський А. О., винахідники Пикалюк В. С., Ткач В. В., Кривенцов М. А., Шаймарданова Л. Р., Бессалова Є. Ю., Кисельов В. В., Зайвий Ю. П., Лесковський А. О. власник ДУ «Кримський державний медичний університет імені С. І. Георгієвського». – № u201106266; заявл. 19.05.2011, опубл. 25.11.2011, Бюл. № 22.
7. Пикалюк В. С., Бессалова Е. Ю., Ткач В. В., Кривенцов М. А., Киселев В. В., Шаймарданова Л. Р. Ликвор как гуморальная среда организма. – Симферополь, ИТ «Ариал». – 2010. – 192 с.
8. Justel A. A multivariate Kolmogorov-Smirnov test of goodness of fit / A. Justel, D. Pena, R. Zamar // Statistics and Probability Letters. – 1997. – Vol. 35(3). – P. 251–259.
9. Kriventsov M. A. Cerebrospinal fluid review: considerations for immunoregulatory role and current trends / M. A. Kriventsov // Таврический медико-биологический вестник. – 2013. – №1, ч. 2(61). – С. 257–265.
10. Nisbet R. A. Handbook of statistical analysis and data mining applications / R. A. Nisbet, J. F. Elder, G. Miner. – Amsterdam; Boston: Academic Press/Elsevier, 2009. – 824 p.
11. OECD. Guidelines for the Testing of Chemicals // Organization for Economic Cooperation and Development. – Paris, France; 2002.
12. Schneider C. A. NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis / C. A. Schneider, W. S. Rasband, K. W. Eliceiri // Nature Methods. – 2012. – № 9. – P. 671–675.