

На правах рукописи

Цомартова Элина Сослановна

**МОРФОЛОГИЧЕСКИЕ И ЦИТОФИЗИОЛОГИЧЕСКИЕ ИЗМЕНЕНИЯ ТИМУСА
КРЫС, ПОДВЕРГАВШИХСЯ
ВОЗДЕЙСТВИЮ ЭНДОКРИННОГО ДИСРАПТОРА
ДИХЛОРДИФЕНИЛТРИХЛОРЭТАНА В ПРЕНАТАЛЬНОМ И ПОСТНАТАЛЬНОМ
ПЕРИОДАХ**

03.03.04 – Клеточная биология, цитология, гистология

**Автореферат
диссертации на соискание ученой степени
кандидата медицинских наук**

Москва – 2021

Работа выполнена в федеральном государственном автономном образовательном учреждении высшего образования Первый Московский государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет) и Федеральном государственном бюджетном научном учреждении «Научно-исследовательский институт морфологии человека»

Научные руководитель:

доктор медицинских наук

Наталья Валентиновна Яглова

Научный консультант:

доктор медицинских наук, профессор,
член-корреспондент РАН

Сергей Львович Кузнецов

Официальные оппоненты:

Мороз Геннадий Александрович - доктор медицинских наук, профессор, федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования «Крымский федеральный университет имени В. И. Вернадского», медицинская академия имени С.И. Георгиевского, кафедра лечебной физкультуры и спортивной медицины, физиотерапии с курсом физического воспитания, заведующий кафедрой

Стручко Глеб Юрьевич - доктор медицинских наук, профессор, федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Чувашский государственный университет имени И.Н. Ульянова», кафедра нормальной и топографической анатомии с оперативной хирургией, заведующий кафедрой

Ведущая организация: федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Пермский государственный медицинский университет имени академика Е.А. Вагнера» Министерства здравоохранения Российской Федерации

Защита состоится «15» марта 2021 года в 14:00 на заседании диссертационного совета ДСУ 208.001.01 при ФГАОУ ВО Первый МГМУ имени И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет) по адресу: 119991, г. Москва, ул. Трубецкая, д.8, стр. 2.

С диссертацией можно ознакомиться в ЦНМБ ФГАОУ ВО Первый МГМУ имени И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет) по адресу: 119034, г. Москва, Zubovskiy bulvar, d. 37/1 и на сайте организации www.sechenov.ru.

Автореферат разослан «__» _____ 2021 года

Ученый секретарь диссертационного совета

доктор медицинских наук, доцент



Блинова Екатерина Валериевна

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы исследования: Изучение морфогенеза и гистофизиологии органов, осуществляющих иммунную защиту организма, в последние десятилетия приобрело особую значимость в связи с увеличением числа аллергических, аутоиммунных и лимфопролиферативных заболеваний [Gore A. et al., 2015]. Анализ литературы показывает, что увеличение числа аллергических и аутоиммунных заболеваний, начавшееся после окончания Второй мировой войны, происходило параллельно с увеличением производства и потребления различных классов химических соединений [European Parliament 2019; WHO 2017]. Многие из них обладают свойствами эндокринных дисрапторов – веществ, способных влиять на эндокринную функцию гормонов, нарушая любые этапы продукции и их взаимодействия с клетками-мишенями, при этом действуя в ничтожно низких дозах, аналогичных дозам естественных гормонов [Diamanti-Kandarakis E. et al., 2009; Kuo C. et al., 2012; Street M. et al., 2018; La Merrill M. et al., 2020]. Из известных эндокринных дисрапторов наибольший интерес представляют персистирующие стойкие универсальные поллютанты, из которых наиболее распространенным на планете является дихлордифенилтрихлорэтан (ДДТ) [Udoji F. et al., 2010]. Возобновившееся в 21-м веке применение ДДТ обеспечивает на многие десятилетия его персистенцию в экосистемах и воздействие на организм человека и животных [WHO 2011]. ДДТ обладает способностью проникать через плацентарный барьер, что является фактором риска для развития органов плода [Bouwman H. et al., 2012; Gore A. et al., 2015]. Механизмы, нарушающие течение основных морфогенетических процессов, могут быть связаны как с нарушением эндокринной функции у матери, так и с непосредственным воздействием на эмбриональные зачатки органов. Влияние ДДТ как эндокринного дисраптора на развитие органов иммунной защиты в пренатальном и постнатальном периодах онтогенеза крайне мало изучено.

Степень разработанности проблемы: В научной литературе представлены немногочисленные данные о влиянии токсичных и субтоксичных доз ДДТ на морфофункциональное состояние тимуса [Street J. et al., 1975; French R. et al., 2002]. Дисрапторное действие низких доз изучено в значительно меньшей степени. Наиболее подробным исследованием воздействия этого эндокринного дисраптора на органы лимфоидной системы являются работы Н.В. Ягловой и Е.П. Тимохиной, изучавших изменения в структуре и функционировании тимуса и селезенки половозрелых крыс [Яглова Н.В. и др. 2012; 2013; 2017]. Влияние низких фоновых доз ДДТ на морфогенез тимуса в пренатальном и постнатальном периодах не изучено, что обусловило цель настоящего исследования.

Цель: охарактеризовать морфологические и цитофизиологические изменения тимуса крыс, подвергавшихся воздействию эндокринного дисраптора ДДТ в пренатальном и постнатальном периодах.

Задачи:

1. Выявить морфологические изменения тимуса у крыс различных возрастных групп, подвергавшихся воздействию эндокринного дисраптора ДДТ в пре- и постнатальном периодах.
2. Оценить изменения пролиферативной активности тимоцитов *ex tempore* у крыс различных возрастных групп, подвергавшихся воздействию низких доз ДДТ в пре- и постнатальном периодах.
3. Охарактеризовать гистотопографические особенности пролиферативных процессов в тимусе крыс различных возрастных групп, подвергавшихся воздействию низких доз ДДТ в пре- и постнатальном периодах.
4. Определить особенности формирования пролиферативного ответа тимоцитов на панТ-клеточный митоген у крыс, подвергавшихся воздействию низких доз ДДТ в пре- и постнатальном развитии.

Научная новизна:

Впервые установлено, что воздействие низких доз ДДТ в пренатальном и постнатальном периодах вызывает морфологические и цитофизиологические изменения тимуса крыс.

Выявлено, что в пренатальном периоде наибольшую чувствительность к дисрапторному действию ДДТ проявляют ретикулоэпителиальный и соединительно-тканый компоненты стромы.

Показано, что наибольшие изменения постнатального морфогенеза тимуса проявляются в пубертатном периоде.

Впервые определено, что воздействие низких доз ДДТ на развивающийся организм изменяет динамику пролиферативных процессов в паренхиме тимуса и замедляет развитие инволютивных изменений.

Установлено, что у крыс, развивающихся в условиях постоянного низкодозового воздействия ДДТ, нарушено формирование пролиферативного ответа на Т-клеточный митоген, причиной которого является более высокая митотическая активность и повышенное содержание низкодифференцированных тимоцитов в корковом веществе после достижения половой зрелости.

Научно-практическая значимость: Доказана способность низких доз ДДТ, предусмотренных максимально допустимыми уровнями его содержания в продуктах питания, нарушать пренатальный и постнатальный морфогенез тимуса. Выявленное нарушение формирования пролиферативного ответа тимоцитов на Т-клеточный митоген у организмов, подвергавшихся

пренатальному и постнатальному воздействию низких доз ДДТ, показывает вероятный механизм нарушения у них реакций клеточного иммунитета.

Полученные данные являются основой для изучения дисморфогенетического действия ДДТ на развивающиеся органы иммунной защиты.

Соответствие диссертации паспорту научной специальности: диссертация соответствует п. 5, 6 области исследования паспорта специальности 03.03.04 – клеточная биология, цитология, гистология.

Методология и методы исследования: Методология исследования основана на динамической оценке морфологических характеристик коркового и мозгового вещества тимуса и цитофизиологических параметров тимоцитов у крыс, подвергавшихся воздействию эндокринного дисраптора в пренатальном и постнатальном периодах. Сроки исследования включают основные периоды в развитии особи: новорожденности, подсосный, пубертатный и постпубертатный (начало активного репродуктивного периода), совпадающие с периодами развития и начала инволютивных возрастных изменений в тимусе. Выбор доз и способ их введения основан на анализе нормативной документации, регламентирующей содержание ДДТ в продуктах питания, питьевой воде, а также научной литературы об отличиях метаболизма ДДТ в организме крысы. В экспериментальном исследовании использован комплекс морфологических (световая микроскопия и компьютерная морфометрия гистологических препаратов, иммуногистохимия с количественной оценкой результатов), культуральных, радиоизотопных и статистических методов.

Степень достоверности и апробация результатов: Достоверность результатов обеспечивается определением задач и подбором комплекса адекватных им современных методов исследования, позволяющих достичь запланированной цели исследования, формированием репрезентативных контрольных и экспериментальных групп, использованием комплекса статистических методов, позволяющих оценить значимость выявленных изменений, и сравнительным анализом собственных данных с данными других исследователей.

Результаты диссертационного исследования доложены и обсуждены на XXVI Международной конференции «Информационные технологии в медицине, биологии, фармакологии и экологии» (Ялта, 2018), Всероссийской научной конференции с международным участием «Актуальные вопросы морфогенеза в норме и патологии» (Москва, 2018), XXVII Международной конференции «Новые технологии в медицине, биологии, фармакологии и экологии» (Гурзуф, 2019), Международной научно-практической конференции «Современные проблемы и перспективы исследований в анатомии и гистологии животных» (Витебск, респ. Беларусь, 2019).

Личное участие автора заключалось в планировании и проведении экспериментов. Автор лично проводил световую микроскопию и компьютерную морфометрию гистологических препаратов, иммуногистохимию с количественной оценкой результатов. Участвовал в исследовании пролиферативной активности тимоцитов методом определения пролиферации *ex tempore*. Автор принимал непосредственное участие в статистической обработке данных, написании статей и тезисов, их подготовке к публикации в научных изданиях, участвовал в качестве докладчика на всероссийских и международных конференциях.

Внедрение результатов исследования: Результаты исследования внедрены в учебный процесс на кафедре гистологии, цитологии и эмбриологии ФГАОУ ВО «Первый Московский государственный медицинский университет».

Положения, выносимые на защиту:

1. Воздействие низких доз эндокринного дисраптора ДДТ в пренатальном и постнатальном периодах развития изменяет параметры гистогенеза паренхимы и стромы тимуса и развития инволютивных изменений органа.
2. Воздействие низких доз ДДТ нарушает возрастную динамику пролиферативных процессов и приводит к повышенной пролиферации в основном низкодифференцированных лимфоцитов после достижения организмом половой зрелости, что обуславливает нарушение формирования пролиферативного ответа тимоцитов на Т-клеточный митоген в постнатальном развитии.

Публикации: По теме диссертационного исследования опубликовано 8 печатных работ, включая 3 статьи в изданиях, индексируемых в международных наукометрических базах данных Scopus, Web of Science, из которых 2 в рецензируемых изданиях, рекомендованных ВАК при Минобрнауки России.

Объем и структура диссертации: Диссертация изложена на 125 страницах текста и состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов, результатов собственных исследований, обсуждения результатов, заключения и выводов. Работа иллюстрирована 65 рисунками и 2 таблицами. Список литературы включает 183 источника, из них 26 отечественных и 157 зарубежных.

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Материалы и методы исследования

Лабораторные животные. Экспериментальное исследование выполнено на крысах Вистар, полученных из ФГБУН НЦБМТ ФМБА России (филиал «Столбовая»). Уход осуществлялся по нормам и правилам обращения с лабораторными животными, в соответствии с «Международными рекомендациями по проведению медико-биологических исследований с использованием животных» (1985г.). Эксперимент проведен в соответствии с правилами

работы с использованием экспериментальных животных, утвержденными приказом Минздрава СССР № 577 от 12.08.1977г. На проведение эксперимента получено разрешение этического комитета ФГБНУ «НИИ морфологии человека» (протокол № 8а от 06.10.2011г.).

Схема эксперимента. Пренатальное и постнатальное воздействие низких доз эндокринного дисраптора ДДТ на развивающийся организм осуществляли путем замены в поилках питьевой водопроводной воды на раствор *o,n*-ДДТ («Sigma-Aldrich», США) с концентрацией 20 мкг/л самцов и самок крыс с момента ссаживания. Потребление раствора ДДТ крысами продолжалось в течение всей беременности и вскармливания до достижения потомством 3-недельного возраста. С этого момента потомство крыс отсаживали от матерей, и они самостоятельно потребляли раствор ДДТ вместо питьевой воды. Расчет уровней воздействия ДДТ на развивающийся организм производили на основании определения низких доз для ДДТ [Vandenberg L. et al., 2012], максимально допустимых уровней его содержания в продуктах питания в Российской Федерации [Технический регламент Таможенного союза ТР ТС 021/2011], а также отличий в скорости метаболизма ДДТ в организме крысы и человека [Yamazaki H. et al., 2010]. Потребление ДДТ беременными самками составило $2,70 \pm 0,19$ мкг/кг/сут, во время лактации – $2,47 \pm 0,11$ мкг/кг/сут, самостоятельное потребление потомством – $2,90 \pm 0,13$ мкг/кг/сут, что соответствует фоновому воздействию ДДТ на организм путем потребления его с пищевыми продуктами [WHO, 2017]. Наличие ДДТ, его метаболитов и сходных хлорорганических соединений в стандартном сухом корме для лабораторных животных и водопроводной воде исследовали методом газожидкостной хроматографии в ФБУЗ «Центр гигиены и эпидемиологии в городе Москве». Результаты исследования показали отсутствие определяемых соединений в образцах.

Таблица 1. Сроки исследования и экспериментальные группы

№ п/п	Период развития и возраст	Количество животных в экспериментальной группе	Количество животных в контрольной группе
1.	Новорожденные (первые 12 часов после рождения)	23	14
2.	Подсосный период (7 суток)	16	14
3.	Пубертатный период (42 дня)	13	12
4.	Постпубертатный период (70 суток)	12	12
Итого: 116		64	52

Исследование проводили на потомстве мужского пола (n=116). В качестве контрольной группы использовали мужское потомство интактных самок. Животных выводили из эксперимента передозировкой золетила («Virbac Sante Animale», Франция) в различные этапы постнатального онтогенеза (табл. 1). Тимэктомию производили в стерильных условиях. Определяли абсолютную и относительную массу органа. Одну долю тимуса использовали для определения пролиферации тимоцитов, вторую для гистологических исследований.

Гистологические исследования. Тимус фиксировали в растворе Буэна. После стандартной автоматизированной гистологической проводки с помощью гистопроцессора «Tissue-Tek VIP 5 Jr» («Нугесо», Франция) образцы были залиты в парафин. Срезы изготавливали с помощью микротомы «Microm HM 340E» («Microm GmbH», Германия). После депарафинирования срезы окрашивали гематоксилином и эозином («Biovitrum», Россия). Изучение гистологических препаратов тимуса проводили методом световой микроскопии с использованием микроскопа «Leica DM2500» и компьютерной морфометрии с помощью пакета программ «ImageScore» («Leica Microsystems», Германия). Определяли следующие морфометрические параметры: площадь коркового и мозгового вещества, площадь безэпителиального пространства, количество лимфоцитов в 1 мм² коркового вещества, количество лимфоцитов в 1 мм² мозгового вещества тимуса, количество тимических телец в 1 мм² мозгового вещества, степень развития тимических телец.

Иммуногистохимические исследования. Для изучения гистотопографии пролиферативных процессов использовали поликлональные антитела к Ki-67 («Abcam», США) в разведении 1:100. Для проведения иммуногистохимических исследований стекла с адгезивным покрытием «Superfrost Plus» («Menzel», Германия). Иммуногистохимические реакции проводили в соответствии с протоколом производителя антител. Для проявления иммунопероксидазной реакции использовали набор реактивов «UltraVision LP detection system» («ThermoFisher Scientific», США). В качестве контроля наносили вторые антитела на срезы без предварительной инкубации с первыми антителами. Срезы докрашивали гематоксилином Майера. В препаратах определяли: ширину субкапсулярно расположенного слоя активно делящихся лимфобластов (мкм), процент Ki-67-позитивных лимфоцитов в более глубоких слоях коркового вещества, процент Ki-67-позитивных лимфоцитов в мозговом веществе.

Радиоизотопные исследования:

Получение культуры тимоцитов. Тимус гомогенизировали с помощью клеточных сеток с диаметром пор 40 мкм с охлаждённой средой RPMI 1640 («ПанЭко», Россия). Полученную клеточную суспензию освобождали от тканевых фрагментов отстаиванием в центрифужных пробирках в течение 5 минут и дважды отмывали в среде путём центрифугирования при 1000 об/мин в течение 7 минут. Осадок ресуспендировали в произвольном объёме среды для

отмывки и определяли количество живых клеток в камере Горяева по модифицированному методу Шрека. Для этого клеточную суспензию разводили в смеси равных объёмов 0,1% раствора эозина в растворе Рингера и 0,1% водного раствора трипанового синего. Число погибших клеток не превышало 10%. Суспензию клеток доводили до концентрации 2×10^6 /мл в культуральной среде. Среда для культивирования состояла из среды RPMI 1640, 10%-ую инактивированной эмбриональной телячьей сыворотки, 10 мМ буфера HEPES, 2 мМ L-глутамина, 5×10^{-5} М 2-меркаптоэтанола («ПанЭко», Россия).

Пролиферация ex tempore. Для исследования пролиферативной активности тимоцитов использовали метод определения пролиферации *ex tempore*, позволяющий получать данные, наиболее приближенные к уровню пролиферации в организме [Рахмилевич А.Л., 1990; Яглова Н.В., Обернихин С.С., 2013]. Клетки в количестве 2×10^5 (0,1 мл) вносили в 96-луночные планшеты для определения 4-х часовой пролиферации, добавляли ^3H -тимидин (1мКи/лунку). После инкубации клетки снимали на харвестре, метку просчитывали на β -счетчике («LKB», Австрия).

Радиоизотопный метод определения пролиферативной активности лимфоцитов тимуса в реакции бласттрансформации. В лунки 96-луночного круглодонного планшета вносили смесь 100 мкл клеток тимуса в концентрации 2×10^6 клеток/мл и 100 мкл Конканавалина А («Sigma», США) с таким расчётом, чтобы конечная концентрация Конканавалина А составляла 5 мкг/мл. Контрольные лунки содержали смесь 100 мкл клеток (2×10^6 клеток/мл) и 100 мкл среды для культивирования. Планшет инкубировали 72 ч при 37°C в атмосфере воздуха с 5% содержанием CO_2 . За 4 часа до окончания инкубирования в лунки вносили по 1 мКи ^3H -тимидина. Пробы собирали при помощи харвестра на стекловолнообразные фильтры, высушивали и просчитывали на β -спектрометре «1209 Rackbeta liquid scintillation counter» («LKB», Австрия). Индекс пролиферации в реакции бласттрансформации (ИБ) определяли по формуле: $\text{ИБ} = \text{А} / \text{В}$, где А – Конканавалин А – стимулированная пролиферация клеток, В – пролиферация клеток в среде.

Статистическая обработка данных проводилась с помощью пакета прикладных программ STATISTICA 7.0 («Statsoft Inc.», США). Для описания количественных признаков проводили анализ соответствия вида распределения признака закону нормального распределения с использованием критериев Колмогорова-Смирнова, Лиллиефорса, Шапиро-Уилка. Центральные тенденции и рассеяния количественных признаков, имеющих приближенно нормальное распределение описывали средним значением М и стандартной ошибкой среднего значения m. Сравнение независимых групп по количественному признаку проводили с помощью t-критерия Стьюдента с учетом значений критерия Левена о равенстве дисперсий, критерия χ^2 . Для сравнения групп различного возраста использовали однофакторный дисперсионный анализ [6]. Различия считали статистически значимыми при $p < 0,01$.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Морфологические изменения тимуса крыс различных возрастных групп, подвергавшихся пренатальному и постнатальному воздействию эндокринного дисраптора ДДТ

Новорожденные животные. Тимус новорожденных крыс контрольной группы состоял из двух долей. Снаружи тимус был покрыт капсулой, от которой отходили соединительнотканые перегородки, делящие доли на дольки. В дольках хорошо различалось корковое и мозговое вещество. Корковое вещество было сформировано лимфоцитами и составляло две трети. Мозговое, представленное ретикулоэпителиальными клетками, соответственно, одну треть дольки. Наружную часть коркового вещества составляли лимфобласты. У некоторых крыс под капсулой обнаруживали узкое безэпителиальное пространство. В корковом веществе часто наблюдали митотически делящиеся лимфоциты. Количество лимфоцитов в 1мм^2 коркового вещества была невелико. В мозговом веществе содержание лимфоцитов было в 1,7 раза меньше, чем в корковом веществе. В мозговом веществе встречались как отдельные ретикулярные эпителиоциты с повышенной оксифилией цитоплазмы, так и тимические тельца. Подавляющее большинство составляли тимические тельца 1-ой стадии развития, состоящие в среднем из 3-х клеток. В мозговом веществе хорошо визуализировались венозные сосуды. Их просветы были свободны.

Тимус новорожденных крыс, развивавшихся при воздействии ДДТ, имел типичное анатомическое строение. Абсолютная и относительная масса тимуса не отличались от контрольных значений (рис. 1). По сравнению с контрольной группой дольчатая структура была менее выраженной, а соединительно-тканые перегородки были более тонкими. В дольках различались корковое и мозговое вещество, но граница между ними была менее четкой. Соотношение коркового и мозгового вещества соответствовало контрольному (рис. 2а). В отличие от крыс контрольной группы у 100% крыс опытной группы выявляли в структуре коркового вещества широкое безэпителиальное пространство (рис. 2б). В корковом веществе под безэпителиальным пространством располагался слой лимфобластов. В корковом веществе часто наблюдали митотически делящиеся лимфоциты. Количество лимфоцитов в единице площади коркового и мозгового вещества не отличалось от значений контрольной группы (рис. 3). Мозговое вещество характеризовалось меньшим количеством тимических телец. Просветы сосудов были свободны.

7-ые сутки постнатального развития. Тимус крыс контрольной группы представлял собой крупное образование, состоящее из двух долей. По сравнению с предыдущим сроком исследования его масса увеличилась почти в тридцать раз, но увеличение относительной массы было статистически незначимым (рис. 1). Наблюдалось существенное увеличение толщины коркового вещества (рис. 2а). Под капсулой располагалось безэпителиальное пространство,

площадь которого увеличилась по сравнению с предыдущим сроком исследования (рис. 2б). В наружных слоях коркового вещества располагались лимфобласты. Количество лимфоцитов в 1мм^2 коркового вещества увеличилось по сравнению с предыдущим сроком исследования (рис. 3а). Граница между корковым и мозговым веществом была четкой. Содержание лимфоцитов в мозговом веществе не изменялось (рис. 3б). В мозговом веществе увеличилось количество тимических телец (рис. 4). Более половины составляли тельца 1ой стадии развития (рис. 5). В отличие от новорожденных у 7-ми суточных крыс выявлялись также тимические тельца 3-ей стадии развития. Митотически делящиеся лимфоциты встречались и в корковом, и в мозговом веществе. Сосудистое русло в мозговом веществе было хорошо выражено. Просветы сосудов были свободны.

У крыс, развивавшихся при воздействии низких доз ДДТ, отмечалось аналогичное увеличение абсолютной массы тимуса (рис. 1а). Относительная масса органа не отличалась от значений контрольной группы (рис. 1б). Доли тимуса имели характерное дольчатое строение, но перегородки, разделяющие дольки, имели менее плотную структуру, чем у крыс контрольной группы, и представляли собой отдельно лежащие волокна. Граница между корковым и мозговым веществом стала более четкой. Корковое вещество значительно увеличилось по сравнению с предыдущим сроком исследования, и степень его развития соответствовала контрольным значениям (рис. 2а). Выраженность бэзэпителиального пространства коркового вещества у крыс была разной. В среднем, его площадь не отличалась от значений контрольной группы (рис. 2б).

Плотность лимфоцитов в корковом веществе статистически значимо увеличилась по сравнению с предыдущим сроком и не отличалась от значений контрольной группы (рис. 3а). Количество лимфоцитов в мозговом веществе не изменялось по сравнению с предыдущим сроком и не отличалось от контрольных значений (рис. 3б). В мозговом веществе выявлено уменьшение количества тимических телец в 1мм^2 по сравнению с предыдущим сроком. По сравнению с возрастным контролем их число было в три раза меньше (рис. 4). Встречались тимические тельца 1-ой, 2-ой и 3-ей стадии развития, но процент тимических телец 1-ой стадии развития был меньше, а 2-ой – больше, чем в контрольной группе (рис. 5). Как и в контрольной группе тимические тельца состояли в среднем из 4 ретикулярных эпителиоцитов.

42-ые сутки постнатального развития. По сравнению с предыдущим сроком исследования масса тимуса крыс контрольной группы увеличилась в среднем в 1,8 раза, а относительная масса органа не изменялась (рис. 1). Дольки тимуса были разделены широкими соединительнотканными перегородками, состоящими из отдельно лежащих коллагеновых волокон и немногочисленных фибробластов. В структуре долек четко выделялось корковое и мозговое вещество. Мозговое вещество было более выражено по сравнению с предыдущим

сроком исследования (рис. 2а). В корковом веществе отсутствовало безэпителиальное пространство. Количество лимфоцитов в единице площади коркового вещества увеличилось (рис. 3а), но появились участки гибели единичных тимоцитов (рис. 2а). В мозговом веществе выявлено статистически значимое увеличение содержания лимфоцитов (рис. 3б).

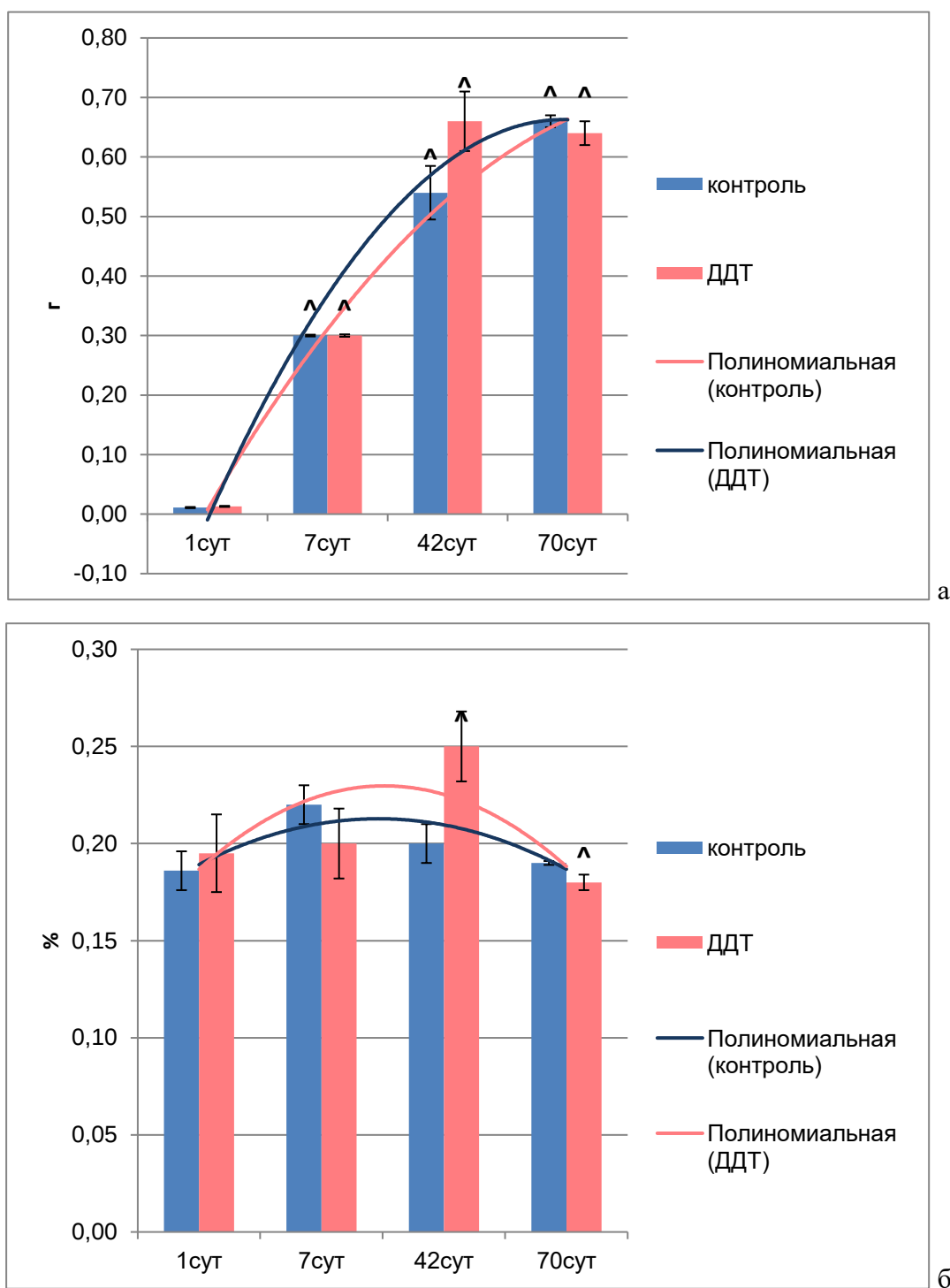


Рисунок 1. Тенденции изменения абсолютной (а) и относительной (б) массы тимуса крыс контрольной группы и развивавшихся в условиях воздействия низких доз ДДТ в постнатальном онтогенезе.

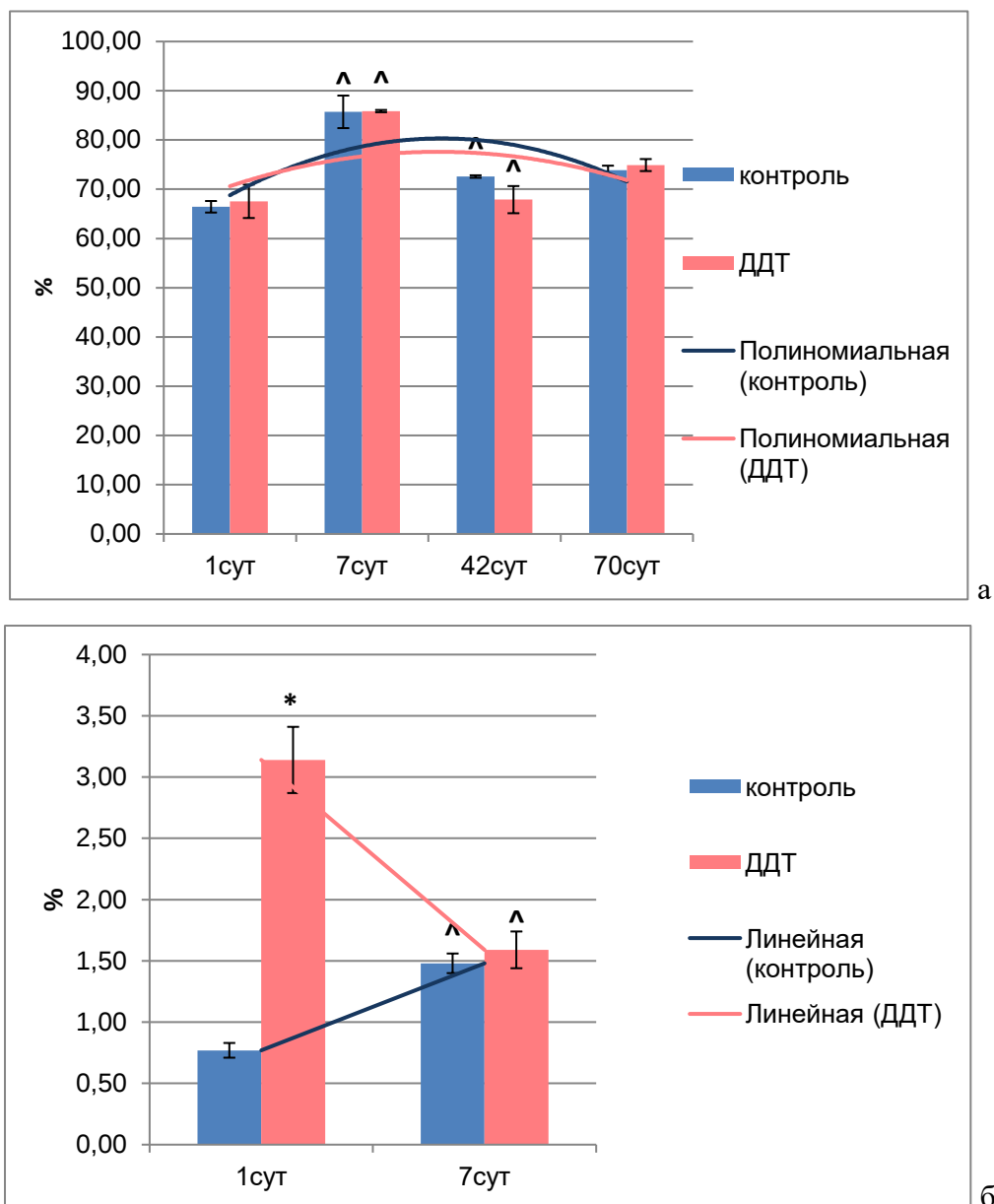


Рисунок 2. Тенденции изменения доли коркового вещества (а) и безэпителиального пространства в корковом веществе (б) тимуса крыс контрольной группы и развивавшихся в условиях воздействия низких доз ДДТ в постнатальном онтогенезе.

Количество тимических телец значительно уменьшилось по сравнению с предыдущим сроком исследования (рис. 4). Встречались тимические тельца 1-ой, 2-ой и 3-ей стадий развития (рис. 5). Преобладали тельца первой стадии, состоящие из 4 ретикулярных эпителиоцитов.

У крыс, развивавшихся в условиях воздействия ДДТ, по сравнению с предыдущим сроком исследования тимус в большей степени увеличился в размерах (рис. 1). Междольковые соединительнотканые перегородки по структуре не отличались от таковых в контроле. Значительно уменьшилось содержание коркового вещества в дольках, как и в контрольной группе (рис. 2а). Безэпителиальное пространство отсутствовало. Содержание лимфоцитов в 1 мм² площади среза коркового вещества увеличилось и не отличалось от контрольных значений

(рис. 3а). Аналогично контролю в корковом веществе появились участки очаговой гибели лимфоцитов. Граница между корковым и мозговым веществом была четкой. Содержание лимфоцитов в мозговом веществе увеличилось аналогично значениям контрольной группы (рис. 3б). Количество тимических телец уменьшилось по сравнению с предыдущим сроком исследования, но было значительно меньшим по сравнению с таковым у крыс контрольной группы аналогичного возраста (рис. 4). В отличие от контрольной группы тимические тельца третьей стадии развития не обнаруживались. Преобладали тельца первой стадии. Их доля в общем числе тимических телец превышала значения контрольной группы (рис. 5). Тимические тельца состояли, как правило, из 4 ретикулярных эпителиоцитов.

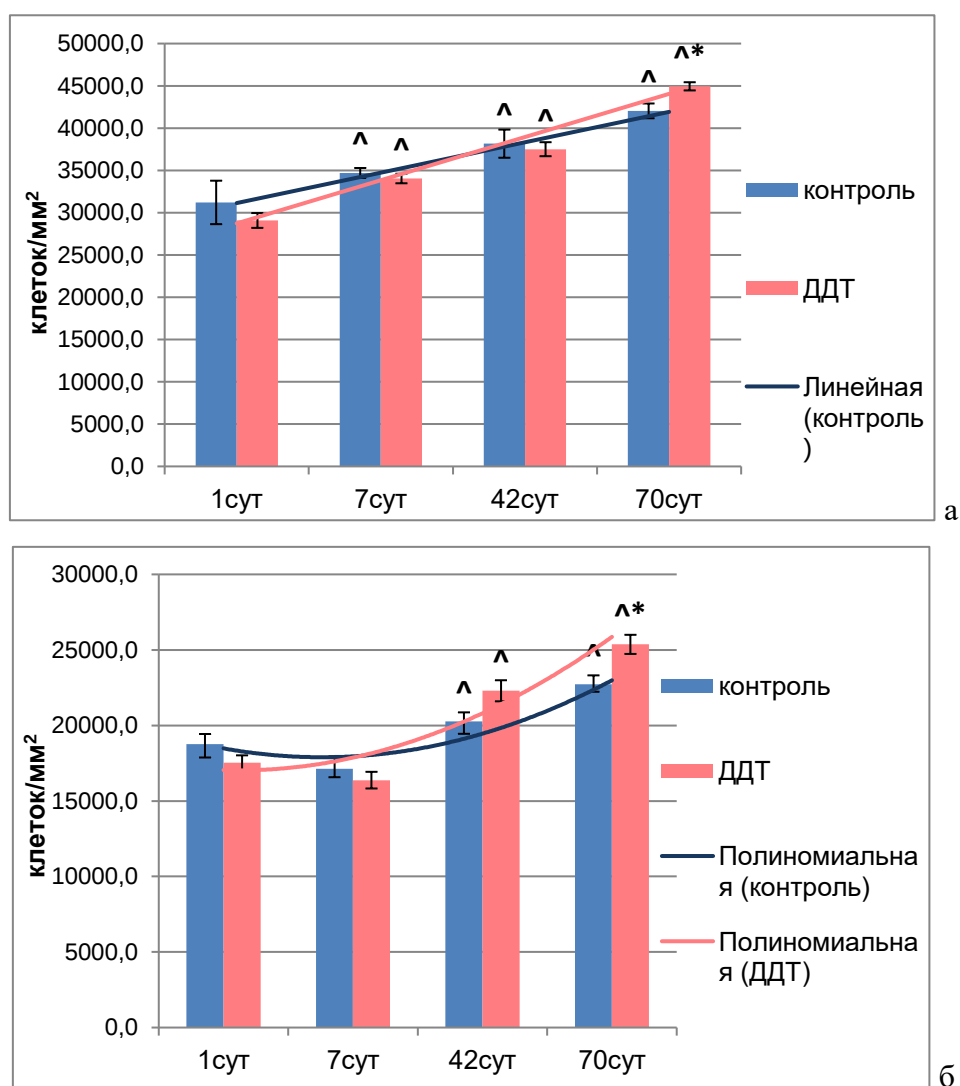


Рисунок 3. Тенденции изменения численности лимфоцитов в 1 мм² коркового вещества (а) и мозгового вещества (б) тимуса крыс контрольной группы и развивавшихся в условиях воздействия низких доз ДДТ в постнатальном онтогенезе.

*Примечание: * – $p < 0,01$ по сравнению с контрольной группой, ^ – по сравнению с предыдущей возрастной группой.*

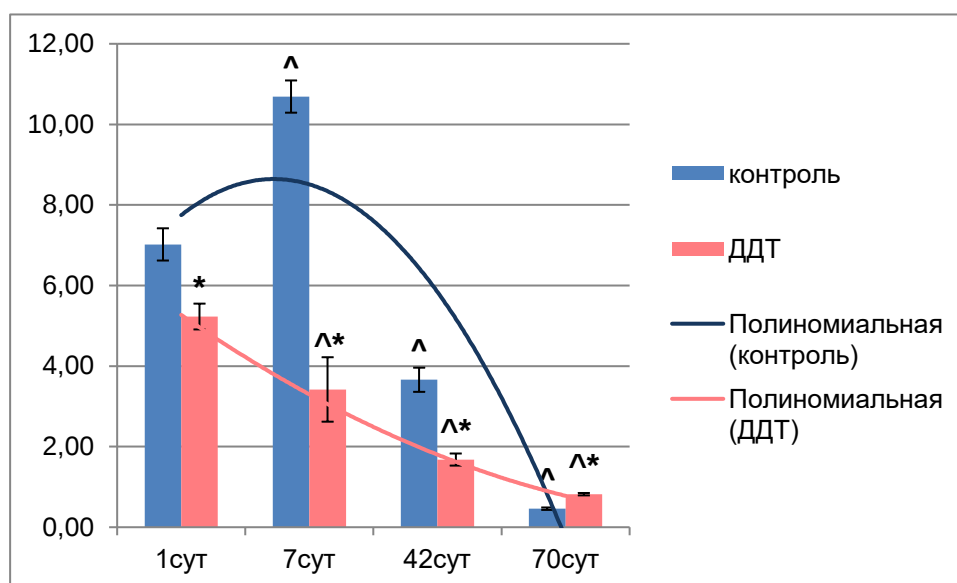


Рисунок 4. Тенденции изменения численности тимических телец в 1 мм² мозгового вещества тимуса крыс контрольной группы и развивавшихся в условиях воздействия низких доз ДДТ в постнатальном онтогенезе.

*Примечание: * – $p < 0,01$ по сравнению с контрольной группой, ^ – по сравнению с предыдущей возрастной группой.*

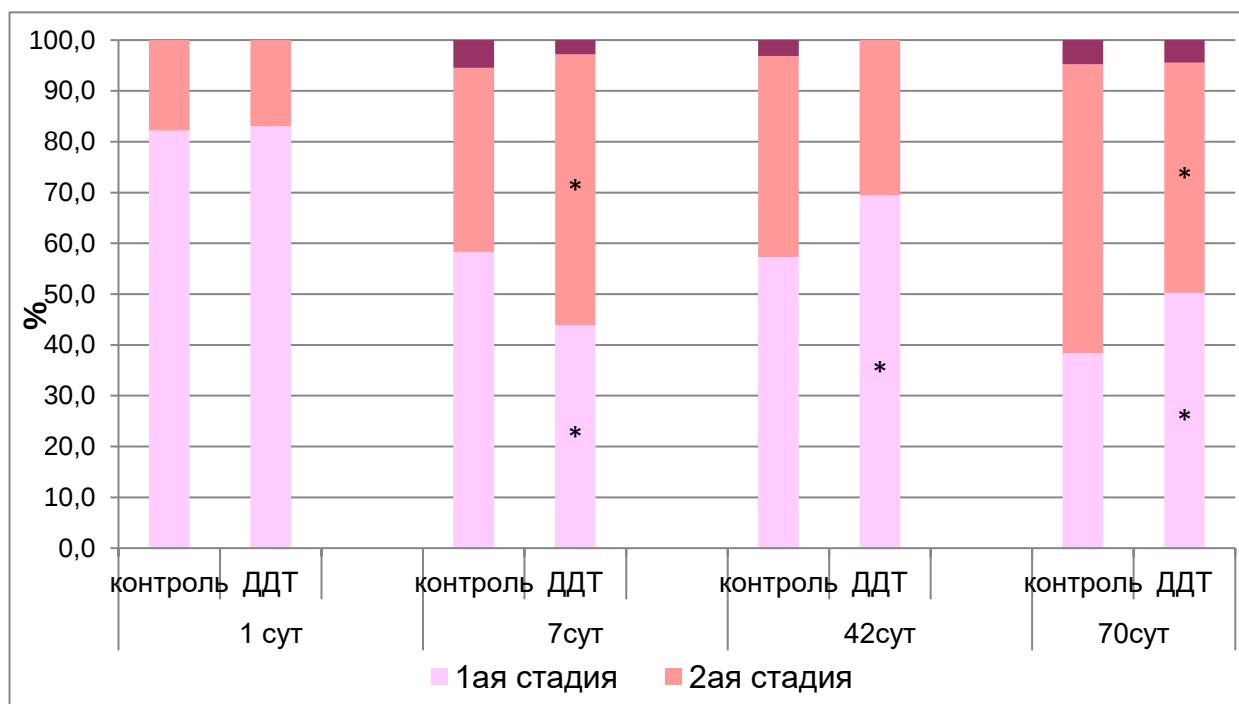


Рисунок 5. Динамика развития тимических телец в мозговом веществе тимуса крыс контрольной группы и развивавшихся в условиях воздействия низких доз ДДТ в постнатальном онтогенезе.

70-ые сутки постнатального развития. У крыс контрольной группы масса тимуса увеличилась более чем на 20% по сравнению с предыдущим сроком исследования, а относительная масса не изменялась (рис. 1). В долях корковое и мозговое вещество имели четкую границу. Их соотношение не изменилось по сравнению с предыдущим сроком исследования (рис. 2а). Несмотря на наличие очагов гибели тимоцитов и опустошения коркового вещества, содержание лимфоцитов в единице площади среза увеличилось (рис. 3а). Аналогично и в мозговом веществе увеличилось содержание лимфоцитов (рис. 3б). Количество тимических телец уменьшилось почти в восемь раз по сравнению с предыдущим сроком исследования (рис. 4). Встречались тельца 1-ой, 2-ой и 3-ей стадии. В отличие от пубертатного возраста после наступления половой зрелости в мозговом веществе превалировали тельца 2ой стадии развития (рис. 5). Как правило, они состояли из 3 ретикулярных эпителиоцитов.

У крыс, развивавшихся при воздействии низких доз ДДТ, на 70-ые сутки постнатального развития тимус имел типичное строение. Но в отличие от крыс контрольной группы увеличения абсолютной массы органа не наблюдалось, а относительная масса уменьшилась (рис. 1). Несмотря на различную возрастную динамику, эти показатели на 70-ые сутки в опытной и контрольной группах не имели статистически значимых различий. Соотношение коркового и мозгового вещества незначительно изменилось и не отличалось от возрастного контроля (рис. 2а). Количество лимфоцитов в единице площади коркового вещества увеличилось по сравнению с предыдущим сроком в большей степени, чем у контрольных животных и превысило их значения (рис. 3а). Тем не менее, в корковом веществе также выявлялись очаги гибели клеток. В мозговом веществе также выявлено большее число лимфоцитов как по сравнению с предыдущим сроком исследования, так и с контрольными животными аналогичного возраста (рис. 3б). Количество тимических телец уменьшилось, но на 70-ые сутки превышало значения контрольной группы (рис. 4). Тимические тельца состояли в основном из 3 ретикулярных эпителиоцитов. Как и в предыдущем сроке исследования превалировали тельца первой стадии развития (рис. 5).

Таким образом, проведенное исследование показало, что у потомства самок, ежедневно потреблявших ДДТ в течение всей беременности, развитие тимуса в целом не отличается от такового у потомства интактных самок. Макроскопическое и массометрическое исследование не выявило различий в строении тимуса, то есть пренатальное воздействие эндокринного дисраптора не нарушало программу формирования органа. Но микроскопическое исследование обнаружило отличия в строении паренхимы и стромы тимуса в каждом из исследуемых возрастных периодов.

Изменения пролиферативных процессов в паренхиме тимуса крыс

Изменения пролиферации *ex tempore* клеток тимуса в различные периоды постнатального онтогенеза

Исследование пролиферации *ex tempore* клеток тимуса выявило равномерное снижение пролиферативной активности клеток от периода новорожденности до пубертатного периода и резкий спад этого процесса после достижения половой зрелости у крыс контрольной группы (рис. 6).

У крыс, развивавшихся в условиях воздействия эндокринного дисраптора ДДТ, выявлено значительное уменьшение пролиферативной активности в подсосном периоде, после чего пролиферативные процессы изменялись незначительно по сравнению с контролем и после достижения половой зрелости протекали более активно (рис. 6).

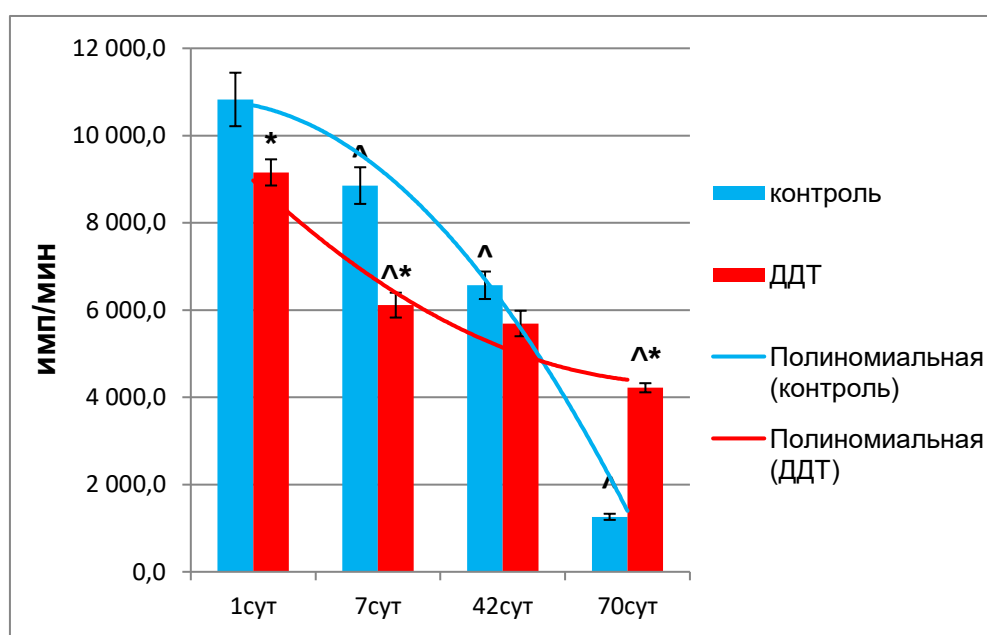


Рисунок 6. Тенденции изменения пролиферации *ex tempore* клеток тимуса крыс контрольной группы и развивавшихся в условиях воздействия низких доз ДДТ в постнатальном онтогенезе.

*Примечание: * – $p < 0,01$ по сравнению с контрольной группой. ^ – по сравнению с предыдущей возрастной группой.*

Ширина субкапсулярного слоя активно делящихся лимфобластов у крыс контрольной группы уменьшалась до пубертатного периода. Уменьшение было неравномерным: наибольшее (двукратное) уменьшение наблюдалось к 7-ым суткам, к 42-ым суткам выявлено уменьшение слоя лимфобластов на треть. После достижения половой зрелости слой лимфобластов не уменьшался (рис. 7).

У крыс, развивавшихся в условиях воздействия эндокринного дисраптора, также наблюдалось уменьшение ширины субкапсулярного слоя делящихся лимфобластов с

возрастом. Но выраженность этого процесса в постнатальном развитии была меньшей, что привело к превышению этого показателя по сравнению с контролем с 42-ых суток (рис. 7).

Возрастная динамика пролиферативных процессов в тимусе

Процент Ki-67-позитивных лимфоцитов в корковом веществе крыс контрольной группы изменялся в постнатальном развитии волнообразно, повышаясь на 7-ые и 70-ые сутки. Однако общая тенденция свидетельствует о снижении пролиферативных процессов в корковом веществе с возрастом (рис. 8а). У крыс, развивавшихся в условиях воздействия низких доз ДДТ, динамика этого показателя была иной. Процент Ki-67-позитивных лимфоцитов в корковом веществе был стабилен и не снижался с возрастом (рис. 8а). Процент Ki-67-позитивных лимфоцитов в мозговом веществе у крыс контрольной группы имел общие черты с аналогичным показателем в корковом и отличался только более выраженным снижением пролиферирующих лимфоцитов в пубертатном периоде. У крыс, развивавшихся в условиях воздействия эндокринного дисраптора, характер

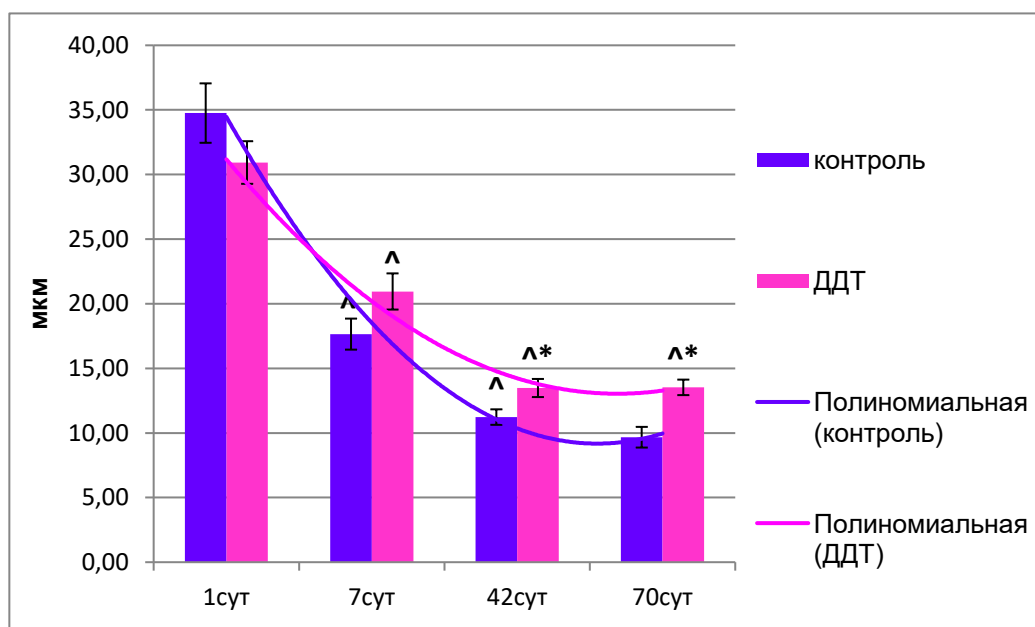


Рисунок 7. Тенденции изменения ширины субкапсулярного слоя делящихся лимфобластов тимуса крыс контрольной группы и развивавшихся в условиях воздействия низких доз ДДТ в постнатальном онтогенезе.

*Примечание: * – $p < 0,01$ по сравнению с контрольной группой, ^ – по сравнению с предыдущей возрастной группой.*

изменения этого показателя в постнатальном развитии был идентичен контролю и отличался только численными значениями – более низкими в 1-ые и 7-ые и более высокими на 42-ые и 70-ые сутки (рис. 8б).

Из полученных данных следует, что у крыс, развивавшихся в условиях воздействия эндокринного дисраптора ДДТ, были нарушены темпы пролиферации

низкодифференцированных тимоцитов. Вероятно, что это обусловлено воздействием ДДТ. Известно, что ДДТ вызывает снижение цАМФ в тимocyтах, что неизбежно приводит к уменьшению их митотической активности [Hennighausen G. et al., 1985]. Мы наблюдали снижение пролиферации тимоцитов, как по данным иммуногистохимического выявления Ki-67-положительных клеток, так и по оценке пролиферации радиоизотопным методом. Вероятно, что торможение пролиферации в период, когда тимус должен активно развиваться, явилось причиной отсутствия возрастного снижения пролиферации в пубертатном и постпубертатном периодах. То есть мы наблюдали замедление темпов развития органа и смещение роста тимуса в период, когда должна начинаться его возрастная инволюция.

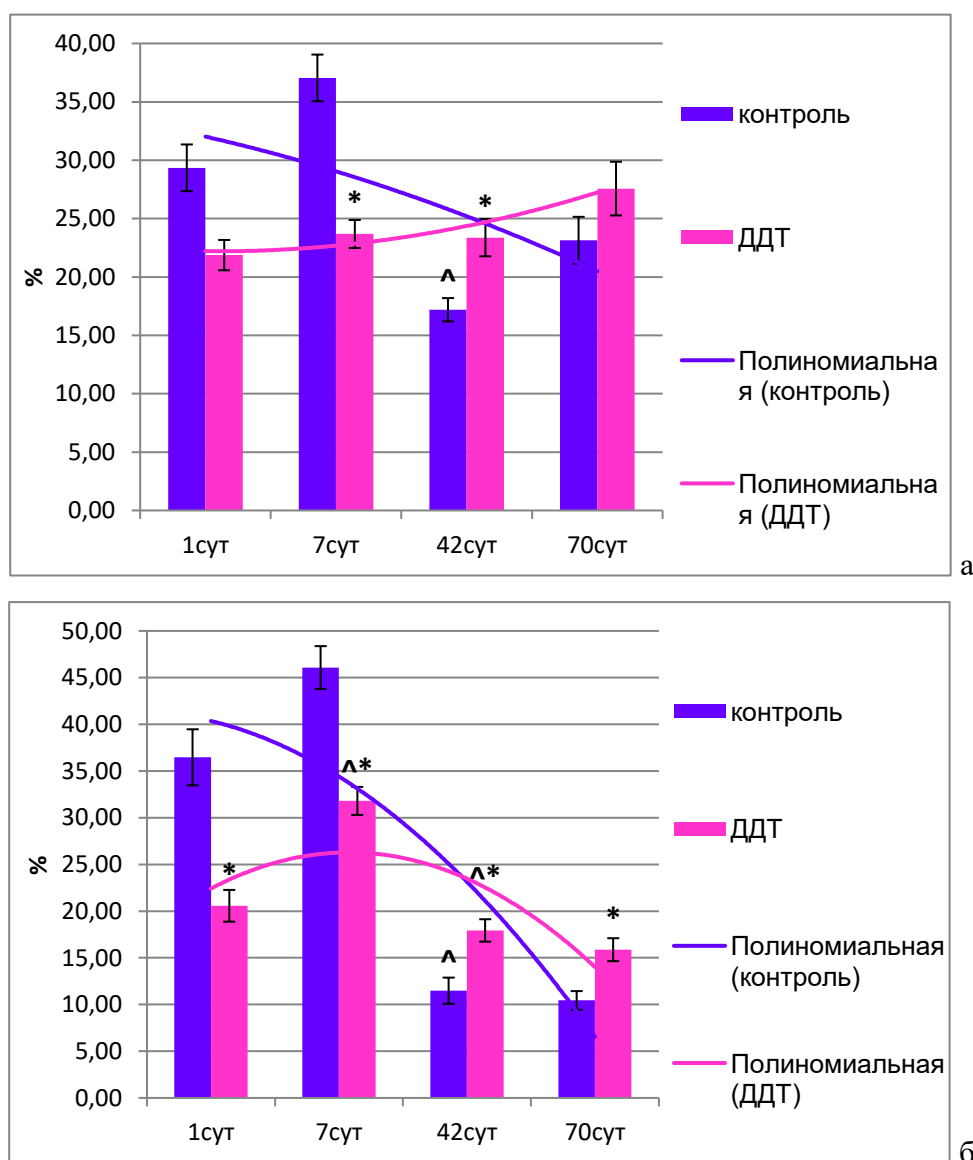


Рисунок 8. Тенденции изменения процента Ki-67-позитивных лимфоцитов в корковом (а) и мозговом (б) веществе крыс контрольной группы и развивавшихся в условиях воздействия низких доз ДДТ в постнатальном онтогенезе.

Формирование пролиферативного ответа тимоцитов на панТ-клеточный митоген

На 7-ые сутки тимоциты крыс контрольной группы характеризовались высоким митогенным ответом на конканавалин А. У крыс, развивавшихся в условиях воздействия ДДТ, также был выявлен высокий индекс пролиферации тимоцитов (рис. 9). На 42-ые сутки у крыс контрольной группы индекс пролиферации увеличился по сравнению с предыдущим сроком исследования. У крыс, развивавшихся в условиях воздействия ДДТ, этот показатель был уменьшен в два раза по сравнению с предыдущим сроком исследования и по сравнению с контрольной группой аналогичного возраста (рис. 9). На 70-ые сутки у крыс контрольной группы способность тимоцитов отвечать пролиферацией на стимул конканавалина А сохранялась на высоком уровне (рис. 9). У крыс, развивавшихся при воздействии эндокринного дисраптора, индекс пролиферации не изменялся по сравнению с пубертатным периодом и был более чем в два раза ниже значений контрольной группы (рис. 9).

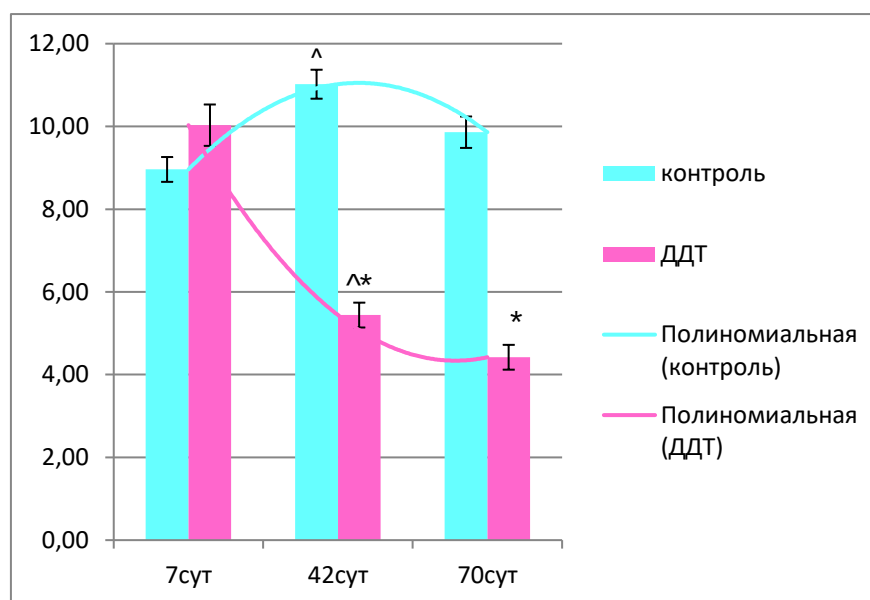


Рисунок 9. Изменения индекса пролиферации тимоцитов в реакции бласттрансформации митогеном конканавалином А в постнатальном развитии крыс контрольной группы и крыс, развивавшихся в условиях воздействия эндокринного дисраптора ДДТ.

*Примечания: * – $p < 0,01$ по сравнению с контрольной группой, ^ – по сравнению с предыдущим сроком исследования.*

Пониженный индекс пролиферации указывает на наличие меньшего числа дифференцированных тимоцитов, так как способность отвечать бласттрансформацией на стимул митогена характерна для зрелых Т-клеток [Holladay S. et al., 2000]. Второй причиной было повышение пролиферативной активности тимоцитов в целом, так как пролиферирующий тимоцит не может уже отвечать на митогенный стимул.

ВЫВОДЫ

1. Воздействие низких доз эндокринного дисраптора дихлордифенилтрихлорэтана в пренатальном и постнатальном периодах вызывает морфологические и цитофизиологические изменения тимуса крыс, затрагивая как паренхиму, так и строму органа.
2. Изменения, обусловленные воздействием эндокринного дисраптора в пренатальном периоде связаны с нарушением развития соединительно-тканых элементов и ретикулоэпителиальной стромы: более раннее формирование и регресс безэпителиальных пространств, меньшее формирование тимических телец. Морфологические изменения в постнатальном периоде заключаются в повышении содержания лимфоцитов и в корковом, и мозговом веществе после достижения половой зрелости, что указывает на дисбаланс пролиферации и миграции лимфоцитов тимуса.
3. Развитие организма в условиях воздействия эндокринного дисраптора ДДТ изменяет течение пролиферативных процессов, обуславливая пониженный уровень пролиферации тимоцитов в период активного развития органа и более активную пролиферацию после наступления половой зрелости, когда начинается возрастная инволюция тимуса.
4. Пренатальное и постнатальное воздействие низких доз ДДТ нарушает формирование пролиферативного ответа тимоцитов на Т-клеточный митоген, что связано с более высокой активностью пролиферативных процессов в паренхиме и повышенным содержанием лимфобластов после достижения половой зрелости, что является фактором риска нарушений реакций клеточного иммунитета.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. Яглова Н.В., Цомартова Э.С., Назимова С.В., Обернихин С.С., Мухамедова С.Г., Пашина Н.Р., Мусаева Д.О. Морфологические изменения тимуса новорожденных крыс, подвергавшихся воздействию эндокринного дисраптора дихлордифенилтрихлорэтана во внутриутробном периоде развития // **Бюллетень экспериментальной биологии и медицины.** – 2018. – Т.167. – №2. – С.261-264.
2. Яглова Н.В., Цомартова Э.С., Обернихин С.С., Назимова С.В., Яглов В.В., Черешнева Е.В., Иванова М.Ю., Кузнецов С.Л. Изменения пролиферативных процессов в тимусе крыс, подвергавшихся антенатальному и постнатальному воздействию эндокринного дисраптора дихлордифенилтрихлорэтана // **Медицинский вестник Северного Кавказа.** – 2019. – Т. 14. – № 4. – С. 676-681.
3. Yaglova N.V., Tsomartova E.S., Obernikhin S.S., Ivanova M.Y., Cheresheva E.V., Muhamedova S.G., Lomanovskaya T.A., Yaglov V.V. Developmental exposure to low doses of

dichlorodiphenyltrichloroethane impairs proliferative response of thymic lymphocytes to Concanavalin A in rats // **Heliyon**. – 2020. Vol. 6. – E03608.

4. **Цомартова Э.С.** Развитие тимуса при пренатальном воздействии ДДТ// Информационные технологии в медицине, биологии, фармакологии и экологии: IT+M&Ec`2018. Весенняя сессия. С. 271-274.

5. **Цомартова Э.С., Яглова Н.В., Кузнецов С.Л.** Морфологическая характеристика тимуса 7-дневных крыс, подвергавшихся воздействию эндокринного дисраптора дихлордифенилтрихлорэтана (ДДТ) в пренатальном и постнатальном развитии //«Актуальные вопросы морфогенеза в норме и патологии» Москва. 2018г. С. 75-76.

6. **Цомартова Э.С., Тимохина Е.П., Горлушкин В.М.** Структура тимуса крыс пубертатного возраста, развивавшихся при воздействии низких доз ДДТ // Новые технологии в медицине, биологии, фармакологии и экологии: IT+M&Ec`2019. Весенняя сессия. С.98-100.

7. **Цомартова Э.С., Яглова Н.В., Тимохина Е.П., Кузнецов С.Л.** Пролиферативная активность тимоцитов новорожденных крыс, развивавшихся при воздействии низких доз эндокринного дисраптора ДДТ // «Современные проблемы и перспективы исследований в анатомии и гистологии животных». Беларусь. 2019г. С. 159-161.

8. **Цомартова Э.С., Яглова Н.В., Обернихин С.С.** Изменения пролиферативной активности тимоцитов в пубертатном возрасте у крыс, подвергавшихся воздействию низких доз ДДТ.// Новые технологии в медицине, биологии, фармакологии и экологии: IT+M&Ec`2020. Весенняя сессия. С.65-68.