

ФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ И СТРУКТУРНЫЕ ИЗМЕНЕНИЯ ТИМУСА КРЫС ПРИ ВОЗДЕЙСТВИИ РАЗЛИЧНЫХ ДОЗ ЭНДОКРИННОГО ДИСРАПТОРА

Тимохина Е.П., Яглова Н.В., Обернихин С.С., Яглов В.В.

НИИМЧ им. акад. А.П. Авцына ФГБНУ «РНЦХ им. акад. Б.В. Петровского»
Абрикосовский пер., 2, г. Москва, 119991, ГСП-1, РФ; e-mail: rodich_k@mail.ru

Поступила в редакцию 13.07.2023. DOI: 10.29039/rusjbpс.2023.0605

Аннотация. В последние годы в мире отмечен значительный рост числа заболеваний, связанных с нарушениями функционирования иммунной системы. Одной из главных причин этого можно считать загрязнение окружающей среды эндокринными дисрапторами. Наиболее распространенным на планете дисраптором является ДДТ. Отмечается повсеместное содержание его в продуктах питания, воде и почве, что делает изучение воздействия его фоновых доз на организм крайне актуальным. Системное потребление низких доз дисраптора ДДТ приводит к значительным изменениям структурных и функциональных характеристик тимуса крыс, которые проявляются усилением гибели лимфоцитов и ретикулоэпителиоцитов, в механизмах гибели которых задействован р53-зависимый путь апоптоза, а также снижением пролиферативной активности тимоцитов, т.е. способно оказывать иммунотоксическое действие на организм. Эти данные показывают, что максимальные допустимые уровни содержания ДДТ в продуктах питания не являются безопасными для иммунной системы организма.

Ключевые слова: дисраптор, ДДТ, тимус, апоптоз, пролиферация, иммунная система.

ВВЕДЕНИЕ

В последние годы в мире отмечен значительный рост числа заболеваний, связанных с нарушениями функционирования иммунной системы. Многие исследователи сходятся во мнении, что одной из главных причин этого можно считать загрязнение окружающей среды эндокринными дисрапторами [1,2]. Согласно определению, данному ВОЗ, эндокринные дисрапторы – это вещества, которые нарушают один или несколько параметров функционирования эндокринной системы и тем самым оказывают негативное влияние на организм или его потомство, либо популяцию [3]. Исследователями был проявлен большой интерес к проблеме эндокринных дисрапторов, но большинство работ посвящено эстрогеноподобным, антиандрогенным и антитиреоидным веществам. Наименее изученным вопросом является как прямое, так и опосредованное влияние дисрапторов через эндокринную систему на развитие и функционирование иммунной системы. Исследование влияния эндокринных дисрапторов на развитие органов иммунной системы приобретают важное значение для понимания механизмов нарушений иммунитета, защитных реакций и адаптации организма. Наиболее распространенным на планете дисраптором является дихлордифенилтрихлорэтан (ДДТ). Это связано как с его массивным использованием в прошлом, так и с длительным периодом полураспада и способности к биоаккумуляции в организмах животных и человека. Его воздействие на человека оказывается в первую очередь через потребление продуктов питания. Благодаря низкой молекулярной массе и высокой липофильности он легко проникает через плаценту и гистогематические барьеры, также экскретируется с молоком, что обеспечивает постоянное воздействие дисраптора на всех этапах развития организма [4,5]. В связи с повсеместным распространением ДДТ его содержание в продуктах питания, воде, почве, воздухе регламентировано нормативными документами [6]. Этот факт делает актуальной проблему изучения влияния разрешенных МДУ доз эндокринного дисраптора на организм человека и животных и, в частности, на иммунную систему.

Целью работы было изучение функциональных и структурных изменений тимуса крыс, вызванных воздействием системного потребления различных низких доз эндокринного дисраптора ДДТ.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Эксперимент выполнен на самцах крыс Вистар (n=32) с массой тела 80-100г (питомник «Столбовая»). Животных были разделены на 3 группы: 1 контрольную и 2 опытные. Доступ к воде и пище у крыс был свободным. Животные опытных групп (n=22) вместо воды получали растворы о,п-ДДТ («Sigma», США) с концентрацией 20 и 80 мкг/л. Учет потребляемой жидкости производили ежедневно. Выбор потребляемой дозы ДДТ производили с учетом нормативов содержания ДДТ в продуктах питания в Российской Федерации (СанПин 2.3.2.1078-01. – 2008). Животные контрольной группы (n=10) получали водопроводную воду. Среднесуточное потребление ДДТ крысами составило $1,89 \pm 0,086$ мкг/кг в группе, получавшей раствор ДДТ 20 мкг/л, и $7,77 \pm 0,17$ мкг/кг в группе, получавшей раствор 80 мкг/л. Животных выводили из эксперимента через 10 недель с помощью передозировки золетила («Virbac Sante Animale», Франция). После стандартной гистологической проводки с помощью гистопроцессора «Tissue-Tek VIP 5 Jg» («Hygesc», Франция) изготавливали срезы с помощью микротомы «Microm HM 340E» («Microm GmbH», Германия) и окрашивали гематоксилином и эозином. Изучение гистологических препаратов проводили методом световой микроскопии с использованием микроскопа «Leica DM2500» и компьютерной морфометрии с помощью программы «ImageScope» («Leica Microsystems,

GMBH, Австрия). В гистологических препаратах тимуса определяли соотношение коркового и мозгового веществ, ширину субкапсулярного слоя, количество тимических телец в мм² площади среза мозгового вещества, оценивали количество ретикулярных эпителиоцитов, входящих в их состав, и стадии развития телец (1-я стадия – сближение нескольких ретикулярных эпителиоцитов с повышенной оксифилией цитоплазмы; 2-я стадия – концентрическое наложение ретикулярных эпителиоцитов и накопление в них кератина; 3-я стадия – формирование полости в центре тельца; 4-я стадия – распад тимического тельца). Проводили иммуногистохимическое исследование экспрессии белка p53 тимоцитами с использованием первичных кроличьих поликлональных антител (“Santa Cruz Biotechnology”, США). Также определяли спонтанную пролиферативную активность тимоцитов и пролиферацию в реакции бласттрансформации радиоизотопным методом с использованием 3H-тимидина. В качестве митогена использовали Конканавалин А («Sigma», США). Конечная концентрация Конканавалина А после внесения в культуру клеток составила 5 мкг/мл. Индекс стимуляции пролиферации в реакции бласттрансформации (ИБ) определяли по формуле: ИБ = А/Б, где А – Конканавалин А – стимулированная пролиферация клеток, Б – пролиферация клеток в среде.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Тимус контрольной группы крыс через 10 недель после начала эксперимента имел типичное дольчатое строение. Дольки тимуса были покрыты капсулой. Доля коркового вещества составляла 76,4±1%, мозгового – 23,6±1%. В корковом слое хорошо визуализировался субкапсулярный слой, образованный плотно лежащими лимфобластами. В мозговом веществе отмечались единичные тимические тельца.

В тимусе крыс 1 опытной группы, потреблявшей ДДТ в дозе 1,890±0,086 мкг/кг/сут в течение 10 недель соотношение площади коркового и мозгового вещества статистически значимо не изменилось. Однако в корковом веществе были отмечены участки опустошения, говорящие о гибели лимфоцитов. Процентное содержание клеток, экспрессирующих белок p53, не изменилось по сравнению с контрольной группой. p53-позитивные клетки располагались диффузно в корковом, а также группами в мозговом веществе. Количество тимических телец в мозговом веществе также соответствовало значению контрольной группы, однако число ретикулоэпителиоцитов в их составе статистически значимо увеличилось (таблица. 1). Доля тимических телец на ранних стадиях развития также увеличилась. Было отмечено снижение спонтанной пролиферативной активности тимоцитов и повышение пролиферативного ответа на митоген (таблица 1).

В тимусе крыс 2 опытной группы, потреблявших раствор ДДТ в дозе 7,77±0,17 мкг/кг/сут в течение 10 недель, статистически значимо изменилось соотношение коркового и мозгового слоев (рис. 1). Также было отмечено уменьшение ширины субкапсулярного слоя по сравнению со значением контрольной группы (табл. 1). В корковом слое имелись участки гибели лимфоцитов. Количество тимических телец в мозговом веществе не менялось, однако среднее количество ретикулоэпителиоцитов в них увеличилось (табл. 1). И, в отличие от контрольной группы, были выявлены тимические тельца с распадом и образованием полости в центральной части телец. Экспрессия белка p53 клетками тимуса возросла по сравнению с контрольной и 1 опытной группой. p53-позитивные тимоциты обнаруживались в корковом и мозговом веществе, отмечалось усиление экспрессии в субкапсулярном слое. Показатели пролиферативной активности тимоцитов и индуцированная пролиферация при этом значительно снизились (табл. 1).

ОБСУЖДЕНИЕ

После 10 недель потребления ДДТ в меньшей дозе, гибель ретикулярных эпителиоцитов в мозговом слое была более выражена, чем в контрольной группе за счет увеличения количества клеток, образующих тимические тельца. Однако, процентное содержание клеток, экспрессирующих белок p53, не изменилось по сравнению с контрольной группой. В отличие от контрольной группы, где p53-позитивные клетки располагались в основном субкапсулярно, в группе, потреблявшей ДДТ в дозе 1,89±0,086 мкг/кг/сут в течение 10 недель, клетки, экспрессирующие белок p53, располагались диффузно в корковом веществе, а также группами

Таблица 1. Изменения морфометрических показателей тимуса и пролиферативной активности клеток тимуса при воздействии различных низких доз ДДТ в течение 10 недель (M±m).

	Ширина субкапсул. слоя, мкм	Кол-во тим. телец в 1мм ² мозг. вещества	Кол-во клеток в тим. тельцах	Включение ³ H-тимидина, имп/мин	Индукц. пролиферация
Контрольная группа	44,22±1,19	1,84±0,29	3,61±0,10	10557,88 ±845,12	2,27±0,11
1 опытная группа	41,61±1,79	2,42±0,47	5,34±0,21*	7163,57±67,00	13,4±0,7*
2 опытная группа	39,35±1,44*	2,42±0,23*	5,01±0,20*	4605,05 ±154,95*+	1,24±0,20*+

* – статистически значимые отличия от контрольной группы, + – 2ой опытной группы от 1ой

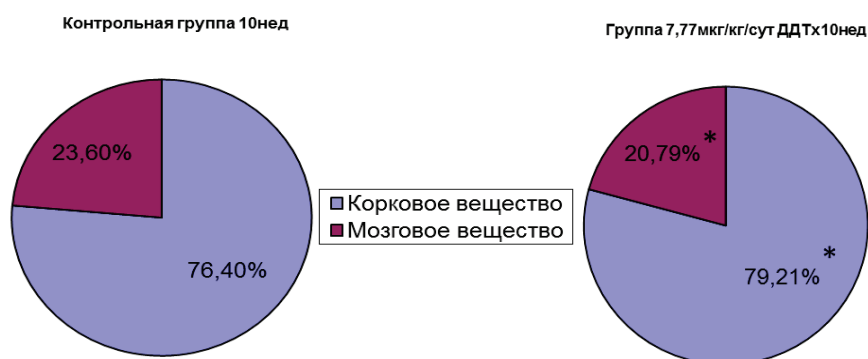


Рисунок 1. Соотношение коркового и мозгового вещества тимуса крыс контрольной группы, и опытной группы, потреблявшей ДДТ в дозе $7,77 \pm 0,17$ мкг/кг/сут в течение 10 недель

в мозговом веществе. Соотношение коркового и мозгового вещества не изменялось и не отличалось от значений контрольной группы. Тем не менее, отмечалось прогрессивное снижение ширины субкапсулярного слоя, в результате чего, этот показатель был ниже, чем в контрольной группе. Данный факт объясняется значительной гибелью лимфобластов на более раннем сроке исследования данной дозы ДДТ, а также снижением пролиферативной активности тимоцитов в данной опытной группе, что не дало возможности восстановить численность клеток в субкапсулярном слое. Стоит также отметить, что в данной дозе исследования значительно увеличилась ответная реакция тимоцитов на введение митогена на фоне пониженной спонтанной пролиферативной активности, что не типично для клеток тимуса [7].

В тимусе крыс, потреблявших более высокую дозу ДДТ, имелись признаки усиления гибели лимфоцитов. Экспрессия белка p53 клетками тимуса возросла по сравнению с контрольной и опытной группой аналогичного срока исследования, потреблявшей меньшую дозу ДДТ. p53-позитивные тимоциты обнаруживались в корковом и мозговом веществе, а также отмечалось увеличение их количества в субкапсулярном слое, что вместе со значительным снижением пролиферативной активности в данной группе, привело к снижению толщины слоя лимфобластов. Значительные изменения отмечались также и в строме тимуса. Увеличилось количество гибнущих ретикулярных эпителиоцитов за счет увеличения как числа тимических телец, так и количества клеток в них. При этом только в данной опытной группе, были выявлены тимические тельца с распадом и образованием полости в центральной части телец. Значительная гибель ретикулярных эпителиоцитов привела к уменьшению доли мозгового вещества в тимусе крыс данной группы и указывает на возможное нарушение секреции тимических гормонов и созревания Т-лимфоцитов. Данный факт говорит о негативном влиянии малых доз ДДТ на функционирование центрального органа иммунной системы тимуса, а, следовательно, может быть причиной нарушения реакций в первую очередь клеточного иммунитета, также как и при действии субтоксических доз ДДТ [8].

ВЫВОДЫ

Наше исследование показало, что системное потребление низких доз дисраптора ДДТ приводит к значительным изменениям структурных и функциональных характеристик тимуса крыс, которые проявляются усилением гибели лимфоцитов и ретикулоэпителиоцитов, в механизмах гибели которых задействован p53-зависимый путь апоптоза, а также снижением пролиферативной активности тимоцитов, т.е. способно оказывать иммунотоксическое действие на организм. Эти данные показывают, что максимальные допустимые уровни содержания ДДТ в продуктах питания не являются безопасными для иммунной системы организма.

Список литературы / References:

1. Timokhina E.P., Yaglov V.V., Nazimova S.V. Dichlorodiphenyltrichloroethane and the Adrenal Gland: From Toxicity to Endocrine Disruption. *Toxics*, 2021, vol. 9, no. 10, p. 243, doi: 10.3390/toxics9100243.
2. Gore A.C., Chappell V.A., Fenton S.E., Flaws J.A., Nadal A. et al. EDC-2, The Endocrine Society's Second Scientific Statement on Endocrine-Disrupting Chemicals. *Endocr. Rev.*, 2015, vol. 36, pp. E1-E150, doi: 10.1210/er.2015-1010.
3. *World Health Organization*. 2006. Preventing disease through healthy environments - towards an estimate of the environmental burden of disease. Geneva: World Health Organization.
4. Bouwman H., Becker P.J., Cooppan R.M., Reinecke A.J. Transfer of DDT used in malaria control to infants via breast milk. *Bull. World Health Organ.*, 1992, vol. 70, pp. 241-250.
5. Salone L.R., Vann W.F., Dee D.L. Breastfeeding: an overview of oral and general health benefits. *J. Am. Dent. Assoc.*, 2013, vol. 144, pp. 143-151.
6. Технический регламент Таможенного союза ТР ТС 021/2011 «О безопасности пищевой продукции». СПб: ГИОРД, 2015, 176 с. [Technical Regulations of the Customs Union TR CU 021/2011 "On food safety". St. Petersburg: GIORД, 2015, 176 p. (In Russ.)].

7. Ярилин А.А. Возрастные изменения тимуса и Т-лимфоцитов. *Иммунология*, 2003, № 2, с. 117-127 [Yarilin A.A. Age-related changes in thymus and T-lymphocytes. *Immunology*, 2003, no. 2, pp. 117-127 (In Russ.)].
8. Udoji F. et al. Immunosuppressive effects of triclosan, nonylphenol, and DDT on human natural killer cells in vitro. *J. Immunotoxicol.*, 2010, vol. 7, no. 3, pp. 205-212.

FUNCTIONAL AND STRUCTURAL CHANGES IN THE RAT THYMUS INDUCED BY DIFFERENT DOSES OF ENDOCRINE DISRUPTOR

Timokhina E.P., Yaglova N.V., Obernikhin S.S., Yaglov V.V.

Avtsyn research institute of human morphology of federal state budgetary scientific institution "Petrovsky national research centre of surgery"

Tsyurupy str., 3, Moscow, 117418, Russia; e-mail: rodich_k@mail.ru

Received 13.07.2023. DOI: 10.29039/rusjbpс.2023.0605

Abstract. In recent years, there has been a significant increase in the number of diseases associated with impaired functioning of the immune system in the world. One of the main reasons for this can be considered environmental pollution by endocrine disruptors. The most common disruptor on the planet is DDT. Its ubiquitous content in food, water and soil is noted, which makes the study of the effect of its background doses on the body extremely relevant. Systemic consumption of low doses of the disruptor DDT leads to significant changes in the structural and functional characteristics of the rat thymus, which are manifested by increased death of lymphocytes and reticuloepitheliocytes, in the mechanisms of death of which the p53-dependent pathway of apoptosis is involved, as well as a decrease in the proliferative activity of thymocytes, i.e., it is capable of having an immunotoxic effect on the body. These data show that the maximum permissible levels of DDT in food are not safe for the body's immune system.

Key words: *disruptor, DDT, thymus, apoptosis, proliferation, immune system.*