

© Коллектив авторов, 2013  
УДК 591.147.3:632.951

## ВЛИЯНИЕ ХРОНИЧЕСКОГО ВОЗДЕЙСТВИЯ НИЗКИХ ДОЗ ДДТ НА МОРФОФУНКЦИОНАЛЬНОЕ СОСТОЯНИЕ ТИМУСА КРЫС

*Е.П. Родиченко, Н.В. Яглова, В.В. Яглов, С.С. Обернихин*

ФГБУ «НИИ морфологии человека» РАМН, г. Москва

**Проведены исследования влияния низких доз ДДТ на морфофункциональное состояние тимуса крыс. Крысы Вистар с массой тела 80-100 г. потребляли ДДТ в дозе  $1,89 \pm 0,086$  мкг/кг/сут в течение 6 и 10 нед. При гистологическом исследовании тимуса было выявлено усиление гибели как лимфоцитов, так и ретикулоэпителиоцитов, что приводило сначала к компенсаторному повышению, а затем снижению пролиферативной активности клеток. Отмечено повышение способности тимоцитов отвечать на митогенное воздействие на фоне пониженной спонтанной пролиферативной активности.**

**Ключевые слова:** тимус, крыса, воздействие, токсичность, ДДТ, низкие дозы, морфология.

В последние десятилетия в мире отмечается рост заболеваемости, связанный с нарушениями функционирования иммунной системы. Многие исследователи из разных стран сходятся во мнении, что основной причиной повышения числа заболеваний в мире за последние десятилетия можно по праву считать загрязнение окружающей среды [3,4]. Оно, в свою очередь, приводит к перенапряжению и срыву защитных функций и адапционных резервов организма человека, за которыми следует развитие острых и хронических патологических процессов [2].

Стойкие органические загрязняющие вещества или загрязнители (СОЗ), поступающие в окружающую среду в результате деятельности человека, в силу высокой токсичности, стабильности, способности к дальнему переносу и биоаккумуляции считаются одними из наиболее опасных загрязнителей. Наиболее распространенным стойким органическим загрязнителем, представляющим наибольшую опасность с точки зрения биогенеза, считается пестицид 1,1,1-трихлор-2,2-бис (4-хлорфенил) этан (ДДТ). Благодаря высокой устойчивости к разло-

жению фоновые дозы ДДТ регистрируются на всех материках и во всех океанах [7]. В настоящее время ДДТ активно используется в качестве инсектицида для уничтожения переносчиков малярии и висцерального лейшманиоза [1]. В связи с этим, изучение влияния фоновых доз ДДТ, регистрируемых повсеместно, на организм человека и животных, и в частности на иммунную систему, очень актуально в настоящее время. Однако состояние этой проблемы на данный момент мало изучено. Имеются данные о воздействии более высоких (токсичных и субтоксичных) доз ДДТ на функционирование иммунной системы млекопитающих и человека. При изучении влияния субхронического действия субтоксичных доз ДДТ на функционирование иммунной системы белых крыс было выявлено подавление гуморального и клеточного иммунного ответа, приводящее к повышению восприимчивости организма к возбудителям бактериальных инфекций [6]. Кроме того, ДДТ вызывал увеличение образования макрофагами фактора некроза опухоли-альфа и оксида азота, тем самым приводя к воспалительным реакциям и цитокиновому дисбалансу

[8]. Имеются данные, что ДДТ способен снижать активность естественных киллеров, тем самым увеличивая риск развития у человека злокачественных опухолей и заболеваемость вирусными инфекциями [9].

Целью данной работы было изучение морфофункциональных изменений тимуса под действием низких, фоновых доз ДДТ.

#### Материалы и методы

Эксперимент выполнен на 42 самцах крыс Вистар массой тела 80-100 г. Животные опытной группы (n=22) вместо воды получали водные растворы о,р-ДДТ («Sigma», США) с концентрацией 20 мкг/л. Среднесуточная доза ДДТ, потребленная животными составила  $1,89 \pm 0,086$  мкг/кг, что соответствует потреблению организмом ДДТ с пищевыми продуктами с учетом его максимально допустимых уровней в продуктах питания (в мясной продукции – 0,1 мг/кг; в молочной продукции – 0,05 мг/кг; в зерновых культурах – 0,02 мг/кг).

Животные контрольной группы (n=20) получали водопроводную воду. Доступ к воде и пище у крыс был свободным. Учет потребляемой жидкости производили ежедневно. Животных опытной и контрольной групп выводили из эксперимента через 6 и 10 нед передозировкой зоветила. Эксперимент проведен в соответствии с правилами, которые представлены в «Международных рекомендациях по проведению медико-биологических исследований с использованием животных» (1985) и приказе МЗ РФ №267 от 19.06.2003 г. «Об утверждении правил лабораторной практики».

Образцы водопроводной воды и сухого корма для лабораторных животных проверяли на наличие ДДТ и его метаболитов методом газожидкостной хроматографии, показавшей отсутствие в корме и водопроводной воде хлорорганических пестицидов, в том числе ДДТ и его метаболитов.

Тимус крыс фиксировали в растворе Буэна, после традиционной проводки материал заливали в парафин. Изготовленные срезы окрашивали гематоксилином и эозином. Исследование проводили методом световой микроскопии и компьютерной морфометрии с использованием программы «ImageScope» («Leica Microsystems GmbH»,

Австрия). В гистологических препаратах тимуса определяли соотношение коркового и мозгового веществ, ширину субкапсулярного слоя, количество телец Гассалья на мм<sup>2</sup> площади среза мозгового вещества, оценивали стадии развития телец и количество ретикулоэпителиоцитов, входящих в их состав. Определяли спонтанную пролиферативную активность тимоцитов и пролиферативную активность в реакции бласттрансформации радиоизотопным методом с использованием <sup>3</sup>H-тимидина. В качестве митогена использовали конканавалин А («Sigma», США). Конечная концентрация конканавалина А после внесения в культуру клеток составляла 5 мкг/мл. Индекс стимуляции пролиферации в реакции бласттрансформации (ИБ) определяли по формуле:  $ИБ = A/B$ , где А – Конканавалин А – стимулированная пролиферация клеток, В – пролиферация клеток в среде.

#### Результаты и их обсуждение

Гистологическое исследование тимуса крыс контрольной группы через 6 нед после начала эксперимента показало, что орган имел типичное для данного возраста строение. Тимус представлял собой паренхиматозный дольчатый орган, снаружи покрытый тонкой соединительнотканной капсулой. Паренхима каждой дольки была образована лимфоидной тканью, строма сформирована ретикулоэпителиоцитами. В дольке четко различались две зоны: корковое вещество, занимающее периферическую часть дольки, и мозговое вещество, находящееся в центре дольки. В корковом веществе лимфоциты плотно прилежали друг к другу. Доля коркового вещества составляла  $73,37 \pm 1,4$  %, мозгового –  $26,63 \pm 1,4$  % паренхимы (табл. 1).

В корковом веществе хорошо визуализировался субкапсулярный слой, образованный плотно лежащими лимфобластами. Толщина субкапсулярного слоя варьировала в пределах  $43,56 \pm 1,67$  мкм. В мозговом веществе лимфоциты располагались рыхло, между ними были видны ретикулоэпителиоциты. В мозговом веществе встречались единичные тимусные тельца. Количество их в 1 мм<sup>2</sup> среза мозгового вещества составляла в среднем  $0,80 \pm 0,15$  телец. Ти-

мусные тельца состояли в среднем из  $3,07 \pm 0,12$  клеток и в подавляющем большинстве случаев ( $90,01 \pm 5,09$  %) представляли собой концентрическое наложение светлых и темных ретикулоэпителиоцитов со значительным накоплением кератина (табл.1). Просветы сосудов как артериального, так и венозного русла были свободны, либо в просвете имелось небольшое количество плазмы. В корковом и мозговом веществе встречались митотически делящиеся клетки.

Спонтанная пролиферативная активность тимоцитов составила имп/мин. Индекс индуцированной пролиферации был равен 2,9 (рис. 1, 2).

В тимусе крыс контрольной группы через десять недель после начала эксперимента отмечались возрастные инволютивные изменения. В корковом слое были выявлены участки гибели лимфоцитов с появлением характерной картины «звездного неба». Плотность лимфоцитов была снижена по сравнению с предыдущим сроком исследования, в результате чего стали заметны ретикулоэпителиоциты. Заметных изменений доли коркового ( $76,4 \pm 1\%$ ) и мозгового ( $23,6 \pm 1\%$ ) веществ отмечено не было (табл.1). Также не было статистически значимых отличий в сравнении ширины субкапсулярного слоя, составлявшей  $44,22 \pm 1,19$  мкм (табл. 1). Также статистически значительно увеличилось количество тимусных телец в единице площади среза мозгового вещества до  $1,84 \pm 0,29$  на  $\text{мм}^2$  и среднее количество ретикулоэпителиальных клеток в тимусных тельцах до  $3,61 \pm 0,10$ . Выраженные отличия наблюдались и в стадиях развития тимусных телец. По сравнению с предыдущим сроком исследования выявлено значительное увеличение новообразования телец. Доля тимусных телец, представляющих собой скопления ретикулоэпителиоцитов в начальной стадии накопления кератина, увеличилась более чем в пять раз и составила  $56,48 \pm 4,03\%$  от общего их количества. Тимические тельца более поздней стадии развития, представляющие собой концентрическое наложение ретикулоэпителиоцитов с накопле-

ниями кератина, соответственно встречались реже. Их доля составляла  $43,52 \pm 4,03\%$  (табл. 1).

Значения спонтанной и индуцированной пролиферации тимоцитов статистически значимо не отличались от предыдущего срока исследования (рис. 1, 2).

После употребления ДДТ в дозе  $1,89 \text{ мкг/кг}$  в течение 6 нед при гистологическом исследовании соотношение коркового и мозгового веществ по сравнению с показателями 6-недельной контрольной группы не изменилось и составило  $75,49 \pm 0,89\%$  и  $24,51 \pm 0,89\%$  (табл. 1). Увеличение ширины субкапсулярного слоя также не достигло статистической значимости и было равно  $45,94 \pm 1,59 \text{ мкм}$  (табл. 1). У большинства животных в корковом слое наблюдались гибель лимфоцитов, опустошение коркового слоя тимуса, появление картины «звездного неба». В мозговом веществе наблюдалось увеличение количества тимусных телец, составившее  $1,61 \pm 0,3$  телец/ $\text{мм}^2$ . Также увеличилось количество ретикулоэпителиоцитов в тимических тельцах до  $4,6 \pm 0,14$  клеток. В отличие от крыс контрольной группы, у крыс, получавших низкие дозы ДДТ в течение 6 нед, чаще встречались тимусные тельца, более ранних стадий развития ( $54,14 \pm 4,38\%$ ), тельца, представляющие собой концентрические скопления ороговевающих клеток с большими накоплениями кератина в цитоплазме обнаруживались реже. Их доля составляла  $45,86 \pm 4,38\%$  (табл. 1).

Изучение митотической активности тимоцитов выявило повышение спонтанной пролиферации клеток (рис.1). Индекс индуцированной пролиферации тимоцитов не изменялся (рис. 2).

Характер изменений в тимусе сохранился и после употребления крысами ДДТ в дозе  $1,89 \text{ мкг/кг}$  в течение 10 нед. Также, как и в опытной группе с меньшим сроком исследования, показатели соотношения коркового и мозгового веществ в сравнении с контрольными показателями практически не изменился. Доля коркового вещества составляла  $74,98 \pm 1,37\%$  площади гистологического среза тимуса. Не изменилась также и ширина субкапсуляр-

Таблица 1

**Изменения морфометрических показателей тимуса крыс контрольной группы и после употребления ДДТ в дозе  $1,89 \pm 0,086$  мг/кг ( $M \pm m$ )**

		Контрольная группа 6нед	Контрольная группа 10нед	Группа 1,89мг/кг 6нед	Группа 1,89мг/кг 10нед
Соотношение слоев, %	корковый слой	73,37 $\pm$ 1,40	76,40 $\pm$ 1,00	75,49 $\pm$ 0,89	74,98 $\pm$ 1,37
	мозговой слой	26,63 $\pm$ 1,40	23,60 $\pm$ 1,00	24,51 $\pm$ 0,89	25,02 $\pm$ 1,37
Субкапсулярный слой, мкм		43,56 $\pm$ 1,67	44,22 $\pm$ 1,19	45,94 $\pm$ 1,59	41,61 $\pm$ 1,79#
Количество тимических телец в мозговом слое, телец/мм <sup>2</sup>		0,8 $\pm$ 0,15	1,84 $\pm$ 0,29#	1,61 $\pm$ 0,30*	2,42 $\pm$ 0,47*#
Количество клеток в тимических тельцах		3,07 $\pm$ 0,12	3,61 $\pm$ 0,10#	4,60 $\pm$ 0,14*	5,34 $\pm$ 0,21*#
Соотношение стадий тимических телец, %	ранняя стадия развития	9,99 $\pm$ 5,09	56,48 $\pm$ 4,03#	54,14 $\pm$ 4,38*	74,91 $\pm$ 4,10*#
	поздняя стадия развития	90,01 $\pm$ 5,09	43,52 $\pm$ 4,03#	45,86 $\pm$ 4,38*	25,09 $\pm$ 4,10*#

Примечание. \* – статистически значимые отличия от значений контрольной группы, # – статистически значимые отличия от значений группы крыс, с меньшим сроком эксперимента

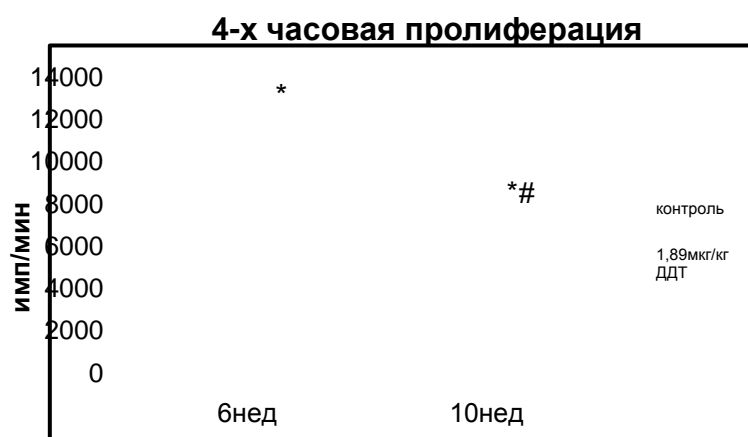


Рис. 1. Изменения спонтанной пролиферативной активности клеток тимуса крыс контрольной группы и после употребления ДДТ в дозе  $1,89 \pm 0,086$  мг/кг ( $M \pm m$ )



Рис. 2. Изменения индекса митоген-индуцированной пролиферации клеток тимуса крыс контрольной группы и после употребления ДДТ в дозе  $1,89 \pm 0,086$  мг/кг ( $M \pm m$ )

ного слоя в сравнении с контрольной группой. Этот показатель был равен  $41,61 \pm 1,79$  мкм. Однако было отмечено более заметное, статистически значимое сужение субкапсулярного слоя по сравнению с группой, получавшей ту же дозу ДДТ в течение меньшего срока. Количество телец Гассали в мозговом веществе тимуса крыс увеличилось по сравнению с предыдущим сроком исследования и составило  $2,42 \pm 0,47$  клеток/мм<sup>2</sup>, но соответствовало значениям контрольной группы крыс того же возраста. Количество ретикулоэпителиоцитов в тимических тельцах повысилось по сравнению с предыдущим сроком исследования до  $5,34 \pm 0,21$  клеток и статистически значимо превысило значения контрольной группы. Доля тимических телец в ранних стадиях развития от общего количества телец увеличилась по сравнению с предыдущим сроком исследования до  $74,91 \pm 4,1\%$ , что значительно превысило показатели контрольной группы.

Показатель спонтанной пролиферации был статистически значимо ниже значения как контрольной, так и опытной с меньшим сроком воздействия ДДТ групп, что может говорить о снижении количества митотически делящихся клеток в данной группе. Данные индуцированной пролиферации свидетельствуют об увеличении этого показателя больше чем в 4 раза по сравнению с контрольной и опытными группами.

Таким образом, в контрольной группе через 10 нед после начала эксперимента появились начальные признаки возрастных инволютивных изменений. Тимус достигает максимума развития к периоду полового созревания, затем начинается возрастные изменения, появляющиеся усилением гибели лимфоцитов, увеличением образования тимических телец, увеличением числа клеток в тимических тельцах, что в конечном итоге приводит к сморщиванию долек [5].

Сравнение изменений в опытных и контрольных группах показало, что их характер одинаков в контрольных и опытных группах, но темпы гибели клеток тимуса при потреблении ДДТ были

ускорены. В опытной группе через 6 нед после начала эксперимента изменения были схожи с показателями контрольной группы через 10 нед. Поскольку в контрольной группе более длительного срока исследования наблюдались возрастные изменения тимуса, схожесть показателей может говорить о более быстром течении этих процессов у крыс, получавших низкие дозы ДДТ в течение 6 нед. После употребления ДДТ в течение 10 нед выявленные изменения в тимусе усилились в сравнении с предыдущим сроком исследования и контрольной группой. Но характер изменений также был схож у сравниваемых групп, за исключением того факта, что тимоциты крыс, потреблявших ДДТ в течение 10 нед приобрели свойство реагировать на митоген резким усилением пролиферации на фоне пониженной спонтанной пролиферативной активности, что не типично для клеток тимуса [5]. Выраженная гибель ретикулоэпителиоцитов, наблюдаемая как через 6, так и через 10 нед в опытной группе, указывает на возможное нарушение секреции тимических гормонов и созревания Т-лимфоцитов, что требует дальнейшего исследования. Это усиление инволютивных изменений может говорить о негативном влиянии малых доз ДДТ на функционирование центрального органа иммунной системы тимуса, а, следовательно, и быть причиной нарушения реакций в первую очередь клеточного иммунитета также как и при действии субтоксических доз ДДТ [6, 9].

#### Выводы

1. Воздействие низкой дозы ДДТ ( $1,89 \pm 0,086$  мкг/кг) в течение как шести, так и десяти недель приводит к изменению морфофункциональных характеристик тимуса крыс Вистар, проявляющихся усилением гибели как лимфоцитов, так и ретикулоэпителиоцитов.
2. Воздействие низких доз ДДТ существенно увеличивало темпы инволютивных изменений ретикулоэпителиоцитов, что проявлялось увеличением количества тимических телец, а также увеличением количества клеток в составе тимических телец.

3. Усиление гибели тимоцитов под воздействием низких доз ДДТ приводило сначала к компенсаторному повышению, а затем снижению пролиферативной активности клеток, но повышало их способность отвечать на митогенное воздействие.

#### Литература

1. Возврат малярии в страны европейского региона ВОЗ: уроки истории и современная ситуация / М.Н. Ежов [и др.] // Медицинская паразитология и паразитарные болезни. – 2005. – № 1. – С. 26-30.
2. Гичев Ю.П. Здоровье человека как индикатор экологического риска промышленных регионов / Ю.П. Гичев // Вестн. Рос. АМН. – 1995. – №8. – С. 52-54.
3. Майстрова И.Н. Состояние иммунного статуса у детей, проживающих в экологически неблагоприятных условиях / И.Н. Майстрова // Здоровоохранение. – 1998. – №8. – С. 21-23.
4. Фролов В. М. Влияние экологически вредных факторов крупного промышленного региона на иммунологическую реактивность населения / В.М. Фролов // Журн. микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. – 1995. – №2. – С. 119-124.
5. Ярилин А.А. Возрастные изменения тимуса и Т-лимфоцитов / А.А. Ярилин // Иммунология. – 2003. – №2. – С. 117-127.
6. Banerjee B.D. Effects of sub-chronic DDT exposure on humoral and cell-mediated immune responses in Albino rats / B.D. Banerjee // Bulletin of the Environmental contamination and Toxicology. – 1987. – Vol. 39, № 5. – P. 827-834.
7. Daly G. Organic contaminants in mountains / F. Wania // Environ. Sci. Technol. – 2005. – Vol. 39, №2. – P. 385-398.
8. Immunomodulatory effect of DDT (bis[4-chlorophenyl]-1,1,1-trichloroethane) on complement system and macrophages / R. Dutta [et al.] // Toxicology. – 2008. – Vol. 22, №3. – P. 504-510.
9. Immunosuppressive effects of triclosan, nonylphenol, and DDT on human natural killer cells in vitro / F. Udoji [et al.] // J Immunotoxicol. – 2010. – Vol. 7, №3. – P. 205-212.
10. Munoz-Arnanz J. New DDT inputs after 30 years of prohibition in Spain. A case study in agricultural soils from southwestern Spain / B. Jimenez // Environmental Pollution. – 2011. – Vol. 159, №12. – P. 3640-3646.

## CHANGES IN RAT THYMUS MORPHOLOGY AND FUNCTION AFTER CHRONIC EXPOSURE TO LOW DOSES OF DDT

*E.P. Rodichenko, N.V. Yaglova, V.V. Yaglov, S.S. Obernikhin*

There is increasing evidence that chronic environmental exposure to DDT and other pesticides play an important role in disregulation of the immune system and increased incidence of autoimmune and allergic diseases. The aim of the research was to investigate whether consumption of low doses of DDT may affect the immune system and change morphology and function of thymus. The research was performed on 42 Wistar rats 80-100gg body weight. Rats were exposed to  $1.89 \pm 0.086 \mu\text{g/kg}$  DDT per os for 6 and 10 weeks. Histological examination found time-depending acceleration of apoptosis both of lymphocytes and reticuloepithelial cells. After 10 weeks of exposure proliferation of thymocytes was significantly decreased. Concanavalin A-induced mitogenic activity of thymocytes after 10 weeks of exposure to DDT was 6 times higher than the control values. The data obtained showed that even low doses of DDT accelerated thymus aging and modulated proliferation of thymocytes.

**Key words:** *thymus, rat, effects, toxicity, DDT, low dose, morphology.*

Яглов Валентин Васильевич – д-р мед. наук, проф., академик Международной академии аграрного образования, главный научный сотрудник лаборатории развития эндокринной системы ФГБУ «НИИ морфологии человека» РАМН.

117418, г. Москва, ул. Цюрупы, д. 3.

Тел. (499) 128-66-83.

E-mail: vyaglov@mail.ru.

Яглова Наталья Валентиновна – д-р мед. наук, зав. лабораторией развития эндокринной системы ФГБУ «НИИ морфологии человека» РАМН.

117418, г. Москва, ул. Цюрупы, д. 3.

E-mail: yaglova@mail.ru.