

УДК 591.4/591.8

МЕХАНИЗМ ФОРМИРОВАНИЯ КОРКОВО-МОЗГОВОГО СООТНОШЕНИЯ В ТИМУСЕ ПОЗВОНОЧНЫХ ЖИВОТНЫХ И ЧЕЛОВЕКА

¹Юрчинский В.Я., ²Ерофеева Л.М.

¹ФГБОУ ВПО «Смоленский государственный университет», Смоленск, e-mail: Zool72@mail.ru;

²ФГБОУ ВПО «Московский государственный медико-стоматологический университет имени А.И. Евдокимова» Минздрава России, Москва, e-mail: gystology@mail.ru

С использованием методов световой микроскопии и морфометрии изучен комплекс макро и микро-морфологических параметров тимуса, которые напрямую зависят от процессов пролиферации и дифференцировки лимфоцитов: индекс массы тимуса, корково-мозговой индекс, количество тимоцитов на единицу площади мозгового и коркового вещества, а также митотический индекс тимоцитов коркового и мозгового вещества тимуса. Исследование проводилось на примере представителей четырех классов наземных позвоночных животных (Chordata, Tetrapoda): Amphibia, Reptilia, Aves, Mammalia. Результаты исследования свидетельствуют о том, что показатели изучаемых макро- и микроморфологических параметров напрямую зависят от уровня организации, особенностей биологии, степени специализации к различным условиям среды. Выявлено, что повышение емкости энергетического обмена и развитие теплокровности оказывает наиболее существенное влияние на морфологию тимуса позвоночных животных и человека. Показано, что по изученным морфологическим параметрам тимус человека отличается от позвоночных животных, обитающих в естественной экологически чистой среде, что связано с влиянием на здоровье человека экстремальных условий антропогенного характера.

Ключевые слова: позвоночные животные, тимус, гистология, Т-лимфоциты, митотический индекс, корково-мозговой индекс

DIFFERENCES OF THE FORMING WAY OF CORTICO-MEDULLARE CORRELATION IN THYMUS OF VERTEBRAL ANIMALS AND HUMAN

¹Yurchinskij V.Y., ²Erofeeva L.M.

¹Smolensk State University, SmolSU, Smolensk, e-mail: Zool72@mail.ru;

²Moscow State University of Medicine and Dentistry named after A.I. Evdokimov, MSUMD, Moscow, e-mail: gystology@mail.ru

Using light microscopy and morphometry the article show the analysis of complex of thymus' macro- and micromorphological parameters which is directly depends on the processes of proliferation and differentiation of lymphocytes: the index of weigh of thymus and cortico-medullare, the number of thymocytes and mitotical index. Four classes of vertebral animals were studied (Chordata, Tetrapoda): Amphibia, Reptilia, Aves, Mammalia. It has revealed the similarities and the differences in the structure of thymus gland of vertebral animals which are remarkable for the organization level, biological features and for their adaptation to the habitat. The dependence of the morphology of the thymus on the capacity of energy metabolism of the organism was shown in article. The article also show results of the antropogenic environment's influence on the morphology of human thymus.

Keywords: vertebrate animals, thymus, histology, T-cells, cortico-medullare index, mitotic index

Объемная доля коркового и мозгового вещества тимуса является надежным индикатором его функционального состояния. В настоящее время накоплено достаточно фактов, свидетельствующих о зависимости корково-мозгового соотношения от возраста [8, 9]. Представлены неоспоримые доказательства трансформации обсуждаемого параметра при влиянии на организм различного рода стрессовых воздействий: чрезмерная физическая нагрузка и гиподинамия, заболевания и травмы, экологические факторы физической и химической природы [1, 2]. В основе таких изменений лежат сложные процессы, связанные с пролиферацией, созреванием и дифференцировкой лимфоцитов [6, 7]. Вместе с этим очевиден дефицит работ, в рамках которых морфология тимуса изучается в сравнительном плане у широкого спектра позвоночных

животных естественной среды обитания в сравнении с человеком, что может приводить к ошибочному мнению о сходстве ключевых морфологических характеристик тимуса у всех позвоночных.

Цель работы заключалась в сравнительном изучении основных морфологических характеристик тимуса, связанных с состоянием его лимфоидного компонента у наземных позвоночных животных в сравнении с человеком.

Материал и методы исследования

Исследование тимуса проводили на примере 15-ти видов позвоночных, относящихся к четырем классам: класс Земноводные (Amphibia): *Rana esculenta* (n 36), *R. temporaria* (n 28), *R. terrestris* (n 36); класс Пресмыкающиеся (Reptilia): *Lacerta agilis* (n 36), *Vipera berus* (n 24), *Natrix natrix* (n 36); класс Птицы (Aves): *Columba livia* (n 36), *Scolopax rusticola* (n 24), *Muscicapa striata* (n 16); класс Млекопитающие

(Mammalia): *Sorex araneus* (n 36), *S. caecutiens* (n 24), *Clethrionomys glareolus* (n 40), *Mus musculus* (n 24), *Sylvivus major* (n 24), *Homo sapiens* (n 65).

Исследование проводили на примере неполовозрелых особей и особей II периода зрелого возраста. Рамки соответствующего возраста человека определялись согласно классификации, принятой на 7-й Всесоюзной конференции по возрастной морфологии, физиологии и биохимии в 1965 году. Возраст животных эквивалентно соответствовал возрасту человека и определялся по общепринятым методикам [4]. Всего изучено 224 препарата неполовозрелых и 250 препаратов половозрелых позвоночных.

Для исследования тимуса человека использовали материал, набранный на базе отделения клинической патологии при Смоленском областном институте патологии. Весь секционный материал тщательно отбирали по анамнезу с целью исключения причин смерти, которые могли бы повлиять или резко изменить структуру тимуса. Эвтаназию животных осуществляли передозировкой эфирным наркозом (ЗАО «Вектон») в соответствии с требованиями Министерства здравоохранения Российской Федерации к работе экспериментально-биологических клиник, а также «Европейской конвенции по защите позвоночных животных, используемых для экспериментов или в научных целях» (г. Страсбург, 1986). Тимус, изъятый сразу после эвтаназии, взвешивали и измеряли. Доли тимуса фиксировали 10% нейтральным формалином, обезжировали и заливали в парафин по стандартной методике. Срезы тимуса толщиной 5 мкм окрашивали гематоксилин-эозином, пикрофуксином по Ван-Гизону, альдегид-фуксином и смесью Halmi по Габу-Дыбану. Микрофотографии получали с использованием цифрового аппарата Nikon CoolPix 7900 (Nikon, Япония). Полученные изображения экспортировали в компьютер и проводили измерение абсолютных площадей коркового и мозгового вещества тимуса с помощью программы ImageJ 1.38 (National Institutes of Health, Bethesda, США, свободный доступ в интернете). Для суждения о морфофункциональном состоянии тимуса определяли корково-мозговой индекс (КМИ), который рассчитывали как отношение коркового вещества к мозговому. Измерение площади коркового и мозгового вещества тимуса проводили при увеличении окуляра х8, объектива х4 (МБС-9), а также окуляра х7 и объектива х8 (МБР-3). При изучении цитоконструкции тимуса подсчет общего количества тимоцитов в корковом и мозговом веществе тимуса проводили на условной единице площади в 100 мкм² (ок. ×15, об. ×60 под масляной иммерсией) на цифровых фотографиях. Для каждого препарата оценивали 10 полей зрения. Количество митозов в субкапсулярной зоне коры и мозговом веществе (митотический индекс – МИ) определяли на 1000 зарегистрированных клеток (ок. ×15, об. ×90 под масляной иммерсией). Значимость различий между сравниваемыми группами оценивали методами параметрической и непараметрической статистики (t-критерий Стьюдента, U-критерий Манна-Уитни). Анализ распределения признаков на нормальность проводили с использованием критериев Лиллиефорса и Шапиро-Уилка, а условие равенства дисперсий выборок проверяли по критерию Левена.

Результаты исследования и их обсуждение

На примере неполовозрелых позвоночных прослеживается зависимость мор-

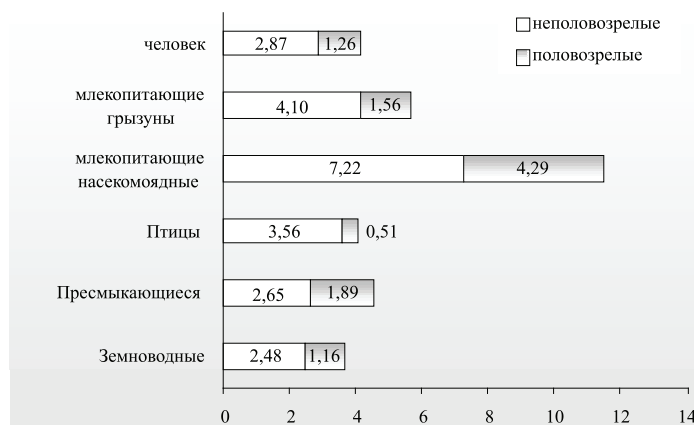
фологии тимуса от уровня организации. Выявлено, что холоднокровные животные закономерно уступают более развитым классам позвоночных по величинам всех изученных морфологических показателей. У земноводных и пресмыкающихся существенно снижено содержание тимоцитов в корковом и мозговом веществе тимуса, что особенно заметно при сравнении земноводных с другими позвоночными. Особенно сильно по показателям КМИ и МИ холоднокровные позвоночные уступают насекомоядным млекопитающим. С момента возникновения истинной наземности (пресмыкающиеся) у неполовозрелых позвоночных КМИ изменяются мало (рисунок), вместе с этим происходит увеличение (практически двукратное) плотности локализации тимоцитов, как в корковом, так и в мозговом веществе тимуса (таблица). Пресмыкающиеся по сравнению с земноводными характеризуются увеличением количества митозов в коре и снижением их числа в мозговом веществе. Возникновение теплокровности неоднозначно сказывается на состоянии изучаемых морфологических параметров тимуса.

Отчетливо прослеживается сходство КМИ и количества тимоцитов коры и мозгового вещества у птиц и грызунов. Вместе с этим для человека в сравнении с другими млекопитающими характерны самые низкие показатели КМИ тимуса. По этим характеристикам человек проявляет сходство с холоднокровными позвоночными. Только по количеству тимоцитов на единицу площади и их МИ показатели тимуса человека выходят на уровень, характерный для теплокровных животных (рисунок, таблица). В свою очередь землеройки-бурозубки отличаются стабильно повышенными значениями всех изученных морфологических параметров тимуса, что особенно сильно проявляется на примере КМИ (рисунок). По количеству тимоцитов землеройки уже мало отличаются от грызунов, человека и птиц. Величина митотического индекса насекомоядных млекопитающих и грызунов сходна (таблица).

У всех позвоночных независимо от уровня организации с возрастом наблюдается снижение показателей исследуемых морфологических параметров тимуса. У земноводных и всех млекопитающих при переходе к зрелому возрасту наблюдается двукратное снижение КМИ. При этом у пресмыкающихся такое снижение незначительно, тогда как у птиц оно оказывается максимальным (в 6 и более раз). Согласно полученным результатам у всех амниот с возрастом происходит одинаково

сильное (двукратное) снижение МИ тимочитов коры. При этом у половозрелых птиц МИ коры ниже соответствующего показателя неполовозрелых представителей в 3,5 раза, тогда как у человека такое снижение оказывается пятикратным. В мозговом веществе тимуса холоднокровных позвоночных с возрастом темпы пролиферации лимфоцитов изменяются мало (недоста-

верные различия). Данный показатель птиц хотя и незначительно (в 1,3 раза), но достоверно уменьшается, тогда как у млекопитающих (грызуны и землеройки-бурозубки) его значения снижены уже вдвое. Для человека характерно самое существенное снижение темпов пролиферации лимфоцитов в мозговом веществе тимуса (рисунок, таблица).



Корково-мозговой индекс тимуса позвоночных

Морфометрические показатели коркового и мозгового вещества тимуса позвоночных животных и человека ($\bar{x} \pm S_x$)

Группа	Количество тимочитов коры (S = 100 мкм ²)	Количество тимочитов в мозговом веществе (S = 100 мкм ²)	МИ, % на 1000 тимочитов		Количество тимочитов коры (S = 100 мкм ²)	Количество тимочитов в мозговом веществе (S = 100 мкм ²)	МИ, % на 1000 тимочитов, Мозговое вещество	
			Кора	Мозговое вещество			Кора	Мозговое вещество
	неполовозрелые				половозрелые			
Amphibia	308,12 ± 29,9 *, c,d,e,f	139,54 ± 21,6 b,c,d,e,f	1,74 ± 0,34 c,d,e,f	1,83 ± 0,32 d,e,f	260,79 ± 23,7 *, b,c,d,e,f	143,27 ± 16,4 b,c,d,e,f	0,81 ± 0,21 *, d,e	1,59 ± 0,31 b,f
Reptilia	466,69 ± 34,8 c,d,e,f	267,35 ± 27,6 a,c,d,e,f	2,19 ± 0,29 *,c,d,e,f	1,45 ± 0,31 c,d,e,f	481,18 ± 41,9 a,c,d	273,80 ± 37,6 a,c,d,f	0,92 ± 0,15 *, d,e,f	1,19 ± 0,25 a,f
Aves	652,88 ± 48,24 a,b,d	338,91 ± 38,27 *, a,b,f	2,79 ± 0,42 *, a,b,d,e	1,86 ± 0,22 *, b,d,e,f	654,26 ± 56,7 a,b,e,f	418,61 ± 49,6 *,a,b,e	0,79 ± 0,11 *, d,e	1,38 ± 0,17 *, a,f
Insectivora	759,89 ± 61,6 *, a,b,c,e	356,29 ± 35,4 *, a,b,f	3,88 ± 0,53 *, a,b,c,f	3,11 ± 0,49 *, a,b,c,f	611,37 ± 59,0 *, a,b,e	467,01 ± 52,9 *,a,b,e,f	1,55 ± 0,33 *, a,b,c,f	1,49 ± 0,31 *,b,f
Rodentia	644,74 ± 54,5 *, a,b,d	318,33 ± 29,3 *, a,b,f	3,67 ± 0,45 *, a,b,c,f	3,03 ± 0,41 *, a,b,c,f	513,00 ± 27,9 *, a,c,d	266,40 ± 23,2 *,a,c,d,f	1,51 ± 0,24 *, a,b,c,f	1,39 ± 0,34 *, a,f
H. sapiens	679,95 ± 46,9 *, a,b	403,61 ± 18,9 *, a,b,c,d,e	2,69 ± 0,36 *, a,b,d,e	2,55 ± 0,41 *, a,b,c,d,e	553,49 ± 54,6 *, a,c	346,48 ± 38,3 *, a,b,d,e	0,67 ± 0,12 *, b,d,e	0,73 ± 0,15 *, a,b,c,d,e

Примечания: * – достоверность возрастных отличий ($p \leq 0,05$), достоверность отличий ($p \leq 0,05$) по сравнению: a – с земноводными, b – с рептилиями, c – с птицами, d – с насекомоядными млекопитающими, e – с грызунами, f – с человеком.

Проведено сопоставление МИ тимочитов коры и мозгового вещества тимуса позвоночных животных разного возраста. У всех неполовозрелых позвоночных, за исключением земноводных и человека, МИ тимочитов коры превышает аналогичный показатель мозгового вещества тимуса: в 1,3 раза (грызуны и землеройки-бурозубки) и в 1,5 раза (птицы, пресмыкающиеся). На стадии второй зрелости у человека и млекопитающих животных отличий МИ

в коре по сравнению с мозговым веществом тимуса не наблюдается, тогда как у пресмыкающихся и птиц МИ тимочитов мозгового вещества незначительно преобладает над соответствующим показателем коры. Только у половозрелых земноводных МИ индекс мозгового вещества практически вдвое выше аналогичного показателя тимочитов коры тимуса. Плотность расположения тимочитов в корковом веществе тимуса с возрастом снижается только у млекопита-

ющих, включая человека. У земноводных, пресмыкающихся и птиц возрастных изменений этого показателя не зафиксировано (рисунок, таблица). Вместе с этим при переходе от неполовозрелой стадии жизненного цикла к зрелому возрасту степень инфильтрации тимоцитами мозгового вещества тимуса либо не изменяется (земноводные, пресмыкающиеся, грызуны, человек), либо незначительно возрастает (птицы и землеройки-бурозубки).

Морфометрическое изучение клеток лимфоидного ряда в тимусе показало существование возрастных отличий у изученных групп позвоночных животных. По этому признаку всех изученных представителей сравнительно-морфологического ряда можно разбить на 2 группы. В одну группу входят млекопитающие, включая человека, в другую – холоднокровные позвоночные и птицы. У представителей первой группы с возрастом снижается плотность расположения тимоцитов в коре тимуса и существенно падает МИ индекс как мозгового вещества, так и коры. У человека такое снижение оказывается более выраженным, чем у млекопитающих-животных. У представителей второй группы с возрастом не изменяется плотность расположения тимоцитов как в коре, так и в мозговом веществе. Показатели МИ существенно снижаются только в коре. Снижение интенсивности деления лимфоцитов в мозговом веществе у холоднокровных позвоночных оказывается незначительным (таблица).

Обсуждение полученных результатов. Изученные в данной работе морфологические параметры тимуса зависят от темпов поступления предшественников тимоцитов в кору тимуса, их созревания, селекции, а также выхода зрелых Т-лимфоцитов в кровеносное русло [7, 8]. Повышение уровня энергообмена (переход к теплокровности) оказывает существенное влияние на скорость данных процессов, что определяется гормональными воздействиями гипоталамо-гипофизарной системы [7]. Наглядной иллюстрацией такой зависимости является морфология тимуса землероек-бурозубок, энергетический обмен которых отличается максимальной емкостью, в силу особого образа жизни [3]. Следует ожидать, что у людей тяжелого физического труда, а также спортсменов должно наблюдаться более активное поступление предшественников лимфоцитов в тимус и, как следствие, возрастание КМИ и МИ. Последнее подтверждается результатами работ, исследующих последствия воздействия умеренной физической нагрузки на организм [5]. Противоположная ситуация характерна для

холоднокровных позвоночных, у которых на фоне пассивности и замедленного обмена веществ показатели, связанные с лимфоцитарным компонентом тимуса, закономерно снижены. Следует учитывать, что аналогичная ситуация возникает в тимусе и теплокровных позвоночных в рамках экспериментов по влиянию гиподинамии [9]. Неслучайно сопоставление человека и других позвоночных свидетельствует о большем сходстве характеристик тимуса человека с холоднокровными позвоночными (КМИ, МИ у половозрелых). Причиной тому, вероятно, является выраженная гиподинамия большинства людей в условиях современной жизни. Тимоциты мозгового вещества прошли позитивную селекцию и составляют всего около 5% от всех поступивших в тимус предшественников [6, 7]. Полученные данные позволяют утверждать, что на неполовозрелой стадии жизненного цикла количество аутоolerантных клеток (относительно числа недифференцированных тимоцитов коры) у всех позвоночных сходно. На стадии второй зрелости только у теплокровных представителей возрастает количество тимоцитов, проходящих позитивную селекцию в коре. Как результат отсутствие снижения плотности расположения тимоцитов в мозговом веществе на фоне уменьшения данного показателя в коре (грызуны, человек). Более того, у теплокровных, отличающихся наиболее энергозатратным образом жизни (птицы и землеройки-бурозубки), гибель тимоцитов в коре оказывается наиболее низкой. Очевидно, выработка адаптаций к гиперактивному образу жизни и повышенным энергозатратам, вынуждает все звенья лимфоидной системы более экономно расходовать клеточный материал, повышая его функциональное качество. Кроме этого, созревающие лимфоциты данных групп животных могут отличаться степенью экспрессии определенных мембранных белков-рецепторов, что позволяет повысить устойчивость к действию глюкокортикоидов во время стрессового воздействия, а также дает возможность формировать популяцию клеток с достаточно высокой степенью аутоolerантности. Возможность таких клеточных перестроек доказана [7]. Следует предположить, что укрепление иммунитета человека в условиях умеренной физической нагрузки в основе своей может иметь в том числе и эти механизмы.

Исследованные группы животных являются обитателями экологически чистых биотопов, в отличие от человека, организм которого испытывает воздействие широкого спектра агрессивных факторов антропогенной среды. Результатом таких отличий

является более выраженное возрастное снижение скорости созревания тимоцитов человека в сравнении с млекопитающими (соответственно в 3,5 и 2 раза). Возрастная инволюция тимуса заключается не только в снижении объемов поступающих в тимус предшественников Т-лимфоцитов, но и вызывает замедление их созревания [9]. На примере позвоночных животных выявлено, что в разных зонах тимуса темпы созревания лимфоцитов снижаются неравномерно. Данные свидетельствуют о выраженном снижении пролиферативной активности клеток коры, что может быть связано со свойствами самих предшественников, не прошедших позитивную селекцию, а также определяется утратой функционального потенциала клеток ретикулярного эпителия, активно влияющих на пролиферацию и дифференцировку лимфоцитов [8, 9]. Практически полное сохранение показателей МИ в мозговом веществе тимуса земноводных, пресмыкающихся и птиц может указывать на отличительные особенности зрелых аутоотолерантных тимоцитов у этих групп позвоночных, либо является свидетельством сохранения потенциала эпителия мозгового вещества тимуса. Однако у млекопитающих, включая человека, темпы пролиферации одинаково сильно снижаются как в коре, так и в мозговом веществе.

Таким образом, корково-мозговое соотношение в тимусе позвоночных в значительной степени зависит от процессов, связанных с пролиферацией, созреванием и рециркуляцией лимфоцитов, что справедливо для всех представителей сравнительно-морфологического ряда. Тимус представляет собой звено сложной системы, на состояние которой существенный отпечаток накладывает уровень организации и специфические особенности среды обитания. Обнаруженные отличия морфологии тимуса позвоночных животных и человека являются свидетельством пластичности лимфоидной системы в целом и тимуса в частности, что обеспечивает поддержание иммунных функций.

Список литературы

1. Агеева А.В., Самусев Р.П., Щербакова Л.В. Морфология тимуса неполовозрелых крыс под влиянием длительных сроков ограничения двигательной активности // Астраханский медицинский журнал. – 2007. – № 1. – С. 13.
2. Ерофеева Л.М. Сравнительная характеристика морфологических изменений в тимусе после облучения гамма лучами и ускоренными ионами углерода // Морфология. – 2008. – Т. 133, № 2. – С. 45.
3. Зотин А.И., Владимирова И.Г., Кирпичников А.А. Энергетический метаболизм и направление эволюционного прогресса в классе млекопитающих // Журнал общей биологии. – 1990. – Т. 51, № 6. – С. 760–767.
4. Клевезаль Г.А. Принципы и методы определения возраста млекопитающих. – М.: КМК, 2007. – 282 с.
5. Ткачук М.Г. Тимус при различных физических нагрузках // Морфология. – 2008. – Т. 133, № 4. – С. 96.
6. Mori K., Itoi M., Tsukamoto N. The perivascular space path of hematopoietic progenitor cells and mature T cells between the blood circulation and thymic parenchyma // Int. Immunol. – 2007. – 19(6). – P. 745–53.
7. Pearse, G. Normal structure, function and histology of the thymus // Toxicol. Pathol. – 2006. – № 34 (5). – P. 504–14.
8. Raica M., Cimpean A.M., Encica S. Involution of the thymus: a possible diagnostic pitfall // J. Morphol. Embriol. – 2007. – № 48 (2). – P. 101–106.
9. Shanley D. P., Manley A. D. An evolutionary perspective on the mechanisms of immunosenescence // Trends Immunol. – 2009. – № 30(7). – P. 374–381.

References

1. Ageeva A.V., Samusev R.P., Shcherbakova L.V. Thymus' morphology of immature rats under the influence of long periods of limited physical activity. Astrakhanskiy meditsinskiy zhurnal. 2007; 1: 13.
2. Erofeeva L.M. Comparative characteristics of morphological changes in the thymus after irradiation of gamma rays and accelerated carbon ions. Morfologiya. 2008; 133.(2): 45.
3. Zotin A.I., Vladimirova I.G., Kirpichnikov A.A. Energy metabolism and the direction of evolutionary progress in the class of mammals. Zhurnal obshchey biologii. 1990; 51.(6): 760-7.
4. Klevezal' G.A. Principles and methods of determining the age of mammals. Moscow: KMK; 2007.
5. Tkachuk M.G. Thymus at various physical activities. Morfologiya. 2008; 133. (4): 96.
6. Mori K., Itoi M., Tsukamoto N. The perivascular space path of hematopoietic progenitor cells and mature T cells between the blood circulation and thymic parenchyma. Int. Immunol. 2007; 19(6): 745–53.
7. Pearse G. Normal structure, function and histology of the thymus. Toxicol. Pathol. 2006; 34 (5): 504–14.
8. Raica M., Cimpean A.M., Encica S. Involution of the thymus: a possible diagnostic pitfall. J. Morphol. Embriol. 2007; 48 (2): 101–106.
9. Shanley D.P., Manley A.D. An evolutionary perspective on the mechanisms of immunosenescence. Trends Immunol. 2009; 30(7): 374–381.

Рецензенты:

Карамышева Е.И., д.м.н., профессор кафедры фармакологии, ГБОУ ВПО «Московский государственный медико-стоматологический университет им. А.И. Евдокимова», г. Москва;

Колесников Л.Л., д.м.н., профессор, зав. кафедрой нормальной анатомии, ГБОУ ВПО «Московский государственный медико-стоматологический университет им. А.И. Евдокимова», г. Москва.

Работа поступила в редакцию 03.03.2014.