

ИЗМЕНЕНИЯ ИНВОЛЮТИВНЫХ ПРОЦЕССОВ В ТИМУСЕ ЭНДОКРИННЫМИ ДИСРАПТОРАМИ

С.С. Обернихин, Н.В. Яглова, Э.С. Цомартова, С.В. Назимова, В.В. Яглов

НИИ морфологии человека им. акад. А.П. Авцына ФГБНУ РНЦХ им. акад. Б.В. Петровского, г. Москва, Россия

Эндокринные дисрапторы – это химические вещества природного или искусственного происхождения, которые могут имитировать, блокировать или нарушать действие гормонов в организме. Дихлордифенилтрихлорэтан (ДДТ) считается одним из самых распространенных эндокринных дисрапторов на планете [1]. Он обладает способностью нарушать функционирование половых, надпочечниковых и щитовидной желёз [2, 3]. Воздействие его фоновых доз на органы иммунной защиты изучены в меньшей степени. Тимус является эндокринной железой и первичным лимфоидным органом, который необходим для формирования адаптивного иммунного ответа. Он обеспечивает дифференцировку Т-клеток и их миграцию в Т-зависимые области периферических лимфоидных органов, таких как лимфатические узлы, миндалины, селезенка, пейеровы бляшки [4,5]. Среди органов иммунной защиты тимус первым подвергается возрастной инволюции [6]. Было показано, что инволюция функции тимуса нарушает опосредованный Т-клетками иммунитет и нарушает толерантность к собственным антигенам [7]. Функционирование клеток тимуса, как лимфоцитов, так и ретикулярного эпителия, испытывает сильное влияние глюкокортикоидных и половых гормонов [8, 9]. Поэтому его развитие и функционирование может нарушаться эндокринными дисрапторами. Исследования показали, что большинство известных эндокринных дисрапторов, проникают через плацентарный барьер [10]. Некоторые из них оказывают дисморфогенное действие на развивающиеся органы плода [11]. После рождения эндокринные нарушения также могут негативно влиять на программу постнатального развития. В наших предыдущих исследованиях мы выявили изменения в морфологии тимуса новорожденных крысят, подвергнутых внутриутробному воздействию низких дозы ДДТ [12].

Цель работы – оценить выраженность инволютивных изменений в тимусе крыс, подвергавшихся воздействию ДДТ во время пренатального и постнатального развития.

Материалы и методы

Самки крыс весом 180–220 г. получали раствор о, п-ДДТ 20 мкг/л («Sigma-Aldrich», Сент-Луис, Миссури, США) вместо водопроводной воды с момента спаривания во время беременности и лактации. После отъема потомство самок крыс получало тот же раствор о, п-ДДТ во время постнатального развития. Контролем служило потомство, полученное от интактных самок. В эксперименте участвовали только потомки мужского пола (10 крыс, подвергшихся воздействию ДДТ, и 10 контрольных крыс). Крыс выводили из эксперимента передозировкой золетила в постпубертатном периоде в возрасте 10 недель. Среднесуточное потребление ДДТ после отъема составило $2,90 \pm 0,12$ мкг/кг массы тела, что соответствует потреблению ДДТ человеком с пищевыми продуктами с учетом различий в метаболизме ДДТ у крыс и человека [13]. Отсутствие ДДТ, его метаболитов и родственных хлорорганических соединений в водопроводной воде и продуктах питания подтверждено методом газовой хроматографии в ФБУ Здравоохранения г. Москвы.

Тимус взвешивали сразу после удаления с помощью полуаналитических весов («Сартосом», Россия), а затем фиксировали в растворе Буэна. После стандартной гистологической обработки образцы тканей заливали в парафин. Гистологические срезы тимуса окрашивали гематоксилином и эозином. Гистологическое исследование проводили с помощью светового микроскопа «Leica DM2500» (Leica Microsystems GmbH, Wetzlar, Germany). Определяли массу тела и массу тимуса, а также рассчитывали относительную массу тимуса. Пролиферирующие клетки выявляли методом иммуногистохимии с использованием антител к Ki-67 («Cell Marque», США) и набора для визуализации «UltraVision LP Detection System» («ThermoScientific», США) согласно с рекомендациями производителя. Компьютерную морфометрию проводили при помощи программного обеспечения «ImageScope» («Leica Microsystems», Германия). Исследовали следующие параметры: площадь коркового и мозгового вещества, ширина субкапсулярного слоя активно делящихся лимфоцитов, а затем рассчитывали субкапсулярно-кортикальное соотношение как отношение ширины субкапсулярного слоя к толщине коркового вещества. Подсчитывали количество Ki-67-позитивных и общее количество лимфоцитов и в 1 мм² коркового и мозгового вещества.

Статистическую обработку данных проводили с помощью программы «Statistica 7.0» («StatSoft», США). Центральные тенденции и рассеяние признаков, имеющих приблизительно нормальное распределение, описывали средним значением и стандартной ошибкой среднего значения ($M \pm m$). Сравнение независимых групп проводили с помощью t-критерия Стьюдента с учетом значений критерия Левена о равенстве дисперсий и χ^2 . Статистически значимыми различия считались при $p < 0,05$.

Результаты

Тимус взрослых крыс, подвергшихся воздействию ДДТ, имел типичную анатомию и гистологию с отчетливо выраженным корковым и мозговым веществом. Относительная масса тимуса не отличалась от контроля. Гистологическое исследование выявило некоторые признаки ранней возрастной инволюции тимуса у контрольных крыс, такие как менее плотная клеточность коры и более выраженные стромальные элементы, очаговая гибель лимфоцитов и ошутимые тельца в коре, редкие тимусные тельца. У крыс, подвергшихся воздействию малых доз ДДТ, возрастные изменения были выражены в меньшей степени. У крыс, подвергшихся воздействию ДДТ, гистоморфометрия выявила высокое соотношение коры и мозгового вещества и повышенную клеточность коры и мозгового вещества. Помимо более высокой плотности лимфоцитов, в мозговом веществе продемонстрировано изменение эпителиальных клеток тимуса. Количество тимических телец в 1 мм^2 мозгового вещества было вдвое больше, чем в контроле. Стадии развития тимических телец также различались. У интактных крыс более половины телец находились на второй стадии развития. У крыс, подвергшихся воздействию ДДТ, преобладали тимусные тельца первой стадии развития (рис. 1).

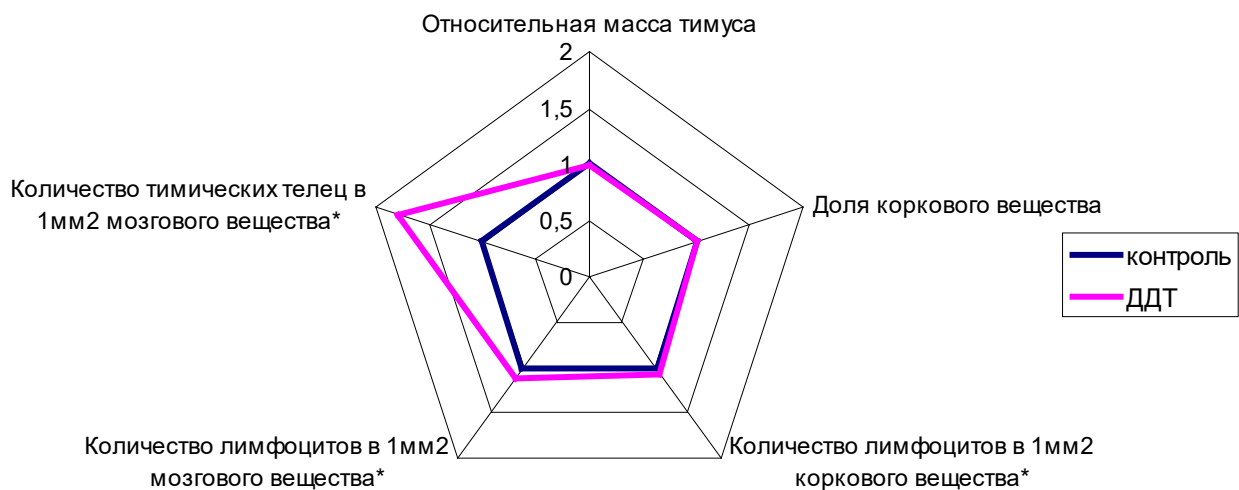


Рис. 1. Отличие морфологических характеристик тимуса крыс, развивавшихся при воздействии ДДТ. Значения контрольной группы приняты за 1. * – $p < 0,05$ по сравнению с контролем.

При иммуногистохимическом исследовании выявлено значительное изменение скорости пролиферации тимоцитов во всех оцениваемых компартментах. Компактный слой субкапсулярных лимфобластов у контрольных крыс был сужен и очагово дезинтегрирован. У крыс подвергавшихся воздействию ДДТ, субкапсулярные лимфобласты представляли собой более плотный интегральный слой, который был на 40 % шире, чем в контрольной группе. Помимо субкапсулярной области, во внутренней коре также обнаруживались митотически активные лимфоциты, но они располагались в коре диффузно. Процент Ki-67-позитивных лимфоцитов в 1 мм^2 коры у крыс, подвергшихся воздействию ДДТ, был значительно выше, чем в контроле.

Также при иммуногистохимическом исследовании выявлены Ki-67-положительные тимоциты и в мозговом веществе. У контрольных крыс пролиферирующие лимфоциты в мозговом веществе были равномерно распределены. Их процент был вдвое меньше, чем в коре. В отличие от контроля, у крыс, подвергшихся воздействию ДДТ, процент делящихся лимфоцитов был в 1,5 раза выше. Они также были диффузно распределены в мозговом веществе (рис. 2).

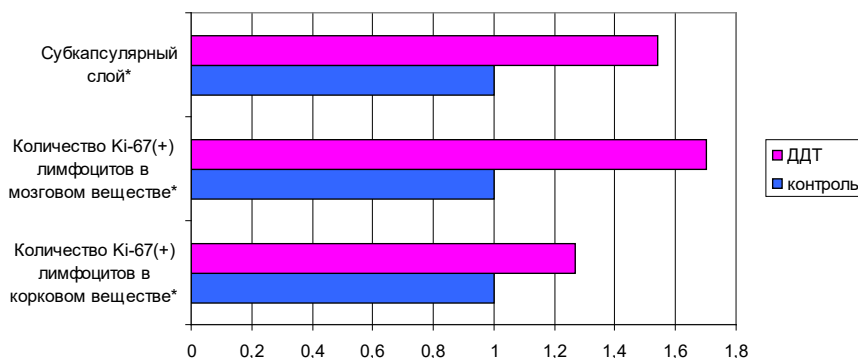


Рис. 2. Особенности пролиферативных процессов в тимусе крыс, развивавшихся при воздействии ДДТ. Значения контрольной группы приняты за 1. * – $p < 0,05$ по сравнению с контролем.

Обсуждение

Гистофизиология тимуса включает приток лимфоидных предшественников в субкапсулярную область, где они активно пролиферируют, сопутствующую дифференцировку лимфобластов в зрелые Т-клетки во внутренней коре и их эмиграцию из тимуса. Инволюция тимуса характеризуется прогрессирующей потерей массы органа, истощением коры из-за уменьшения притока клеток-предшественников из костного мозга и снижения клеточной пролиферации и дифференцировки [14]. У крыс инволюция тимуса начинается с шестинедельного возраста [15]. В настоящем исследовании на 10-недельных крысах мы обнаружили ранние возрастные изменения в тимусе контрольной группы. Иммуногистохимическая оценка клеточной пролиферации выявила истощение субкапсулярного слоя и низкую митотическую активность кортикальных и медуллярных лимфоцитов, свидетельствующую об угасании тимопоэза. У крыс, подвергшиеся воздействию ДДТ, тимус имел аналогичную контрольной группе массу и размеры коркового вещества, при этом отмечалась очаговая гибель лимфоцитов. Отличительной особенностью была более высокая клеточность коры и мозгового вещества, что отражает более активную продукцию Т-клеток. Более широкий слой лимфобластов под капсулой и более высокий процент делящихся лимфоцитов во внутренней коре свидетельствуют о том, что тимопоэз, у подвергшихся воздействию ДДТ крыс, не начинает регрессировать после полового созревания. Продукция Т-клеток в тимусе контролируется так называемыми перекрестными помехами тимуса, которые включают инициацию пролиферации, дифференцировки и миграции клеток-предшественников эпителиальными клетками тимуса, а также индукцию дифференцировки и функции эпителиальных клеток тимуса тимоцитами [16]. В настоящем исследовании мы наблюдали большее количество тимических телец у крыс, подвергшихся воздействию ДДТ. Более того, большинство телец находились в начальной стадии развития, что свидетельствует об их усиленном образовании. Возможная роль тимических телец в развитии Т-клеток до сих пор остается открытым вопросом [17,18], но исследования онтогенеза тимуса крыс показывают, что тимические тельца появляются, когда тимопоэз активен, и их количество уменьшается с возрастом одновременно с уменьшением продукции Т-клеток [19]. В нашем исследовании мы выявили более интенсивную продукцию лимфоцитов и эпителиальных клеток тимуса. Таким образом, оказывается, что тимус крыс, подвергшихся воздействию эндокринного дисраптора, был более ювенильным по сравнению с контрольной группой. Ранее мы показали, что пролиферативный ответ на Т-клеточный митоген Конканавалин А у препубертатных и пубертатных крыс был адекватен возрасту и не отличался от контроля, но после полового созревания, в возрасте 10 нед, значительно снижался [20]. Известно, что сниженный пролиферативный ответ на митоген свидетельствует о функциональной незрелости лимфоцитов, характерной для неонатального периода онтогенеза [21]. Кроме того, низкий пролиферативный ответ наблюдается в пожилом возрасте и связан со старением клеток и снижением обновления иммунных клеток [22]. Результаты настоящего исследования проливают свет на причину недостаточной пролиферативной реакции лимфоцитов. Функциональная недостаточность лимфоцитов тимуса, скорее всего, является следствием повышенного содержания низкодифференцированных пролиферирующих клеток, которые не обладают способностью полноценно отвечать на митоген.

Наши результаты свидетельствуют о том, что воздействие ДДТ в процессе развития нарушает постнатальный рост тимуса и функциональное созревание лимфоцитов тимуса. Поэтому, хорошо развитый, функционально активный вид тимуса не может считаться маркером достаточной функции Т-клеток в случае развития особи при постоянном воздействии химических веществ, нарушающих работу эндокринной системы.

Заключение

Таким образом, наши результаты показывают, что наряду с эндокринными железами ДДТ оказывает дисморфогенетическое действие и на центральные органы иммунитета, что проявляется в задержке развития тимуса, снижением миграции Т-клеток и повышенной пролиферацией тимоцитов и соответственно, в наступлении возрастной инволюции. Полученные данные показывают, что у организмов, развивающихся при воздействии низких доз ДДТ, морфологические и функциональные показатели могут отличаться от возрастных нормативных значений состояния иммунной системы.

Работа выполнена по государственному заданию рег. номер № FGFZ-2022–0035.

Литература

1. World Health Organization. Pesticide Residues in Food – 2018. Toxicological Evaluations; World Health Organization and Food and Agriculture Organization of the United Nations. WHO: Geneva, Switzerland, 2019; 780p.
2. Яглова Н.В., Яглов В.В. Изменения тиреоидного статуса крыс при длительном воздействии низких доз дихлордифенилтрихлорэтана. Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. 2013. Т. 156. № 12. С. 720–722.
3. Яглова Н.В., Цомартова Д.А., Яглов В.В. Влияние пренатального и постнатального воздействия низких доз дихлордифенилтрихлорэтана (ДДТ) на секрецию катехоламинов у крыс в разные периоды онтогенеза. Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. 2017. Т. 163. № 4. С. 415–418.
4. Anderson G., Moore N.C., Owen J.J., Jenkinson E.J. Cellular interactions in thymocyte development. Annu. Rev. Immunol. 1996. V. 14. P. 73–99.
5. Thapa P., Farber D.L. The role of the thymus in the immune response. Thorac. Surg. Clin. 2019. V. 29. P. 123–131.
6. Calder A.E., Hince M.N., Dudakov J.A., Chidgey A.P., Boyd R.L. Thymic involution: Where endocrinology meets immunology. Neuroimmunomodulation. 2011. V. 18. P. 281–289.
7. Sheu T.T., Chiang B.L., Yen J.H., Lin W.C. Premature CD4. T cell aging and its contribution to lymphopenia-induced proliferation of memory cells in autoimmune-prone non-obese diabetic mice. PLoS ONE. 2014. V. 9. e89379.
8. Gruver A.L., Sempowski G.D. Cytokines, leptin, and stress-induced thymic atrophy. J. Leukoc. Biol. 2008. V. 84. P. 915–923.
9. Singh N., Miranda K., Singh U., Nagarkatti P., Nagarkatti M. Diethylstilbestrol (DES) induces autophagy in thymocytes by regulating Beclin-1 expression through epigenetic modulation. Toxicology. 2018. V. 410. P. 49–58.
10. Mestres J., Pérez-Albaladejo E., Porte C., Postigo C. High-throughput analysis of the steroid profile in placental cell cultures to evaluate endocrine disrupting effects of contaminant exposure. J. Chromatogr. A. 2022. 1667. 462886.
11. La Merrill M.A., Vandenberg L.N., Smith M.T., Goodson W., Browne P., Patisaul H.B., Guyton K.Z., Kortenkamp A., Coglian V.J., Woodruff T.J., et al. Consensus on the key characteristics of endocrine-disrupting chemicals as a basis for hazard identification. Nat. Rev. Endocrinol. 2020. V. 18. P. 45–57.
12. Яглова Н.В. и др. Морфологические изменения тимуса новорожденных крыс, подвергавшихся воздействию эндокринного дисраптора дихлордифенилтрихлорэтана (ДДТ) во внутриутробном периоде развития. Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. 2019. Т. 167. № 2. С. 261–264.
13. Yamazaki H., Takano R., Shimizu M., Murayama N., Kitajima M., Shono M. Human blood concentrations of dichlorodiphenyltrichloroethane (DDT) extrapolated from metabolism in rats and humans and physiologically based pharmacokinetic modeling. J. Health Sci. 2010. V. 56. P. 566–575.
14. Gruver A.L., Sempowski G.D. Cytokines, leptin, and stress-induced thymic atrophy. J. Leukoc. Biol. 2008. V. 84. P. 915–923.
15. Gruver A., Hudson L., Sempowski G.D. Immunosenescence of ageing. J. Pathol. 2007. V. 211. P. 144–156.
16. Kondo K., Ohigashi I., Takahama Y. Thymus machinery for T-cell selection. Int. Immunol. 2019. V. 31. P. 119–125.
17. Wang J., Sekai M., Matsui T., Fujii Y., Matsumoto M., Takeuchi O., Minato N., Hamazaki Y. Hassall's corpuscles with cellular-senescence features maintain IFN α production through neutrophils and pDC activation in the thymus. Int. Immunol. 2019. V. 31. P. 127–139.
18. Laan M., Salumets A., Klein A., Reintamm K., Bichele R., Peterson H., Peterson P. Post-Aire Medullary Thymic Epithelial Cells and Hassall's Corpuscles as Inducers of Tonic Pro-Inflammatory Microenvironment. Front. Immunol. 2021. V. 12. 635569.
19. Bodey B., Kaiser H.E. Development of Hassall's bodies of the thymus in humans and other vertebrates (especially mammals) under physiological and pathological conditions: Immunocytochemical, electron microscopic and in vitro observations. In Vivo. 1997. V. 11. P. 61–85.
20. Yaglova N.V. et al. Developmental exposure to low doses of dichlorodiphenyltrichloroethane impairs proliferative response of thymic lymphocytes to Concanavalin A in rats. Heliyon. 2020. V. 6. N. 3. e03608.
21. Holladay S., Smialowicz R. Development of the murine and human immune system: Differential effects of immunotoxicants depend on time of exposure. Environ. Health Perspect. 2000. V. 108. P. 463–473.
22. Sansoni P., Vescovini R., Fagnoni F., Biasini C., Zanni F., Zanlari L., Telera A., Lucchini G., Passeri G., Monti D.; et al. The immune system in extreme longevity. Exp. Gerontol. 2008, V. 43. P. 61–65.