

И.М. ДЬЯЧКОВА

## МОРФОЛОГИЧЕСКОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ КОМПОНЕНТОВ КЛЕТОЧНОГО ИММУННОГО ОТВЕТА ТИМУСА ЛАБОРАТОРНЫХ КРЫС ПРИ ПОСТУПЛЕНИИ КАЛЬЦИЯ С ПИТЬЕВОЙ ВОДОЙ

**Ключевые слова:** тимус, CD3-позитивные клетки, кальций, иммунитет, Т-лимфоциты, лимфоциты, макрофаги, лабораторные животные, кальций.

Исследование структурно-функциональных особенностей тимуса является актуальным, так как в нем происходит лимфопоэз, он отвечает за эффективность клеточного иммунного ответа как врожденного, так и приобретенного иммунитета. Целью настоящей работы явилось изучение морфологических структур CD3-позитивных структур тимуса лабораторных животных при употреблении соли кальция, поступающей с питьевой водой. В работе с помощью иммуногистохимического метода исследованы количественные показатели CD3-позитивных клеток тимуса. Для общегистологической характеристики тимуса применяли окраску гематоксилином и эозином. Ежедневно в ходе эксперимента животные получали с питьевой водой в среднем 8,1–10,2 мг/кг кальция. Можно констатировать, что употребление питьевой воды с концентрацией кальция 235 мг/л приводит к увеличению средних размеров площади дольки тимуса, преимущественно за счет коркового вещества. Увеличение относительного количества больших лимфоцитов в корковом веществе долек тимуса происходит за счет уменьшения количества средних и малых форм клеток. Что касается процентного содержания больших и малых CD3-позитивных клеток в структурах тимуса, в опытной группе животных наблюдается снижение малых клеток в мозговом веществе и на границе между корковым и мозговым веществами за счет увеличения количества больших и средних клеток тимуса соответственно.

**Актуальность.** В связи снижением иммунологической реактивности населения возрос интерес к иммуномодулирующей терапии. Установлено повышение инфекционных, аутоиммунных, онкологических, аллергических заболеваний. Исследования в этой области позволяют разработать новый подход к селективной модуляции отдельных звеньев иммунитета и по-новому подойти к коррекции с помощью препаратов [2].

Исследование структурно-функциональных особенностей тимуса является актуальной проблемой, так как тимус – центральный орган иммунной системы. В тимусе происходит лимфопоэз большинства Т-лимфоцитов, он отвечает за эффективность клеточного иммунного ответа как врожденного, так и приобретенного иммунитета [1, 4].

Такие макроэлементы, как кальций, играют важную роль в формировании иммунного ответа, в том числе в созревании и дифференцировке Т-лимфоцитов [3, 7]. Высокоспецифичным маркером Т-лимфоцитов является CD3 антиген [6]. Используя флюорохром-меченые моноклональные антитела, связывающиеся с определёнными CD, можно произвести подсчёт содержания лимфоцитов, относящихся к различным по функции или стадии развития субпопуляциям [8]. Это позволяет понять природу некоторых заболеваний, оценить состояние пациента, следить за течением и прогнозировать дальнейшее развитие заболевания. Детальное исследование влияния иммуностропных препаратов на органы иммунной системы, особенно на клеточном и тканевом уровне, необходимо для избирательного воздействия на нарушенные гистофизиологические процессы, что является обязательным условием успешной иммуномодуляции [5].

Цель исследования – изучение морфофункциональной характеристики структур тимуса и популяций CD3-позитивных клеток лабораторных крыс при поступлении соли кальция с питьевой водой в течение 60 суток.

**Материалы и методы исследования.** Объектом исследования служили 44 тимуса белых нелинейных лабораторных крыс-самцов одного возраста и массы 150–180 г. На время выведения из эксперимента животные достигали 3–3,5 месяца. Экспериментальные животные разделены на две группы:

*первая группа* – контрольные животные ( $n = 22$ ), получавшие питьевую воду «Сестрица природная» в свободном доступе, соответствующую требованиям ГОСТ Р 52109-2003, СанПиН 2.1.4.1116-02;

*вторая группа* – подопытные животные ( $n = 22$ ), получавшие питьевую воду «Сестрица природная» в свободном доступе, соответствующую требованиям ГОСТ Р 52109-2003, СанПиН 2.1.4.1116-02 с добавлением хлорида кальция в концентрации 235 мг/л в пересчете на кальций.

Ежедневно в ходе эксперимента опытные животные получали с питьевой водой в среднем 8,1–10,2 мг/кг кальция.

Все действия, предусматривающие контакты с экспериментальными животными, проводились согласно «Правилам проведения работ с использованием экспериментальных животных» (приказ № 742 от 13 ноября 1984 г. Министерства здравоохранения СССР), требованиям «Европейской конвенции о защите позвоночных животных, которые используются для экспериментальных и других научных целей» (Страсбург, 1986) и принципам Хельсинкской декларации о гуманном отношении к животным. Выведение животных из эксперимента проводилось путем декапитации.

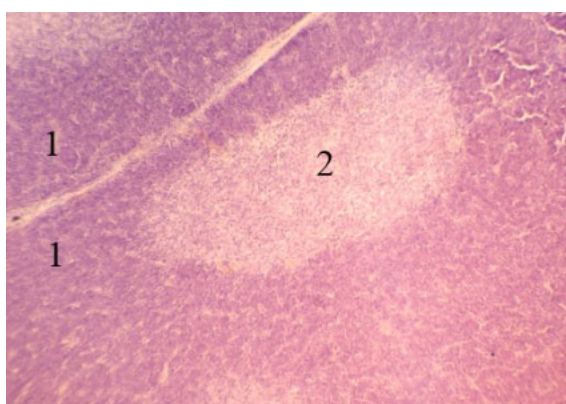
После фиксации в 10%-ном растворе нейтрального формалина тимус крыс заливали парафином. Парафиновые срезы толщиной 3 мкм готовились на микротоме МПС-2 и после депарафинирования и регитратации в этаноле нисходящей концентрации срезы тимуса погружали в восстанавливающий цитратный буфер (рН 6,0).

Для общегистологической характеристики тимуса и проведения морфометрического анализа применяли окраску гематоксилином и эозином.

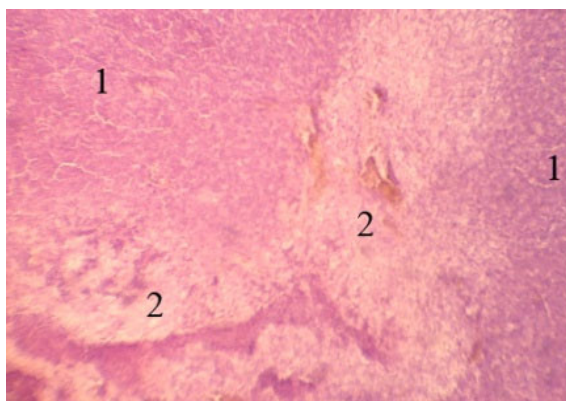
Оценку иммуногистохимического состояния клеток проводили обработкой мечеными поликлональными антителами к CD3 клеточным мембранным маркерам, иммуногистохимическая реакция ставилась в соответствии рекомендациями фирмы-изготовителя (Santa Cruz, USA). Парафиновые срезы органа толщиной 3 мкм наносились на стекла, предварительно обработанные L-poly-sine. Потом срезы органа подвергались сушке при 25°C в течение 24 ч. Окраска препаратов происходила с помощью иммуногистохимических автоконтейнеров AUTOSTAINER-360 (THERMO, Великобритания) и Leica BOND-MAX (Германия). После ингибирования эндогенной пероксидазы охлажденным 3%-ным раствором перекиси водорода в течение 10 мин проводили высокотемпературную обработку прогреванием на водяной бане при 95°C в течение 20 мин в 0,01 М цитратном буфере (рН 6,0) для восстановления антигенов в тканях тимуса. Инкубация с первичными антителами (анти-CD3) производилась при комнатной температуре в течение 60 мин. Визуализацию связавшихся продуктов реакции проводили биотин-стрептавидин-пероксидазным методом с использованием набора LSAB+Kit, HRP, в качестве красящего вещества использовали диаминобензидин. Последний дает коричневую окраску детектированным CD3 позитивным структурам.

Морфометрию участков долек тимуса и размеров клеточных структур проводили с применением компьютерного анализа микрофотографий, сделанных при увеличении объектива 40 и окуляра 10 с использованием светового микроскопа МИКМЕД-5. Компьютерную морфометрию проводили с помощью программы «Sigma Scan Pro 5.0» [7]. Границы каждого поля зрения препаратов тимуса записывали в формате JPEG, для каждого случая вычисляли количество клеток и их площадь. Площадь коркового и мозгового веществ долек тимуса измеряли в одном срезе.

**Результаты исследования и их обсуждение.** При окраске срезов тимуса крыс, получавших питьевую воду с добавлением кальция, гематоксилином и эозином выявляется следующее: в дольках тимуса хорошо определяются корковое и мозговое вещества, однако дольки становятся менее контурированными по сравнению с таковыми контрольных животных (рис. 1).



а



б

Рис. 1. Тимус экспериментальных животных:  
а – контрольная группа; б – группа, получавшая питьевую воду с добавлением кальция.  
Окраска гематоксилином и эозином. Микроскоп МИКМЕД-1. Об. 10. Ок. 10:  
1 – корковое вещество дольки тимуса; 2 – мозговое вещество дольки тимуса

В некоторых дольках железы наблюдалось «врастание» мозгового вещества в корковое в виде небольших наплывов. В мозговом веществе каждой дольки обнаруживаются тельца Гассалья в количестве 2–4 на одну дольку, в то

время как у контрольных животных в тимусе встречаются дольки, не содержащие этих телец. Наряду с дольками средних размеров в вилочковой железе животных данной группы визуально отмечаются и крупные дольки. Морфометрический анализ показал, что средние площади долек, а также площади коркового и мозгового веществ в них заметно отличаются от таковых у контрольных.

Размеры коркового вещества долек тимуса животных, получавших кальций с питьевой водой, превышают аналогичные показатели контрольных крыс в 1,7 раза, а мозгового – в 1,4 раза (рис. 2).

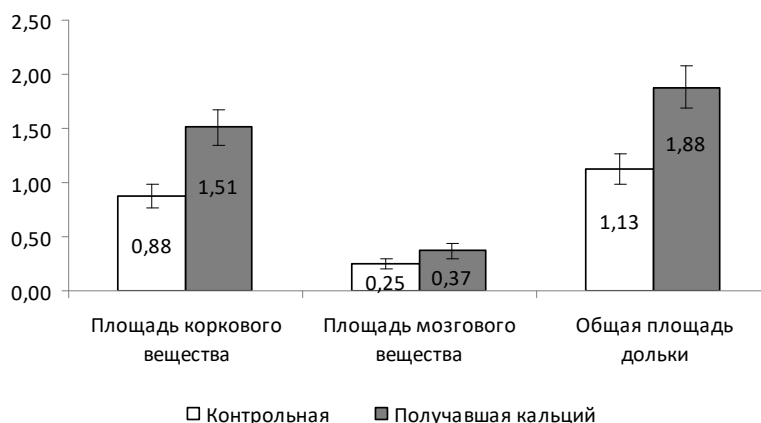


Рис. 2. Сравнение размеров долек тимуса экспериментальных животных

Соотношение площади коркового вещества и площади мозгового вещества долек тимуса (далее  $S_{к.в.}/S_{м.в.}$ ) составило 4,08 в опытной группе, а в контроле – 3,52. Таким образом, можно констатировать, что употребление питьевой воды с концентрацией кальция 235 мг/л приводит к увеличению средних размеров площади дольки тимуса, преимущественно за счет коркового вещества. При подсчете концентрации кальция учитывали и его содержание в питьевой воде «Сестрица-природная».

Подсчет тимоцитов коркового и мозгового веществ долек тимуса в 10 фиксированных площадях под большим увеличением микроскопа показал тенденцию к увеличению количества тимоцитов как в мозговом, так и в корковом веществе долек тимуса (рис. 3).

Исследование распределения тимоцитов с учетом их размеров в корковом и мозговом веществах долек тимуса показано в табл. 1.

Заметим, что у животных как контрольной, так и опытной группы распределение лимфоцитов в мозговом веществе долек тимуса имеет одинаковый характер и сопоставимые цифровые значения. Так, в контрольной группе на долю больших лимфоцитов приходится 36,2%, средних – 44,7%, малых – 19,1%. Для опытной группы показатели составляют 36,6; 45,9; 17,5, соответственно.

Что касается распределения лимфоцитов в корковом веществе, наблюдаются существенные различия в содержании всех видов лимфоцитов. Несмотря на то, что подавляющее большинство всех лимфоцитов как в контрольной, так и в опытной группе составляют клетки среднего размера, их содержание в группе, получавшей питьевую воду с кальцием, уменьшается (с 50 до 46,4%), и различия являются статистически значимыми.

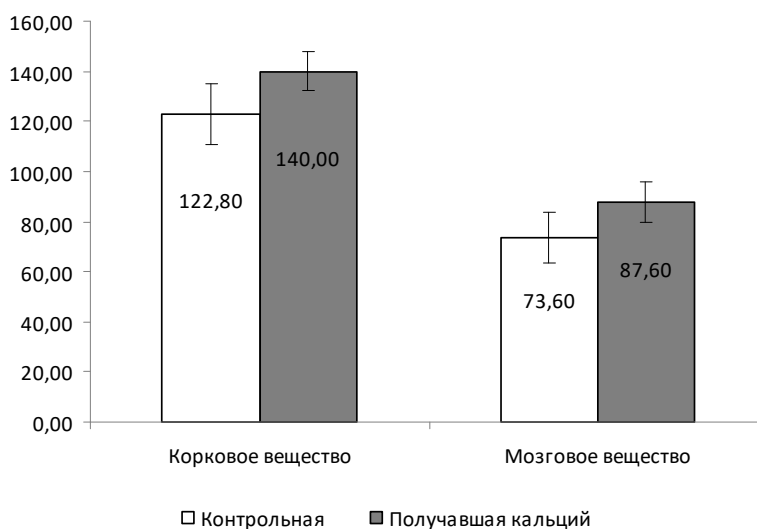


Рис. 3. Сравнение количества тимоцитов в структурах тимуса, шт.

Таблица 1

**Распределение тимоцитов в корковом и мозговом веществе долек тимуса экспериментальных животных с учетом их размеров, мкм<sup>2</sup>**

Размер	Группа			
	контрольная		получавшая кальций	
	корковое вещество	мозговое вещество	корковое вещество	мозговое вещество
Маленькие: 4,26–10,57	28,9%	19,1%	23,2%	17,5%
Средние: 10,58–16,87	50,0%	44,7%	46,4%*	45,9%
Большие: 16,88–27,25	21,1%	36,2%	30,4%*	36,6%

Примечание. \* – различия с контрольной группой статистически значимы ( $p < 0,05$ ).

Относительно процентного содержания больших и малых лимфоцитов в опытной группе наблюдается прямо противоположная картина: если в контрольной группе на долю больших лимфоцитов приходилось 21,1%, а на долю малых – 26,9%, то в опытной группе эти значения составляют 30,4 и 23,2%. Таким образом, увеличение относительного количества больших лимфоцитов в корковом веществе долек тимуса происходит за счет уменьшения количества средних и малых форм.

При обработке срезов тимуса иммуногистохимическим методом для выявления антител CD3-позитивных клеток как у контрольных, так и у опытных животных выявляется дольчатое строение органа. В четко контурированных дольках овально-полигональной формы, разграниченных друг от друга темными прослойками междольковых септ, хорошо определяется корковое и мозговое вещества долек.

CD3-позитивные клетки у контрольных животных в большом количестве выявляются на границе коркового и мозгового веществ долек тимуса (в среднем  $13,9 \pm 0,7$  клетки в одном поле зрения), где они располагаются по всей ее протяженности. Многие клетки имеют полигональную форму, но среди них

встречаются единичные клетки округлой формы. В корковом и в мозговом веществах долек железы (в среднем  $8,8 \pm 0,6$  и  $7,0 \pm 0,5$  клетки в одном поле зрения соответственно) CD3-позитивные клетки располагаются диффузно.

Длительный прием с питьевой водой хлорида кальция приводит к достоверному увеличению количества клеток в одном поле зрения: в корковом веществе долек с  $8,8 \pm 0,6$  (контроль) до  $12,0 \pm 1,3$  ( $p < 0,05$ ), а в мозговом веществе долек – с  $7,0 \pm 0,5$  (контроль) до  $11,0 \pm 0,7$  (табл. 2). На границе коркового и мозгового веществ долек тимуса не наблюдается достоверных изменений количества CD3-позитивных клеток.

Таблица 2

Количество CD3-позитивных клеток в структурах долек тимуса экспериментальных животных ( $M \pm \sigma$ )

Структура	Группа	
	контрольная	получавшая кальций
Корковое вещество	$8,8 \pm 0,6$	$12,0 \pm 1,3^*$
Граница между корковым и мозговым веществами	$13,9 \pm 0,7$	$14,9 \pm 1,4$
Мозговое вещество	$7,0 \pm 0,5$	$11,0 \pm 0,7^*$

Примечание. \* – различия достоверны с контрольной группой ( $p < 0,05$ ).

Подсчет CD3-позитивных клеток в долях тимуса в 10 полях зрения с иммерсионным объективом микроскопа показал тенденцию к достоверному увеличению количества клеток как в мозговом, так и в корковом веществе долек тимуса (рис. 4).

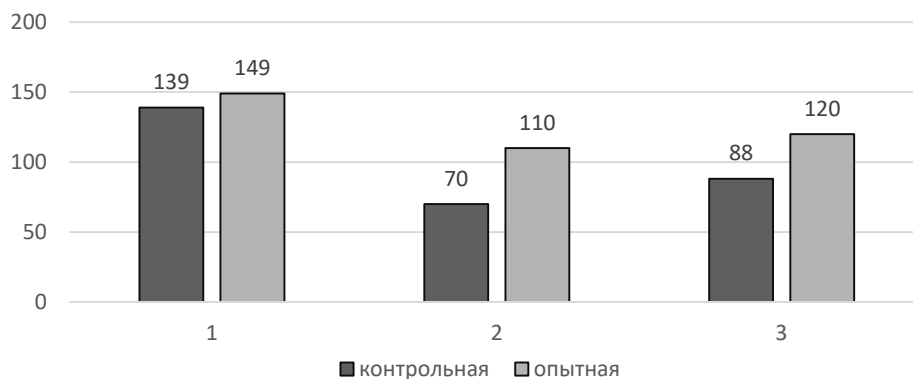


Рис. 4. Сравнение количества CD3-позитивных клеток в структурах тимуса, шт.:  
1 – граница между корковым и мозговым веществами;  
2 – мозговое вещество; 3 – корковое вещество

Распределения CD3-позитивных клеток в долях тимуса с учетом их размеров показано в табл. 3.

У животных опытной группы распределение CD3-позитивных клеток на границе коркового и мозгового веществ значительно отличаются от животных контрольной группы. Заметим, что у животных опытной группы на долю малых CD3-позитивных клеток приходится 17,4%, что достоверно ниже, чем в контрольной группе. Количество же средних CD3-позитивных клеток достоверно увеличивается (60,4%).

Распределение CD3-позитивных клеток в мозговом веществе долек тимуса имеет тенденцию к резкому снижению малых клеток (11,8%) и увеличению

больших (38,2%) при употреблении кальция с питьевой водой. Для контрольной группы животных показатели составляют 40,0% и 17,1%, соответственно. Что касается распределения CD3-позитивных клеток в корковом веществе, то наблюдается статистически значимое увеличение малых клеток (с 1,4% до 17,4%).

Таблица 3

Распределение CD3-позитивных клеток в структурах долек тимуса экспериментальных животных с учетом их размеров, мкм<sup>2</sup>

Размер	Группа					
	контрольная			получавшая кальций		
	граница между корковым и мозговым веществами	корковое вещество	мозговое вещество	граница между корковым и мозговым веществами	корковое вещество	мозговое вещество
Маленькие	27,5%	1,4%	40,0%	17,4%*	11,6%*	11,8%*
Средние	49,3%	40,9%	42,9%	60,4%*	41,7%	50,0%
Большие	23,2%	55,7%	17,1%	22,2%	46,7%	38,2%*

Примечание. \* – различия с контрольной группой статистически значимы ( $p < 0,05$ ).

Относительно процентного содержания больших и малых CD3-позитивных клеток в структурах тимуса в опытной группе наблюдается снижение малых клеток в мозговом веществе и на границе между корковым и мозговым веществами за счет увеличения количества больших клеток в мозговом веществе и средних клеток на границе между корковым и мозговым веществами. Вероятно, соединение кальция ускоряет созревание Т-лимфоцитов [6].

**Выводы.** Поступление кальция с питьевой водой в ходе эксперимента над животными в течение 60 дней значительно увеличивает площади долек тимуса, преимущественно за счет коркового вещества, и количество тимоцитов на единицу площади по отношению к контрольным значениям ( $p < 0,05$ ).

Обнаружено влияние соли кальция на CD3-позитивные клетки: при поступлении в организм  $\text{CaCl}_2$  в корковом и мозговом веществах долек тимуса животных достоверно увеличивается количество клеток и уменьшается количество малых клеток в мозговом веществе и на границе коркового и мозгового веществ.

#### Литература

1. Гордова В.С., Дьячкова И.М. Антигенпрезентирующие клетки лимфоидных органов // Вестник Чувашского университета. 2014. № 2. С. 217–224.
2. Кудрин А.В., Громова О.А. Микроэлементы в иммунологии и онкологии. М.: ГЭОТАР-Медиа, 2007. 544 с.
3. Мельникова О.В., Сергеева В.Е. Морфологические исследования компонентов клеточного и гуморального звеньев иммунного ответа селезенки лабораторных крыс при экспериментальной гиперкальциемии // Морфологические ведомости. 2016. Т. 24, № 1. С. 60–68. DOI: [https://doi.org/10.20340/mv-mn.2016.24\(1\):60-68](https://doi.org/10.20340/mv-mn.2016.24(1):60-68).
4. Рябкина А.И., Капитонова М.Ю., Нестерова А.А., Морозова З.Ч. Онтогенетические стро-мало-паренхиматозных взаимодействий в селезенке // Морфология. 2008. Т. 132, № 2. С. 58.
5. Хаитов Р.М., Алексеев Л.П. Иммуногенетика и биомедицина // Российский аллергологический журнал. 2013. № 1. С. 5–14.
6. Шатских О.А., Лазунова Е.М., Сергеева В.Е. Реакция CD1A- и CD3- позитивных клеток тимуса при введении мелатонина в различных световых условиях // Современные проблемы науки и образования. 2015. № 5. URL: <https://science-education.ru/ru/article/view?id=21615>.
7. Gordova V.S., Sergeeva V.E., Dyachkova I.M., Sapozhnikov S.P., Smorodchenko A.T. Morpho-functional adaptation of rat thymus structures to silicon consumption with drinking water. *Bulletin of Experimental Biology and Medicine*, 2015, vol. 158, no. 6, pp. 816–819.
8. Lambert C., Genin C. CD3 bright lymphocyte population reveal gammadelta T cells. *Cytometry B Clin. Cytom.*, 2004, vol. 61, no. 1, pp. 45–53.

**ДЬЯЧКОВА ИРАИДА МИХАЙЛОВНА** – кандидат биологических наук, доцент кафедры медицинской биологии с курсом микробиология и вирусология, Чувашский государственный университет, Россия, Чебоксары (iraida-djachkova@rambler.ru).

Iraida M. DYACHKOVA

**MORPHOLOGICAL STUDY OF THE COMPONENTS OF THE THYMUS CELLULAR IMMUNE RESPONSE IN LABORATORY RATS WHEN CALCIUM IS SUPPLIED WITH DRINKING WATER**

**Key words:** thymus, CD3-positive cells, calcium, immunity, T-lymphocytes, lymphocytes, macrophages, laboratory animals, calcium.

The study of the structural and functional features of the thymus is relevant, since lymphopoiesis takes place in it, it is responsible for the effectiveness of the cellular immune response of both innate and acquired immunity. The purpose of this work was to study the morphological structures of CD3-positive structures of the thymus in laboratory animals when using calcium salt supplied with drinking water. Quantitative indicators of CD3-positive thymus cells were studied using the immunohistochemical method. For the general histological characteristics of the thymus, hematoxylin and eosin staining was used. During the experiment, the animals received daily an average of 8.1–10.2 mg/kg of calcium with drinking water. It can be stated that intake of drinking water with a calcium concentration of 235 mg/l leads to an increase in the average size of the lobular area, mainly due to the cortical substance. An increase in the relative number of large lymphocytes in the cortical substance of the thymus lobes occurs due to a decrease in the number of medium and small cell forms. As for the percentage of large and small CD3-positive cells in thymus structures, in the experimental group of animals the authors observed a decrease in small cells in the medulla and at the border between the cortical and the medullary substances due to an increase in the number of large and medium thymus cells, respectively.

References

1. Gordova V.S., Dyachkova I.M. *Antigenprezentiruyushchie kletki limfoidnykh organov* [Antigen-presenting cells of lymphoid organs]. *Vestnik Chuvashskogo universiteta*, 2014, no. 2, pp. 217–224.
2. Kudrin A.V., Gromova O.A. *Mikroelementy v immunologii i onkologii* [Trace elements in immunology and oncology. Moscow: Geotarma]. Moscow, GEOTARMe-dia Publ., 2007, 544 p.
3. Mel'nikova O.V., Sergeeva V.E. *Morfologicheskie issledovaniya komponentov kletочно-go i gumoral'nogo zven'ev immunnogo otveta selezenki laboratornykh kryis pri eksperimental'noi giperkal'tsiemii* [Morphological studies of the components of cellular and humoral links of the immune response of the spleen of laboratory rats with experimental hypercalcemia]. *Morfologicheskie vedomosti*, 2016, vol. 24, no. 1, pp. 60–68. DOI: [https://doi.org/10.20340/mv-mn.2016.24\(1\):60-68](https://doi.org/10.20340/mv-mn.2016.24(1):60-68).
4. Ryabikina A.I., Kapitonova M.Yu., Nesterova A.A., Morozova Z.Ch. *Ontogenicheskie stromaloparenkhimatoznykh vzaimodeistvii v селезенке* [Ontogenetic stromal-parenchymal interactions in the spleen]. *Morfologiya*, 2008, vol. 132, no. 2, p. 58.
5. Khaitov R.M., Alekseev L.P. *Immunogenetika i biomeditsina* [Immunogenetics and biomedicine]. *Rossiiskii allergologicheskii zhurnal*, 2013, no. 1, pp. 5–14.
6. Shatskikh O.A., Luzikova E.M., Sergeeva V.E. *Reaktsiya CD1A- i CD3- pozitivnykh kletok timusa pri vvedenii melatonina v razlichnykh svetovykh usloviyakh* [Reaction of CD1A- and CD3-positive cells of the thymus with the introduction of melatonin in various light conditions] *Sovremennye problemy nauki i obrazovaniya*, 2015, no. 5, URL: <https://science-education.ru/ru/article/view?id=21615>.
7. Gordova V.S., Sergeeva V.E., Dyachkova I.M., Sapozhnikov S.P., Smorodchenko A.T. *Morphofunctional adaptation of rat thymus structures to silicon consumption with drinking water*. *Bulletin of Experimental Biology and Medicine*, 2015, vol. 158, no. 6, pp. 816–819.
8. Lambert C., Genin C. CD3 bright lymphocyte population reveal gammadelta T cells. *Cytometry B Clin. Cytom.*, 2004, vol. 61, no. 1, pp. 45–53.

**ИРАИДА М. ДЬЯЧКОВА** – Candidate of Biological Sciences, Associate Professor, Department of Medical Biology with the course Microbiology and Virology, Chuvash State University, Russia, Cheboksary (iraida-djachkova@rambler.ru).

**Формат цитирования:** Дьячкова И.М. Морфологическое исследование компонентов клеточного иммунного ответа тимуса лабораторных крыс при поступлении кальция с питьевой водой [Электронный ресурс] // Acta medica Eurasica. – 2022. – № 3. – С. 71–78. – URL: <http://acta-medica-eurasica.ru/single/2022/3/9>. DOI: 10.47026/2413-4864-2022-3-71-78.