

© М. А. Кривенцов, В. С. Пикалюк, Г. А. Мороз, С. А. Кутя, 2017  
УДК 611.438.018:612.482.4

*М. А. Кривенцов, В. С. Пикалюк, Г. А. Мороз, С. А. Кутя*

## ДИНАМИКА СТРУКТУРНЫХ ПРЕОБРАЗОВАНИЙ И ЭКСПРЕССИИ МАРКЕРОВ CD68 и Ki-67 В ТИМУСЕ КРЫС ПОСЛЕ ОДНОКРАТНОГО ВОЗДЕЙСТВИЯ ИОНИЗИРУЮЩЕГО ИЗЛУЧЕНИЯ

Кафедра нормальной анатомии (зав. — проф. В. С. Пикалюк), Медицинская академия им. С. И. Георгиевского, ФГАОУ ВО «Крымский федеральный университет им. В. И. Вернадского», г. Симферополь

**Цель** — оценка динамики структурных преобразований и экспрессии маркеров CD68 и Ki-67 в тимусе крыс в различные сроки после однократного тотального облучения в сублетальной дозе.

**Материал и методы.** У 30 крыс через 3, 7, 14 и 30 сут после экспериментального облучения в дозе 5 Гр изучали тимус с использованием гистологических, морфометрических и иммуногистохимических методов (маркеры Ki-67 и CD68).

**Результаты.** На 3-и сутки после облучения выявлена «инверсия» слоев тимуса со снижением относительной площади коркового вещества (на 15,1% по сравнению с данными в контроле) и обеднением его клеточной популяции на фоне значимого увеличения экспрессии маркеров Ki-67 и CD68 в субкапсулярной зоне (на 71,3 и 242,1% в сравнении с контролем, соответственно). В последующие сроки эксперимента происходит постепенное восстановление гистоархитектоники и клеточной популяции тимуса за счет пролиферативной активности тимоцитов в субкапсулярной зоне при неизменном уровне экспрессии маркера CD68.

**Выводы.** Наибольшая выраженность морфологических преобразований тимуса приходится на 3-и и 7-е сутки после облучения с восстановлением гистоархитектоники и клеточной популяции органа к 30-м суткам эксперимента.

**Ключевые слова:** тимус, гамма-облучение, крысы

При нарастающем антропогенном загрязнении окружающей среды проблема альтерации, адаптации и репарации органов иммунной системы в условиях повреждающего действия ионизирующего излучения остается актуальной [9]. В практическом здравоохранении и ветеринарии продолжает существовать потребность в новых эффективных и безопасных методах защиты от  $\gamma$ -облучения — нивелирования его негативных последствий. Морфологические преобразования центральных и периферических органов иммуногенеза, в том числе тимуса, в норме [4, 10] и после воздействия ионизирующего излучения широко освещены в литературе [1, 3]. У различных экспериментальных животных продемонстрирована динамика структурных перестроек тимуса в ответ на действие различных видов и доз ионизирующего излучения. Полученные данные зачастую не позволяют точно предсказать динамику гистопатологических реакций в тимусе при конкретной дозе облучения. Одним из наименее изученных вопросов в данной области следует считать изменения экспрессии различных иммуногистохимических маркеров (в частности CD68 и Ki-67).

Цель данного исследования — оценка динамики структурных преобразований и экспрессии маркеров CD68 и Ki-67 в тимусе крыс в различные сроки после однократного тотального облучения в сублетальной дозе.

**Материал и методы.** Исследование проведено на крысах-самцах линии Вистар ювенильного возраста (3–3,5 мес) массой 150–170 г. Животных подвергали однократному воздействию ионизирующего  $\gamma$ -облучения в дозе 5 Гр, которое моделировали на линейном ускорителе Clinac 2100 (Varian, США) на базе Крымского республиканского учреждения «Онкологический клинический диспансер» (г. Симферополь). Использовали следующие параметры ионизирующего излучения: рабочая энергия линейного ускорителя — 6 МэВ, время экспозиции — 50 с, разовая доза — 5 Гр, размер поля — 40 см<sup>2</sup>, глубина проникновения — 2,5 см. Во время облучения крысы находились в свободном режиме перемещения в пределах специально сконструированного бокса площадью 40 см<sup>2</sup>, что обеспечивало равномерное воздействие на них ионизирующего излучения. Среди указанных выше параметров ключевым является доза облучения, равная 5 Гр, которая широко используется для моделирования костномозговой формы острой лучевой болезни у крыс. Вместе с тем, выбранная доза для крыс не достигает LD<sub>50</sub>. По различным литературным данным она колеблется от 6 до 8,5 Гр [12], что связано с отсутствием изучения выживаемости экспериментальных животных, а также с необходимостью

### Сведения об авторах:

*Кривенцов Максим Андреевич* (e-mail: [maksimkgmu@mail.ru](mailto:maksimkgmu@mail.ru)), *Пикалюк Василий Степанович*, *Мороз Геннадий Александрович*, *Кутя Сергей Анатольевич*, кафедра нормальной анатомии, Медицинская академия им. С. И. Георгиевского, ФГАОУ ВО «Крымский федеральный университет им. В. И. Вернадского», 295000, Республика Крым, г. Симферополь, бул. Ленина, 5/7

сохранения численности облучённых крыс на протяжении всего срока эксперимента.

На протяжении исследования крыс содержали в стандартных условиях вивария. Затем, на 3-, 7-, 14-е и 30-е сутки после облучения (по 6 животных каждого срока) декапировали под эфирным наркозом с соблюдением биоэтических требований (в соответствии с «Правилами проведения работ с использованием экспериментальных животных»). Контролем служили 6 интактных крыс. Отсутствие сроков наблюдения в интактной серии обусловлено незначительностью преобразований гистологической структуры тимуса в данной возрастной группе крыс на протяжении эксперимента [4].

После взятия тимуса и проведения необходимых макрокопических и органомерических исследований его фиксировали в 10% растворе нейтрального формалина и по обычной методике заливали в парафин. Серийные гистологические срезы толщиной 4–5 мкм окрашивали гематоксилином — эозином и по Ван-Гизону. Изучение динамики структурных преобразований тимуса после воздействия ионизирующего излучения дополнено данными иммуногистохимического анализа с использованием маркеров Ki-67 (маркер клеточной пролиферации, экспрессирующийся на стадиях клеточного цикла G1, G2, S и во время митоза) и CD68 (панмакрофагальный маркер, экспрессирующийся в моноцитах и макрофагах).

Иммуногистохимические реакции проводили на срезах толщиной 3–4 мкм в соответствии с протоколами компании TermoScientific (США), используя систему визуализации Quanto и DAB Chromogen. Положительную реакцию оценивали по желто-коричневому окрашиванию ядра — для маркера Ki-67 (клон sp6, TermoScientific) или цитоплазмы — для маркера CD68 (клон ab-1, TermoScientific). Количественный уровень экспрессии изучаемых маркеров выражали в виде соотношения площади иммунопозитивных ядер/цитоплазмы (для Ki-67 и CD68 соответственно) и иммунонегативной площади (индексы  $I_{Ki-67}$  и  $I_{CD68}$  соответственно).

Просмотр и получение цифровых фотографий микропрепаратов тимуса осуществляли с помощью цитоморфометрического комплекса Olympus CX-41 (Olympus, Япония) с набором планарных объективов. На гистологических срезах с использованием программного обеспечения ImageJ [11] путем наложения морфометрической сетки измеряли площади основных структур тимуса (капсулы и трабекул, коркового и мозгового вещества) и определяли их относительные площади к общей площади гистологического среза, а также кортико-медуллярный индекс (КМИ).

На основании полученных данных в программе Statistica 10.0 (StatSoft, США) строили вариационные ряды, оценивали нормальность распределения по критерию Колмогорова—Смирнова [5], рассчитывали среднее значение и ошибку среднего, определяли значимость отклонений от показателей у интактных крыс с использованием непараметрического U-критерия Манна—Уитни. Критическим уровнем значимости считали  $p < 0,05$ .

Все измерения и исследования производили с использованием средств измерительной техники, прошедших метрологическую поверку, и вспомогательного оборудования, после аттестации на базе отдела морфологии с электронной микроскопией Центральной научно-исследовательской лаборатории Медицинской академии им. С.И.Георгиевского ФГАОУ ВО «Крымский федеральный университет им. В.И.Вернадского». Соблюдение основных биоэтических норм при проведении исследования

подтверждено заключением комитета по этике ФГАОУ ВО «КФУ им. В.И.Вернадского» (выписка из протокола № 3 от 19.10.2015 г.).

**Результаты исследования.** Полученные результаты свидетельствуют об отчетливо выраженном влиянии  $\gamma$ -облучения на структуру тимуса. При этом наиболее значительные изменения гисто- и цитоархитектоника тимуса претерпевала на 3-и сутки после облучения. Капсула и междольковые перегородки были значительно расширены за счет отека и крайне выраженного полнокровия сосудов стромы. При сохранении, в целом, четкой границы между корковым и мозговым веществом наблюдалась «инверсия» слоев, т. е. корковое вещество выглядело светлее, чем мозговое, с сосредоточением клеток лимфоидного ряда в периваскулярных зонах (рис. 1). Это, вероятно, обусловлено гибелью и миграцией тимоцитов коркового вещества после воздействия ионизирующего излучения. Как в корковом, так и мозговом веществе тимуса обнаружено большое количество клеток, находящихся на различных стадиях митотического деления, а также клеток, гибнущих путем апоптоза. Некоторые участки коркового вещества тимуса были представлены лишь сетью эпителиоретикулоцитов с признаками внутриклеточной дистрофии.

На 7-е и 14-е сутки после облучения тимус, в целом, характеризовался восстановлением гистологической структуры. Отличительной особенностью его структурной организации оставалось расширение и полнокровие сосудов микроциркуляторного русла (с наличием, в ряде случаев, очагов выхода форменных элементов крови во внесосудистое пространство) (см. рис. 1, в, г), а также визуальное уменьшение относительного содержания коркового вещества. Начиная с 7-х суток после облучения, популяция тимоцитов в корковом веществе восстанавливалась при наличии всё ещё значительного количества апоптотически гибнущих клеток в окружении активных макрофагов. В корковом веществе преобладали клетки небольшого размера с резко базофильным ядром за счёт гиперконденсации хроматина, а в мозговом — клетки средних размеров в окружении хорошо визуализирующихся клеток микроокружения. При этом в субкапсулярной зоне тимуса отмечалось появление большого количества крупных клеток лимфоидного ряда со слабобазофильным ядром и цитоплазмой (см. рис. 1, в, г), что указывает на активацию процесса внутритимусной пролиферации и дифференцировки костномозговых клеток-предшественников.

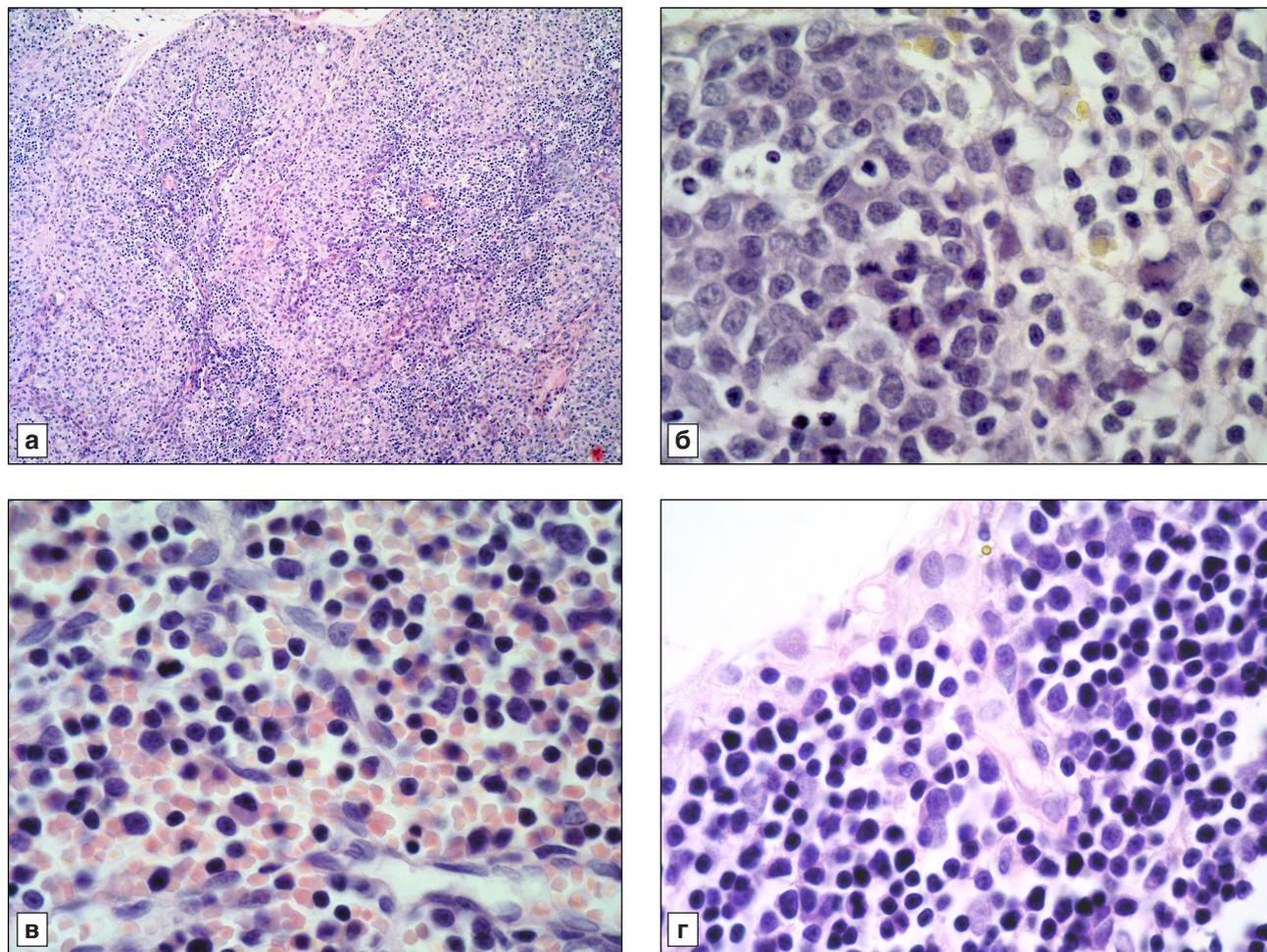


Рис. 1. Тимус крысы на 3-и (а, б), 7-е (в) и 14-е (г) сутки после облучения.

а — общая гистологическая организация тимуса; б — кортико-медуллярная зона; в — корковое вещество; г — субкапсулярная зона. Окраска гематоксилином — эозином. Ув.: а — 100; б-г — 1000

На 30-е сутки после облучения гистологическое строение тимуса соответствовало таковому у интактных крыс.

Перестройка тимуса подтверждалась морфометрическими данными структурно-функциональных зон тимуса (таблица). Так, на 3-и сутки после облучения происходило перераспределение соотношения между основными структурно-функциональными зонами тимуса в сторону стромально-сосудистых компонентов за счет, преимущественно, коркового вещества. На 7-е и 14-е сутки после облучения относительная площадь коркового вещества тимуса была меньше, чем у интактных животных (см. таблицу). При этом доля мозгового вещества на 7-е сутки также уменьшалась по сравнению с таковой у интактных крыс, а на 14-е сутки — увеличивалась. На 30-е сутки после облучения относительная площадь коркового и мозгового вещества значительно не отличалась от таковой у животных. Важно, что общей тенденцией, выявленной во все сроки

эксперимента, явилось статистически значимое увеличение относительной площади стромальных образований тимуса по сравнению с таковой у интактных животных.

КМИ на 3-, 7-е и 30-е сутки значимо не отличался от такового в контроле, что, несмотря на значительные изменения относительных площадей коркового и мозгового вещества, было связано с однонаправленным перераспределением структурных компонентов тимуса (уменьшением доли коркового и мозгового вещества в пользу стромально-сосудистых компонентов).

Иммуногистохимический индекс Ki-67 ( $I_{Ki-67}$ ) в тимусе у интактных крыс составлял  $38,8 \pm 2,5$ ,  $25,16 \pm 1,22$  и  $36,6 \pm 1,4$  в корковом веществе, мозговом веществе и субкапсулярной зоне соответственно. Экспрессия данного маркера в глубокой зоне коры тимуса не изменялась. При этом в субкапсулярной зоне тимуса экспрессия маркера Ki-67 значимо увеличивалась, а в мозговом веществе — снижалась. Так, в субкапсу-

Относительная площадь среза структурных образований тимуса крыс после однократного  $\gamma$ -облучения (%)

Показатель	Интактные животные	Сутки после облучения (отклонение от показателей у интактных крыс)			
		3-и	7-е	14-е	30-е
Корковое вещество	57,8±1,1	49,0±1,5 (-15,14%)*	46,4±1,3 (-19,67%)*	38,6±2,6 (-33,31%)*	55,8±1,3 (-3,54%)
Мозговое вещество	27,5±0,5	24,4±1,1 (-11,42%)*	22,6±0,9 (-17,93%)*	34,1±1,4 (23,98%)*	25,2±0,8 (-8,47%)
Капсула и соединительнотканые трабекулы	14,02±0,24	26,6±0,6 (89,64%)*	31,0±0,7 (121,05%)*	27,4±1,8 (95,06%)*	19,99±0,28 (42,58%)*
КМИ	2,01±0,08	2,05±0,15 (1,76%)	2,12±0,15 (5,67%)	1,16±0,12 (-42,07%)*	2,26±0,12 (12,37%)

Примечание. КМИ — кортико-медуллярный индекс.

\* Отклонение от показателей у интактных животных значимо при  $p < 0,05$ .

лярной зоне экспрессия данного маркера пролиферации достигала наибольшей выраженности (рис. 2, а, б). Значения  $I_{Ki-67}$  в этой зоне спустя 3, 7 и 30 сут после облучения составляли  $63 \pm 3$ ,  $48,1 \pm 2,5$  и  $58 \pm 5$  соответственно, превосходя на 71,33 ( $p < 0,05$ ), 31,43 ( $p < 0,05$ ) и 58,71% ( $p < 0,05$ ) таковые у интактных крыс. В мозговом веществе  $I_{Ki-67}$  значимо снижался по сравнению с  $I_{Ki-67}$  у интактных животных на 7-, 14-е и 30-е сутки на 25,04 ( $p < 0,05$ ), 25,80 ( $p < 0,05$ ) и 16,40% ( $p < 0,05$ ) и составлял  $18,9 \pm 0,8$ ,  $18,7 \pm 1,2$  и  $21,0 \pm 1,0$  соответственно.

Экспрессия цитоплазматического маркера макрофагов CD68 вне зависимости от исследуемой серии экспериментальных животных была выражена в двух зонах тимуса: в субкапсулярной зоне и на границе между корковым и мозговым веществом (в кортико-медуллярной зоне). У интактных крыс иммуногистохимический индекс CD68 ( $I_{CD68}$ ) в субкапсулярной зоне составил  $10,4 \pm 1,0$ , а в кортико-медуллярной зоне —  $14,2 \pm 1,4$ .

На 3-и сутки после облучения было отмечено статистически значимое увеличение количества CD68-позитивных клеток как в субкапсулярной зоне ( $I_{CD68}$  —  $35,4 \pm 1,8$ ; на 242,11%), так и в кортико-медуллярной зоне ( $I_{CD68}$  —  $22 \pm 3$ ; на 56,94%), чем у интактных животных.

Полученные данные  $I_{CD68}$  отражают процесс формирования в периваскулярных пространствах кортико-медуллярной зоны тимуса макрофагально-клеточных инфильтратов, включающих в себя клетки, обладающие фагоцитарной активностью. Данные клетки, по-видимому, привлекаются из периферической крови и костного мозга с целью элиминации утраченной клеточной популяции тимоцитов, а также для формирования пула антиген-представляющих клеток в условиях возросшей потребности в пролиферации и дифференцировке новых тимоцитов.

При этом на 7-, 14-е и 30-е сутки после облучения статистически значимых различий в уровне экспрессии CD68 ни в субкапсулярной зоне, ни в кортико-медуллярной зоне выявлено не было, что отчасти связано со значительным уровнем вариации изучаемого показателя.

Обсуждение полученных данных. Тимус, являясь центральным органом иммунной системы, одним из первых в организме реагирует на негативные эндо- и экзогенные факторы, среди которых далеко не последнее место занимает воздействие ионизирующего излучения. В качестве предпосылок к изменениям гисто- и цитоархитектоники тимуса в ответ на  $\gamma$ -облучение, в первую очередь, выступает высокая радиационная чувствительность тимоцитов (преимущественно, коркового вещества) [8], а также лабильность клеточной популяции за счет внутритимусной миграции и миграции клеток-предшественников из костного мозга [3]. С другой стороны — принимая во внимание неизбежную активацию гипоталамо-гипофизарно-надпочечниковой оси регуляции с формированием стрессового ответа организма, помимо прямого повреждающего действия ионизирующего излучения на тимоциты, следует учитывать опосредованную глюкокортикоидами активацию апоптоза [6, 7]. Выявленная динамика структурных преобразований тимуса коррелирует с изменениями в периферических органах иммунной системы (брыжеечных лимфатических узлах), полученных в рамках того же эксперимента [2], а также с данными ряда авторов, описывающих регенерацию тимуса после облучения с двухволновой кинетикой [3].

Выявленная динамика экспрессии иммуногистохимических маркеров пролиферации (Ki-67) и макрофагов (CD68), начиная с 7-х суток после облучения, указывает на восстановление клеточ-

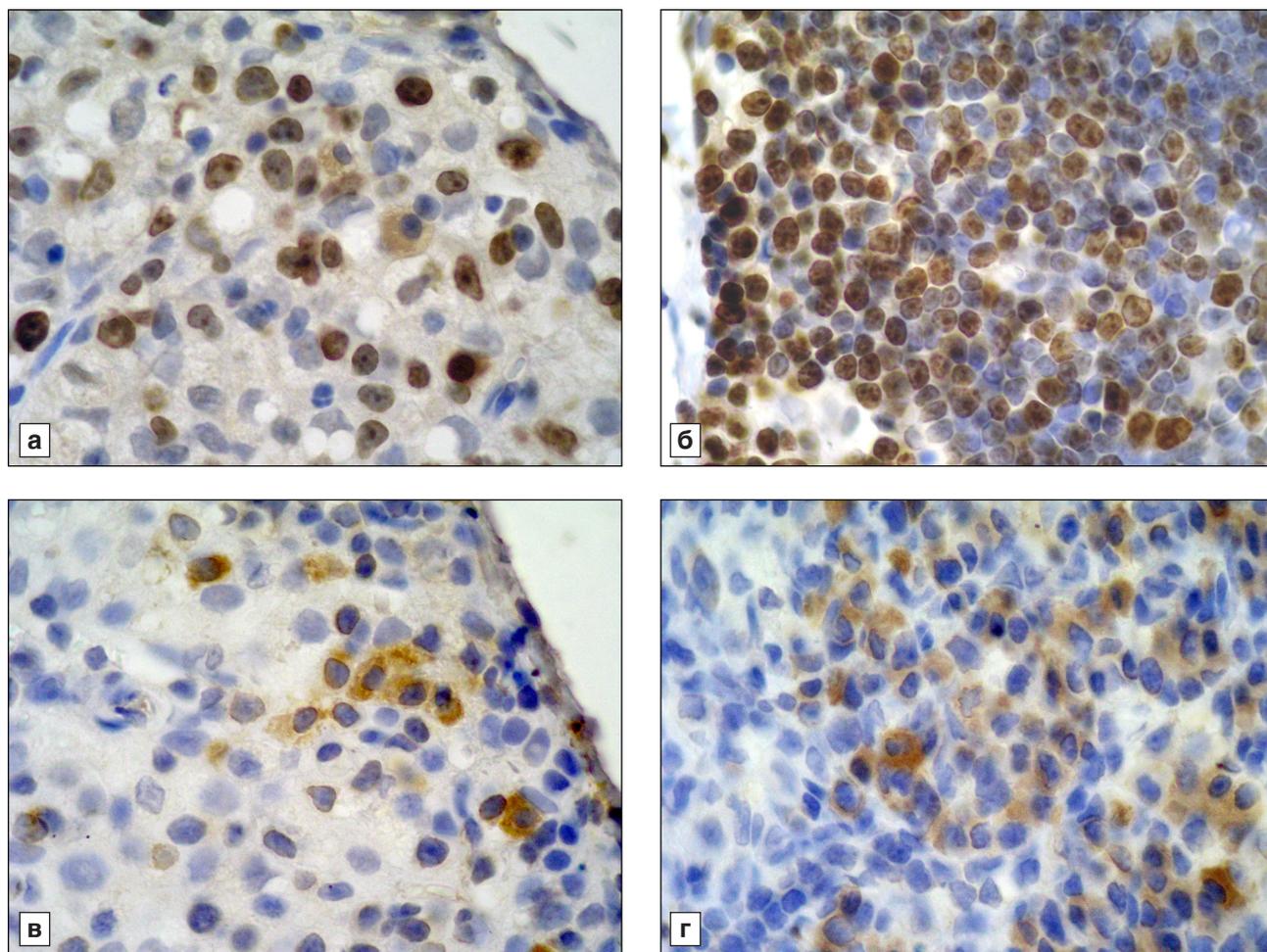


Рис. 2. Экспрессия маркера Ki-67 (а, б) и маркера CD68 (в, г) в тимусе крысы.

а, в — субкапсулярная зона тимуса крысы на 3-и сутки после облучения; б — субкапсулярная зона тимуса крысы на 30-е сутки после облучения; г — кортико-медулярная зона тимуса на 3-и сутки после облучения. а, б — иммуногистохимическая реакция на Ki-67; в, г — иммуногистохимическая реакция на CD68. Ув. 1000

ной популяции тимуса, утраченной после воздействия ионизирующего излучения. Это происходит за счет привлечения предшественников иммунокомпетентных клеток из красного костного мозга, клеток моноцитарного ряда, а также активации внутритимусной пролиферации лимфоцитов, преимущественно, в его субкапсулярной зоне.

Полученные нами результаты дополняют имеющиеся в литературе данные о лучевом поражении тимуса и могут служить в качестве контрольных значений для морфологической оценки эффективности применения тех или иных радиопротекторных/корректирующих средств.

#### Вклад авторов:

Концепция и дизайн исследования: М.А.К., В.С.П., Г.А.М.

Сбор и обработка материала: М.А.К.

Статистическая обработка данных: М.А.К.

Написание текста: М.А.К., С.А.К., Г.А.М., В.С.П.

**Авторы сообщают об отсутствии в статье конфликта интересов.**

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Бибик Е.Ю., Мелешенко А.В., Ткаченко Е.В. и др. Влияние хронического воздействия ионизирующего излучения на морфогенез тимуса и красного костного мозга в эксперименте // Украинськ. морфол. альманах. 2014. Т. 12, № 2. С. 7–9 [Bibik E.Yu., Meleshhenko A.V., Tkachenko E.V. et al. Influence of the chronic effect of ionizing radiation on the morphogenesis of the thymus and red bone marrow in the experiment // Ukrain's'kii morfologichnii al'manakh. 2014. Vol. 12, № 2. P. 7–9. In Russ.].
2. Кривенцов М.А., Куцая В.В. Динамика структурных преобразований лимфатических узлов крыс после однократного воздействия ионизирующего фотонного излучения // Морфология. 2014. Т. 8, № 1. С. 53–57 [Kriventsov M.A., Kustaya V.V. Dynamics of structural transformation of lymph nodes in rats after a single exposure to ionizing photon radiation // Morfologija. 2014. Vol. 8, № 1. P. 53–57. In Russ.].
3. Митин А.Н., Комогорова В.В., Литвина М.М. и др. Динамика субпопуляций тимоцитов при регенерации тимуса после облучения // Иммунология. 2012. № 6. С. 297–302 [Mitin A.N., Komogorova V.V., Litvina M.M. et al. Dynamics of thymocyte populations during the regeneration of the thymus after irradiation // Immunologiya. 2012. № 6. P. 297–302. In Russ.].

4. Мороз Г.А. Строение тимуса интактных крыс-самцов линии Вистар разного возраста // Світ медицини та біології. 2009. Т. 5, № 3–2. С. 98–102 [Moroz G.A. Structure of intact male Wistar rats' thymus in different age // Svit medistini ta biologii. 2009. Vol. 5, № 3–2. P. 98–102. In Russ.].
5. Орлов А.И. Непараметрические критерии согласия Колмогорова—Смирнова, омега-квадрат и ошибки при их применении // Науч. журн. КубГАУ. 2014. № 97 (03). С. 1–29 [Orlov A.I. Nonparametric Kolmogorov—Smirnov's consent criteria, omega-square and errors of their use // Nauchnyi zhurnal Kubanskogo gosudarstvennogo agrarnogo universiteta. 2014. № 97 (03). P. 1–29. In Russ.].
6. Старская И.С., Кудрявцев И.В., Полевщиков А.В. Морфологический анализ и динамика гидрокортизон-индуцированной атрофии тимуса // Мед. академ. журн. 2012. Т. 12, № 3. С. 94–96 [Starskaya I.S., Kudryavtsev I.V., Polevshnikov A.V. Morphological analysis and dynamics of hydrocortisone-induced atrophy of the thymus // Meditsinskii akademicheskii zhurnal. 2012. Vol. 12, № 3. P. 94–96. In Russ.].
7. Elmore S.A. Enhanced histopathology of the thymus // Toxicol. Pathol. 2006. Vol. 34, № 5. P. 656–665.
8. Jinbo L., Hongquan C., Jianliang J. et al. X-ray irradiation selectively kills thymocytes of different stages and impairs the maturation of donor-derived CD4+ CD8+ thymocytes in recipient thymus // J. Biomed. Res. 2012. Vol. 26, №5. P. 355–364.
9. Mavragani I.V., Laskaratou D.A., Frey B. et al. Key mechanisms involved in ionizing radiation-induced systemic effects. A current review // Toxicol Res. 2015. Vol. 21, № 5 (1). P. 12–33.
10. Pearse G. Normal structure, function and histology of the thymus // Toxicol. Pathol. 2006. Vol. 34, № 5. P. 504–514.
11. Schneider C.A., Rasband W.S., Eliceiri K.W. NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis // Nature Methods. 2012. № 9. P. 671–675.
12. Williams J.P., Brown S.L., Georges G.E. et al. Animal models for medical countermeasures to radiation exposure // Radiat Res. 2010. Vol. 173 (4). P. 557–578.

Поступила в редакцию 13.02.2017  
Получена после доработки 11.05.2017

## DYNAMICS OF STRUCTURAL CHANGES AND CD68 AND KI-67 MARKER EXPRESSION IN RAT THYMUS AFTER A SINGLE EXPOSURE TO IONIZING RADIATION

*Kriventsov M.A., Pikalyuk V.S., Moroz G.A., Kutya S.A.*

**Objective** — to examine the dynamics of structural changes and CD68 and Ki-67 marker expression in the thymus of rats at different time intervals after a single total irradiation in sublethal dose.

**Material and methods.** In 30 rats after 3, 7, 14 and 30 days after experimental irradiation at a dose of 5 Gy, thymus was studied using histological, morphometric and immunohistochemical methods (Ki-67 and CD68 markers).

**Results.** On the 3rd day after irradiation, the «inversion» of the thymus layers was detected with a decrease in the relative cortical area (by 15.1% as compared with data in controls) and a depletion of cell populations. Simultaneously, a significant increase in the expression of Ki-67 and CD68 markers in the subcapsular area was noted (by 71.3% 242.1% in comparison with the control, respectively). In subsequent time points of the experiment, a gradual recovery of thymus histoarchitectonics and cell populations was found that was due to the proliferative activity of thymocytes in the subcapsular zone at a constant level of expression of CD68 marker.

**Conclusions.** The greatest expression of the morphologic changes in the thymus took place at 3 and 7 days after irradiation, with the restoration of histoarchitectonics and cell populations on the 30th day of the experiment.

**Key words:** *thymus, gamma-irradiation, rats*

Department of Normal Anatomy, S.I.Georgievsky Medical Academy, V.I.Vernadskiy Crimean Federal University, Simferopol, 5/7 Lenina boulevard, Simferopol, Crimea 295000