

СРАВНИТЕЛЬНАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА АТРОФИИ ТИМУСА ПРИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОМ КАНЦЕРОГЕНЕЗЕ И ВОЗРАСТНОЙ ИНВОЛЮЦИИ (МОРФОЛОГИЧЕСКОЕ И ИММУНОГИСТОХИМИЧЕСКОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ)

Москвичев Е.В.¹

¹ФГБОУ ВПО «Чувашский государственный университет имени И.Н. Ульянова», медицинский факультет, кафедра нормальной и топографической анатомии с оперативной хирургией (зав. – д.м.н., профессор Л.М. Меркулова) (428000, г. Чебоксары, Московский проспект, 45, e-mail: anatomy@chuvsu.ru)

Иммуногистохимическим методом исследована морфология тимуса крыс с экспериментальной опухолью толстой кишки и проведено сравнение с изменениями при возрастной инволюции. Установлено, что при канцерогенезе число зрелых медуллярных тимоцитов остается на постоянном уровне в течение всего эксперимента в отличие от возрастной атрофии железы, при которой их количество постепенно уменьшается. Формирование злокачественной опухоли на поздних сроках эксперимента сопровождается увеличением числа клеток нейроэндокринного и нейроэктодермального происхождения в структурах тимопоэтического окружения дольки. В корковом веществе отмечено повышение экспрессии маркера клеточной пролиферации Ki-67 на фоне увеличения числа CD3⁺ тимоцитов. Вероятно, подобные изменения могут быть обусловлены как усилением дифференцировки кортикальных тимоцитов, так и токсическим влиянием опухоли на костный мозг и снижением поступления незрелых CD3⁻ клеток-предшественников в тимус. Результаты работы свидетельствуют о возможности канцерогенеза изменять некоторые показатели тимопоэза, а также дополняют сведения о течении возрастной атрофии тимуса.

Ключевые слова: тимус, канцерогенез, возрастная инволюция, тимопоэз, клетки APUD-серии.

COMPARATIVE CHARACTERISTICS OF THYMIC ATROPHY IN EXPERIMENTAL CARCINOGENESIS AND AGE-RELATED INVOLUTION (MORPHOLOGIC AND IMMUNOHISTOCHEMICAL STUDY)

Moskvichev E.V.¹

¹"Chuvash State University named after I.N. Ulyanov". The Medicine faculty, chair of normal and regional anatomy with operative surgery (Head - M.D., professor L.M. Merkulova) (428000, Cheboksary, Moscow Prospect, 45)

The morphology of thymus of the rats with experimental tumors of the colon was studied with use of immunohistochemistry. We made comparative investigation of the changes in age-related involution. It was found, that number of mature medullar thymocytes remains at a constant level during the experiment, in contrast to age-atrophy of thymus, where their number is gradually reduced. The formation of malignant tumor in the later stages of the experiment is accompanied by an increase in the number of cells of neuroendocrine and neuroectodermal origin in structures of thymocyte microenvironment. In the thymic cortex noted an increase expression of cell proliferation marker Ki-67 at the background of increased numbers of CD3⁺ thymocytes. Probably, these changes may be due to both increased differentiation of cortical thymocytes, and the toxic effects of the tumor on the bone marrow and decreased supply of immature CD3⁻ precursor cells in the thymus. The results of the study indicate the possibility of tumorigenesis to change some features of thymopoiesis. They also supplement the information about current age-related atrophy of the thymus.

Key words: thymus, carcinogenesis, age-related involution, thymopoiesis, APUD cells.

Введение

Рост злокачественных новообразований сопровождается продукцией веществ, угнетающих защитные силы организма. Это приводит либо к снижению противоопухолевого иммунного ответа, либо к полному его блокированию [12]. При этом опухоль перестает распознаваться иммунными клетками как чужеродная или дефектная ткань и становится биологически более агрессивной.

Известно, что одну из ключевых ролей в процессе ускользания опухоли от иммунного надзора играют иммуносупрессивные T-reg лимфоциты, а также дендритные клетки, присутствующие в значительном количестве в зоне локального иммунного ответа на границе роста опухоли [2]. Иммуносупрессивные T-reg клетки имеют фенотип CD3+/CD4+/CD25+/Foxp3 и могут происходить из зрелых периферических Т-лимфоцитов с фенотипом CD3+/CD4+/CD25- [11]. Есть мнение, что увеличение в опухоли числа T-reg клеток сочетается с плохим прогнозом и низкой эффективностью лечения [13].

Кроме подавления локального иммунного ответа, опухоль обладает прямым токсическим влиянием на иммунные органы, что приводит к снижению продукции ими иммунокомпетентных клеток либо к выработке дефектных цитотоксических лимфоцитов, которые могут служить источником происхождения иммуносупрессивных T-reg клеток [6; 10]. Однако механизм прямого иммуносупрессорного влияния опухоли на иммунные органы до конца не ясен.

Немаловажное значение в развитии злокачественных новообразований принадлежит иммунодефицитам. Известно, что старение сопровождается угнетением многих звеньев иммунитета, при этом страдают как клеточный, так и гуморальный иммунный ответ [7]. В настоящее время снижение иммунной реактивности организма вследствие старения считается одной из причин более высокой заболеваемости раком у пожилых по сравнению с молодыми [3]. Есть мнение, что это может быть обусловлено возрастной инволюцией вилочковой железы [5].

Цель исследования – выявление особенностей изменений морфологии и молекулярного фенотипа тимуса при развивающейся злокачественной опухоли толстой кишки и их сравнение с изменениями при возрастной инволюции железы.

Материалы и методы исследования. Работа выполнена на 60 белых нелинейных крысах-самцах 5 месяцев массой 180-220 граммов. Уход и содержание животных проводили в соответствии с «Правилами проведения работ с использованием экспериментальных животных». Животные были разделены на две группы. Животным первой группы (30 крыс) внутрибрюшинно вводили 1,2-диметилгидразин из расчета 20 мг/кг массы 1 раз в неделю в течение 5 недель в соответствии с экспериментальной моделью [4]. Животные второй группы – интактные (30 крыс) служили для исследования возрастных инволютивных изменений и контроля. Выведение животных из эксперимента проводилось через 30, 90 и 150 суток после окончания введения канцерогена путем декапитации. Одновременно выводились интактные животные соответствующего возраста. Объектом исследования служил тимус. В работе применялись следующие методы.

1. Иммуногистохимический метод с использованием четырех коммерческих моноклональных (МАКАТ) и поликлональных (ПКАТ) антител фирм Santa Cruze (США) и NovoCastrа (Великобритания):

- МАКАТ к кластеру дифференцировки лимфоцитов 3 типа;
- ПКАТ к белку нейроэктодермы S-100 для идентификации дендритных клеток;
- МАКАТ к гликопротеиду пресинаптических везикул synaptophysin для идентификации нейроэндокринных клеток;
- МАКАТ к белку клеточной пролиферации Ki-67.

Материал для исследования методом иммуногистохимии фиксировали 10%-ным нейтральным забуференным формалином в течение 24 ч, выполняли стандартную спиртовом-ксилоловую проводку. Подготовленные образцы тканей заливали в парафин, готовили срезы толщиной 4 мкм, которые наносили на высокоадгезивные стекла и высушивали при температуре 37 °С в течение 18 ч. Демаскировка и иммуногистохимическая окраска проводилась на автостейнере Leica Bond Max (Германия). Контролем иммуногистохимической реакции служила неиммунизированная кроличья и мышьяная сыворотка. Результат реакции оценивали путем подсчета позитивно окрашенных клеток на 100 клеток в десяти полях зрения при увеличении $\times 400$, выражая результаты в процентах и единицах в поле зрения.

2. Окраска срезов тимуса гематоксилином и эозином для изучения общегистологической картины микропрепаратов и проведения линейных морфометрических измерений.

3. Компьютерная морфометрия с использованием лицензионных программ Leica application suite 3.6.0 и «Микроанализ». Данные обрабатывались статистически, достоверность определялась t-критерием Стьюдента.

Результаты исследования и обсуждение. Возрастная инволюция тимуса сопровождается структурной перестройкой органа и проявляется в постепенном уменьшении лимфоидной ткани с увеличением количества жировой и фиброзной. Атрофия паренхимы железы выражается в снижении средней площади тимической дольки с $1,52 \pm 0,02$ мм² у крыс 6 месяцев до $0,97 \pm 0,06$ мм² ($P < 0,01$) у крыс 10 месяцев. При этом регистрируется снижение толщины коркового вещества с 328 ± 56 мкм до 197 ± 34 мкм ($P < 0,001$), а также площади мозгового вещества с $0,61 \pm 0,04$ мм² до $0,46 \pm 0,05$ мм². Отмечается замещение паренхимы жировой тканью, при этом процесс замещения идет с периферических отделов органа. При обработке препаратов тимуса антителами к кластеру дифференцировки лимфоцитов 3 типа в корковом и мозговом веществе выявляются многочисленные зрелые тимоциты. Установлено, что у интактных крыс 6 месяцев позитивную реакцию с CD 3 дают 13% клеток коркового и

53% клеток мозгового вещества (рис. 1). У животных 8 месяцев регистрируется увеличение числа этих клеток в корковом веществе до 21,5% ($P<0,01$) и уменьшение их количества в мозговой зоне до 47%. Через 10 месяцев количество $CD3^+$ тимоцитов коркового вещества достоверно возрастает до 29% ($P<0,001$), тогда как в мозговом веществе снижается до 35% ($P<0,01$) (рис. 2). Окраска препаратов интактных крыс 6 месяцев к маркеру нейроэктодермы S-100 и белку нейроэндокринной дифференцировки synaptophysin выявляет немногочисленные клетки, локализованные в мозговом веществе и на границе коркового и мозгового вещества. Их количество достигает $18,4\pm2,9$ и $12,8\pm3,05$ в поле зрения соответственно. У животных 8 месяцев отмечается увеличение числа $S-100^+$ и $synaptophysin^+$ клеток до $21,8\pm2$ и $19\pm1,1$ ($P<0,01$) в поле зрения соответственно. У крыс 10 месяцев регистрируется дальнейшее достоверное повышение числа этих клеток до $34,2\pm5,3$ ($P<0,001$) и $22,4\pm3,4$ ($P<0,001$) в поле зрения соответственно. Обработка препаратов тимуса интактных крыс 6 месяцев антителами к маркеру клеточной пролиферации Ki-67 выявляет многочисленные пролиферирующие клетки. Индекс Ki-67 у интактных крыс этого возраста составляет 39% в корковом и 11,6% в мозговом веществе долики. Инволютивные изменения в тимусе у животных 10 месяцев характеризуются достоверным снижением индекса Ki-67 как в корковом, так и в мозговом веществе железы до 26,4% ($P<0,01$) и 6,9% ($P<0,001$) соответственно.

Введение канцерогена по указанной схеме через пять месяцев вызывает развитие злокачественной опухоли толстой кишки, имеющей морфологию дифференцированной аденокарциномы. Формированию опухоли предшествует пролиферация и клеточная дисплазия крипт слизистой оболочки кишки. Через один и три месяца после воздействия общегистологическая картина тимуса и его морфометрические характеристики у крыс с введением канцерогена не имеют достоверных отличий от интактных животных. Однако через пять месяцев после введения канцерогена морфологическая картина железы существенно меняется и отличается от возрастной инволюции. Регистрируется достоверное и более значительное снижение площади тимической долики и мозгового вещества до $0,69\pm0,01$ ($P<0,01$) и $0,29\pm0,01$ ($P<0,01$) мм^2 соответственно, а также толщины коркового вещества до $168\pm12,4$ мкм.

Отмечаются изменения и в молекулярном фенотипе железы, причем некоторые показатели имеют достоверные отличия от значений у интактных крыс уже через 3 месяца после воздействия. Обработка препаратов тимуса маркерами нейроэктодермальной и нейроэндокринной дифференцировки выявляет достоверное увеличение количества клеток, дающих позитивную реакцию к белку S-100 и synaptophysin до $34,2\pm4,2$ ($P<0,01$) и $38,9\pm2,6$ ($P<0,001$) соответственно, уже через три месяца после введения канцерогена. Подобные

изменения сохраняются и через пять месяцев после воздействия (рис. 3, 4). Окраска препаратов тимуса антителами к кластеру дифференцировки лимфоцитов 3 типа выявляет достоверное увеличение числа $CD\ 3^+$ тимоцитов в корковом веществе до 47% ($P<0,001$), тогда как количество этих клеток в медуллярной зоне меняется не существенно. Исследование маркера клеточной пролиферации Ki-67 выявляет достоверное ($P<0,01$) повышение его экспрессии в структурах коркового и мозгового вещества долики по сравнению с интактными крысами соответствующего возраста через пять месяцев после введения канцерогена.

Как показали наши исследования, инволюция тимуса через один и три месяца после введения канцерогенеза не имеет существенных морфологических отличий от изменений у интактных животных соответствующего возраста, за исключением увеличения числа клеток нейроэктодермального и нейроэндокринного происхождения в структурах тимопоэтического окружения. Формирование злокачественной опухоли через пять месяцев после введения канцерогена существенно меняет как морфологию железы, так и ее молекулярный фенотип. Нами показано, что развившаяся опухоль толстой кишки ускоряет инволютивные процессы в тимусе, что выражается в более значительном снижении относительной массы железы и ее морфометрических показателей по сравнению с возрастными изменениями у интактных животных. Вероятно, также имеет место токсическое влияние опухоли на костный мозг, обуславливающее нарушение поступления клеток-предшественников в тимус и, как следствие, – относительное увеличение числа зрелых $CD3^+$ кортикальных тимоцитов. В отличие от возрастной инволюции, при которой по мере старения происходит постепенное уменьшение числа $CD3^+$ тимоцитов мозгового вещества, число этих клеток при канцерогенезе остается на постоянном уровне. Мы считаем, что это может быть обусловлено иммунной реакцией на рост опухоли. На это также указывает значительное увеличение числа клеток, дающих позитивную реакцию с S-100 и synaptophysin, а также повышенная экспрессия маркера клеточной пролиферации Ki-67 в структурах коркового и мозгового вещества.

Известно, что в тимусе позитивную реакцию с маркером нейроэктодермальной дифференцировки S-100 дают медуллярные дендритные клетки и некоторые популяции эпителиальных клеток, входящие в состав PVS (периваскулярных пространств), а с synaptophysin – нейроэндокринные клетки, которые причисляют к клеткам АПУД-серии [1; 8]. Нейромедиаторы, выделяемые нейроэндокринными клетками, регулируют деятельность клеток микроокружения тимоцитов и секрецию ими гормонов и интерлейкинов, которые, в свою очередь, необходимы для созревания и дифференцировки Т-лимфоцитов [9]. Мы считаем, что одновременное увеличение числа клеток, регулирующих дифференцировку

тимоцитов, но имеющих разный гистогенез и механизм действия, на фоне повышения экспрессии маркера клеточной пролиферации, может указывать на усиление тимопоэза. **Заключение.** Таким образом, нами установлено, что на ранних сроках канцерогенеза (1 и 3 месяца) инволюция тимуса в целом повторяет изменения при возрастной атрофии. Исключение составляют популяция клеток АПУД-серии и клетки нейроэктодермального происхождения, которые, по-видимому, одними из первых реагируют на предопухолевые изменения и принимают участие в инициации противоопухолевого клеточного иммунного ответа. Канцерогенез на этапе инвазивной опухоли существенно изменяет морфологию тимуса и его молекулярный фенотип по сравнению с возрастной атрофией. При этом в железе, наряду с инволютивными изменениями, отмечаются признаки усиления тимопоэза. Вероятно, подобные изменения могут быть обусловлены как иммунной реакцией на рост опухоли, так и продукцией тимусом дефектных аутореактивных цитотоксических клеток, необходимых для формирования опухолевой иммунной толерантности.

Рисунки.

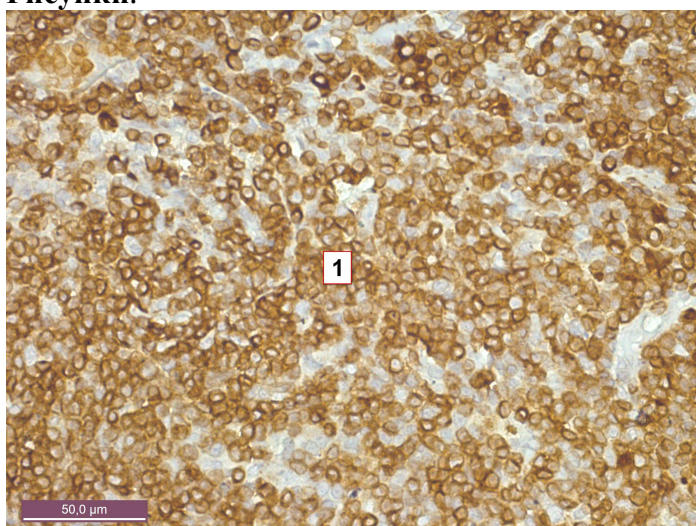


Рисунок 1. Тимус интактной крысы 5 месяцев. Экспрессия CD 3 в тимоцитах мозгового вещества. 1 – тимоциты, дающие мембранную окраску с CD 3. Иммуногистохимический метод с CD 3. Ув. 400.

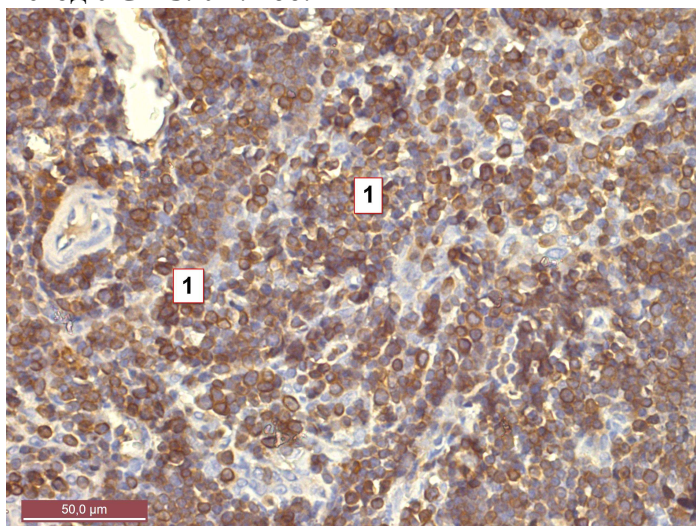


Рисунок 2. Тимус intactной крысы 10 месяцев. Уменьшение тимоцитов, экспрессирующих CD 3, в мозговом веществе. 1 – тимоциты, дающие мембранную окраску с CD 3. Иммуногистохимический метод с CD 3. Ув. 400.

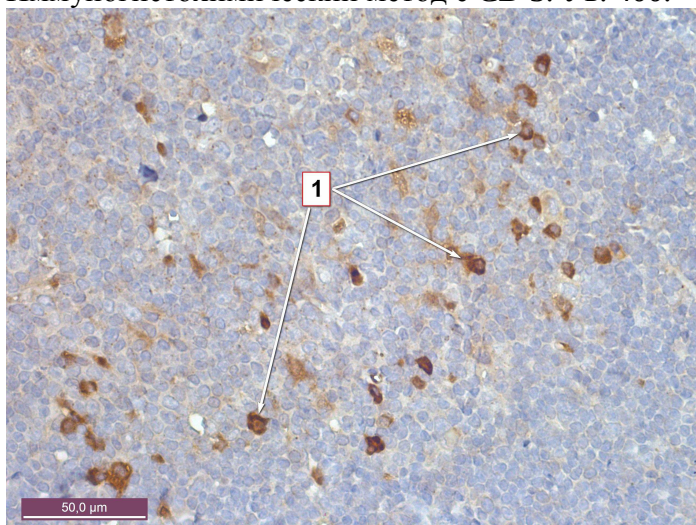


Рисунок 3. Тимус крысы 6 месяцев с введением канцерогена. Экспрессия S-100 в дендритных клетках мозгового вещества. 1 – клетки мозгового вещества, позитивные к S-100. Иммуногистохимическая реакция к белку S-100. Ув. 400.

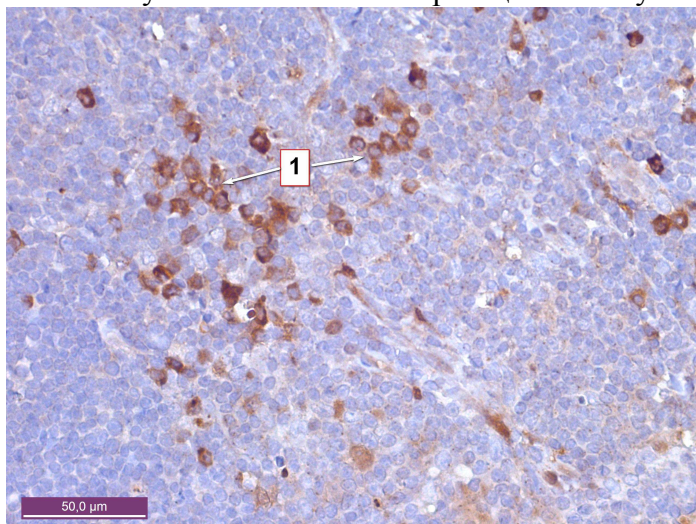


Рисунок 4. Тимус крысы 10 месяцев с введением канцерогена. Увеличение клеток, экспрессирующих S-100 в мозговом веществе. 1 – клетки мозгового вещества, позитивные к S-100. Иммуногистохимическая реакция к белку S-100. Ув. 400.

Список литературы

1. Bai M. Immunohistochemical expression patterns of neural and neuroendocrine markers, the neural growth factor receptors and the beta-tubulin II and IV isotypes in human thymus / Bai M., Papoudou-Bai A., Karatzias G. // *Anticancer Res.* - 2008. - Vol. 28, № 1A. - P. 295-303.
2. Clarke S.L. CD4+CD25+FOXP3+ regulatory T cells suppress anti-tumor immune responses in patients with colorectal cancer / Clarke S.L., Betts G.J., Plant A. // *PLoS One.* – 2006. - Vol. 27, № 1. - P. 129.

3. Dominguez A.L. Implications of aging and self-tolerance on the generation of immune and antitumor immune responses / Dominguez A.L., Lustgarten J. // *Cancer Res.* – 2008. - Vol. 68, № 13. - P. 5423-5431.
4. Gilbert J.M. Experimental colorectal cancer as a model of human disease // *Ann R Coll Surg Engl.* – 1987. - Vol. 69, № 2. - P. 48-53.
5. Gress R.E. Reduced thymus activity and infection prematurely age the immune system / Gress R.E., Deeks S.G. // *J. Clin Invest.* – 2009. - Vol. 119, № 10. - P. 2884-2887.
6. Mailloux A.W. Regulatory T-cell trafficking: from thymic development to tumor-induced immune suppression / Mailloux A.W., Young M.R. // *Crit Rev Immunol.* – 2010. – Vol. 30, № 5. - P. 435-447.
7. Malaguarnera L. Immunosenescence and cancer: a review / Malaguarnera L., Ferlito L., Di Mauro S. // *Arch Gerontol Geriatr.* – 2001. - Vol. 32, № 2. - P. 77-93.
8. Raica M. Structural heterogeneity and immunohistochemical profile of Hassall corpuscles in normal human thymus / Raica M., Encica S., Motoc A. // *Ann Anat.* – 2006. – Jul., Vol. 188, № 4. - P. 345-352.
9. Savino W. Hematopoiesis / Savino W., Smaniotto S., Dardenne M. // *Adv Exp Med Biol.* – 2005. - Vol. 567. - P. 167-185.
10. Stewart T.J. Improving cancer immunotherapy by targeting tumor-induced immune suppression / Stewart T.J., Smyth M.J. // *Cancer Metastasis Rev.* – 2011. - Vol. 30, № 1. - P. 125-140.
11. Valzasina B. Tumor-induced expansion of regulatory T cells by conversion of CD4+CD25- lymphocytes is thymus and proliferation independent / Valzasina B., Piconese S., Guiducci C. // *Cancer Res.* – 2006. - Vol. 66, № 8. - P. 4488-4495.
12. Whiteside T.L. The role of immune cells in the tumor microenvironment // *Cancer Treat Res.* - 2006. - Vol. 130. - P. 103-124.
13. Wolf D. The expression of the regulatory T cell-specific forkhead box transcription factor FoxP3 is associated with poor prognosis in ovarian cancer / Wolf D., Wolf A.M., Rumpold H. // *Clin Cancer Res.* – 2005. - Vol. 11, № 23. - P. 8326-8331.

Рецензенты:

Воронов Леонид Николаевич, доктор биологических наук, профессор кафедры биологии и методики преподавания ФГБОУ ВПО «Чувашский государственный педагогический университет имени И.Я. Яковлева» Министерства образования и науки Российской Федерации, г. Чебоксары.

Долгов Игорь Юрьевич, доктор медицинских наук, профессор, главный врач БУ «Республиканский клинический онкологический диспансер», главный онколог Министерства здравоохранения и социального развития Чувашской Республики.