

ОБЩЕГИСТОЛОГИЧЕСКОЕ И ЛЮМИНЕСЦЕНТНО-ГИСТОХИМИЧЕСКОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ ТИМУСА КРЫС ПРИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОМ КАНЦЕРОГЕНЕЗЕ В УСЛОВИЯХ ВРОЖДЕННОГО ИММУНОДЕФИЦИТА

Стручко Г.Ю.¹, Драндрова Е.Г.¹, Меркулова Л.М.¹, Стоменская И.С.¹, Кострова О.Ю.¹

¹ФГБОУ ВО «Чувашский государственный университет имени И.Н. Ульянова», Чебоксары, e-mail: glebstr@mail.ru

В работе исследовано морфофункциональное состояние вилочковой железы потомства животных с врожденным иммунодефицитом при постнатальном введении 1,2-диметилгидразина. С помощью общегистологических и люминесцентно-гистохимических методов исследован тимус крыс-самок в норме, после введения канцерогена и на фоне иммунодефицита. Установлено, что при развитии аденокарциномы толстой кишки в вилочковой железе наблюдаются значимые морфофункциональные изменения, характерные для акцидентальной инволюции. Этот процесс особенно выражен в группе животных, которые родились от самок с иммунодефицитом. Проявление инволюции - изменение морфологии дольки, достоверное уменьшение ее морфометрических показателей (диаметр коркового и площадь мозгового вещества), выраженный дисбаланс уровня серотонина, гистамина и катехоламинов во всех ее структурах с достоверным повышением индекса (серотонин+гистамин)/катехоламины. Кроме того, в 1,5 раза увеличивается количество тучных клеток с умеренной и выраженной степенью дегрануляции. Таким образом, можно заключить, что предшествующий иммунодефицит у самок до беременности сказывается на морфофункциональных изменениях железы у потомства. В связи с этим развивающаяся индуцированная злокачественная опухоль быстрее ускользает от иммунного надзора и становится более агрессивной с развитием ранних метастазов.

Ключевые слова: тимус, канцерогенез, врожденный иммунодефицит, инволюция, апоптоз, тучные клетки, биогенные амины.

HISTOLOGICAL AND LUMINESCENCE-HYSTOCHEMICAL STUDY OF THE THYMUS IN EXPERIMENTAL CARCINOGENESIS IN CONDITIONS OF CONGENITAL IMMUNODEFICIENCY

Struchko G.Yu.¹, Drandrova E.G.¹, Merkulova L.M.¹, Stomenskaya I.S.¹, Kostrova O.Yu.¹

¹I.N.Ul'yanov Chuvash State University, Cheboksary, e-mail: glebstr@mail.ru

The morphofunctional state of the thymus of the progeny of animals with congenital immunodeficiency was studied in the postnatal administration of 1,2-dimethylhydrazine. With the help of histological and luminescent-histochemical methods, the thymus of female rats was studied normally, after the introduction of a carcinogen and against the background of immunodeficiency. It was found that with the development of adenocarcinoma of the colon in the thymus, there are significant morphofunctional changes characteristic of the accidental involution. This process is particularly pronounced in the group of animals that were born from females with immunodeficiency. The manifestation of involution is a change in the morphology of the lobule, a significant decrease in its morphometric parameters (Cortical diameter and area of medulla), a marked imbalance in serotonin, histamine and catecholamine levels in all its structures with a significant increase in the serotonin + histamine / catecholamine index. In addition, the number of mast cells with a moderate and pronounced degree of degranulation increases 1.5 times. Thus, it can be concluded that the previous immunodeficiency in females before pregnancy affects the morphofunctional changes in the gland in offspring. In this regard, the developing induced malignant tumor escapes faster from immune surveillance and becomes more aggressive with the development of early metastases.

Keywords: thymus, carcinogenesis, congenital immunodeficiency, involution, apoptosis, mast cells, biogenic amines.

Сейчас не вызывает сомнений, что развитие как фундаментальной, так и практической онкологии обусловлено успехами в молекулярной генетике и иммунологии. В результате этого мы приблизились к пониманию сущности и особенностей формирования противоопухолевой защиты от стадии распознавания опухолевых антигенов до этапа реализации уничтожения опухоли. Кроме того, произошло изменение ряда взглядов на

взаимоотношение опухоли и клеток системы иммунитета [1]. Таким образом, можно заключить, что современная онкоиммунология переживает переосмысление некоторых утверждений и понятий, принятых ранее, а именно, что онкологические заболевания – не патология иммунной системы, в отличие от аллергических и аутоиммунных заболеваний, при которых нарушения иммунитета являются основной причиной развития болезни. Установлено также, что при развитии опухоли изменения со стороны иммунитета зачастую вызваны влиянием уже возникшей опухоли, т.е. вторичны [1].

Интерес и актуальность исследования механизмов работы системы иммунитета обусловлены современными запросами практической медицины и связаны с возможностью профилактики развития различных заболеваний. Изученность механизмов работы системы иммунитета до сих пор недостаточна. Это связано, прежде всего, с кооперацией большого количества клеток в иммунных реакциях, а также с недостатком доступных методов их выявления [2].

Установлено, что колоректальный рак является одной из наиболее распространенных опухолей с различным метастазированием в легкие, печень и другие органы [3]. Агрессивный рост и достаточно быстрое метастазирование колоректального рака очень часто связывают с нарушением противоопухолевой активности из-за предшествующего удаления селезенки [3; 4].

Кроме того, выявлено, что снижение противоопухолевого иммунитета у потомства грызунов связано с дисбалансом иммунной системы крысы в первые месяцы беременности [5]. Доказано, что в патогенезе развития опухоли в организме животных имеет принципиальное значение серьезный дисбаланс эндокринной системы: выраженная атрофия тимуса с деструкцией эпителиальных клеток, структур окружения коркового и мозгового вещества, а также торможение тимопоэза [6]. Однако в литературе встречается много информации о том, что сама иммунная недостаточность организма способствует развитию более агрессивной опухоли с формированием ранних метастазов [7].

Именно поэтому изучение морфофункциональных особенностей как иммунных, так и эндокринных органов на различных уровнях у потомства животных с вторичным иммунодефицитом, а также разработка эффективных способов коррекции иммунодефицита в организме матери для получения здорового потомства является весьма актуальным и приоритетным.

Цель исследования – исследование морфофункционального состояния вилочковой железы потомства животных с врожденным иммунодефицитом при постнатальном введении 1,2-диметилгидразина.

Материал и методы

Эксперименты проведены на нелинейных белых крысах (n=100). Уход за животными, которые содержались в виварии, осуществлялся в соответствии с «Правилами проведения работ с использованием экспериментальных животных». Исследования проводились на 4 группах животных: 1) интактный контроль (потомство здоровых самок, n=25), 2) контрольная группа (потомство спленэктомированных крыс, n=25), 3) первая подопытная группа (потомство здоровых самок, которым через 1 месяц после рождения начинали вводить канцероген (1,2-диметилгидразин) из расчета 20 мг/кг 1 раз в неделю в течение 4 недель, n=25), 4) вторая подопытная группа (потомство спленэктомированных самок, которым через 1 месяц после рождения начинали вводить 1,2-диметилгидразин из расчета 20 мг/кг 1 раз в неделю в течение 4 недель, n=25).

При изучении потомства подопытных групп отмечено, что развитие иммунодефицита у самок не влияет на формирование пола крысят. Во всех исследуемых группах рождалось 55-60% самок и 40-45% самцов. Развитие опухоли толстой кишки на фоне введения канцерогена у крысят обоих полов происходило в одинаковом проценте случаев. Умерщвление животных проводили путем декапитации через 6 месяцев после окончания курса введения 1,2-диметилгидразина.

Во время вскрытия животных всех групп проводилась ревизия органов грудной и брюшной полости с обязательным исследованием толстой кишки. Патоморфологическое исследование включало в себя изучение частоты развития злокачественных новообразований, их локализацию и морфотипирование. Животные, у которых опухоль не формировалась, в исследование не включались.

При морфофункциональном исследовании вилочковой железы нами использовались следующие методы.

1. **Окраска гематоксилином и эозином.** Орган фиксировался в 10%-ном нейтральном формалине в течение суток, промывался в проточной воде, и затем выполнялась стандартная проводка на тканевом гистопротессоре Leica ASP 200 (Leica, Германия). Парафиновые срезы тимуса наносили толщиной 3 мкм на стекла Mentzel Glasses super frost (Германия) и окрашивали гематоксилином и эозином по стандартной методике.
2. **Люминесцентно-гистохимический метод Хилларна-Фалька** использовался для выявления норадреналина и серотонина в структурах тимуса. Криостатные препараты изучались под люминесцентным микроскопом ЛЮМАМ-4 в течение двух суток.
3. **Люминесцентно-гистохимический метод Кросса-Эвена-Роста** проводился для обнаружения структур вилочковой железы, содержащих гистамин. Криостатные срезы органа изучались в течение суток с помощью люминесцентного микроскопа ЛЮМАМ-4.
4. Для определения уровня норадреналина, серотонина и гистамина в структурах

тимуса применялся метод **цитоспектрофлуориметрии**. Количественные показатели измерялись с помощью насадки ФМЭЛ-1А, которая устанавливалась на микроскоп ЛЮМАМ-4. Уровень выше перечисленных медиаторов в люминесцирующих клетках тимуса определяли в условных единицах (единицы флюоресценции по шкале вольтметра). Для оценки функционального состояния структур тимуса высчитывался индекс **(серотонин+гистамин)/катехоламины**. Увеличение этого соотношения указывает на подавление физиологической активности клеток, снижение этого индекса свидетельствует об их стимуляции [5].

5. **Окраска по Унна с использованием полихромного толуидинового синего** применялась для изучения качественного и количественного состава тучных клеток вилочковой железы. При микроскопии тучных клеток учитывалась их степень дегрануляции. Выделяли недегранулированные, слабо, умеренно и сильно дегранулированные тучные клетки.

6. **Компьютерная морфометрия**. С помощью системы архивирования на микроскопе Leica DM4000B (Leica, Германия) получали оцифрованные фотографии препаратов с использованием фотокамеры Leica DFC 425 и лицензионной программы Leica Application Suite 3.6.0 (Leica, Германия). Морфометрия площади мозгового вещества и толщины коркового вещества долек вилочковой железы выполнялась с использованием этой же программы.

Статистическую значимость полученных данных определяли по *t*-критерию Стьюдента. Данные представляли в виде средней арифметической величины (*M*) и ее средней ошибки (*m*).

Результаты исследования и их обсуждение

Наши эксперименты показали, что введение канцерогена приводит к формированию предраковых изменений, таких как пролиферация крипт толстой кишки и клеточная дисплазия разной степени. На фоне этого через 6 месяцев формируется аденокарцинома умеренной и низкой дифференцировки.

При морфологическом исследовании было отмечено, что тимус крыс на фоне развития злокачественной опухоли достоверно отличается от такового в контрольной группе. Установлено, что у интактных животных дольки тимуса чаще имеют овальную форму и разделены междольковыми перегородками, в пределах которых иногда определяется небольшое количество жировой ткани. Корковое вещество представлено в основном лимфоцитами, внутри которых хорошо различимо ядро диаметром от 2,7 до 3,6 мкм и ядрышко в центре. Встречаются также более крупные тимоциты с диаметром ядра от 3,8 до 4,9 мкм и базофильной цитоплазмой по периферии. Иногда выявляются крупные лимфоциты неправильной формы с большим ядром (до 5,4 мкм) и узким ободком оксифильной

цитоплазмы. В корковом веществе обнаруживаются кровеносные сосуды, которые направлены от мозгового вещества на периферию дольки лучеобразно в междольковых септах. Мозговое вещество также в основном представлено лимфоцитами с крупным ядром диаметром от 3,5 до 4,8 мкм и с узкой базофильной цитоплазмой на периферии.

У потомства самок с предшествующей спленэктомией, которым вводили канцероген, отмечали уменьшение тимуса в массе и размерах, стирание границы между корковым и мозговым веществом, замещение паренхимы железы жировой тканью.

На периферии вилочковой железы часто выявляются участки скопления эпителиальных клеток с малым количеством лимфоцитов, которые окружены жировой прослойкой. В центре тимуса визуализируются небольшого размера дольки, в мозговом веществе которых определяются скопления эпителиоцитов. При морфометрии регистрируется снижение площади мозгового вещества почти в 2 раза и толщины коркового вещества на 22,3%. Масса тимуса уменьшается не столь значительно - на 20%, что можно связать с замещением рабочей паренхимы органа жировой тканью.

Люминесцентно-гистохимическое исследование вилочковой железы подтверждает общегистологическую картину: отмечается стирание границ между тимусными дольками, междольковые септы расширены и содержат жировую ткань. Обработка препаратов ортофталевым альдегидом по методу Кросса на гистамин позволила зарегистрировать преобладание интенсивности люминесценции мозгового вещества над корковым. Количество люминесцирующих гранулярных клеток и их размеры по сравнению с группой интактного контроля уменьшено.

Использование цитоспектрофлуориметрии позволило установить, что уровень серотонина в люминесцирующих гранулярных клетках (ЛГК) коркового вещества и в тучных клетках достоверно снижается, интенсивность люминесценции катехоламинов в лимфоцитах коркового и мозгового вещества также уменьшается, а содержание гистамина в клетках кортико-медуллярной зоны, тучных клетках и лимфоцитах мозгового вещества, напротив, достоверно выше, чем в группе интактного контроля (таблица).

Уровень серотонина (СТ), гистамина (ГСТ) и катехоламинов (КА) (в усл. ед.)
в клетках тимуса крыс интактного контроля, контрольной и опытных групп

Структуры тимуса		Интактный контроль	Контрольная группа	Первая опытная группа	Вторая опытная группа
ЛГК кортико-медуллярной зоны	СТ	512,23±12,3	532,7±9,2*	275,5±17,6**	341,5±8,2**
	ГСТ	542,5±3,4	601,2±4,4**	1221,0±31,2**	984,3±12,4**
	КА	192,7±5,8	184,5±7,4	208,6±10,3*	168,2±9,8*

ЛГК субкапсулярной зоны	СТ	288,8±2,3	309,6±3,9**	248,7±17,8*	232,3±21,8**
	ГСТ	442,8±9,5	497,4±4,8**	668,7±22,6**	478,1±6,4
	КА	172,3±1,8	185,7±3,3*	154,4±7,8*	188,2±8,1
Лимфоциты коркового вещества	СТ	228,1±1,8	252,9±2,3**	198,1±9,2*	254,4±7,5
	ГСТ	442,7±5,8	468,1±2,2**	421,2±9,1*	499,8±8,8**
	КА	152±7,4	165,3±5,1	140,0±6,1	125,1±3,4**
Лимфоциты мозгового вещества	СТ	185,7±5,2	202,3±4,6**	168,9±4,8	148,6±5,2**
	ГСТ	221,7±2,3	239,8±1,7**	224,5±8,7	589,4±15,3**
	КА	141,8±2,6	150,3±3,43*	146,9±4,5	126,8±2,3*
Тучные клетки	СТ	262,9±1,5	297,3±3,1**	78,3±3,5**	105,8±9,3**
	ГСТ	532,9±8,9	530,7±6,5	521,7±5,3	614,8±5,5**
	КА	168,6±2,8	167,2±2,2*	86,0±2,7**	209,1±5,2*

* - P<0,01; ** - P<0,001 по сравнению с крысами интактного контроля.

Вычисляемый нами индекс (серотонин+гистамин)/катехоламины в клетках кортико-медуллярной зоны, тимоцитах коркового и мозгового вещества возрастал на 21, 35 и 104% соответственно. В клетках субкапсулярной зоны и тучных клетках это соотношение, наоборот, снижалось на 10 и 33% соответственно.

На срезах, окрашенных толуидиновым синим по Унна, визуализируются расширенные междольковые соединительнотканые перегородки с тучными клетками разной степени дегрануляции. Во второй опытной группе выявляется в среднем 7-10 тучных клеток, что в более чем в 1,5 раза выше, чем у интактных крыс. Мастоциты с умеренной и выраженной степенью дегрануляции составляют больше половины всех тучных клеток.

Итак, нами выявлено, что при развитии аденокарциномы толстой кишки в вилочковой железе наблюдаются значимые морфофункциональные изменения, характерные для разных стадий акцидентальной инволюции. Этот процесс особенно выражен в группе животных, которые родились от самок с иммунодефицитом. Проявление инволюции - изменение морфологии дольки, достоверное уменьшение ее морфометрических показателей, выраженный дисбаланс уровня серотонина, гистамина и катехоламинов во всех ее структурах с достоверным повышением индекса (серотонин+гистамин)/катехоламины. Кроме того, в наших предыдущих исследованиях с использованием поликлональных антител зарегистрировано снижение клеточной пролиферации тимоцитов как коркового, так и мозгового вещества, уменьшение количества эпителиальных клеток в тимусных дольках, увеличение числа дендритных клеток, макрофагов и клеток АПУД-серии [8]. Помимо этого, в тимусе выявляется увеличение числа клеток, экспрессирующих белок апоптоза Р-53 и снижение bcl-2⁺-клеток [9].

Как известно, серотонин, катехоламины и гистамин оказывают выраженное влияние на многие физиологические процессы в органах и тканях. Катехоламины, например, активируют Т-хелперы, стимулируют антителообразование, усиливают функциональную активность тучных клеток, а также влияют на активность клеток моноцитарно-макрофагальной системы [10]. Кроме того, они являются индукторами как гуморального, так и клеточного иммунитета, влияя на продукцию противовоспалительных цитокинов в крови [11]. Серотонин, наряду с норадреналином, усиливает взаимодействие клеток иммунной системы и их миграцию, активирует фагоцитоз и продукцию интерлейкинов [11]. Гистамин же, напротив, тормозит фагоцитоз и дегрануляцию тучных клеток, угнетает работу клеток гуморального иммунитета [12]. Участвуя в клеточном иммунитете, гистамин усиливает цитотоксичность Т-клеток и натуральных киллеров [12; 13].

Согласно литературным данным, зарегистрированное нами увеличение индекса (серотонин+гистамин)/катехоламины практически во всех структурах тимуса, и особенно в лимфоцитах коркового и мозгового вещества, будет свидетельствовать об угнетении функциональной активности и последующем развитии акцидентальной инволюции железы.

В настоящее время нет сомнений, что развивающаяся злокачественная опухоль и тимус оказывают друг на друга взаимное влияние. Так как большинство опухолей являются тимусзависимыми, то их развитие практически всегда сопровождается инволютивными изменениями в железе. Это обнаруживается и при злокачественном росте, в том числе с использованием химических канцерогенов [7]. Доказано, что при канцерогенезе индуцируется выброс из вилочковой железы незрелых Т-лимфоцитов, которые направляются в очаг злокачественного роста и поддерживают рост перерожденных клеток [9]. Поступление тимусных лимфоцитов в опухоль способствует усилению активности роста как самих опухолевых клеток, так и сосудов путем продукции фактора роста эндотелия [6].

Таким образом, изучив гистологическую картину, содержание биогенных аминов и иммуногистохимический фенотип тимуса, можно заключить, что предшествующий иммунодефицит у самок до беременности сказывается на морфофункциональных изменениях железы у потомства. В связи с этим развивающаяся индуцированная злокачественная опухоль быстрее ускользает от иммунного надзора и становится более агрессивной с развитием ранних метастазов.

Список литературы

1. Бережная Н.М. Физиологическая система соединительной ткани и онкогенез. Роль клеточных компонентов стромы в развитии опухоли / Н.М. Бережная, В.Ф. Чехун //

Онкология. - 2016. - Т. 18, № 1. - С. 4-14.

2. Finn O.J. Immuno-oncology: understanding the function and dysfunction of the immune system in cancer // *Annals of oncology*. – 2012. – Vol. 23, № 8. – P. 116-119.

3. Higashijima J. Effect of splenectomy on antitumor immune system in mice / J. Higashijima, M. Shimada, M. Chikakiyo et al. // *Anticancer Res*. - 2009. - Vol. 29, № 1. - P. 385-393.

4. Sonoda K. Decreased growth rate of lung metastatic lesions after splenectomy in mice / K. Sonoda, K. Izumi, Y. Matsui, M. Inomata, N. Shiraishi, S. Kitano // *Eur. Surg. Res*. - 2006. - Vol. 38, № 5. - P. 469-475.

5. Яглова Н.В. Влияние активации иммунной системы материнского организма в ранние сроки беременности на постнатальный морфогенез органов иммунной системы потомства / Н.В. Яглова, С.С. Обернихин // *Проблемы репродукции*. – 2013. - № 1. - С. 73-77.

6. Стручко Г.Ю. Морфологическая и иммуногистохимическая характеристика тимуса при химическом канцерогенезе, вызванном введением 1,2-диметилгидразина / Г.Ю. Стручко, Л.М. Меркулова, Е.В. Москвичев // *Морфология*. - 2014. - Т. 146. - № 5. - С. 35-39.

7. Стручко Г.Ю. Морфологическая и иммуногистохимическая характеристика опухолей желудочно-кишечного тракта на фоне иммунной недостаточности / Г.Ю. Стручко, Л.М. Меркулова, Е.В. Москвичев и др. // *Вестник Чувашского университета*. – 2011. - № 3. - С. 450-456.

8. Стручко Г.Ю. Морфофункциональные изменения селезенки и тимуса крысят, родившихся от спленэктомизированных крыс-самок / Г.Ю. Стручко, Л.М. Меркулова, О.Ю. Кострова и др. // *Успехи современного естествознания*. - 2014. - № 9-2. - С. 70-72.

9. Драндрова Е.Г. Иммуногистохимические исследования клеточного состава тимуса при канцерогенезе в условиях вторичного иммунодефицита / Е.Г. Драндрова, Г.Ю. Стручко, Л.М. Меркулова и др. // *Современные проблемы науки и образования*. - 2015. - № 3. URL: <http://www.science-education.ru/ru/article/view?id=19825> (дата обращения: 10.02.2018).

10. Elenkov I.J. Stress System Organization, Physiology and Immunoregulation / I.J. Elenkov, G.P. Chrousos // *Neuroimmunomodulation*. -2006. - Vol. 13. - P. 257-267.

11. Симбирцев А.С. Цитокины в лабораторной диагностике / А.С. Симбирцев, А.А. Тотолян // *Клиническая лабораторная диагностика: национальное руководство* / под ред. В.В. Долгова, В.В. Меньшикова. – М.: ГОЭТАР-Медиа, 2012. – Т. 2. – С. 193-229.

12. Hellstrand K. Histamine in cancer immunotherapy: a preclinical background // *Semin. oncol.* - 2002. - V. 29, N 3. - P. 35-40.

13. Москвичев Е.В. Морфологическая и иммуногистохимическая характеристика вилочковой железы при экспериментальном канцерогенезе в условиях вторичной иммунной недостаточности: автореф. дис. ... докт. мед. наук. – Оренбург, 2013. - 30 с.