

УДК 599.323.4-114.44:591.044
ББК Е623.362.423.2*732.32-64

Л.М. МЕРКУЛОВА, Г.Ю. СТРУЧКО, О.М. АРЛАШКИНА, М.Н. МИХАЙЛОВА

МОРФОЛОГИЧЕСКИЕ ИЗМЕНЕНИЯ СЕЛЕЗЕНКИ В УСЛОВИЯХ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОГО КАНЦЕРОГЕНЕЗА

Ключевые слова: селезенка, канцерогенез, 1,2-диметилгидразин, В-лимфоциты, Т-лимфоциты, белая пульпа, опухоль, толстая кишка.

С помощью морфологических и иммуногистохимических методов исследования изучен лимфоидный компартмент селезенки у крыс в возрасте 3 и 6 месяцев, подвергшихся химическому канцерогенезу, индуцированному 1,2-диметилгидразином. Установлено, что канцероген приводит к уменьшению основных морфометрических показателей В- и Т-зависимых зон селезенки. При этом в этих зонах значительно сокращается число CD79a+-клеток (В-лимфоцитов) и CD45RO+-клеток (Т-лимфоцитов). Выявлено, что все количественные и качественные изменения белой пульпы селезенки более выражены у крыс в возрасте 6 месяцев.

L. MERKULOVA, G. STRUCHKO, O. ARLASHKINA, M. MIKHAYLOVA
MORFOLOGICAL CHANGES OF THE LIEN IN THE CONDITIONS
OF THE EXPERIMENTAL CARCINOGENESIS

Key words: lien, carcinogenesis, 1,2-dimethylhydrazine, B-lymphocytes, T-lymphocytes, white pulp, tumor, colon.

By means of morphological and immunohistochemical methods of a research the lymphoid device of a lien at rats at the age of 3 and 6 months which underwent a chemical carcinogenesis, the induced 1,2-dimethylhydrazine is studied. It is established that the entered carcinogen leads to decrease of the main morphometric indicators in - and T-dependent zones of a lien. After administration of carcinogen in these zones the number of CD79a+ cells (B-lymphocytes) and CD45RO+ cells (T-lymphocytes) is considerably reduced. It is taped that all quantitative and high-quality changes of a white pulp of a lien are more expressed at rats at the age of 6 months.

Неуклонный рост онкологической заболеваемости является глобальной медико-социальной проблемой. По данным Росстата, одной из распространенных локализаций опухолей является толстая кишка, составляя 11,4% в общей структуре заболеваемости злокачественными новообразованиями населения России. Существуют данные о том, что примерно 80-90% опухолей у человека возникают при воздействии различных химических канцерогенов [1].

Известно, что химический канцерогенез приводит к определенным нарушениям в системе иммунного надзора [7]. Имеются сведения, что рост злокачественных новообразований сопровождается продукцией биологически активных веществ, угнетающих защитные силы организма. Это, в свою очередь, приводит к снижению противоопухолевого иммунного ответа [10], в результате чего опухоль не распознается иммунными клетками как чужеродная. Вероятно, это связано с инволюцией тимуса на фоне канцерогенеза [5]. Также имеются сведения о том, что опухоль обладает прямым токсическим влиянием на иммунные органы [3], что, в свою очередь, приводит к снижению продукции ими иммунокомпетентных клеток, выработке дефектных и иммуносупрессивных клеток [9].

Одна из ведущих ролей в формировании противоопухолевой иммунной защиты принадлежит самому большому периферическому органу иммуногенеза – селезенке. Здесь происходит окончательная антигензависимая дифференцировка В- и Т-лимфоцитов, а также превращение В-лимфоцитов в плазмочиты и накопление клеток-памяти.

Несмотря на имеющиеся противоречия в литературе по вопросам взаимодействия опухоли и иммунных органов, можно утверждать, что иммунитет играет в патогенезе онкогенеза значительную роль [4]. Поэтому углублённое

изучение локального иммунного статуса, в частности, селезенки при развитии опухоли является весьма актуальной задачей.

Цель исследования – изучение морфологических и иммуногистохимических характеристик селезенки крыс при химическом канцерогенезе, индуцированном 1,2-диметилгидразином, через 1 и 4 месяца после воздействия.

Материалы и методы исследования. Эксперимент выполнен на 40 белых нелинейных крысах в возрасте 3 и 6 месяцев. Все процедуры по содержанию крыс и выведение из эксперимента производились согласно правилам проведения работ с использованием экспериментальных животных и принципам Хельсинской декларации о гуманном отношении к животным. Животные были разделены на две группы. Первая – интактные крысы, которым для контроля вводили изотонический раствор хлорида натрия ($n = 20$). Вторая группа – животные, которым через месяц после рождения внутрибрюшинно вводили канцероген (1,2-диметилгидразин) из расчета 20 мг/кг 1 раз в неделю в течение четырех недель ($n = 20$). Выведение крыс из эксперимента производили через 1 и 4 месяца после окончания курса инъекций. При патоморфологическом исследовании учитывались частота развития новообразований, их локализация и морфологические особенности. Объектом исследования служила селезенка.

В работе применялись следующие методы:

1. Иммуногистохимический метод с использованием коммерческих моноклональных антител (МКАТ) производства Santa Cruze (США):

- МКАТ к В-лимфоцитам (CD79 α);
- МКАТ к Т-лимфоцитам (CD45RO).

Материал для исследования фиксировали 10%-ным нейтральным забуференным формалином в течение 24 ч и выполняли стандартную спиртовоксилоловую проводку. Подготовленные образцы тканей заливали в парафин. Готовые срезы толщиной 4 мкм наносили на высокоадгезивные стекла и высушивали при температуре 37°C в течение 18 ч. Демаскировка и иммуногистохимическая окраска проводились с использованием системы визуализации Leica ChromoPlex™ 1 Dual Detection for BOND. Контролем иммуногистохимической реакции служила неиммунизированная сыворотка. Результаты реакций оценивали с применением микроскопа МИКРОМЕД 3 ЛЮМ.

2. Окраска срезов селезенки гематоксилином и эозином для изучения общегистологической картины.

3. Компьютерная морфометрия с использованием программы «Микро-Анализ» (Санкт-Петербург, 2010) для измерения Т- и В-зависимых зон белой пульпы, а также количественных характеристик иммуногистохимических реакций.

4. Статистическая обработка с использованием лицензионного пакета программ MS Office 2003, достоверность определялась по t -критерию Стьюдента.

Результаты исследования и их обсуждение. Введение 1,2-диметилгидразина через один месяц после окончания курса приводит к трансформации слизистой толстой кишки, что проявляется клеточной дисплазией, полиморфизмом, гиперхромией ядер и усилением митотической активности клеток железистого эпителия. Через 4 месяца канцероген вызывает образование одной, реже двух опухолей в толстой кишке размером от 0,3 до 1,0 см, которые имеют структуру высококодифференцированной аденокарциномы.

Лимфоидная ткань селезенки крыс формирует две основные В- и Т-зависимые зоны, которые представлены периабдоминальными лимфоидными муфтами (ПАЛМ) и лимфоидными узелками. Выделяют первичные лимфоидные узелки, не имеющие центров размножения, и вторичные лимфоидные узелки с герминативными центрами (ГЦ), которые появляются только после

антигенной стимуляции. Они, в свою очередь, образуют В-зависимую зону, где осуществляется дифференцировка, пролиферация В-лимфоцитов и накопление клеток-памяти. Т-зависимой зоной являются периартериальная зона лимфоидных узелков и ПАЛМ, которые состоят из Т-лимфоцитов и интердигитирующих клеток. Местом, где В- и Т-лимфоциты взаимодействуют между собой и встречаются с антигенами, является маргинальная зона, которая располагается по периферии лимфоидных узелков [8]. Количественный и качественный состав этих структур свидетельствует о функциональном состоянии селезенки и отображает состояние ее локального иммунного статуса.

В селезенке интактных крыс каждый лимфоидный узелок имеет округлую форму, четкое зональное строение и ровные границы. При этом доля крупных лимфоидных узелков (более 500 мкм в диаметре) преобладает над мелкими (менее 300 мкм) и средними (300-500 мкм).

Наши исследования показали, что при канцерогенезе лимфоидные узелки не только приобретают измененную форму, но и теряют четкие контуры между зонами, границы между ними становятся размытыми, стертыми. Введение канцерогена приводит к увеличению числа мелких и средних лимфоидных узелков в 2 раза, а число крупных уменьшается на 10%.

Диаметр лимфоидных узелков селезенки через 1 месяц после введения 1,2-диметилгидразина достоверно снижается на 19%, а через 4 месяца более значимо – на 22 % (табл. 1).

Таблица 1

Морфометрические параметры лимфоидных узелков (ЛУ) селезенки

Показатели	Интактные крысы. Через 1 месяц после инъекций	Крысы с введением канцерогена. Через 1 месяц после инъекций	Интактные крысы. Через 4 месяца после инъекций	Крысы с введением канцерогена. Через 4 месяца после инъекций
Диаметр ЛУ, мкм	620,8±23,5	502,33±18,4***	561,8±22,9	437,71±14,3***
Диаметр ГЦ, мкм	218,53±8,5	191,59±8,3*	202,02±9,2	171,78±5,9**
Ширина маргинальной зоны, мкм	121,3±6,02	118,352±2,2	122,85±2,7	109,737±2,1***
Ширина ПАЛМ, мкм	118,31±4,8	125,06±4,8	119,33±3,3	111,11±3,9*

Примечание. * – $p < 0,05$; ** – $p < 0,01$; *** – $p < 0,001$ по сравнению с аналогичными показателями у интактных животных.

При этом диаметр герминативных центров лимфоидных узелков также значительно меньше через 4 месяца после введения канцерогена (табл. 1), что косвенно указывает на снижение у этих крыс В-клеточной иммунореактивности.

Кроме того, наши исследования показали, что при канцерогенезе в герминативных центрах лимфоидных узелков уменьшается количество CD79α⁺-клеток: в 3 месяца – на 31%, а в 6 месяцев – на 35% (табл. 2).

Введение канцерогена приводит к уменьшению ширины ПАЛМ только через 4 месяца после инъекций (рис. 1), а количество CD45RO⁺ Т-лимфоцитов этой зоны уменьшается у крыс как через 1, так и через 4 месяца (табл. 2).

Канцерогенез в толстой кишке сопровождается также уменьшением ширины маргинальной зоны лимфоидных узелков селезенки на обоих сроках наблюдения (табл. 1). Это может быть связано как с инволюцией тимуса и уменьшением поступления лимфоцитов Т-типа в селезенку [6], так и с нарушением дифференцировки В-лимфоцитов.

Таблица 2

Доля CD79a⁺-клеток (В-лимфоцитов) в герминативных центрах лимфоидных узелков и CD45RO⁺-клеток (Т-лимфоцитов) в периартериолярных лимфоидных муфтах селезенки, %

Показатели	Интактные крысы. Через 1 месяц после инъекций	Крысы с введением канцерогена. Через 1 месяц после инъекций	Интактные крысы. Через 4 месяца после инъекций	Крысы с введением канцерогена. Через 4 месяца после инъекций
CD79a ⁺ -клетки	46,91±2,5	32,48±3,5**	45,37±3,5	29,31±3,6**
CD45RO ⁺ -клетки	42,39±2,7	35,24±2,0*	38,07±2,3	32,36±2,0**

Примечание. * – $p < 0,05$; ** – $p < 0,01$ по сравнению с аналогичными показателями у интактных животных.

Выводы. Введение 1,2-диметилгидразина приводит к существенным морфологическим и иммуногистохимическим изменениям белой пульпы селезенки: изменению соотношения между лимфоидными узелками различного диаметра в сторону увеличения мелких, уменьшению диаметра узелков и их герминативных центров. Через 4 месяца после окончания введения канцерогена отмечается более выраженная гипоплазия лимфоидных узелков по сравнению с таковой в предыдущий срок: значительное сокращение диаметра герминативных центров и ширины маргинальной зоны, существенное уменьшение числа В- и Т-лимфоцитов, а также уменьшение диаметра ПАЛМ.

Таким образом, изменения, выявленные в селезенке, свидетельствуют о снижении локального иммунного статуса селезенки при канцерогенезе, что сопровождается недостаточностью противоопухолевого иммунного ответа и может служить предпосылкой ускорения темпов злокачественного роста.

Литература

1. *Белицкий В.А., Якубовская М.Г.* Генетический полиморфизм и вариабельность химического канцерогенеза // *Биохимия*. 2008. № 73(5). С. 675–689.
2. *Гумен А.В., Шанин С.Н., Козинец И.А.* Цитотоксическая активность натуральных киллерных клеток селезенки крыс при стрессе и ее коррекция короткими иммуномодулирующими пептидами // *Цитокины и воспаление*. 2006. Т. 5, № 2. С. 37–41.
3. *Киселева Е.П.* Механизмы инволюции тимуса при опухолевом росте // *Успехи современной биологии*. 2004. Т. 124. С. 589–601.
4. *Кострова О.Ю.* Акцидентальная инволюция тимуса крыс на фоне развития аденокарциномы толстой кишки, вызванной введением канцерогена в различной дозировке // *Фундаментальные исследования*. 2013. № 3-2. С. 321–324. URL: <http://www.fundamental-research.ru/ru/article/view?id=31334> (дата обращения: 02.09.2016)
5. *Москвичев Е.В., Меркулова Л.М., Стручко Г.Ю., Кострова О.Ю., Михайлова М.Н.* Возрастная инволюция и острая атрофия тимуса при экспериментальном канцерогенезе // *Вестник Волгоградского государственного медицинского университета*. 2014. № 3(51). С. 127–129.
6. *Москвичев Е.В., Меркулова Л.М., Стручко Г.Ю.* Иммуногистохимическая характеристика апоптоза и клеточной пролиферации в тимусе при экспериментальной опухоли толстой кишки // *Иммунология*. 2012. Т. 33, № 6. С. 303–305.
7. *Михайлова М.Н., Стручко Г.Ю., Меркулова Л.М., Кострова О.Ю., Москвичев Е.В., Драндрова Е.Г., Стоменская И.С.* Участие дендритных и нейроэндокринных клеток тимуса в развитии его инволюции при формировании экспериментальной опухоли толстой кишки // *Вестник Чувашского университета*. 2011. № 3. С. 377–383.
8. *Ярилин А.А.* Иммунология. М.: ГЭОТАР-Медиа. 2010. С. 430–476.
9. *Clarke S.L., Betts G.J., Plant A.* CD4+CD25+FOXP3+ regulatory T cells suppress antitumor immune responses in patients with colorectal cancer. *PLoS One*, 2006, vol. 27, no. 1, p. 129
10. *Whiteside T.L.* The role of immune cells in the tumor microenvironment. *Cancer Treat Res.*, 2006, vol. 130, pp. 103–124.

References

1. Belitskii V.A., Yakubovskaya M.G. *Geneticheskiy polimorfizm i variabel'nost' khimicheskogo kantserogeneza* [Genetic polymorphism and variability of a chemical carcinogenesis]. *Biokhimiya* [Biochemistry]. 2008, no. 73(5), pp. 675–689.
2. Gumen A.V., Shanin S.N., Kozinets I.A. *Tsitotoksicheskaya aktivnost' natural'nykh killernykh kletok selezenki krysa pri stresse i ee korrektsiya korotkimi immunomoduliruyushchimi peptidami* [Cytotoxic activity natural the killernykh of cells of a lien of rats at a stress and its correction by short immunomodulatory peptides]. *Tsitokiny i vospalenie* [Cytokines and inflammation]. 2006, vol. 5, no. 2, pp. 37–41.
3. Kiseleva E.P. *Mekhanizmy involyutsii timusa pri opukholevom roste* [Mechanisms of an involution of a thymus with a tumoral growth]. *Uspekhi sovremennoi biologii* [Achievements of modern biology], 2004, vol. 124, pp. 589–601.
4. Kostrova O.Yu. *Aktsidental'naya involyutsiya timusa krysa na fone razvitiya adenokartsinomy tolstoi kishki, vyzvannoi vvedeniem kantserogena v razlichnoi dozirovke* [Aktsidentalny involution of a thymus of rats against the background of development of an adenocarcinoma of the large intestine caused by administration of carcinogen in various dosage]. *Fundamental'nye issledovaniya* [Basic researches]. 2013, no. 3-2, pp. 321–324. URL: <http://www.fundamental-research.ru/ru/article/view?id=31334> (data obrashcheniya: 02.09.2016).
5. Moskvichev E.V., Merkulova L.M., Struchko G.Yu., Kostrova O.Yu., Mikhailova M.N. *Vozrast'naya involyutsiya i ostraya atrofiya timusa pri eksperimental'nom kantserogeneze* [Age involution and acute atrophy of a thymus at an experimental carcinogenesis]. *Vestnik Volgogradskogo gosudarstvennogo meditsinskogo universiteta* [The Bulletin of the Volgograd state medical university], 2014, no. 3(51), pp. 127–129.
6. Moskvichev E.V., Merkulova L.M., Struchko G.Yu. *Immunogistokhimicheskaya kharakteristika apoptoza i kletochnoi proliferatsii v timuse pri eksperimental'noi opukholi tolstoi kishki* [The immunohistochemical characteristic of an apoptosis and cellular proliferation in a thymus at an experimental tumor of a large intestine]. *Immunologiya* [The Immunology]. 2012, vol. 33, no. 6, pp. 303–305.
7. Mikhailova M.N., Struchko G.Yu., Merkulova L.M., Moskvichev E.V., Kostrova O.Yu., Stomenskaya I.S. *Uchastie dendritnykh i neuroendokrinnnykh kletok timusa v razvitii ego involyutsii pri formirovanii eksperimental'noi opukholi tolstoi kishki* [Involvement of dendritic and neuroendocrine cells of thymus in the development of its involution against the formation of experimental colon cancer]. *Vestnik Chuvashskogo universiteta*, 2011, no. 3, pp. 377–383.
8. Yarilin A.A. *Immunologiya* [The Immunology]. Mosco, GEOTAR-Media Publ., 2010, pp. 430–476.
9. Clarke S.L., Betts G.J., Plant A. CD4+CD25+FOXP3+ regulatory T cells suppress antitumor immune responses in patients with colorectal cancer. *PLoS One*, 2006, vol. 27, no. 1, p. 129
10. Whiteside T.L. The role of immune cells in the tumor microenvironment. *Cancer Treat Res.*, 2006, vol. 130, pp. 103–124.

МЕРКУЛОВА ЛАРИСА МИХАЙЛОВНА – доктор медицинских наук, профессор, заведующая кафедрой нормальной и топографической анатомии с оперативной хирургией, Чувашский государственный университет, Россия, Чебоксары (merkulova192@mail.ru).

MERKULOVA LARISA – Doctor of Medical Sciences, Professor, Head of Normal and Topographic Anatomy Department with Operative Surgery, Chuvash State University, Russia, Cheboksary.

СТРУЧКО ГЛЕБ ЮРЬЕВИЧ – доктор медицинских наук, заведующий кафедрой инструментальной диагностики с курсом фтизиатрии, Чувашский государственный университет, Россия, Чебоксары (glebstr@mail.ru).

STRUCHKO GLEB – Doctor of Medical Sciences, Head of Department of the Instrumental Diagnostics Department with a course of Phthiology, Chuvash State University, Russia, Cheboksary.

АРЛАШКИНА ОЛЬГА МИХАЙЛОВНА – аспирантка кафедры инструментальной диагностики с курсом фтизиатрии, Чувашский государственный университет, Россия, Чебоксары (olgaruz1202@mail.ru).

ARLASHKINA OLGA – Post-Graduate Student, Department of the Instrumental Diagnostics Department with a course of Phthiology, Chuvash State University, Cheboksary, Russia.

МИХАЙЛОВА МАРИНА НИКОЛАЕВНА – кандидат медицинских наук, доцент кафедры нормальной и топографической анатомии с оперативной хирургией, Чувашский государственный университет, Россия, Чебоксары (mar3007@mail.ru).

MIKHAYLOVA MARINA – Candidate of Medical Sciences, Associate Professor, Normal and Topographic Anatomy Department with Operative Surgery, Chuvash State University, Cheboksary, Russia.
