

DOI: 10.47026/2413-4864-2024-4-64-75

УДК 599.323.4-114.44.044:[577.118:549.232]
ББК Е623.362.432.2*692.32-641.2/641.9:Г126.2Е.С. САМАКИНА, Г.Ю. СТРУЧКО, Л.М. МЕРКУЛОВА,
О.Ю. КОСТРОВА, А.О. НЮГАНЕН**ОЦЕНКА СТРУКТУРЫ СЕЛЕЗЕНКИ КРЫСЫ ПРИ ИЗОЛИРОВАННОМ И КОМБИНИРОВАННОМ ДЕЙСТВИИ СЕЛЕНА И ЭТИЛКАРБАМАТА**

Ключевые слова: селезенка, морфология, морфометрия, воздействие селена, воздействие этилкарбамата.

Иммунная система, обладая сложной структурной организацией, выполняет основные функции в обеспечении противовоспалительного и противоопухолевого иммунного ответа. Селезенка, как периферический орган иммунной системы, играет важную роль в реализации этих функций и содержит значительное количество иммунных клеток. Этилкарбамат, являясь канцерогеном 2А группы, может провоцировать развитие неопластических процессов через активацию мутации гена *Kras* и стимуляцию онкогенных сигналов. Вместе с тем селен влияет на иммунный ответ, снижая пролиферацию опухолевых клеток и оказывая противовоспалительное действие. Несмотря на существование отдельных исследований о влиянии этилкарбамата и селена на организм животных, данных о комбинированном воздействии этих веществ на селезенку крыс в экспериментальных условиях в научной литературе не представлено.

Цель исследования – оценка морфологических и морфометрических изменений структуры селезенки крыс-самцов при пероральном введении в их организм селена и внутрибрюшинной инъекции этилкарбамата.

Материалы и методы исследования. В работе исследовали массу тел крыс-самцов и селезенки, оценивали морфологические и морфометрические параметры селезенки, вычисляли лимфоидный коэффициент и индекс Керногана. Животные были разделены на четыре группы: N1 – контрольная; N2 – животные, получавшие с питьевой водой селен; N3 – животные, которым вводили внутрибрюшинно этилкарбамат; N4 – животные, получавшие с питьевой водой селен с последующей инъекцией этилкарбамата.

Результаты. Установлено, что в группе N2 снижена площадь лимфоидных узелков, уменьшен индекс Керногана и увеличен лимфоидный коэффициент, при этом масса тела крыс и селезенки неизменна. Через месяц после изолированного поступления этилкарбамата статистически значимо уменьшены и масса тела, и масса селезенки крыс. При этом в группе N3 увеличены площадь и диаметр герминативного центра, толщина перипортальной лимфоидной муфты и индекс Керногана, а лимфоидный коэффициент снижен. На ультрамикроскопическом уровне в группе N3 выявлено увеличение количества плазматических клеток, а в лимфоцитах – количество отеких митохондрий. В группе N4 определили увеличение площади и диаметра лимфоидных узелков, герминативного центра, а также лимфоидный коэффициент, а индекс Керногана неизменен. При исследовании ультратонких срезов в группе N4 выявлены лимфоциты различных переходных форм.

Выводы. Установлено, что на фоне поступления селена в организм крыс-самцов возникла морфологическая перестройка белой пульпы селезенки, вероятно, связанная с реакцией Т-лимфоцитов. Инъекция этилкарбамата привела к преимущественному влиянию на В-клеточное звено иммунного ответа селезенки. При комбинированном поступлении селена и этилкарбамата выявили гиперплазию белой пульпы, заключающуюся в увеличении ее структур.

Введение. Иммунная система, обладая многокомпонентной структурной организацией, выполняет широкий спектр функций, включая участие в противовоспалительной реакции и подавлении неопластических процессов на всех их этапах развития. Исследования морфологических изменений показывают, что адаптивный потенциал и уровень иммунореактивности зависят от функционального состояния органов иммунной системы, которые обеспечивают специфические и неспецифические ответы на экзогенные и эндогенные воздействия.

Селезенка, как орган периферической иммунной системы, обладая уникальной структурной организацией, играет важную роль в иммунных ответах, что реализуется красной и белой пульпой органа. Эти структурные компартменты в совокупности содержат около трети всех иммунных клеток организма, включая макрофаги, дендритные клетки, Т- и В-клетки [8, 12]. В белой пульпе скопления иммунных клеток образуют лимфоидные узелки с герминативным центром и без герминативного центра, периартериальную лимфоидную муфту (ПАЛМ). Такое строение способствует эффективному совместному взаимодействию клеток иммунной системы [1, 2, 20, 30]. Кроме того, в селезенке происходит активация процессов синтеза специфических антител в ответ на поступающие антигены [2, 3, 11]. Анализ многочисленных исследований указывает на то, что при воздействии на организм лабораторных животных различных химических и биологических агентов наблюдаются морфологические изменения в селезенке [3, 6, 13, 14]. При этом определяются признаки гиперплазии и усиленной пролиферации клеток белой пульпы, что в итоге может привести к деструкции и атрофии лимфоидных структур селезенки.

Длительное воздействие патологических факторов на организм приводит к высвобождению воспалительных цитокинов, таких как IL-6, TNF-альфа, ядерный фактор Каппа- β (NF)- κ B, которые стимулируют пролиферацию клеток, индуцируют ангиогенез. Все это может привести к серьезным структурным и функциональным сдвигам в тканях и в органах, увеличивая риск развития неопластического процесса [21, 29, 33]. Воспалению часто подвержены легкие, поскольку они уязвимы для различных химических и биологических агентов [28, 29]. Одним из повреждающих веществ является этилкарбамат или этиловый эфир карбаминной кислоты, который, согласно данным Международного агентства по изучению рака (International Agency for Research on Cancer – IARC, Citation, 2010), является опасным загрязнителем воздуха и канцерогеном 2A группы. В исследовании F.C.P. Rosin et al. (2011) указано, что после инъекции этилкарбамата возникает гиперплазия ткани легкого с развитием узелков. На фоне изменений в паренхиме легкого происходит очень раннее увеличение как эффекторных (клеток, продуцирующих IFN- γ , из селезенки), так и супрессорных/регуляторных (клеток CD11b⁺Gr-1⁺/CD4⁺Foxp3⁺) фенотипов в селезенке, что указывает на раннее подавление иммунитета [26]. Кроме этого, при его попадании в организм развивается Kras-мутация, которая приводит к онкологическому процессу в легких грызунов, а в редких случаях – в печени и сердце [16, 18, 19, 28]. Также он стимулирует онкогенную сигнализацию в раковых клетках, включая ядерный фактор (NF)- κ B, тем самым способствуя выживанию и пролиферации опухолевых клеток [34]. Исследования показали, что этилкарбамат вызывает специфические гистопатологические изменения в различных органах.

На разных этапах иммунного ответа непосредственную роль играют микроэлементы. Селен является важным для организма человека микроэлементом, входит в состав ферментов, выполняющих ряд функций: антиоксидантную, иммуноэндокринную, противовоспалительную, участвует в метаболическом цикле и клеточном гомеостазе, имеет противоопухолевый эффект [4, 8, 23, 24, 36]. Селен также снижает репарацию опухолевой ДНК и ингибирует пролиферацию опухолевых клеток, способствуя остановке фазового перехода G1/S [15]. Он влияет как на врожденный, так и на адаптивный иммунный ответ, стимулируя увеличение пролиферации Т- и В-лимфоцитов, а также регулирует синтез иммуноглобулинов [10, 25]. Известно также, что токсическая доза селена может

неблагоприятно влиять на строение селезенки. В исследовании О.В. Никитенко и И.Н. Путалова (2010) отмечено, что высокая доза селена вызывает снижение количества лимфобластов, малых лимфоцитов, плазматических клеток и инволюцию лимфоидных зон селезенки, что указывает на угнетение иммунного ответа [6].

В доступных научных публикациях не встретились данные о комбинированном действии селена и этилкарбамата на селезенку крыс при их введении в организм экспериментальных животных.

Цель исследования – изучение влияния селена и этилкарбамата на морфологические и морфометрические изменения селезенки крыс-самцов при их изолированном и комбинированном поступлении.

Материалы и методы исследования. Работа выполнена на 32 крысах-самцах линии Wistar, полученных от филиала «Андреевка» ФГБУН НЦБМТ ФМБА России. Животные содержались в виварии ФГБОУ ВО «Чувашский государственный университет имени И. Н. Ульянова».

Крысы-самцы были разделены на четыре равные группы:

1-я (N1, $n = 8$) контрольная (интактная) группа;

2-я (N2, $n = 8$) группа, крысы-самцы получали селен с питьевой водой в дозировке 20 мкг/кг в течение месяца;

3-я (N3, $n = 8$) группа, крысам-самцам однократно внутрибрюшинно вводился этилкарбамат в дозе 1 г/кг массы тела, предварительно разведенный в 1 мл 0,9%-го физиологического раствора;

4-я группа (N4, $n = 8$) крысы получали предварительно 1 месяц селен (по схеме как в группе N2), а затем – инъекцию этилкарбамата (по схеме как в группе N3). Инъекцию этилкарбамата проводили в последний день приема селена.

Во всех исследуемых группах вода предоставлялась в свободном доступе, и крысы-самцы пили ее по мере потребности. При подборе дозы селена в группах N2 и N4 использовались рекомендации других исследователей и рассчитывалось среднее количество потребления воды крысами за день в условиях вивария [6–7]. В среднем суточное потребление селена на крысу через питьевую воду составило $4 \pm 0,4$ мкг.

В группах N3, N4 возраст крыс на момент введения этилкарбамата составил $90 \pm 1,5$ дня. Средняя доза вводимого этилкарбамата ($287 \pm 10,3$ мг) животным из N3 и N4 производилась исходя из массы тела крысы (средняя масса крысы-самца составила $287 \pm 10,3$ г). При подборе данной дозы этилкарбамата были использованы результаты исследования других авторов [26, 28, 29, 34].

Средний возраст крыс-самцов во всех группах на начало эксперимента составил $60 \pm 1,5$ дня, средняя масса – $122 \pm 8,9$ г. К моменту завершения эксперимента средний возраст крыс был сопоставимым во всех группах и составил $120 \pm 1,5$ дня. Количественные показатели средней массы тела крыс-самцов в группах исследования менялись в зависимости от изолированного или комбинированного воздействия селена и этилкарбамата.

После прекращения введения селена и этилкарбамата экспериментальным животным крысы содержались в стандартных условиях вивария под динамическим мониторингом их активности.

Животные выводились из эксперимента через 30 дней с момента завершения приема селена и инъекции этилкарбамата. Для этого применяли телазол из расчета 15 мг/кг внутримышечно. Затем последовала цервикальная декапитация.

В работе были использованы следующие методы исследования у крыс:

1. Оценка массы тела (гр) и селезенки (мг) крыс-самцов с помощью порционных весов SW-02 (производитель Cas) и электронных лабораторных весов серии «Эва» Ска-120В (производитель ООО «Скейл-КАС»).

2. Окрашивание гематоксилином и эозином гистологических срезов селезенки.

3. Изучение клеточной структуры ультратонких срезов селезенки (толщиной 60-80 нм) (электронный микроскоп Hitachi HT 7700 Exalens (производитель Japan), ускоряющее напряжение 100 кэВ, разрешение 0,144 нм).

4. Компьютерная морфометрия гистологических срезов селезенки (лицензионная программа «Микро-Анализ» и микроскоп МИКРОМЕД 3 ЛЮМ (Россия, Санкт-Петербург)): оценка количественных показателей площадей лимфоидных узелков (ЛУ) и герминативного центра (ГЦ) (мкм^2), диаметра ЛУ (мкм), толщины ПАЛМ (мкм), толщины стенки центральной артерии селезенки (мкм), диаметра внутреннего просвета центральной артерии селезенки (мкм);

5. Вычисление показателей, характеризующих морфофункциональное состояние исследуемых структур селезенки, лимфоидного коэффициента (ЛК) и индекса Керногана (ИК) производилось по методике, предложенной В.П. Волковым (2015) [1], с использованием формул:

1) ЛК:

$$\text{ЛК} = \frac{D_{\text{ЛУ}}}{L_{\text{ПАЛМ}}},$$

где $D_{\text{ЛУ}}$ – диаметр лимфоидного узелка; $L_{\text{ПАЛМ}}$ – толщина периартериальной лимфоидной муфты;

2) ИК:

$$\text{ИК} = \frac{2 \times L}{D},$$

где L – толщина стенки центральной артерии; D – внутренний диаметр центральной артерии.

Полученные цифровые данные анализировали с помощью Microsoft Office Excel 2020 и программы Statistica 10.0 (Stat Soft Inc.) с использованием стандартных методов параметрической и непараметрической статистики. Сравнение независимых групп по количественному признаку проводили с помощью U-критерия Манна–Уитни с учетом значений критерия Левена о равенстве дисперсий. Полученные данные выражали в виде средней арифметической величины со средней ошибкой соответственно $M \pm m$. Различия считали статистически значимыми при $p < 0,05$.

Результаты исследования и их обсуждение. Анализ динамики массы тела крыс в экспериментальной группе животных, которым вводили только этилкарбамат (N3), показал статистически значимое уменьшение массы тела от исходной на 26,4% ($p_{m-u} < 0,005$). В соответствии с этим у животных данной группы наблюдалось уменьшение массы селезенки на 48,5% ($p_{m-u} < 0,0003$), чего не наблюдалось у крыс из N2 и N4 (табл. 1).

Анализ морфологической структуры селезенки крыс после окрашивания гематоксилином и эозином при изолированном воздействии селена (N2) показал более чуткую дифференцировку границ зон ЛУ (между мантийной и маргинальной и ГЦ). При комбинированном воздействии на организм крысы селеном и этилкарбаматом (N4) не установлено подобных изменений при сравнении

с N1 (рис. 1–2). Морфологическая оценка дифференцировки границ между маргинальной и мантийной зонами ЛУ при изолированном воздействии этилкарбамата на организм крыс из N3 нарушалась, хотя при этом контуры границы между маргинальной зоной и красной пульпой сохранялись отчетливо.

Таблица 1

Изменение массы тела и селезенки крыс-самцов в контрольной и опытных группах

Параметры	N1, n = 8	N2, n = 8	N3, n = 8	N4, n = 8
Масса тела крыс, г	258±19,6	285±24 $p_{m-u} < 0,033$	190,33±8,84 $p_{m-u} < 0,005$	247,66±6,89 $p_{m-u} = 0,8$
Масса селезенки, мг	648,35±60,33	665,1±71,17 $p_{m-u} = 0,9$	334,8±40,6 $p_{m-u} < 0,0009$	609,3±38,2 $p_{m-u} = 0,43$

Примечание. p_{m-u} – при сравнении с контрольной группой (N1).

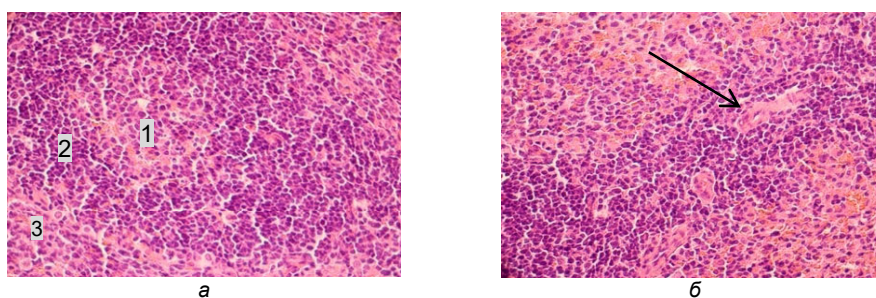


Рис. 1. Селезенка крысы-самца контрольной группы:

а – ЛУ с ГЦ: 1 – ГЦ; 2 – мантийная зона; 3 – маргинальная зона;

б – периартериальная лимфоидная муфта, в центре расположена центральная артерия селезенки. Центральная артерия селезенки указана стрелкой.

Окраска гематоксилином и эозином. Микромед 3 Люм. Ув. ×600/600.

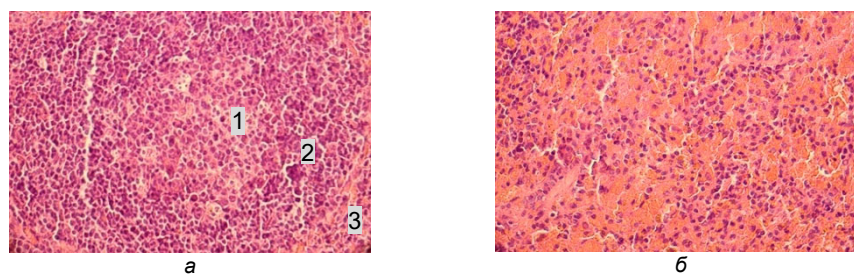


Рис. 2. Селезенка крысы-самца при комбинированном приеме селена и инъекции этилкарбамата:

а – ЛУ с ГЦ: 1 – ГЦ; 2 – мантийная зона; 3 – маргинальная зона. Увеличена площадь ГЦ;

б – полнокровная красная пульпа. Окраска гематоксилином и эозином.

Микромед 3 Люм. Ув. ×600/600.

Анализ морфометрических параметров селезенки экспериментальных животных во всех исследуемых группах показал следующее (табл. 2). Было установлено, что с увеличением числа первичных ЛУ наблюдалось уменьшение площади ЛУ (мкм^2) селезенки в группе N2 в сравнении с контрольной группой (в 1,27 раза), однако этот показатель был статистически незначимым ($p_{m-u} = 0,12$). Установлена высокая статистическая значимость увеличения числа ЛУ с ГЦ

в селезенке при комбинированном воздействии селеном и этилкарбаматом на организм крысы (N4) с синхронным увеличением площади ЛУ (в 1,4 раза в сравнении с контрольной группой ($p_{m-u} < 0,000012$)) (табл. 2).

Таблица 2

Морфометрические параметры селезенки контрольной и опытных групп

Параметр	N1 (n = 8)	N2 (n = 8)	N3 (n = 8)	N4 (n = 8)
Площадь ЛУ, мкм ²	251 851,5± ±28 914,612	199 073,268± ±99 00,97 $p_{m-u} = 0,14$	268 204,28± ±21 001,0279 $p_{m-u} = 0,12$	399 488,286± ±22 698,368 $p_{m-u} < 0,000012$
Диаметр ЛУ, мкм	649,25±23,47	634,74±19,22 $p_{m-u} < 0,04$	615,55±11,59 $p_{m-u} < 0,04$	789,73±27,74 $p_{m-u} < 0,001$
Площадь ГЦ, мкм ²	26 650,18± ±3 825,969	24 395,732± ±3 099,333 $p_{m-u} < 0,04$	36 881,16± ±2 500,72 $p_{m-u} < 0,0399$	32 695,48± ±869,81 $p_{m-u} < 0,05$
Диаметр ГЦ, мкм	220,293±23,889	250,159±32,14 $p_{m-u} < 0,0001$	301,055±18,505 $p_{m-u} < 0,05$	363,588±39,82 $p_{m-u} < 0,04$
Толщина ПАЛМ, мкм	336,3±30,2	428,2±28,6 $p_{m-u} < 0,03$	624,28±28 $p_{m-u} < 0,0000002036$	421,89±20,09 $p_{m-u} < 0,002$
Толщина стенки центральной артерии, мкм	11,58±0,72	14,21±0,65 $p_{m-u} < 0,012$	17,84±0,665 $p_{m-u} < 0,00000154$	14,22±0,66 $p_{m-u} < 0,0066$
Внутренний диаметр центральной артерии, мкм	12,58±1,75	18,91±1,38 $p_{m-u} < 0,05$	7,71±0,69 $p_{m-u} < 0,05$	13,72±1,27 $p_{m-u} = 0,62$
ИК	1,84±0,82	1,5±0,94 $p_{m-u} < 0,05$	4,63±1,9 $p_{m-u} < 0,05$	2,07±1,03 $p_{m-u} = 0,1$
ЛК	1,77±0,75	2,002±0,9 $p_{m-u} < 0,05$	1,24±0,39 $p_{m-u} < 0,05$	2,49±1,5 $p_{m-u} < 0,05$

Примечание. p_{m-u} – при сравнении с контрольной группой (N1).

Выявлено, что площадь (мкм²) и диаметр ГЦ (мкм) ЛУ селезенки крыс статистически значимо увеличивались при изолированном воздействии этилкарбаматом на организм животного (N3). Эти показатели по сравнению с аналогичными параметрами селезенки крыс контрольной группы (N1) были выше в 1,5 раза – площадь ГЦ ЛУ ($p_{m-u} < 0,0399$) и в 1,4 раза – диаметр ГЦ ЛУ ($p_{m-u} < 0,05$). Увеличение площади и диаметра ГЦ ЛУ селезенки крыс наблюдалось и в группе N4, но эти изменения были менее выраженные (табл. 2).

Также установлено, что при изолированном воздействии этилкарбамата на организм крысы (N3) происходило увеличение толщины ПАЛМ, уменьшение диаметра ЛУ селезенки, увеличение ЛК. В группе N4 (при комбинированном воздействии на организм крысы селеном и этилкарбаматом) наблюдались противоположные изменения структуры селезенки: увеличение диаметра ЛУ ($p_{m-u} < 0,04$), толщины ПАЛМ ($p_{m-u} < 0,002$) и ЛК ($p_{m-u} < 0,05$) (табл. 2).

Показатели толщины стенки и внутреннего диаметра центральной артерии селезенки крыс при изолированном и комбинированном воздействии этилкарбамата и селена менялись синхронно (табл. 2). В группе N3, где крысы не получали селен, а оказывалось изолированное воздействие этилкарбамата на их организм, наблюдалось увеличение толщины стенки центральной артерии ($p_{m-u} < 0,00000154$), уменьшение ее внутреннего диаметра ($p_{m-u} < 0,05$). Это указывает на ухудшение кровотока в селезенке, что подтвердилось полученными значениями ИК (табл. 2).

Качественная визуальная оценка белой пульпы селезенки при электронной микроскопии позволила выявить более плотное скопление лимфоцитов на разных стадиях их созревания (N2). При этом в лимфоцитах селезенки

определялось незначительное количество (3–4 усл. ед.) митохондрий без признаков деформации. Наблюдалась концентрация гетерохроматина по периферии ядра лимфоцита в виде ободка большими глыбами. У крыс в группе N3 определялась следующая трансформация структуры селезенки: агрегирование макрофагов, увеличение количества митохондрий в 4–5 раз в лимфоцитах и плазматических клеток до 2–3 на единицу среза. Обнаруживали интенсивную выраженную эндоплазматическую сеть и комплекс Гольджи с увеличенными рибосомами (до 7–9 усл. ед.).

В структуре селезенки экспериментальных животных при комбинированном воздействии селена и этилкарбамата наблюдалось увеличение различных переходных форм лимфоцитов, увеличение количества митохондрий до 5–6 усл. ед. с их размещением в суженной цитоплазматической зоне лимфоцитов.

Установлено, что в группе N3 через месяц после инъекции этилкарбамата преобладали ЛУ с ГЦ, у которых выявлено увеличение площади ГЦ, и возникло снижение ЛК. Перечисленные отклонения указывали на угнетение клеточного иммунного ответа и на преобладание гуморального. Полученные результаты совпадали с данными И.С. Цветкова с соавт. (2018), которые описали гиперплазию ГЦ и обосновали смещение баланса Тх-1 и Тх-2 в сторону индукции гуморального иммунного ответа [5]. Результаты исследования позволили установить, что этилкарбамат привел к увеличению толщины и уменьшению диаметра центральной артерии. Повышение ИК, по данным В.П. Волкова, указывает на снижение кровотока в органе [1, 3]. Изменения в центральной артерии селезенки могли быть связаны с аномальным ангиогенезом [17]. Вероятно, в толще ее стенки происходили склеротические трансформации. Кроме этого, эти изменения в артерии, согласно исследованию Л.А. Шарифудиновой [9], указывали на периваскулярный отек, который привел к нарушению гемодинамики и поступлению циркулирующих лимфоцитов в иммунокомпетентные зоны селезенки. Таким образом, в селезенке в группе N3 через месяц после инъекции этилкарбамата возникло преобладание В-клеточного иммунного ответа.

Выявлено, что в группе N2 через месяц с момента завершения приема селена крысами-самцами морфологические и морфометрические параметры селезенки изменены и включали: преобладание первичных ЛУ над вторичными, увеличение ЛК и незначительное снижение ИК. Полученные изменения указывали, что на фоне приема микроэлемента в селезенке преимущественно активны зоны, ответственные за Т-клеточное звено иммунного ответа. Это подтверждалось исследованием, опубликованным в *Journal of Functional Foods* авторами X. Zhang et al. (2020), в котором отмечалось, что селен способствовал регуляции и стимуляции дифференцировки Т-клеток, адгезии и миграции лимфоцитов, а также активности макрофагов [35], что стимулировало увеличение клеточного иммунного ответа. В работе S. Qin et al. (2015) подтверждались и согласовывались результаты с нашим исследованием, в котором селенит натрия индуцировал лимфоциты селезенки и способствовал активности Т-клеточного звена иммунного ответа [22]. Также прием микроэлемента вызывал увеличение диаметра центральной артерии, тем самым усиливал приток клеток и их заселение в соответствующие зоны, а также улучшал кровоток в паренхиме [1]. Предположительно, по этой причине в качестве ответной реакции изменилась площадь лимфоидных узелков и ПАЛМ.

В группе N4 при комбинированном поступлении селена и этилкарбамата установлены гиперпластические признаки белой пульпы, проявлявшиеся увеличением площади и диаметра ЛУ. ИК увеличивался незначительно по сравнению

с контрольной группой, что указывало на защитные свойства селена от повреждения, вызванного этилкарбаматом. Это предположение подтверждали научные исследования о влиянии селена на сердечно-сосудистую систему за счет включения его в состав ферментов, например, глутатионпероксидазы – 1 (GX-1) [17, 27, 32]. GX-1 защищала клетки от окислительного повреждения. Лимфоидный коэффициент был значительно повышен по сравнению с контрольной группой. Это указывало на то, что Т-зависимая зона селезенки устойчива к воздействию этилкарбамата. Селен на данном сроке снижал воздействие этилкарбамата на развитие воспалительного процесса в легких и не вызывал изменений в селезенке. Данное предположение требует дальнейшего исследования.

Выводы. Через месяц после внутрибрюшинной инъекции этилкарбамата в дозе 1 г/кг массы тела у крыс-самцов было установлено уменьшение массы тела и селезенки крысы, а также выявлены морфологические и морфометрические изменения структуры селезенки, указывающие на угнетение клеточного иммунного ответа, преобладание В-клеточного звена и ухудшение показателей пропускной способности центральной артерии селезенки.

Через месяц с момента завершения поступления селена в организм крысы (20 мкг/кг массы тела) было установлено преобладание Т-клеточного звена иммунного ответа и улучшение показателей пропускной способности центральной артерии селезенки.

При комбинированном воздействии селена и этилкарбамата на организм крысы-самца выявили морфологические и морфометрические изменения селезенки, указывающие на улучшение пропускной способности центральной артерии селезенки и преобладание Т-клеточного звена иммунного ответа.

Литература

1. Волков В.П. Новый алгоритм морфометрической оценки функциональной иммуноморфологии селезенки // *Universum: медицина и фармакология*. 2015. № 5-6(18). С. 6.
2. Зайцев В.Б., Федоровская Н.С., Железнов Л.М. Морфометрические особенности структуры селезенки // *Вестник новых медицинских технологий*. 2018. Т. 25, № 3. С. 153–159.
3. Изменения белой пульпы селезенки у потомства спленэктомированных крыс различных возрастных периодов после введения 1, 2-диметилгидразина / О.М. Арлашкина, Г.Ю. Стручко, Л.М. Меркулова, М.Н. Михайлова // *Клиническая и экспериментальная морфология*. 2019. Т. 8, № 4. С. 49–58.
4. Механизмы действия модифицированной наночастицами селена минеральной воды «Красноармейский новый» / А.В. Абрамцова, Г.В. Сагадян, Л.А. Пигунова и др. // *Курортная медицина*. 2016. № 1. С. 26–34.
5. Морфологические изменения органов иммунной системы у самцов мышей C57BL/6 при воздействии высокой дозы тестостерона / И.С. Цветков, М.Т. Добрынина, В.А. Мхитаров [и др.] // *Клиническая и экспериментальная морфология*. 2018. № 2(26). С. 19–24. DOI: 10.31088/2226-5988-2018-26-2-19-24.
6. Никитенко О.В., Путалова И.Н. Структурно-клеточные перестройки лимфоидных органов после внутрибрюшинного введения селенита натрия в токсической дозе // *Вестник новых медицинских технологий*. 2010. Т. 17, № 2. С. 32–35.
7. Синдирева А.В., Майданюк Г.А., Голубкина Н.А. Влияние селена на содержание микроэлементов в печени крыс линии Wistar // *Вестник Нижневартковского государственного университета*. 2018. № 3. С. 103–109.
8. Характеристика иммуноморфологических процессов в селезенке пациентов с иммунной тромбоцитопенией / Н.С. Федоровская, Л.М. Железнов, С.В. Петров, В.Б. Зайцев // *Журнал анатомии и гистопатологии*. 2020. Т. 9, № 3. С. 54–63.
9. Шарафутдинова Л.А., Валиуллин В.В. Морфологическая характеристика селезенки крыс при воздействии на организм наночастиц диоксида титана // *Вестник Уральской медицинской академической науки*. 2018. Т. 15, № 6. С. 830–839.
10. Bae M., Kim H. The role of vitamin C, vitamin D, and selenium in immune system against COVID-19. *Molecules*, 2020, vol. 25, no. 22, pp. 5346.
11. Crane G.M., Liu Y.C., Chadburn A. Spleen: development, anatomy and reactive lymphoid proliferations. *Seminars in Diagnostic Pathology*. WB Saunders, 2021, vol. 38, no. 2, pp. 112–124.

12. Elmore S.A. Enhanced histopathology of the spleen. *Toxicologic pathology*, 2006, vol. 34, no. 5, pp. 648–655.
13. Ermolina E.V., Stadnikov A.A., Smoliagin A.I. Morphological features of the organs of the immune system in conditions of exposure to chromium and benzene. *Gigiena i Sanitariia*, 2012, vol. 3, pp. 69–71.
14. Fazliddinova M.G., Uygunovich N.A. Comparison of the results of morphological changes observed in the spleen under the influence of carcinogens in the experiment. *IQRO*, 2023, vol. 2, no. 1, pp. 273–278.
15. Guo C.H., Wang S.Y., Chung C.H. et al. Selenium modulates AR/IGF-1R/EGFR and TROP2 signaling pathways and improves anticancer efficacy in murine mammary carcinoma 4T1. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, 2023, vol. 120, pp. 109417.
16. Jiao Z., Dong Y., Chen Q. Ethyl carbamate in fermented beverages: presence, analytical chemistry, formation mechanism, and mitigation proposals. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 2014, vol. 13, no. 4, pp. 611–626.
17. Ju W., Li X., Li Z. et al. The effect of selenium supplementation on coronary heart disease: A systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology*, 2017, vol. 44, pp. 8–16.
18. Li G. et al. A survey of ethyl carbamate in beer from Chinese market. *Food Control*, 2017, vol. 79, pp. 254–257.
19. Li G.G., Guo Z.Z., Ma X.F. et al. The M2 macrophages induce autophagic vascular disorder and promote mouse sensitivity to urethane-related lung carcinogenesis. *Developmental & Comparative Immunology*, 2016, vol. 59, pp. 89–98.
20. Mebius R.E., Kraal G. Structure and function of the spleen. *Nature reviews immunology*, 2005, vol. 5, no. 8, pp. 606–616.
21. Munn L. L. Cancer and inflammation. *Wiley Interdisciplinary Reviews: Systems Biology and Medicine*, 2017, vol. 9, no. 2, pp. 1370.
22. Qin S. et al. Effects of selenium-chitosan on blood selenium concentration, antioxidation status, and cellular and humoral immunity in mice. *Biological Trace Element Research*, 2015, vol. 165, pp. 145–152.
23. Rataan A.O., Geary S.M., Zakharia Y. et al. Potential role of selenium in the treatment of cancer and viral infections. *International journal of molecular sciences*, 2022, vol. 23., no. 4, pp. 2215.
24. Razaghi A., Geary S.M., Zakharia Y. et al. Selenium stimulates the antitumour immunity: Insights to future research. *European Journal of Cancer*, 2021, vol. 155, pp. 256–267.
25. Roman M., Jitaru P., Barbante C. Selenium biochemistry and its role for human health. *Metallomics*, 2014, vol. 6, no. 1, pp. 25–54.
26. Rosin F.C.P. et al. Identification of myeloid-derived suppressor cells and T regulatory cells in lung microenvironment after Urethane-induced lung tumor. *International immunopharmacology*, 2011, vol. 11, no. 7, pp. 873–878.
27. Ruseva B., Atanasova M., Georgieva M. et al. Effects of selenium on the vessel walls and anti-elastin antibodies in spontaneously hypertensive rats. *Experimental Biology and Medicine*, 2012, vol. 237, no. 2, pp. 160–166.
28. Sozio F., Schioppa T., Sozzani S. et al. Urethane-induced lung carcinogenesis //Methods in cell biology. *Academic Press*, 2021, vol. 163, pp. 45–57.
29. Stathopoulos G. T. et al. Epithelial NF-κB activation promotes urethane-induced lung carcinogenesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2007, vol. 104, no. 47, pp. 18514–18519.
30. Steiniger B.S. Human spleen microanatomy: why mice do not suffice. *Immunology*, 2015, vol. 145, no. 3, pp. 334–346.
31. Stupin A., Cosic A., Novak S. et al. Reduced dietary selenium impairs vascular function by increasing oxidative stress in Sprague-Dawley rat aortas. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 2017, vol. 14, no. 6, p. 591.
32. Tai Y. et al. Molecular mechanisms of T cells activation by dendritic cells in autoimmune diseases. *Frontiers in pharmacology*, 2018, vol. 9, pp. 642.
33. Wen Y. et al. Chronic inflammation, cancer development and immunotherapy. *Frontiers in pharmacology*, 2022, vol. 13, pp. 1040163.
34. Xu C. et al. Inflammation has a role in urethane-induced lung cancer in C57BL/6J mice. *Molecular medicine reports*, 2016, vol. 14, no. 4, pp. 3323–3328.
35. Zhang X. et al. Effects of dietary selenium on immune function of spleen in mice. *Journal of Functional Foods*, 2022, vol. 89, pp. 104914.
36. Zhu Y., Pu Q., Zhang Q. et al. Selenium-binding protein 1 inhibits malignant progression and induces apoptosis via distinct mechanisms in non-small cell lung cancer. *Cancer medicine*, 2022, vol. 12, no. 16, pp. 17149–17170.

САМАКИНА ЕКАТЕРИНА СТАНИСЛАВОВНА – старший преподаватель кафедры факультетской терапии, Чувашский государственный университет, Россия, Чебоксары (ekaterina1996.96@mail.ru; ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-9515-0639>).

СТРУЧКО ГЛЕБ ЮРЬЕВИЧ – доктор медицинских наук, профессор кафедры факультетской терапии, Чувашский государственный университет, Россия, Чебоксары (glebstr@mail.ru; ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-0549-5116>).

МЕРКУЛОВА ЛАРИСА МИХАЙЛОВНА – доктор медицинских наук, профессор кафедры нормальной и топографической анатомии с оперативной хирургией, Чувашский государственный университет, Россия, Чебоксары (merkulova192@mail.ru; <https://orcid.org/0000-0001-7460-6791>).

КОСТРОВА ОЛЬГА ЮРЬЕВНА – кандидат медицинских наук, доцент кафедры факультетской терапии, Чувашский государственный университет, Россия, Чебоксары (evkbiz@yandex.ru; ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-7057-9834>).

НЮГАНЕН АННА ОЛЕГОВНА – младший научный сотрудник, врач-патологоанатом, Национальный медицинский исследовательский центр онкологии имени И.Н. Петрова, Россия, Санкт-Петербург (carridwenmcfall@gmail.com; ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-2685-5093>).

Ekaterina S. SAMAKINA, Gleb Yu. STRUCHKO, Larisa M. MERKULOVA,
Olga Yu. KOSTROVA, Anna O. NYUGANEN

ASSESSMENT OF RAT SPLEEN STRUCTURE UNDER AN ISOLATED AND COMBINED ACTION OF SELENIUM AND ETHYL CARBAMATE

Key words: spleen, morphology, morphometry, selenium exposure, ethyl carbamate exposure.

The immune system, having a complex structural organization, performs the main functions in providing an anti-inflammatory and antitumor immune response. The spleen, as a peripheral organ of the immune system, plays an important role in realization of these functions and contains a significant number of immune cells. Ethylcarbamate, being a group 2A carcinogen, can provoke the development of neoplastic processes through activation of Kras gene mutation and stimulation of oncogenic signals. Alongside with that, selenium affects the immune response, reducing the proliferation of tumor cells and producing an anti-inflammatory effect. Despite the existence of several studies on the effect of ethyl carbamate and selenium on the animal body, there is no data on the combined effect of these substances on the rat spleen under experimental conditions in the scientific literature.

The aim of the study was to evaluate morphological and morphometric changes in the structure of the spleen in male rats with oral administration of selenium into their body and intraperitoneal injection of ethyl carbamate.

Materials and methods of the study. The body mass of male rats and their spleen were studied, morphological and morphometric parameters of the spleen were evaluated, the lymphoid coefficient and the Kernoghan index were calculated. The animals were divided into four groups: N1 – control group; N2 – animals receiving selenium with drinking water; N3 – animals injected intraperitoneally with ethyl carbamate; N4 – animals receiving selenium with drinking water followed by injection of ethyl carbamate.

Results. It was found that in the group 2, the area of lymphoid nodules was reduced, the Kernoghan index was reduced and the lymphoid coefficient was increased, while the body weight of rats and their spleen remained unchanged. In a month after an isolated intake of ethyl carbamate, both the body weight and the spleen weight in rats were significantly decreased. At this, in group 3, the area and the diameter of the germinal center, the thickness of the periarterial lymphoid sheath and the Kernoghan index were increased, and the lymphoid coefficient was reduced. At the ultramicroscopic level, an increase in the number of plasma cells was detected in group N3, as well as the number of swollen mitochondria in lymphocytes. In group 4, an increase in the area and the diameter of lymphoid nodules, the germinal center, as well as the lymphoid coefficient was determined, and the Kernoghan index was unchanged. When studying ultrathin sections in group 4 lymphocytes of various transitional forms were revealed.

Conclusions. It was found that against the background of selenium intake into the body of male rats, a morphological rearrangement of the white pulp of the spleen occurred, probably associated with the reaction of T-lymphocytes. Ethyl carbamate injection resulted in a predominant effect on the B-cell link of the immune response of the spleen. In combined intake of selenium and ethyl carbamate, hyperplasia of the white pulp was revealed, consisting in an increase in its structures.

References

1. Volkov V.P. *Novyi algoritm morfometricheskoi otsenki funktsional'noi immunomorfologii slezenki* [A new algorithm for morphometric evaluation of functional immunomorphology of the spleen]. *Universum: meditsina i farmakologiya*, 2015, vol. 19, no. 2, p. 6.
2. Zaitsev V.B., Fedorovskaya N.S., Zheleznov L.M. *Morfometricheskie osobennosti struktury slezenki* [Morphometric features of the spleen structure]. *Vestnik novykh meditsinskikh tekhnologii*, 2018, vol. 25, no. 3, pp. 153–159.
3. Arlashkina O.M., Struchko G.Yu., Merkulova L.M., Mikhaylova M.N. *Izmeneniya beloi pulpy slezenki u potomstva splenektomirovannykh krys razlichnykh vozrastnykh periodov posle vvedeniya 1, 2-dimetilgidrazina* [Changes in the white pulp of the spleen in the offspring of splenectomized rats of various age periods after administration of 1, 2-dimethylhydrazine]. *Nauchno-prakticheskiy retsenziruemyy zhurnal Klinicheskaya i eksperimental'naya morfologiya*, 2019, vol. 8, no. 4, pp. 49–58.
4. Abramtsova A.V., Sagradyan G.V., Piguonova L.A. et al. *Mekhanizmy deistviya modifitsirovannoi nanochastitsami selena mineral'noi vody «Krasnoarmeiskii novyi»* [Mechanisms of action of mineral water modified with selenium nanoparticles "Krasnoarmeyskiy novyi"]. *Kurortnaya meditsina*, 2016, no. 1, pp. 26–34.
5. Tsvetkov I.S., Dobrynina M.T., Mkhitarov V.A. et al. *Morfologicheskie izmeneniya organov immunnnoi sistemy u samtsov myshei S57BL/6 pri vozdeistvii vysokoi dozy testosterona* [Morphological changes in the immune system organs of male C57BL/6 mice under the influence of a high dose of testosterone]. *Klinicheskaya i eksperimental'naya morfologiya*, 2018, no. 2(26), pp. 19–24. DOI: 10.31088/2226-5988-2018-26-2-19-24.
6. Nikitenko O.V., Putalova I.N. *Strukturno-kletochnye perestroiki limfoidnykh organov posle vnutribryushinnogo vvedeniya selenita natriya v toksicheskoi doze* [Structural and cellular rearrangements of lymphoid organs after intraperitoneal administration of sodium selenite in a toxic dose]. *Vestnik novykh meditsinskikh tekhnologii*, 2010, vol. 17, no. 2, pp. 32–35.
7. Sindireva A.V., Maidanyuk G.A., Golubkina N.A. *Vliyanie selena na sodержanie mikroelementov v pecheni kryis linii wistar* [The effect of selenium on the content of trace elements in the liver of wistar rats]. *Vestnik Nizhnevartovskogo gosudarstvennogo universiteta*, 2018, no. 3, pp. 103–109.
8. Fedorovskaya N.S., Zheleznov L.M., Petrov S.V., Zaitsev V.B. *Kharakteristika immunomorfologicheskikh protsessov v slezenke patsientov s immunnnoi trombocitopeniei* [Characteristics of immunomorphological processes in the spleen of patients with immune thrombocytopenia]. *Zhurnal anatomii i gistopatologii*, 2020, vol. 9, no. 3, pp. 54–63.
9. Sharafutdinova L.A., Valiullin V.V. *Morfologicheskaya kharakteristika slezenki kryis pri vozdeistvii na organizm nanochastits dioksida titana* [Morphological characteristics of rats spleen when exposed to the nanoparticles of titanium dioxide]. *Vestnik Ural'skoi meditsinskoi aka-demicheskoi nauki*, 2018, vol. 15, no. 6, pp. 830–839.
10. Bae M., Kim H. The role of vitamin C, vitamin D, and selenium in immune system against COVID-19. *Molecules*, 2020, vol. 25, no. 22, pp. 5346.
11. Crane G.M., Liu Y.C., Chadburn A. Spleen: development, anatomy and reactive lymphoid proliferations. *Seminars in Diagnostic Pathology*. – WB Saunders, 2021, vol. 38, no. 2, pp. 112–124.
12. Elmore S.A. Enhanced histopathology of the spleen. *Toxicologic pathology*, 2006, vol. 34, no. 5, pp. 648–655.
13. Ermolina E.V., Stadnikov A.A., Smoliagin A.I. Morphological features of the organs of the immune system in conditions of exposure to chromium and benzene. *Gigiena i Sanitariia*, 2012, vol. 3, pp. 69–71.
14. Fazliddinova M.G., Uyunovich N.A. Comparison of the results of morphological changes observed in the spleen under the influence of carcinogens in the experiment. *IQRO*, 2023, vol. 2, no. 1, pp. 273–278.
15. Guo C.H., Wang S.Y., Chung C.H. et al. Selenium modulates AR/IGF-1R/EGFR and TROP2 signaling pathways and improves anticancer efficacy in murine mammary carcinoma 4T1. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, 2023, vol. 120, pp. 109417.
16. Jiao Z., Dong Y., Chen Q. Ethyl carbamate in fermented beverages: presence, analytical chemistry, formation mechanism, and mitigation proposals. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 2014, vol. 13, no. 4, pp. 611–626.
17. Ju W., Li X., Li Z. et al. The effect of selenium supplementation on coronary heart disease: A systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology*, 2017, vol. 44, pp. 8–16.
18. Li G. et al. A survey of ethyl carbamate in beer from Chinese market. *Food Control*, 2017, vol. 79, pp. 254–257.
19. Li G.G., Guo Z.Z., Ma X.F. et al. The M2 macrophages induce autophagic vascular disorder and promote mouse sensitivity to urethane-related lung carcinogenesis. *Developmental & Comparative Immunology*, 2016, vol. 59, pp. 89–98.
20. Mebius R.E., Kraal G. Structure and function of the spleen. *Nature reviews immunology*, 2005, vol. 5, no. 8, pp. 606–616.
21. Munn L. L. Cancer and inflammation. *Wiley Interdisciplinary Reviews: Systems Biology and Medicine*, 2017, vol. 9, no. 2, p. 1370.

22. Qin S. et al. Effects of selenium-chitosan on blood selenium concentration, antioxidation status, and cellular and humoral immunity in mice. *Biological Trace Element Research*, 2015, vol. 165, pp. 145–152.
23. Rataan A.O., Geary S.M., Zakharia Y. et al. Potential role of selenium in the treatment of cancer and viral infections. *International journal of molecular sciences*, 2022, vol. 23, no. 4, p. 2215.
24. Razaghi A., Geary S.M., Zakharia Y. et al. Selenium stimulates the antitumour immunity: Insights to future research. *European Journal of Cancer*, 2021, vol. 155, pp. 256–267.
25. Roman M., Jitaru P., Barbante C. Selenium biochemistry and its role for human health. *Metallomics*, 2014, vol. 6, no. 1, pp. 25–54.
26. Rosin F.C.P. et al. Identification of myeloid-derived suppressor cells and T regulatory cells in lung microenvironment after Urethane-induced lung tumor. *International immunopharmacology*, 2011, vol. 11, no. 7, pp. 873–878.
27. Ruseva B., Atanasova M., Georgieva M. et al. Effects of selenium on the vessel walls and anti-elastin antibodies in spontaneously hypertensive rats. *Experimental Biology and Medicine*, 2012, vol. 237, no. 2, pp. 160–166.
28. Sozio F., Schioppa T., Sozzani S. et al. Urethane-induced lung carcinogenesis //Methods in cell biology. *Academic Press*, 2021, vol. 163, pp. 45–57.
29. Stathopoulos G. T. et al. Epithelial NF-κB activation promotes urethane-induced lung carcinogenesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2007, vol. 104, no. 47, pp. 18514–18519.
30. Steiniger B.S. Human spleen microanatomy: why mice do not suffice. *Immunology*, 2015, vol. 145, no. 3, pp. 334–346.
31. Stupin A., Cosic A., Novak S. et al. Reduced dietary selenium impairs vascular function by increasing oxidative stress in Sprague-Dawley rat aortas. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 2017, vol. 14, no. 6, p. 591.
32. Tai Y. et al. Molecular mechanisms of T cells activation by dendritic cells in autoimmune diseases. *Frontiers in pharmacology*, 2018, vol. 9, pp. 642.
33. Wen Y. et al. Chronic inflammation, cancer development and immunotherapy. *Frontiers in pharmacology*, 2022, vol. 13, pp. 1040163.
34. Xu C. et al. Inflammation has a role in urethane-induced lung cancer in C57BL/6J mice. *Molecular medicine reports*, 2016, vol. 14, no. 4, pp. 3323–3328.
35. Zhang X. et al. Effects of dietary selenium on immune function of spleen in mice. *Journal of Functional Foods*, 2022, vol. 89, p. 104914.
36. Zhu Y., Pu Q., Zhang Q. et al. Selenium-binding protein 1 inhibits malignant progression and induces apoptosis via distinct mechanisms in non-small cell lung cancer. *Cancer medicine*, 2022, vol. 12, no. 16, pp. 17149–17170.

EKATERINA S. SAMAKINA – Senior Lecturer, Department of Faculty Therapy, Chuvash State University, Russia, Cheboksary (ekaterina1996.96@mail.ru; ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-9515-0639>).

GLEB Yu. STRUCHKO – Doctor of Medical Sciences, Professor, Department of Faculty Therapy, Chuvash State University, Russia, Cheboksary (glebstr@mail.ru; ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-0549-5116>).

LARISA M. MERKULOVA – Doctor of Medical Sciences, Professor, Department of the Normal and Topographic Anatomy, Chuvash State University, Russia, Cheboksary (merkulova192@mail.ru; <https://orcid.org/0000-0001-7460-6791>).

OLGA Yu. KOSTROVA – Candidate of Medical Sciences, Assistant Professor, Department of Faculty Therapy, Chuvash State University, Russia, Cheboksary (evkbiz@yandex.ru; ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-7057-9834>).

ANNA O. NYUGANEN – Junior Researcher, Pathologist, N.N. Petrov National Medical Research Center of Oncology, Russia, St. Petersburg (carridwenmcfall@gmail.com; ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-2685-5093>).

Формат цитирования: Оценка структуры селезенки крысы при изолированном и комбинированном действии селена и этилкарбамата [Электронный ресурс] / Е.С. Самакина, Г.Ю. Стручко, Л.М. Меркулова и др. // Acta medica Eurasica. 2024. № 4. С. 64–75. URL: <http://acta-medica-eurasica.ru/single/2024/4/7>. DOI: 10.47026/2413-4864-2024-4-64-75.