

УДК 616.15-006-097

**ИММУНОГИСТОХИМИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА
НЕКОТОРЫХ ПОКАЗАТЕЛЕЙ ТИМОПОЭЗА
ПРИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОМ КАНЦЕРОГЕНЕЗЕ****Москвичев Е.В., Меркулова Л.М., Стручко Г.Ю.***ФГБОУВПО «Чувашский государственный университет имени И.Н. Ульянова»,
Чебоксары, e-mail: anatomy@chuvsu.ru*

С помощью иммуногистохимического метода исследован тимус крыс с экспериментальной опухолью толстой кишки, индуцированной введением 1,2-диметилгидразина. Установлено, что уже на стадии предопухолевых изменений в слизистой оболочке толстой кишки в дольке тимуса достоверно изменяется экспрессия маркеров клеточной пролиферации и апоптоза по сравнению с животными из группы контроля. Сформировавшаяся опухоль толстой кишки так же достоверно меняет морфологию и молекулярный фенотип тимуса по сравнению с животными соответствующего возраста из групп контроля. В структурах железы опытных крыс отмечается повышение экспрессии Bcl-2 на фоне снижения его антагониста белка p53. При этом в тимусе крыс экспериментальной группы наряду с инволютивными изменениями отмечаются признаки повышения экспрессии маркеров клеточной пролиферации, а также увеличение числа зрелых форм тимоцитов коркового вещества.

Ключевые слова: инволюция тимуса, апоптоз, тимопоэз, опухолевая иммуносупрессия**IMMUNOHISTOCHEMICAL CHARACTERISTIC OF SOME INDICATORS
OF THYMOPOIESIS AT EXPERIMENTAL CARCINOGENESIS****Moskvichev E.V., Merkulova L.M., Struchko G.Y.***Chuvash State University named after I.N. Ulianov, Cheboksary, e-mail: anatomy@chuvsu.ru*

Thymus of rats with experimental large intestine tumour, induced by 1,2- dimethylhydrazine, was studied with the help of immune histochemical method. It was found that at the pretumorous stage marker expression of cellular proliferation and apoptose change in mucosa of large intestine in the thymic lobe if compared to the animals in the control group. The tumour of the large intestine definitely changes the thymic morphology and molecular phenotype in comparison with the animals of the same age in the control group. In the glands structures of experimental rats noted increased expression of Bcl-2 in on the background decreased of his antagonist – p53 protein. At the same time except the involuntary changes of rat thymus in the experimental group we can see the signs of marker expression increase of cellular proliferation and also increase in number of mature thymocyte forms in cortical substance.

Keywords: thymic involution, apoptosis, thymopoiesis, tumor immunosuppression

Рост злокачественных новообразований зачастую сопровождается угнетением иммунного ответа, при этом опухоль перестает распознаваться как чужеродная ткань и ускользает от иммунного надзора [5, 10]. Существует несколько механизмов иммуносупрессивного действия опухоли [8]. Один из них реализован на способности опухоли к образованию иммуносупрессивных T-reg клеток с фенотипом CD3+/CD4+/CD25+/Foxp3 в зоне локального иммунного ответа, которые угнетают местный иммунитет [4]. Известно, что иммуносупрессивные T-reg клетки могут происходить из зрелых периферических T-хелперов, число которых значительно возрастает при опухолевом росте [1]. Другой механизм основан на прямом иммуносупрессивном влиянии продуктов метаболизма опухоли и ее биологически активных веществ на иммунные органы, что снижает продукцию ими иммунокомпетентных клеток либо приводит к выработке дефектных цитотоксических лимфоцитов [7], кроме того, опухоль способна на-

рушать поступление клеток предшественников в иммунокомпетентные органы без снижения их синтеза в костном мозге.

Тимус – центральный орган иммуногенеза, который подвергается инволютивным изменениям при канцерогенезе, в некоторых случаях это приводит к снижению тимопоэза [9], однако механизмы инволюции изучены недостаточно. Доступные литературные данные немногочисленны и, зачастую, противоречивы. Так, например, одни авторы указывают на недостаточное поступление в железу костномозговых предшественников тимопоэза [2], в то время как другие это нарушение отрицают [9]. В работах Vesky Adkins с соавт. (2000) [3] было сделано предположение, что злокачественные опухоли могут усиливать апоптоз, а также нарушать созревание и дифференцировку тимоцитов в зрелые формы, однако это предположение не было доказано экспериментально. На основании вышеизложенного целью исследования явилось исследование характеристик клеточной

пролиферации, дифференцировки и апоптоза тимоцитов, а также компонентов их микроокружения в тимусе крыс с экспериментальной опухолью толстой кишки.

Материалы и методы исследования

Работа выполнена на 50 белых нелинейных крысах-самцах массой 180–220 г. Уход и содержание животных проводили в соответствии с «Правилами проведения работ с использованием экспериментальных животных». Крысы были разделены на три группы. Первой группе (30 крыс) внутривенно вводили 1,2-диметилгидразин из расчета 20 мг/кг массы 1 раз в неделю в течение 5 недель в соответствии с экспериментальной моделью [6]. Второй группе животных (группа контроля – 10 крыс) вводили изотонический раствор хлорида натрия. Изменения в опытной и контрольной группе сравнивали с интактными животными третьей группы соответствующего возраста (10 крыс). Выведение животных из эксперимента проводилось через 30, 90, и 150 суток после окончания курса введения канцерогена путем декапитации. Одновременно выводились и контрольные животные соответствующего возраста. Объектом исследования служил тимус. В работе применялись следующие методы:

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

а) МКАТ к кластеру дифференцировки лимфоцитов 3 типа (CD 3);

б) МКАТ к маркеру клеточной пролиферации Ki-67;

в) МКАТ к белку-регулятору апоптоза p-53;

г) МКАТ к антиапоптотическому белку bcl-2.

Материал для исследования иммуногистохимическими методами фиксировали 10% нейтральным забуференным формалином в течение 24 ч, заливали в парафин, готовили срезы толщиной 4 мкм. Срезы наносили на высокоадгезивные стекла и высушивали при температуре 37°C в течение 18 часов. Демаскировка и иммуногистохимическая окраска проводилась на иммуногистохимическом автостейнере Thermo Autostainer 360 (Великобритания). Контролем иммуногистохимической реакции служила неиммунизированная кроличья и мышьяная сыворотка. Результат реакции оценивали с применением микроскопа Leica DM4000B (Германия) путем подсчета позитивно окрашенных клеток на 100 клеток в десяти полях зрения, выражая результаты в процентах и единицах в поле зрения.

2. Окраска гематоксилином и эозином для оценки общегистологической картины и проведения морфометрических измерений.

3. Компьютерная морфометрия с использованием лицензионных программ Leica application suite 3.6.0 (Германия) и Микроанализ (Россия).

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

Результаты исследования и их обсуждение

Обработка препаратов тимуса молодых интактных крыс 4 месяцев антителами к CD 3 выявляет многочисленные зрелые тимоциты, которые занимают 14,13% поля

зрения коркового и 56,9% мозгового вещества. Окраска препаратов антителами к bcl-2 выявляет единичные клетки, расположенные в мозговом веществе и на границе мозгового и коркового вещества. Их число не превышает $2,72 \pm 0,18$ в поле зрения. Исследование экспрессии p-53 демонстрирует позитивную реакцию в единичных клетках коркового и мозгового вещества. Обработка препаратов тимуса маркером клеточной пролиферации Ki-67 выявляет многочисленные пролиферирующие клетки в корковом и мозговом веществе. Установлено, что положительную реакцию с Ki-67 дают 9,42% клеток мозгового и 34,8% клеток коркового вещества.

Через месяц после окончания введения канцерогена в слизистой оболочке толстой кишки крыс формируются очаговые пролифераты крипт без признаков клеточной атипии. При окраске тимуса антителами к CD 3 отмечается положительная реакция в многочисленных клетках коркового и мозгового вещества, число которых достоверно не отличается от интактных и контрольных животных соответствующего возраста. Обработка препаратов тимуса антителами к белкам-регуляторам апоптоза bcl-2 и p-53 выявляет немногочисленные клетки, локализованные в корковом и мозговом веществе, число которых также достоверно не отличается от значений у интактных и контрольных животных. Исследование маркера клеточной пролиферации не выявляет достоверных отличий в количестве пролиферирующих клеток по сравнению с интактными животными соответствующего возраста и крысами с введением физиологического раствора.

Через три месяца после окончания введения канцерогена в пролифератах кишечных крипт на фоне локальной иммунной реакции прослеживаются явления клеточной дисплазии. Окраска препаратов тимуса крыс экспериментальной группы антителами к CD 3 демонстрирует достоверное снижение количества клеток, экспрессирующих этот антиген, в корковом веществе по сравнению с интактными и контрольными животными, тогда как в мозговом веществе достоверные изменения отсутствовали. Обработка препаратов тимуса антителами к антиапоптотическому белку bcl-2 демонстрирует более чем трехкратное увеличение экспрессии этого антигена в клетках коркового и мозгового вещества по сравнению с интактными и контрольными животными соответствующего возраста. Определение белка p-53 не выявило достоверных отличий в его экспрессии в группах экспериментальных и контрольных животных. При

исследовании маркера клеточной пролиферации Ki-67 отмечено небольшое, но достоверное увеличение экспрессии этого антигена в структурах коркового вещества до 46,4%, тогда как экспрессия Ki-67 в структурах мозгового вещества достоверно не изменялась.

Через пять месяцев после окончания введения канцерогена в толстой кишке формируется одна, реже две злокачественные опухоли, имеющие морфологию дифференцированной аденокарциномы. В тимусе крыс экспериментальной группы на этом сроке определяются признаки инволюции в виде уменьшения площади долики и мозгового вещества, а так-

же толщины коркового вещества. Снижение морфометрических характеристик сопровождается уменьшением относительной массы железы, а также замещением тимической паренхимы жировой тканью. Обработка препаратов тимуса антителами к CD 3 выявляет достоверное увеличение количества зрелых тимоцитов в корковом веществе по сравнению с интактными крысами и животными из группы контроля, при этом изменения в количестве этих клеток в мозговом веществе достоверно не отличаются от других групп (рис. 1, 2).

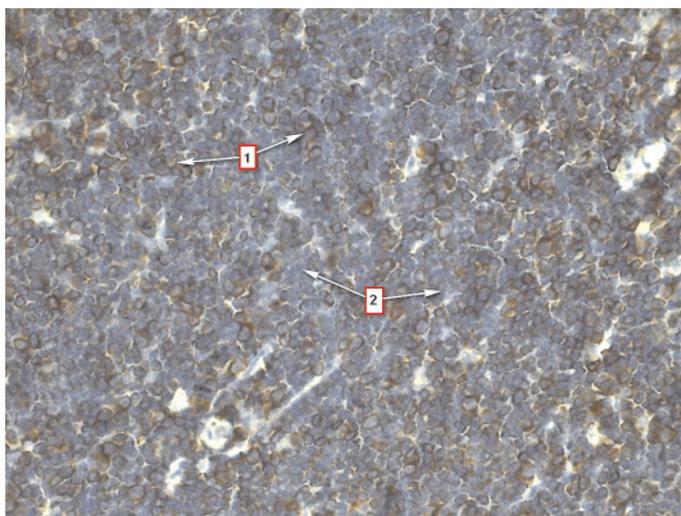


Рис. 1. Тимус интактной крысы 9 месяцев. Экспрессия CD3 в тимоцитах коркового вещества: 1 – тимоциты, дающие мембранную реакцию с CD3; 2 – незрелые тимоциты. Иммуногистохимическая реакция с CD3. Ув. 400

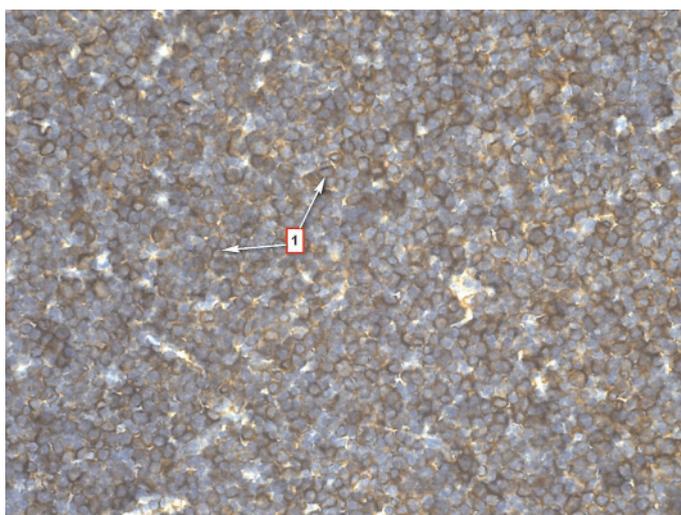


Рис. 2. Тимус крысы через 5 месяцев после введения канцерогена. Увеличение числа клеток, экспрессирующих CD3 в корковом веществе: 1 – тимоциты, дающие мембранную реакцию с CD3. Иммуногистохимическая реакция с CD3. Ув. 400

Мы считаем, что увеличение количества зрелых форм тимоцитов в корковом веществе может быть обусловлено как нарушением по-

ступления незрелых костно-мозговых предшественников вследствие токсического влияния опухоли, так и увеличением числа дифферен-

цированных форм [2]. Окраска тимуса антителами к маркеру клеточной пролиферации Ki-67 выявляет достоверное увеличение числа пролиферирующих клеток в корковом и моз-

говом веществе по сравнению с интактными крысами соответствующего возраста, а также контрольными животными с введением физиологического раствора (рис. 3, 4).

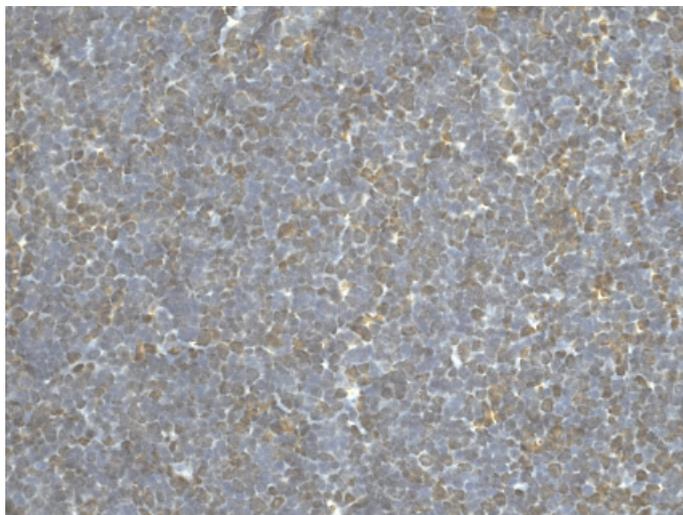


Рис. 3. Тимус интактной крысы 9 месяцев. Экспрессия Ki-67 в ядрах клеток коркового вещества. Иммуногистохимическая реакция к Ki-67. Ув. 400

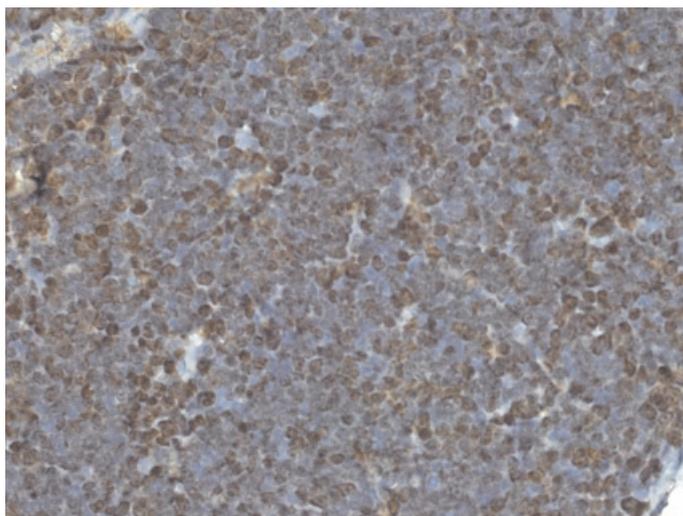


Рис. 4. Тимус крысы через 5 месяцев после введения канцерогена. Увеличение клеток, экспрессирующих Ki-67 в корковом веществе. Иммуногистохимическая реакция к Ki-67. Ув. 400

Исследование белка-ингибитора апоптоза bcl-2 в структурах тимуса демонстрирует более чем двукратное увеличение его экспрессии в структурах коркового и мозгового вещества у экспериментальных крыс по сравнению с интактными и контрольными животными соответствующего возраста. Обработка препаратов тимуса антителами к p-53 демонстрирует небольшое, но достоверное снижение экспрессии этого белка в структурах коркового вещества тимуса по сравнению с интактными и контрольными животными.

Нами установлено, что развивающаяся злокачественная опухоль толстой кишки

у крыс оказывает существенное влияние на морфологию тимуса, при этом достоверные изменения в железе регистрируются уже на этапе предопухолевых изменений слизистой оболочки кишки через три месяца после введения канцерогена. Это проявляется в увеличении экспрессии антиапоптотического белка bcl-2, а также в повышении экспрессии Ki-67 в корковом веществе тимуса. Мы считаем, что подобное усиление клеточной пролиферации следует рассматривать как иммунную реакцию организма на канцерогенез. Предопухолевые изменения в толстой кишке также сопровождаются

достоверным снижением числа зрелых кортикальных тимоцитов, что, в свою очередь, может быть обусловлено как усиленным поступлением в тимус незрелых костномозговых предшественников с фенотипом CD3-, так и миграцией зрелых клеток в зону локального иммунного ответа в слизистой оболочке толстой кишки.

Сформировавшаяся опухоль толстой кишки оказывает еще более существенное влияние на морфологию и молекулярный фенотип тимуса, при этом в железе, наряду с морфологическими изменениями, характерными для инволюции, отмечаются признаки усиления дифференцировки тимоцитов. Это проявляется в достоверном повышении экспрессии маркеров клеточной пролиферации, увеличении числа кортикальных тимоцитов, экспрессирующих CD3, а также в значительном увеличении экспрессии антиапоптотического белка bcl-2 в структурах мозгового вещества на фоне снижения экспрессии его антагониста – белка p-53 в корковом веществе железы. Таким образом, при экспериментальной опухоли толстой кишки в тимусе на фоне изменений, характерных для инволюции, регистрируются признаки усиления пролиферации и дифференцировки тимоцитов в зрелые формы, что, по-видимому, обусловлено формированием опухолевой иммунной толерантности [1, 5].

Работа выполнена в рамках государственного контракта №02.740.11.0708 ФЦП «Научные и научно-педагогические кадры инновационной России» на 2009–2013 гг.

Список литературы

1. Барышников Ю.А. Взаимодействие опухоли и иммунной системы // Практическая онкология. – 2003. – Т.4, №3. – С. 127–130.
2. Киселева Е.П. Механизмы инволюции тимуса при опухолевом росте // Успехи современной биологии. – 2004. – Т. 124. – С. 589–601.
3. Adkins B. Early Block in Maturation Is Associated with Thymic Involution in Mammary Tumor-Bearing Mice / Adkins B., Charyulu V., Sun Qi-Ling // The Journal of Immunology. – 2000. – Vol. 164. – P. 5635–5640.
4. 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.1, №27. – P. 129.
5. Costello R.T. Mechanisms of tumor escape from immunologic response / Costello R.T., Gastaut J.A., Olive D. // Rev Med Intern. – 1999. – Vol. 7, №20. – P. 579–588.

6. Gilbert J.M. Experimental colorectal cancer as a model of human disease // Ann R Coll Surg Engl. – 1987 – Vol. 69, №2. – P. 48–53.

7. Joyce E.O. VEGF inhibits T-cell development and may contribute to tumor-induced immune suppression // Blood, June 2003. – Vol. 101, №12. – P. 4878–4886.

8. Kavanaugh D.Y. Immunologic dysfunction in cancer / Kavanaugh D.Y., Carbone D.P. // Hematol Oncol Clin North Am. – 1996 Aug. – Vol. 10, №4. – P. 927–951.

9. Lopez D.M. Influence of breast cancer on thymic function in mice / Lopez D.M., Charyulu V., Adkins B. // J Mammary Gland Biol Neoplasia. – 2002. – Vol. 7, №2. – P. 191–199.

10. Whiteside T.L. The role of immune cells in the tumor microenvironment // Cancer Treat Res. – 2006. – Vol. 130. – P. 103–124.

References

1. Baryshnikov Ju.A. Vзаимodejstvie opuholi i immunnoj sistemy // Prakticheskaja onkologija 2003, T. 4, no. 3. pp. 127–130.
2. Kiseleva E.P. Mehanizmy involjucii timusa pri opuholevom roste // Uspehi sovremennoj biologii 2004 t. 124, pp. 589–601.
3. Adkins B. Early Block in Maturation Is Associated with Thymic Involution in Mammary Tumor-Bearing Mice / Adkins B., Charyulu V., Sun Qi-Ling // The Journal of Immunology, 2000 Vol. 164 pp. 5635–5640.
4. 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.1. no. 27 pp. 129.
5. Costello R.T. Mechanisms of tumor escape from immunologic response / Costello R.T., Gastaut J.A., Olive D. // Rev Med Intern. 1999. Vol. 7. no. 20 pp. 579–588.
6. Gilbert J.M. Experimental colorectal cancer as a model of human disease // Ann R Coll Surg Engl. 1987 Vol. 69. no. 2 pp. 48–53.
7. Joyce E.O. VEGF inhibits T-cell development and may contribute to tumor-induced immune suppression // Blood, June 2003 Vol. 101. no. 12 pp. 4878–4886.
8. Kavanaugh D.Y. Immunologic dysfunction in cancer / Kavanaugh D.Y., Carbone D.P. // Hematol Oncol Clin North Am. 1996 Aug. Vol. 10. no. 4 pp. 927–951.
9. Lopez D.M. Influence of breast cancer on thymic function in mice / Lopez D.M., Charyulu V., Adkins B. // J Mammary Gland Biol Neoplasia 2002 Vol. 7. no. 2 pp. 191–199.
10. Whiteside T.L. The role of immune cells in the tumor microenvironment // Cancer Treat Res. 2006 Vol. 130 pp. 103–124.

Рецензенты:

Киясов А.П., д.м.н., профессор, зав. кафедрой нормальной анатомии ГБОУ ВПО «Казанский государственный медицинский университет» Минздравсоцразвития РФ, г. Казань;
Суворова Г.Н., д.б.н., профессор, зав. кафедрой анатомии человека Самарского государственного медицинского университета, г. Самара.

Работа поступила в редакцию 14.08.2012.