

УДК 599.323.4-114.73]:616.345

**АКЦИДЕНТАЛЬНАЯ ИНВОЛЮЦИЯ ТИМУСА КРЫС НА ФОНЕ РАЗВИТИЯ АДЕНОКАРЦИНОМЫ ТОЛСТОЙ КИШКИ, ВЫЗВАННОЙ ВВЕДЕНИЕМ КАНЦЕРОГЕНА В РАЗЛИЧНОЙ ДОЗИРОВКЕ****Кострова О.Ю.***ФГБОУ ВПО «Чувашский государственный университет имени И.Н. Ульянова»,  
Чебоксары, e-mail: evkbiz@yandex.ru*

С помощью ряда иммуногистохимических, люминесцентно-гистохимических и общегистологических методов исследован тимус нелинейных лабораторных крыс-самцов через 30, 60, 90 и 120 суток после введения 1,2-диметилгидразина в общей дозе 40 и 80 мг/кг. Установлено, что введение в организм крыс 1,2-диметилгидразина в различной дозировке приводит к формированию акцидентальной инволюции тимуса на фоне роста злокачественной опухоли. Это выражается в деформации долек, в жировом перерождении органа, в уменьшении размеров коркового и мозгового вещества на фоне параллельного снижения массы тимуса, а также в увеличении количества тучных клеток с преобладанием молодых недегранулированных форм, S-100<sup>+</sup>, CD3<sup>+</sup>, CD1A<sup>+</sup>, PCNA<sup>+</sup> клеток. При этом процесс более выражен и начинается раньше у крыс с введением канцерогена в большей дозе.

**Ключевые слова:** тимус, канцерогенез, инволюция тимуса**ACCIDENTAL THYMIC INVOLUTION IN RATS IN THE BACKGROUND OF A COLON ADENOCARCINOMA INDUCED BY ADMINISTRATION OF A CARCINOGEN IN DIFFERENT GIVEN DOSE****Kostrova O.Y.***FGBOU VPO «Chuvash State University, I.N. Ulyanov», Cheboksary, e-mail: evkbiz@yandex.ru*

Through a series of immunohistochemical, luminescent-histochemical methods, and general histologic methods was studied the thymus of nonlinear laboratory male rats at 30, 60, 90 and 120 days after injection of 1,2-dimethylhydrazine in a total dose of 40 or 80 mg/kg. Found that the administration of a rat 1,2-dimethylhydrazine in different given dose leads to the formation of accidental thymic involution against the background of tumor growth. This is reflected in the deformation of the lobules, the fatty degeneration body, reducing the size of the cortex and medulla on the background of the parallel decrease in weight of the thymus, as well as an increase in the number of mast cells with a predominance of young non degranulated forms, S-100<sup>+</sup>, CD3<sup>+</sup>, CD1A<sup>+</sup>, PCNA<sup>+</sup> cells. The process is more pronounced and occurs earlier in the rats with the introduction of a carcinogen at a higher dose.

**Keywords:** thymus, carcinogenesis, the involution of the thymus

В последние годы отмечается значительный рост числа онкологических заболеваний во всем мире. Среди всех онкологических заболеваний опухоли желудочно-кишечного тракта являются одними из самых распространенных уже не первое десятилетие [2]. На сегодня уже достоверно известны сотни причин, повышающих риск развития злокачественной патологии. Установлено, что главная роль в реализации канцерогенного эффекта принадлежит нейроэндокринной и иммунной системе [3]. Известно, что опухоли развиваются на основе выраженных нарушений иммунной системы [10].

Иммунная система человека представляет собой очень сложную многокомпонентную структуру, включающую ряд органов и чрезвычайно большое число разнообразных иммунокомпетентных клеток [12]. Эта система является главным барьером на пути инфекций, а также играет важную роль в том, как организм будет реагировать на онкологическое заболевание. Одну из ведущих ролей в обеспечении противоракового иммунного ответа выполняет тимус, в котором

происходит дифференцировка основных популяций Т-лимфоцитов при регулирующем влиянии эпителиальных и дендритных клеток. От морфофункционального состояния тимуса зависит поддержание гомеостаза в организме и обеспечение стабильности его антигенных структур [5]. Считается, что при развитии опухолей инволюция тимуса и связанное с ней нарушение пополнения периферических Т-лимфоцитов лежит в основе развития Т-клеточного иммунодефицита [4, 7].

**Цель исследования** – изучить морфофункциональные изменения в тимусе крыс через 30, 60, 90 и 120 суток после введения 1,2-диметилгидразина в различной дозировке.

**Материал и методы исследования**

Исучен тимус 150 нелинейных крыс-самцов массой 150–180 г. При заборе материала учитывалась частота развития новообразований, их морфологические особенности, локализация. Кормление, уход и выведение из эксперимента крыс осуществляли в соответствии с правилами содержания лабораторных животных. Крысы были разделены на 3 группы. Первая (20 крыс) – интактные животные. Вторая

(60 крыс) – экспериментальные животные, которым вводили внутривенно 1,2-диметилгидразин в общей дозе 40 мг/кг. Третья (60 крыс) – экспериментальные животные с внутривенным введением 1,2-диметилгидразина в общей дозе 80 мг/кг.

Объектом исследования служил тимус, который забирали через 30, 60, 90 и 120 суток после последней инъекции, взвешивали, затем изготавливали криостатные срезы толщиной 10 мкм.

*Методы исследования:*

1. Иммуногистохимический метод с использованием моноклональных и поликлональных антител фирмы Santa Cruz: МКАТ к CD3 (маркер зрелых Т-лимфоцитов); МКАТ к CD1A (маркер кортикальных тимоцитов); МКАТ к PCNA (маркер пролиферирующих клеток); ПКАТ к белку S-100 (маркер клеток нейроэктодермального происхождения и дендритных клеток); МКАТ к тучным клеткам, положительным к триптазе.

2. Метод окраски полихромным толуидиновым синим по Унна – для качественной и количественной характеристики популяции тучных клеток тимуса.

3. Люминесцентно-гистохимический метод Кросса, Эвена, Роста – для идентификации гистаминсодержащих структур тимуса.

4. Люминесцентно-гистохимический метод Фалька-Хилларпа – для избирательного выявления катехоламин- и серотонинсодержащих структур тимуса.

5. Окраска гематоксилином-эозином с последующей морфометрией коркового и мозгового вещества долек.

6. Морфометрический метод с использованием программы Микро-Анализ для измерения размеров люминесцирующих гранулярных клеток, толщины коркового и площади мозгового вещества тимуса.

7. Статистическая обработка полученных цифровых данных проведена с помощью пакета программ Microsoft office (Word и Excel) на компьютере. Статистическую достоверность определяли критерием Стьюдента (t).

### **Результаты исследования и их обсуждение**

У интактных животных с помощью люминесцентной микроскопии выявляются дольки полигональной формы с хорошо различимым мозговым и корковым веществом. В паренхиме тимуса обнаруживаются люминесцирующие гранулярные клетки премедулярной, субкапсулярной зон и тучные клетки, которые различаются по форме, расположению, размеру, а также по числу, размеру и цвету гранул. Субкапсулярные клетки, диаметр которых в среднем составляет  $5,9 \pm 0,4$  мкм, беспорядочно располагаются на периферии коркового вещества. Диаметр премедулярных клеток составляет в среднем  $13,4 \pm 0,9$  мкм. В их цитоплазме содержатся крупные гранулы с беловато-желтой люминесценцией.

Нами с помощью постановки иммуногистохимических реакций установлено, что клетки мозгового вещества и кортико-медулярной зоны у интактных животных дают положительную реакцию на белок S-100, являющийся маркером дендритных клеток.

В тимусе интактных крыс на окрашенных гематоксилином-эозином срезах хорошо определяются дольки округлой, овальной или полигональной формы со светлым мозговым и темным корковым веществом. На срезах, окрашенных полихромным толуидиновым синим, в междольковых промежутках обнаруживается небольшое количество тучных клеток, среди которых преобладают слабо дегранулированные и дегранулированные формы.

Нами выявлено, что через 30 и 60 суток после введения экспериментальным животным 1,2-диметилгидразина в общей дозе 40 мг/кг, несмотря на выявленные при гистологическом исследовании признаки развивающейся опухоли толстой кишки, морфофункциональная картина тимуса исследованных животных сходна с таковой у интактных крыс.

При введении 1,2-диметилгидразина в общей дозе 80 мг/кг в эти же сроки исследования наблюдаются цитоморфологические изменения в тимусной дольке. Уменьшается масса тимуса, толщина коркового и площадь мозгового вещества. Граница коркового и мозгового вещества стерта, люминесцирующие гранулярные клетки располагаются хаотично по всей ткани. Использование моноклональных антител на белок S-100 дает достоверное увеличение количества дендритных клеток в 2 раза по сравнению с интактными крысами, в то время как число CD3<sup>+</sup>, CD1A<sup>+</sup> и PCNA<sup>+</sup> клеток незначительно отличается от интактной группы животных.

Через 90 суток после введения канцерогена у экспериментальных животных обеих групп отсутствуют дольки правильной округлой формы. В основном встречаются крупные полигональные дольки, которые либо принимают полулунную, либо веретенообразную форму. Увеличивается масса тимуса и площадь мозгового вещества. При этом большую часть паренхимы тимуса замещает жировая и соединительная ткань. При люминесцентной микроскопии увеличивается количество клеток. При окрашивании срезов полихромным толуидиновым синим выявляются дольки с большим количеством тучных клеток. При введении канцерогена в меньшей дозе эти клетки обнаруживаются не в соединительнотканых перегородках, а в прилежащей соединительной ткани. Отмечается увеличение количества S-100<sup>+</sup> клеток. При введении канцерогена в общей дозе 40 мг/кг и 80 мг/кг выявляется повышение CD3<sup>+</sup>, CD1A<sup>+</sup> и PCNA<sup>+</sup> клеток.

На более позднем сроке – через 120 суток – на фоне появления опухоли в проксимальном отделе толстой кишки у крыс

обеих групп выявляются значительные изменения в тимусе. Происходит сокращение массы тимуса, уменьшается площадь мозгового и толщина коркового вещества. При введении канцерогена в общей дозе 40 мг/кг при люминесцентной микроскопии выявляются дольки с малым количеством клеток, а в некоторых дольках визуализируются лишь их остатки в виде сплошных оранжеватых пятен или гранул с расплывчатыми контурами. Премедуллярные клетки малочисленны, встречаются скопления субкапсулярных клеток до 8–10 в поле зрения. При введении канцерогена в общей дозе 80 мг/кг выявляются деформированные дольки со множеством скоплений крупных, глыбчатых, ярко-желтых и наполненных гранулами ЛПК. На окрашенных гематоксилином-эозином срезах выявляется увеличение количества жировой и соединительной ткани. Количество тучных клеток вне зависимости от дозы введения 1,2-диметилгидразина увеличивается в основном за счет недегранулированных и слабдегранулированных форм. При этом у крыс с введением канцерогена в меньшей дозе эти клетки обнаруживаются в паренхиме тимуса. Иммуногистохимическими методами у животных обеих групп установлено увеличение числа дендритных и клеток, положительных к триптазе и уменьшение количества CD3<sup>+</sup>-, CD1A<sup>+</sup>- и PCNA<sup>+</sup> – клеток.

Таким образом, наши исследования показали, что введение крысам 1,2-диметилгидразина приводит к значительному уменьшению размеров коркового и мозгового вещества долек, их деформации, резкому сокращению массы тимуса, жировому перерождению органа, увеличению тучных клеток и к дисбалансу уровня биогенных аминов. По-нашему мнению, эти изменения свидетельствуют о развившейся острой инволюции тимуса [1, 11]. При этом процесс более выражен и начинается раньше при введении канцерогена в общей дозе 80 мг/кг.

В наших исследованиях установлено, что у животных с введением канцерогена в общей дозе 80 мг/кг по сравнению с крысами, которым вводили канцероген в меньшей дозе, опухоли имеют более агрессивный фенотип, что проявляется в гиперэкспрессии белка p53 и раннем появлении отдаленных метастазов. Кроме того, у животных этой группы выявлено формирование синхронных опухолей пищевода, имеющих морфологию плоскоклеточной карциномы на фоне массивного вирусного поражения [7].

Механизмы развития акцидентальной инволюции тимуса на фоне развития опухоли до сих пор остаются до конца не выясненными. Вероятно, это может быть связа-

но с прямой индукцией апоптоза тимоцитов [15] и уменьшением процента тимоцитов в S-стадии клеточного цикла [14]. Одним из ведущих считается недостаточное поступление клеток-предшественников в тимус, которые сохраняются в костном мозге в достаточном количестве и функционально полноценны. Считается также, что это может быть следствием миграции их в опухоль [13]. Кроме того, известно, что акцидентальная инволюция тимуса возникает как адаптационный механизм на стресс любой этиологии [9]. Можно предположить, что потенциальными индукторами инволюции тимуса могут быть глюкокортикоидные гормоны и такие цитокины, как TNF- $\alpha$ , IL-1, IL-4, TGF- $\beta$ , VEGF [8].

Безусловно, патогенез развития инволюции тимуса сложен и многоступенчат, однако, по нашему мнению, основная причина – дисфункция взаимодействия в системе «надпочечники–гипофиз–тимус» [6]. Посредниками взаимодействия эндокринной и иммунной систем в этом случае являются дендритные клетки, способные при их стимуляции секретировать те или иные иммунорегулирующие факторы, в том числе и биогенные амины. Увеличение уровня глюкокортикоидов в крови, а также рост содержания гистамина и серотонина в тимоцитах, что и наблюдается в нашем эксперименте, запускает необратимую реакцию запрограммированной гибели клетки (апоптоза).

#### Список литературы

1. Васендин Д.В., Мичурина С.В., Ищенко И.Ю. Морфологические изменения в тимусе в «катаболической» фазе после воздействия экспериментальной гипертермии // Сибирский медицинский журнал. – 2011. – Т. 101, № 2. – С. 33–35.
2. Егоренков В.В. Профилактика рака желудка и толстой кишки // Практическая онкология. – 2011. – Т.12. – № 2. – С. 70–75.
3. Забежинский М.А. Принципы первичной профилактики рака // Практическая онкология. – 2011. – Т.12. – № 2. – С. 57–61.
4. Киселева Е.П. Механизмы инволюции тимуса при опухолевом росте // Успехи современной биологии. – 2004. – Т. 124(6). – С. 102–114.
5. Ковешников В.Г., Бибик Е.Ю. Функциональная морфология органов иммунной системы. – Луганск: Виртуальная реальность, 2007. – 172 с.
6. Кострова О.Ю. Акцидентальная инволюция тимуса на фоне канцерогенеза в условиях иммуносупрессии / О.Ю. Кострова, Г.Ю. Стручко, Л.М. Меркулова, М.Н. Михайлова, И.С. Стоменская // Вестник молодых ученых Республики Башкортостан. – Уфа, 2012. – С. 33–38.
7. Михайлова М.Н. Участие дендритных и нейроэндокринных клеток тимуса в развитии его инволюции при формировании экспериментальной опухоли толстой кишки / М.Н. Михайлова, Г.Ю. Стручко, Л.М. Меркулова, О.Ю. Кострова и др. // Вестник Чувашского университета. – Чебоксары, 2011. – № 3. – С. 377–383.
8. Пинегин Б.В., Хаитов Р.М., Ярилин А.А. Руководство по клинической иммунологии. Диагностика заболеваний

ний иммунной системы: руководство для врачей. – М.: Гое-тар-Медиа, 2009. – 352 с.

9. Силантьева И.В. Анатомо-морфологические особенности и способы оценки поперечного размера и объема вилочковой железы у детей / И.В. Силантьева, Ю.И. Ровда, О.С. Бадина, И.Г. Хасанова // *Мать и дитя в Кузбассе*. – 2011. – № 2 (45). – С. 11–17.

10. Стручко Г.Ю. Акцидентальная инволюция тимуса на фоне развития злокачественной опухоли, осложненной иммунодефицитом / Г.Ю. Стручко, Е.В. Москвичев, Л.М. Меркулова, О.Ю. Кострова, М.Н. Михайлова // *Материалы II всероссийской научно-практической конференции с международным участием*. – Курск: КГМУ, 2011. – С. 256–257.

11. Турицына Е.Г. Морфологические и этиологические аспекты акцидентальной инволюции тимуса птиц // *Аграрный вестник Урала*. – 2009. – № 12(66). – С. 74–76.

12. Чернушенко Е.Ф. Диагностика вторичных иммунодефицитных состояний // *Искусство лечения*. – 2006. – № 2(28). – С. 5–12.

13. Accidental involution of Thymus / D. Lyden, R. Hattor, S. Dias et al. // *Nature Med.* – 2001. – Vol. 7, № 11. – P. 1886.

14. Differential effects of a single dose of cyclophosphamide on T cell subsets of the thymus and spleen in mice flow cytometry analysis / A. Miyauchi, C. Hiramane, S. Tanaka et al. // *Tohoku. J. Exp. Med.* – 1990. – Vol. 162, № 2. – P. 147–167.

15. Strauss G., Osen W., Debatin K. Induction of apoptosis and modulation of activation and effector function in T cells by immunosuppressive drugs // *Clin. Exp. Immunol.* – 2002. – № 2. – P. 255–266.

### References

1. Vasendin D.V., Michurina S.V., Ishhenko I.Ju. Morfolo- gicheskie izmeneniya v timuse v «katabolicheskoj» faze posle vozdejstviya jeksperimental'noj gipertermii – *Sibirskij medicinskij zhurnal*. 2011. T. 101, no 2. pp. 33–35.

2. Egorenkov V.V. Profilaktika raka zheludka i tolstoj kishki – *Prakticheskaja onkologija*, 2011. T12, no 2. pp. 70–75.

3. Zabezinskij M.A. Principy pervichnoj profilaktiki raka – *Prakticheskaja onkologija*, 2011. T12, no 2. pp. 57–61.

4. Kiseleva E.P. Mehanizmy involjucii timusa pri opuholevom rosten – *Uspehi sovremennoj biologii*, 2004. T. 124 (6). pp. 102–114.

5. Koveshnikov V.G., Bibik E.Ju. Funkcional'naja morfolo- gija organov immunoj sistemy. Lugansk: Virtual'naja real'nost', 2007. 172 p.

6. Kostrova O.Ju. Akcidental'naja involjucija timusa na fone kancerogeneza v uslovijah immunosupressii – *Nauchnyj*

*zhurnal «Vestnik molodyh uchenyh Respubliki Bashkortostan»*, Ufa, 2012. pp. 33–38.

7. Mihajlova M.N. Uchastie dendritnyh i nejroendokrin- nyh kletok timusa v razvitii ego involjucii pri formirovanii jeksperimental'noj opuholi tolstoj kishki – *Zhurnal «Vestnik Chu- vashskogo universiteta»*, Cheboksary, 2011, no 3. pp. 377–383.

8. Pinegin B.V., Haitov R.M., Jarilin A.A. Rukovodstvo po klinicheskoj immunologii. Diagnostika zabolevanij im- munoj sistemy: rukovodstvo dlja vrachej. M.: Gojetar-Media, 2009. 352 p.

9. Silant'eva I.V. Anatomo-morfologicheskie osobennosti i sposoby ocenki poperechnogo razmera i ob#ema vilochko- voj zhelezy u detej – *Zhurnal «Mat' i ditja v Kuzbasse»*. 2011. no 2 (45), pp. 11–17.

10. Struchko G.Ju. Akcidental'naja involjucija timusa na fone razvitija zlokachestvennoj opuholi, oslozhnennoj im- munoj sistemy – *Materialy II vserossijskoj nauchno-prakticheskoj konferencii s mezhdunarodnym uchastiem*. Kursk: KGMU, 2011. pp. 256–257.

11. Turicyna E.G. Morfolo gicheskie i jetiologicheskie as- pekty akcidental'noj involjucii timusa ptic – *Agrarnyj vestnik Urala*. 2009, no 12(66). pp. 74–76.

12. Chernushenko E.F. Diagnostika vtorichnyh im- munoj sistemy sostojanij – *Iskusstvo lechenija*. 2006, no 2(28). pp. 5–12.

13. Accidental involution of Thymus / D. Lyden, R. Hattor, S. Dias et al. // *Nature Med.* 2001. Vol. 7, no. 11. P. 1886.

14. Differential effects of a single dose of cyclophosphamide on T cell subsets of the thymus and spleen in mice flow cytometry analysis / A. Miyauchi, C. Hiramane, S. Tanaka et al. // *Tohoku. J. Exp. Med.* 1990. Vol. 162, no. 2. pp. 147–167.

15. Strauss G., Osen W., Debatin K. Induction of apoptosis and modulation of activation and effector function in T cells by immunosuppressive drugs // *Clin. Exp. Immunol.* 2002. no. 2. pp. 255–266.

### Рецензенты:

Ямщиков Н.В., д.м.н., профессор, за- ведующий кафедрой гистологии и эм- бриологии, ГБОУ ВПО «Самарский госу- дарственный медицинский университет» Минздравсоцразвития РФ, г. Самара;

Гунин А.Г., д.м.н., профессор кафедры акушерства и гинекологии, ФГБОУ ВПО «Чувашский государственный университет имени И.Н. Ульянова», г. Чебоксары.

Работа поступила в редакцию 07.03.2013.