

УДК 616.438: 616.15-006-097: 616.411-089.87-097

ИММУНОГИСТОХИМИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ТИМУСА ПРИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОМ КАНЦЕРОГЕНЕЗЕ НА ФОНЕ СПЛЕНЭКТОМИИ

Москвичев Е.В.

ФГБОУ ВПО «Чувашский государственный университет имени И.Н. Ульянова»,
Чебоксары, e-mail: anatomy@chuvsu.ru

Имуногистохимическим методом исследован молекулярный фенотип тимуса крыс с экспериментальной опухолью толстой кишки на фоне вторичной иммунной недостаточности после спленэктомии и проведено сравнение с изменениями у животных с изолированным введением канцерогена. В работе использованы моноклональные антитела к мульти-цитокератинам, CD3, маркеру клеточной пролиферации Ki-67. Исследованы динамика изменений цитоархитектоники эпителиальных клеток коркового и мозгового вещества, соотношение и количественные характеристики разных популяций тимоцитов, а также показатели клеточной пролиферации в структурах дольки. Установлено, что через пять месяцев после введения канцерогена в группе животных со спленэктомией регистрируется атрофия большей части долек с дезорганизацией сетевой структуры эпителиальных клеток коркового и мозгового вещества, чего не наблюдается у животных с изолированным введением канцерогена. Эти изменения сопровождаются значительным уменьшением числа CD3⁺ тимоцитов на фоне снижения экспрессии белка клеточной пролиферации Ki-67, что свидетельствует об угнетении тимопоэза.

Ключевые слова: тимус, канцерогенез, спленэктомия, тимопоэз, эпителиальные клетки тимуса

IMMUNOHISTOCHEMISTRY OF THE THYMUS IN EXPERIMENTAL CARCINOGENESIS AFTER SPLENECTOMY

Moskvichev E.V.

Chuvash State University named after I.N. Ulyanov, Cheboksary, e-mail: anatomy@chuvsu.ru

Thymic molecular phenotype of rats with experimental large intestine tumor after splenectomy was studied with the help of immunohistochemistry. We made comparative investigation of the changes in the animals with the isolated introduction of carcinogen. We used monoclonal antibodies for multi-cytokeratin, CD3, and the marker of cell proliferation Ki-67. We studied the dynamics of cytoarchitecture changes of epithelial cells in the thymic cortex and medulla, value and quantity of different populations of thymocytes. Also we studied indicators of cell proliferation in the structures of thymic lobes. It was found that five months after the introduction of a carcinogen in a group of animals with splenectomy recorded atrophy of most lobes with disruption of the network structure of the epithelial cells in cortex and medulla, which is not observed in animals with isolated introduction of carcinogen. These changes were accompanied by a significant decrease in the number of CD3⁺ thymocytes against decrease of expression of cell proliferation protein Ki-67, and indicating that the products of thymocytes are inhibited.

Keyword: thymus, carcinogenesis, splenectomy, thymopoiesis, thymic epithelial cells

Иммунная система и растущая злокачественная опухоль находятся в сложных многоуровневых перекрестных взаимодействиях, понимание которых открывает новые подходы к иммунотерапии. При этом ее эффективность находится в прямой зависимости от сохранности иммунной реактивности организма [6]. Ответ организма на рост опухоли имеет сходство с реакцией отторжения трансплантата, важнейшее значение при этом имеет презентация антигена и распознавание его Т-лимфоцитами [13]. Недостаточная противоопухолевая иммунная реакция может быть обусловлена отсутствием чужеродного генетического материала в опухолевых клетках, анатомической изоляцией опухоли, либо ее иммуносупрессивным влиянием [12]. Известно, что рост злокачественных новообразований сопровождается продукцией ими веществ, угнетающих защитные силы организма [2]. Отмечаемая при этом перестройка иммунной защиты приводит к «ускользанию» опухоли

от иммунного надзора, которая перестает распознаваться как чужеродная ткань [12].

Немаловажное значение в прогрессии злокачественных новообразований принадлежит иммунодефицитам. Острые и хронические иммунодефициты могут способствовать недостаточному иммунному ответу на рост опухоли и более агрессивному течению заболевания, что, в частности, наблюдается у больных ВИЧ-инфекцией [8]. Спленэктомия вызывает стойкое нарушение гуморального и клеточного иммунитета [5, 11]. В отечественной литературе комплексе патологических сдвигов, связанных с удалением селезенки, получил обозначение «постспленэктомический гипоспленизм» [1].

В наших предыдущих работах описана динамика изменений морфологии и молекулярного фенотипа тимуса в моделях с канцерогенезом, возрастной инволюцией и спленэктомией [3, 5]. Однако в доступной литературе по-прежнему отсутствуют работы по исследованию изменений иммуноги-

стохимического фенотипа тимуса при канцерогенезе на фоне вторичной иммунной недостаточности после спленэктомии.

Цель исследования – выявление особенностей изменений морфологии и молекулярного фенотипа тимуса при развивающейся злокачественной опухоли толстой кишки на фоне вторичной иммунной недостаточности после спленэктомии.

Материалы и методы исследования

Работа выполнена на 60 белых нелинейных крысах-самцах 4 и 5 месяцев массой 180–220 г. Уход и содержание животных проводили в соответствии с «Правилами проведения работ с использованием экспериментальных животных». Крысы были разделены на две группы. Первой группе животных (30 крыс) внутрибрюшинно вводили 1,2-диметилгидразин из расчета 20 мг/кг массы 1 раз в неделю в течение 5 недель в соответствии с экспериментальной моделью [9]. Животным второй группы (30 крыс) предварительно выполнялась спленэктомия. Операцию проводили с соблюдением правил асептики и антисептики под местной анестезией. Через 30 суток после спленэктомии крысам вводили 1,2-диметилгидразин в дозе и схеме, указанной выше. Выведение животных обеих групп из эксперимента проводилось через 30, 90 и 150 суток после окончания введения канцерогена путем декапитации. Объектом исследования служил тимус. В работе применялись следующие методы:

1. Иммуногистохимический метод с использованием трех коммерческих моноклональных антител (МКАТ) производства NovoCastra (Великобритания):
 - МКАТ к мульти-цитокератинам;
 - МКАТ к кластеру дифференцировки лимфоцитов 3 типа;
 - МКАТ к белку клеточной пролиферации Ki-67.

Материал для исследования методом иммуногистохимии фиксировали 10% нейтральным забуференным формалином в течение 24 ч, выполняли стандартную спиртово-ксилоловую проводку. Подготовленные образцы тканей заливали в парафин, готовили срезы толщиной 4 мкм, которые наносили на высокоадгезивные стекла и высушивали при температуре 37°C в течение 18 ч. Демаскировка и иммуногистохимическая окраска проводилась ручным способом с использованием системы визуализации NovoLink polymer (NovoCastra, Великобритания). Контролем иммуногистохимической реакции служила неиммунизированная сыворотка.

2. Окраска срезов тимуса гематоксилином и эозином для изучения общегистологической картины микропрепаратов.

3. Компьютерная морфометрия. Линейные морфометрические измерения выполнены с использованием лицензионной программы Leica Application Suite 3.6.0. Количественные измерения интенсивности мембранных и цитоплазматических иммуногистохимических реакций выполнены с применением лицензионной программы «Микро-Анализ» (Россия), а также демо-версии программы Sigma Scan Pro (Япония). Интенсивность мембранной иммуногистохимической реакции оценена методом автоматического выделения и подсчета площади интересующего цветового спектра (окрашенного DAB) по отношению к площади снимка с переводом числовых значений в проценты. Для каждого среза выполнены измерения

не менее чем в 10 интересующих полях зрения. Результат ядерной реакции оценивали путем подсчета позитивно окрашенных ядер на 100 клеток в десяти полях зрения при увеличении $\times 400$, выражая результаты в процентах.

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

Результаты исследований и их обсуждение

Через месяц после курсового введения канцерогена тимус сохраняет дольчатое строение. Граница коркового и мозгового вещества хорошо различима. Обработка срезов антителами к цитокератинам выявляет рыхлую сеть эпителиальных клеток в корковом веществе и более компактные периваскулярные скопления в мозговом веществе дольки. Установлено, что позитивную реакцию с цитокератинами на этом сроке дают до 10,1% клеток коркового вещества и до 18,7% клеток мозгового вещества дольки. Окраска препаратов тимуса антителами к кластеру дифференцировки 3 типа выявляет многочисленные CD3⁺ тимоциты. Количество этих клеток в корковом веществе составляет 15,8%, в мозговом – 46,8%. Исследование экспрессии Ki-67 выявляет многочисленные пролиферирующие клетки. В корковом веществе позитивную реакцию с Ki-67 дают 42,4% клеток, в мозговом – 12,85%. Подобное строение железы сохраняется и через три месяца после введения канцерогена, при этом морфология и молекулярный фенотип тимуса не имеют достоверных отличий по сравнению с предыдущим сроком.

Через пять месяцев после введения канцерогена в толстой кишке крыс формируется злокачественная опухоль, имеющая морфологию дифференцированной аденокарциномы. В тимусе отмечается уменьшение размеров долек с расширением междольковых септ, в которых определяется значительное количество жировой ткани. Обработка препаратов антителами к цитокератинам выявляет густую сеть эпителиальных клеток дольки (рис. 1). Количество эпителиальных клеток коркового вещества достоверно возрастает до 32,4% ($P < 0,001$), мозгового – до 31,5% ($P < 0,001$). Окраска препаратов антителами к CD3 выявляет значительное увеличение числа позитивных тимоцитов коркового вещества до 47,5% ($P < 0,001$), тогда как количество этих клеток в мозговой зоне достоверно не изменяется. Определение экспрессии маркера клеточной пролиферации Ki-67 не выявляет достоверных отличий в количестве пролиферирующих клеток по сравнению с предыдущими сроками исследования (рис. 2).

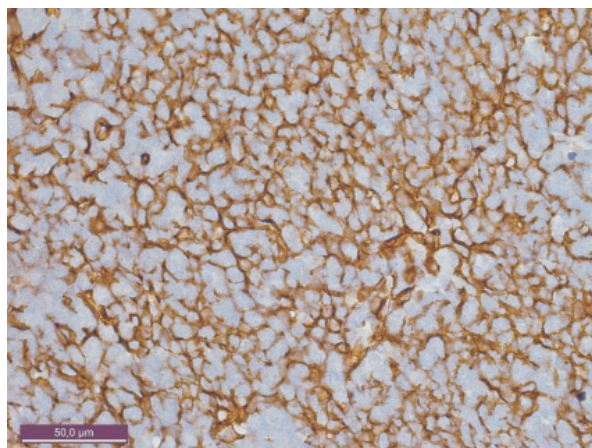


Рис. 1. Тимус крысы через 5 месяцев после введения канцерогена. Густая сеть эпителиальных клеток коркового вещества. Иммуногистохимическая реакция к мульти-цитокератинам. Ув. 400

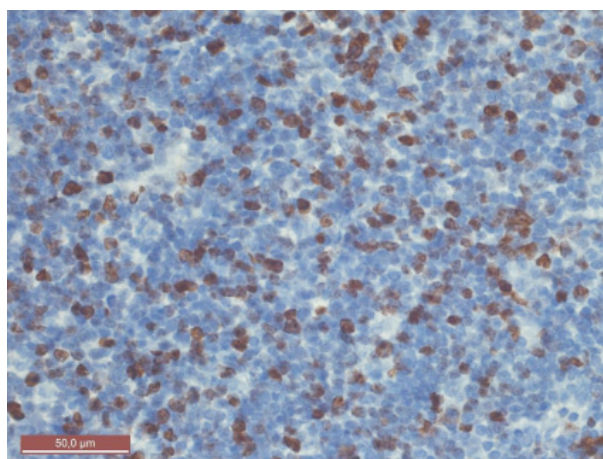


Рис. 2. Тимус крысы через 5 месяцев после введения канцерогена. Пролиферирующие клетки мозгового вещества. Иммуногистохимическая реакция с Ki-67. Ув. 400

Через месяц после введения канцерогена спленэктомированным крысам морфология и иммуногистохимический фенотип тимуса достоверно не отличаются от животных с изолированным введением канцерогена. Однако уже через три месяца в тимусе выявляются признаки инволютивных изменений, которые выражены в уменьшении размеров долек, потере границы между корковым и мозговым веществом и увеличении доли жировой ткани. Следует отметить, что эти изменения более выражены в периферических отделах органа. Обработка препаратов тимуса антителами к цитокератинам выявляет достоверное уменьшение количества эпителиальных клеток в мозговом веществе до 8,1% ($P < 0,001$), при этом наблюдается своеобразная конденсация эпителиоцитов в кортико-медуллярной зоне дольки с опустошением центральных отделов мозгового вещества (рис. 3). Опре-

деление кластера дифференцировки лимфоцитов 3 типа выявляет достоверное снижение числа $CD3^+$ тимоцитов в мозговом веществе дольки до 20,33% ($P < 0,001$). Исследование экспрессии маркера клеточной пролиферации не выявляет достоверных отличий по сравнению с группой животных с изолированным введением канцерогена.

На стадии формирования карциномы у спленэктомированных крыс через пять месяцев тимус значительно уменьшен в размерах, дряблый, желтоватого цвета. Большая часть долек подвержена атрофии и замещена жировой тканью. Сохранившиеся дольки значительно уменьшены в размерах, граница коркового и мозгового вещества едва различима. Окраска препаратов антителами к цитокератинам выявляет густую сеть эпителиальных клеток в сохраненных дольках, а в дольках, подверженных атрофии, – компактные скопления в виде сли-

вающихся периваскулярных розеток без лимфоцитов (рис. 4). Компьютерная морфометрия выявляет уменьшение количества эпителиальных клеток в корковом веществе до 17,4% ($P < 0,001$), тогда как в мозговом веществе число этих клеток возрастает до 43,4% ($P < 0,01$). Исследование экспрессии CD3 в сохранных дольках демонстриру-

ет достоверное снижение числа CD3⁺ клеток до 22,3% ($P < 0,001$) в корковом и до 15,59% ($P < 0,001$) – в мозговом веществе доли. Обработка препаратов антителами к Ki-67 выявляет двукратное снижение экспрессии этого маркера в корковом веществе и более чем пятикратное снижение в мозговой зоне (рис. 5).

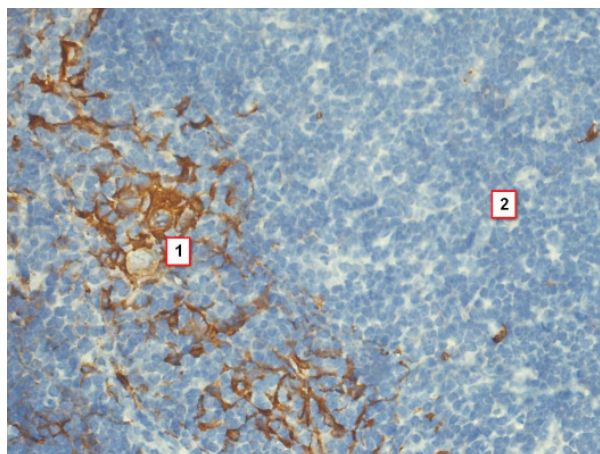


Рис. 3. Тимус спленэктомированной крысы через 3 месяца после введения канцерогена. Конденсация эпителиальных клеток в кортико-медуллярной зоне с «опустошением» мозгового вещества:

1 – эпителиальные клетки на границе коркового вещества, 2 – мозговое вещество. Иммуногистохимическая реакция к мульти-цитокератинам. Ув. 400

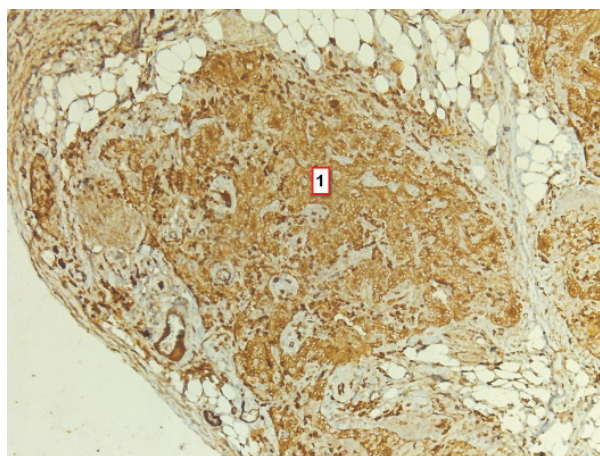


Рис. 4. Тимус спленэктомированной крысы через 5 месяцев после введения канцерогена: 1 – компактные сливающиеся поля эпителиальных клеток в атрофированных дольках. Иммуногистохимическая реакция к мульти-цитокератинам. Ув. 400

Наши исследования показали, что через один месяц после введения канцерогена достоверные отличия морфологии и иммуногистохимического фенотипа тимуса в двух экспериментальных группах отсутствуют. Различия в течении инволютивных процессов регистрируются через три месяца после введения канцерогена, при этом раньше других изменения появляются в популяциях эпителиальных клеток и CD3⁺ тимоцитов мозгового вещества. Мы полагаем, что уменьшение

количества эпителиоцитов мозгового вещества через три месяца после введения канцерогена спленэктомированным крысам является относительным и обусловлено изменением цитоархитектоники клеток с их конденсацией на границе коркового и мозгового вещества. Это, в свою очередь, может быть обусловлено увеличением числа клеток нетимопоэтического микроокружения в структурах мозгового вещества вследствие акцидентальной инволюции тимуса после спленэктомии.

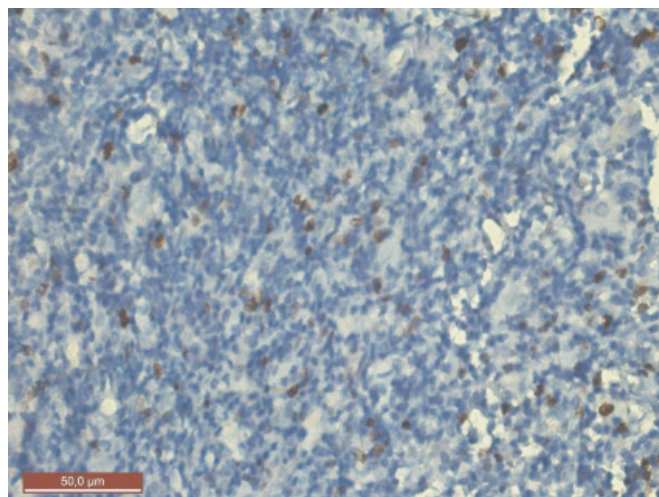


Рис. 5. Тимус спленэктомированной крысы через 5 месяцев после введения канцерогена. Значительное уменьшение пролиферирующих клеток в мозговом веществе. Иммуногистохимическая реакция с Ki-67. Ув. 400

На стадии формирования карциномы достоверные отличия морфологии и молекулярного фенотипа вилочковой железы у животных двух групп регистрируются во всех исследуемых структурах. Установлено, что инволюция тимуса у крыс с канцерогенезом на фоне спленэктомии заканчивается атрофией большей части органа с дезорганизацией сети эпителиальных клеток долек. Известно, что сохранение сети эпителиоцитов коркового вещества необходимо для дифференцировки и созревания Т-лимфоцитов, а ее разрушение приводит к угнетению тимопоэза [7].

Изменения в популяции эпителиальных клеток сопровождаются значительным снижением клеточной пролиферации, достоверным уменьшением числа CD3⁺ тимоцитов в структурах тимуса и указывают на угнетение тимопоэза. По данным литературы, удаление селезенки сопровождается активацией пучковой зоны надпочечников и повышением уровня глюкокортикоидов в крови [4, 5]. Известно, что глюкокортикоидные гормоны способны угнетать продукцию клеток костным мозгом, и, следовательно, поступление предшественников тимопоэза в тимус [10]. Мы считаем, что регистрируемое угнетение тимопоэза у животных с канцерогенезом на фоне спленэктомии может быть обусловлено как токсическим влиянием самой опухоли, так и нарушением поступления клеток-предшественников в железу вследствие влияния повышенного уровня глюкокортикоидов.

Таким образом, наши исследования показали, что развитие экспериментальной злокачественной опухоли толстой кишки на фоне вторичной иммунной недостаточ-

ности после спленэктомии существенно изменяет и усугубляет течение инволютивных изменений в тимусе. При этом в железе на фоне атрофии большей части паренхимы регистрируются признаки выраженного угнетения тимопоэза.

Список литературы

1. Апарцин К.А. Аутоотрансплантация ткани селезенки при вынужденной спленэктомии в условиях хирургической инфекции живота / К.А. Апарцин, Е.Г. Григорьев, А.С. Коган // Хирургия тяжелых гнойных процессов. – Новосибирск: Наука, 2000. – Гл.8. – С. 193–209.
2. Киселева Е.П. Механизмы инволюции тимуса при опухолевом росте // Успехи современной биологии. – 2004. – Т. 124. – С. 589–601.
3. Москвичев Е.В. Иммуногистохимическая характеристика некоторых показателей тимопоэза при экспериментальном канцерогенезе / Москвичев Е.В. Меркулова Л.М., Стручко Г.Ю. // Фундаментальные исследования. – 2012. – № 8. – С. 367–371.
4. Стоменская И.С. Влияние спленэктомии на морфофункциональное состояние надпочечников / И.С. Стоменская, Л.М. Меркулова, Г.Ю. Стручко // Аллергология и иммунология: мат. V съезда иммунологов и аллергологов СНГ. – 2003. – Т. 4 – № 2.
5. Стручко Г.Ю. Морфофункциональное исследование тимуса и иммунобиохимических показателей крови после спленэктомии и иммунокоррекции: автореф. дис. ... д-ра мед. наук. – Саранск, 2003. – 23 с.
6. De Souza AP. The immune system: endogenous anticancer mechanism / De Souza AP, Bonorino C. // Front Biosci. – 2012 Jun. – Vol. 1. – № 4. – P. 2354–2364.
7. Flores K.G. Analysis of the human thymic perivascular space during aging / Flores K.G., Li J., Sempowski G.D., Haynes B.F. // J Clin Invest. – 1999 Oct. – Vol. 104. – № 8. – P. 1031–1039.
8. Furco A. Metastatic cancer of the prostate in a young 40 year-old HIV-infected male patient / A. Furco, F. Bani-Sadr, S. Guymar, J.M. Molina // Presse Med. – 2003 Jun 7. – Vol. 32. – № 20. – P. 930–931.
9. Jacoby R.F. Mutations in the K-ras oncogene induced by 1,2-dimethylhydrazine in preneoplastic and neoplastic rat

colonic mucosa / R.F. Jacoby, X. Llor, B.B. Teng // *J Clin Invest.* – 1991. – Vol. 87. – № 2. – P. 624–630.

10. Jeklova E. Dexamethasone-induced immunosuppression: a rabbit model / E. Jeklova, L. Leva, Z. Jaglic // *Vet Immunol Immunopathol.* – 2008 Apr. – Vol. 122. – № 3–4. – P. 231–240.

11. Morgan T.L. Overwhelming Post-splenectomy Infection (OPSI): A Case Report and Review of the Literature / T.L. Morgan, E.B. Tomich // *J Emerg Med.* – 2012 Oct. – Vol. 43. – № 4. – P. 758–763.

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

13. Whiteside T.L. Immune responses to malignancies // *J. Allergy Clin Immunol.* – 2010. – Vol. 125. – P. 272–283.

References

1. Aparcin K.A. Autotransplantacija tkani selebenki pri vyznuzhdennoj splenektomii v uslovijah hirurgicheskoj infekcii zhivotnogo / Aparcin K.A., Grigor'ev E.G., Kogan A.S. // *Hirurgija tjazhelyh gnojnyh processov.* – Novosibirsk: Nauka, 2000. Gl.8. pp. 193–209.

2. Kiseleva E.P. Mehanizmy involjucii timusa pri opuholevom roste // *Uspehi sovremennoj biologii* 2004 tom 124, pp. 589–601.

3. Moskvichev E.V. Immunogistohimicheskaja karakteristika nekotoryh pokazatelej timopojeza pri jeksperimental'nom kancerogeneze / Moskvichev E.V. Merkulova L.M., Struchko G.J. // *Fundamental'nye issledovanija*, 2012 no. 8 pp. 367–371.

4. Stomenskaja I.S. Vlijanie splenektomii na morfofunkcional'noe sostojanie nadpochechnikov / Stomenskaja I.S., Merkulova L.M., Struchko G.Ju. // *Allergologija i immunologija*, 2003 tom 4 no. 2: Mat. V s#ezda immunologov i allergologov SNG.

5. Struchko G.Ju. Morfofunkcional'noe issledovanie timusa i immunobiohimicheskikh pokazatelej krovi posle splenektomii i immunokorrekcii: Avtoref. dis... dokt. med. nauk. – Saransk, 2003. 23 p.

6. De Souza AP. The immune system: endogenous anticancer mechanism / De Souza AP, Bonorino C. // *Front Biosci*, 2012 Jun Vol. 1 no. 4 pp. 2354–2364.

7. Flores K.G. Analysis of the human thymic perivascular space during aging / Flores K.G., Li J., Sempowski G.D., Haynes B.F. // *J Clin Invest.*, 1999 Oct Vol. 104 no. 8 pp. 1031–1039.

8. Furco A. Metastatic cancer of the prostate in a young 40 year-old HIV-infected male patient / Furco A, Bani-Sadr F, Guymar S, Molina JM // *Presse Med.*, 2003 Jun 7 Vol. 32 no. 20 pp. 930–931.

9. Jacoby R.F. Mutations in the K-ras oncogene induced by 1,2-dimethylhydrazine in preneoplastic and neoplastic rat colonic mucosa / Jacoby R.F., Llor X., Teng B.B. // *J Clin Invest.*, 1991 Vol. 87. no. 2 pp. 624–630.

10. Jeklova E. Dexamethasone-induced immunosuppression: a rabbit model / Jeklova E, Leva L, Jaglic Z // *Vet Immunol Immunopathol.*, 2008 Apr Vol. 122 no. 3–4 pp. 231–240/

11. Morgan T.L. Overwhelming Post-splenectomy Infection (OPSI): A Case Report and Review of the Literature / Morgan T.L., Tomich E.B. // *J Emerg Med.*, 2012 Oct Vol. 43 no. 4 pp. 758–763.

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

13. Whiteside T.L. Immune responses to malignancies // *J. Allergy Clin Immunol.*, 2010 Feb- Vol. 125 pp. 272–283.

Рецензенты:

Димитриев Д.А., д.м.н., профессор, заведующий кафедрой анатомии, физиологии и гигиены детей, ФГБОУ ВПО «Чувашский государственный педагогический университет имени И.Я. Яковлева» Министерства образования и науки России, г. Чебоксары;

Суворова Г.Н., д.б.н., профессор, заведующая кафедрой анатомии человека, ГБОУ ВПО «Самарский государственный медицинский университет» Минздрава России, г. Самара.

Работа поступила в редакцию 07.03.2013.