

УДК 612.438.017.1.086:616-006.6

**ИММУНОГИСТОХИМИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ НЕКОТОРЫХ ПОКАЗАТЕЛЕЙ  
ТИМОПОЭЗА ПРИ КАНЦЕРОГЕНЕЗЕ В УСЛОВИЯХ ВТОРИЧНОЙ  
ИММУННОЙ НЕДОСТАТОЧНОСТИ****Москвичев Е.В.***ФГБОУ ВПО «Чувашский государственный университет имени И.Н. Ульянова»,  
Чебоксары, e-mail: anatomy@chuvsu.ru*

Исследованы некоторые показатели тимопоэза у животных с экспериментальной опухолью толстой кишки на фоне вторичного иммунодефицита после спленэктомии. С использованием моноклональных антител к CD3, p-53, bcl-2 и Ki-67 изучены количественные характеристики тимоцитов, экспрессия белков-регуляторов апоптоза и клеточной пролиферации в структурах коркового и мозгового вещества тимической доли. Установлено, что введение канцерогена животным со спленэктомией изменяет клеточную пролиферацию и экспрессию антиапоптотического белка bcl-2 в структурах долек тимуса уже через один месяц после воздействия. Через три месяца после введения канцерогена в тимусе спленэктомизированных крыс снижается число CD3<sup>+</sup> тимоцитов мозгового вещества, а также экспрессия антиапоптотического белка p-53 и белка клеточной пролиферации Ki-67. Изменения в тимусе крыс с канцерогенезом на фоне спленэктомии через пять месяцев характеризуются признаками угнетения тимопоэза на фоне атрофии большей части тимической паренхимы.

**Ключевые слова:** канцерогенез, спленэктомия, инволюция тимуса, тимопоэз, вторичный иммунодефицит**IMMUNOHISTOCHEMICAL ANALYSIS OF SOME INDICATORS  
OF THYMOPOIESIS AT CARCINOGENESIS IN CONDITION  
OF SECONDARY IMMUNODEFICIENCY****Moskvicev E.V.***Chuvash State University named after I.N. Ulyanov, Cheboksary, e-mail: anatomy@chuvsu.ru*

We investigated some indicators of thymopoiesis of animals with experimental colon tumors in the background of secondary immunodeficiency after splenectomy. We studied the quantitative characteristics and the correlation of thymocytes of the cortex and medulla, as well as the expression of protein regulators of apoptosis and cell proliferation in the structures of the thymic lobules with the use of monoclonal antibodies to CD3, p-53, bcl-2, Ki-67. It was found that the injection of carcinogen to animal with splenectomy changes cell proliferation and expression of anti-apoptotic protein bcl-2 in the structures of the thymus lobes within one month after treatment. Three months after the injection of a carcinogen in the thymus of splenectomized rats reduced the number of CD3<sup>+</sup> thymocytes of the medulla, as well as the expression of anti-apoptotic protein p-53 and protein of cell proliferation Ki-67. Changes in the thymus of rats with carcinogenesis against splenectomy in five months are characterized by oppression of thymopoiesis against atrophy of the parts of the thymic parenchyma.

**Keywords:** carcinogenesis, splenectomy, thymic involution, thymopoiesis, secondary immunodeficiency

Растущее злокачественное новообразование и иммунная система находятся в сложных многоуровневых перекрестных взаимодействиях, изучение которых открывает новые возможности для иммунотерапии опухолей, однако ее эффективность находится в прямой зависимости от сохранности иммунной реактивности организма [8]. Рост злокачественной опухоли сопровождается продукцией веществ, способных снижать или полностью блокировать противоопухолевый иммунный ответ. Опухоль при этом перестает распознаваться иммунными клетками и становится биологически более агрессивной [13].

В настоящее время известно, что один из ключевых механизмов иммуносупрессии при канцерогенезе опосредован через стимуляцию опухолью дендритных клеток и клеток-регуляторов (T-reg cells), которые способны оказывать как местное, так и системное угнетение иммунного ответа [7]. Другим важным условием формирования

иммунной реакции организма на рост опухоли имеет направленность иммунного ответа. Известно, что в зависимости от преобладания в зоне иммунной реакции Т-хелперов 1 или 2 типа опухоль либо распространяется и уничтожается иммунными клетками, либо ускользает от иммунного надзора [2]. Среди возможных механизмов иммуносупрессивного влияния опухоли на тимус также различают недостаточное поступление в железу костномозговых предшественников, нарушение дифференцировки тимоцитов и усиление апоптоза, а также повышенную миграцию клеток на периферию [3].

Немаловажное значение в прогрессии злокачественных новообразований принадлежит иммунодефицитам. Хронические иммунодефициты могут способствовать недостаточному иммунному ответу на рост опухоли, а также формированию клинически агрессивных опухолей, что, в частности, наблюдается у больных ВИЧ-инфекцией [9]. Известно, что спленэктомия

вызывает комплекс патологических сдвигов со стойким нарушением гуморального и клеточного иммунитета, получивший обозначение «постспленэктомический гипоспленизм» [1, 6, 12].

В наших предыдущих работах описана динамика изменений морфологии и молекулярного фенотипа тимуса в моделях с канцерогенезом, возрастной инволюцией и спленэктомией [4, 6]. Однако в доступной литературе по-прежнему отсутствуют работы по исследованию изменений иммуногистохимического фенотипа тимуса при канцерогенезе на фоне вторичной иммунной недостаточности после спленэктомии.

**Цель исследования** – оценка молекулярных характеристик тимопоэза у животных с экспериментальным канцерогенезом 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 [10]. 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 четырех коммерческих моноклональных антител (МКАТ) производства Novo Castra (Великобритания):

- МКАТ к кластеру дифференцировки лимфоцитов 3 типа;
- МКАТ к антиапоптотическому белку bcl-2;
- МКАТ к белку-регулятору апоптоза p-53;
- 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 (Novo Castra, 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 диаминобензидином (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. При малом количестве окрашенных клеток проводили визуальный подсчет их количества 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 окончания введения канцерогена в слизистую оболочку толстой кишки крыс обеих групп формируются очаговые пролифераты крипт без признаков клеточной атипичности. Морфологических отличий в строении тимуса при обработке гематоксилином и эозином у животных обеих групп не выявляется. При окраске тимуса антителами к CD 3 отмечается положительная реакция в многочисленных клетках коркового и мозгового вещества, число которых достоверно не отличается. Обработка препаратов тимуса антителами к белкам-регуляторам апоптоза bcl-2 и p-53 выявляет немногочисленные клетки, локализованные в корковом и мозговом веществе. Установлено, что у животных с изолированным введением канцерогена число bcl-2<sup>+</sup> не превышает  $2,43 \pm 0,18$  в поле зрения, тогда как у крыс с введением канцерогена на фоне спленэктомии их число значительно возрастает до  $6,67 \pm 0,16$  ( $P < 0,001$ ). Количество клеток, позитивных к p-53, достоверно не изменяется. Исследование маркера клеточной пролиферации выявляет небольшое, но достоверное снижение ( $P < 0,01$ ) количества пролиферирующих клеток в структурах коркового и мозгового вещества у животных с введением канцерогена на фоне спленэктомии.

Через три месяца после окончания введения канцерогена в толстой кишке крыс регистрируются признаки предопухолевых изменений. Обработка препаратов тимуса животных обеих групп гематоксилином и эозином демонстрирует начальные признаки инволюции в виде расширения меж-

дольковых септ и уменьшения размеров долек. Окраска препаратов тимуса животных со спленэктомией антителами к CD 3 выявляет значительное снижение ( $P < 0,001$ ) CD 3<sup>+</sup> клеток в мозговом веществе, тогда как в корковом веществе достоверные изменения отсутствовали. Обработка антителами к белку-регулятору апоптоза p-53 выявляет более чем двукратное уменьшение p-53<sup>+</sup> клеток ( $P < 0,001$ ) в структурах дольки спленэктомированных животных, тогда как экспрессия bcl-2 не имеет достоверных отличий в двух экспериментальных группах. При исследовании маркера клеточной пролиферации Ki-67 отмечено небольшое, но достоверное уменьшение ( $P < 0,01$ ) экспрессии этого антигена в структурах коркового вещества (до 23,2%) у животных со спленэктомией и введением канцерогена, тогда как экспрессия Ki-67 в структурах мозгового вещества достоверно не изменяется.

Через пять месяцев после окончания введения канцерогена в толстой кишке животных обеих групп формируется опухоль, имеющая морфологию дифференцированной аденокарциномы. У спленэктомирован-

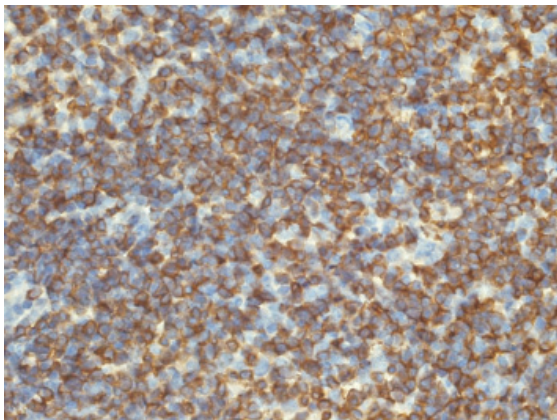


Рис. 1. Тимус крысы через 5 месяцев после введения канцерогена. Экспрессия CD3 в тимоцитах мозгового вещества. Иммуногистохимическая реакция с CD3, ув. 400

Наши исследования показали, что через один месяц после введения канцерогена достоверные отличия морфологии тимуса у животных двух групп отсутствуют. Однако в молекулярном фенотипе тимуса отмечаются небольшие, но достоверные отличия. Раньше других изменяются показатели клеточной пролиферации, а также экспрессия антиапоптотического белка bcl-2. Вероятно, эти изменения следует расценивать как последствия спленэктомии.

Существенные отличия молекулярного фенотипа тимуса в двух группах регистрируются через три месяца после введения канце-

рых крыс на этом сроке тимус значительно уменьшен в размерах, дряблый, желтоватого цвета. Большая часть паренхимы железы подвержена атрофии и замещена жировой тканью. Сохранившиеся дольки значительно уменьшены в размерах, граница коркового и мозгового вещества едва различима. Иммуногистохимическое исследование тимуса у крыс этой группы выявляет достоверные и существенные отличия экспрессии антигенов во всех исследуемых структурах. Обработка препаратов тимуса антителами к CD 3 выявляет значительное ( $P < 0,001$ ) снижение количества зрелых тимоцитов в корковом (до 22,3%) и мозговом (до 15,59%) веществе (рис. 1, 2). Исследование маркеров апоптоза выявляет двукратное снижение ( $P < 0,001$ ) экспрессии bcl-2 и более чем двукратное повышение ( $P < 0,001$ ) экспрессии p-53 в структурах тимуса спленэктомированных крыс. Обработка препаратов антителами к Ki-67 выявляет двукратное ( $P < 0,001$ ) снижение экспрессии этого маркера в корковом веществе и более чем пятикратное ( $P < 0,001$ ) снижение в мозговой зоне (рис. 3, 4).

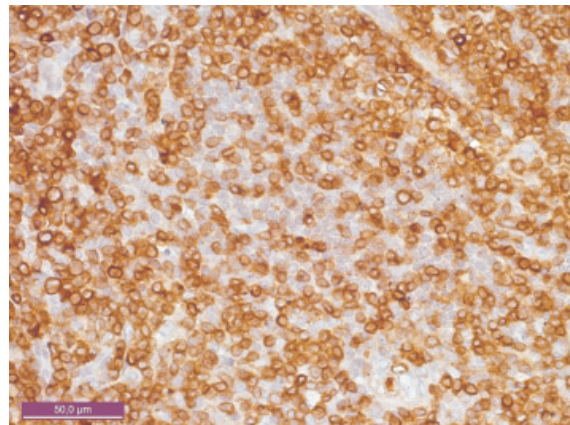


Рис. 2. Тимус спленэктомированной крысы через 5 месяцев после введения канцерогена. Уменьшение CD3<sup>+</sup> тимоцитов в мозговом веществе. Иммуногистохимическая реакция с CD3, ув. 400

рогена и проявляются в снижении количества CD3<sup>+</sup> тимоцитов мозгового вещества, экспрессии белка p-53 и Ki-67 в структурах дольки у животных со спленэктомией. На стадии формирования карциномы через пять месяцев достоверные отличия морфологии и молекулярного фенотипа вилочковой железы у животных двух групп регистрируются во всех исследуемых структурах. При этом у спленэктомированных крыс отмечается снижение числа зрелых тимоцитов, которое сочетается со снижением клеточной пролиферации и изменением соотношения белков апоптоза, что может указывать на угнетение тимопоэза.

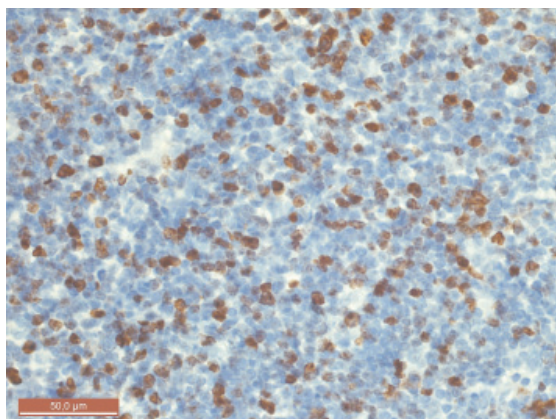


Рис. 3. Тимус крысы через 5 месяцев после введения канцерогена. Экспрессия Ki-67 в клетках мозгового вещества. Иммуногистохимическая реакция с Ki-67, ув. 400

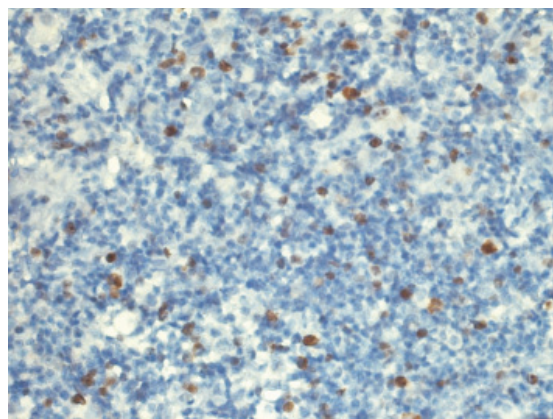


Рис. 4. Тимус спленэктомированной крысы через 5 месяцев после введения канцерогена. Снижение экспрессии Ki-67 в клетках мозгового вещества доли. Иммуногистохимическая реакция с Ki-67, ув. 400

По данным литературы удаление селезенки сопровождается активацией пучковой зоны надпочечников и повышением уровня глюкокортикоидов в крови [5, 6]. Известно, что глюкокортикоидные гормоны способны угнетать продукцию клеток костным мозгом, и, следовательно, поступление предшественников тимопоэза в тимус [11]. 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 недостаточности после спленэктомии изменяет и усугубляет течение инволютивных изменений в тимусе по сравнению с изолированным введением канцерогена. При этом в железе на фоне атрофии большей части паренхимы регистрируются признаки выраженного угнетения тимопоэза.

#### Список литературы

1. Апарцин К.А. Аутотрансплантация ткани селезенки при вынужденной спленэктомии в условиях хирургической инфекции живота / Апарцин К.А., Григорьев Е.Г., Коган А.С. // Хирургия тяжелых гнойных процессов. – Новосибирск: Наука, 2000. – С. 193–209.
2. Барышников Ю.А. Взаимодействие опухоли и иммунной системы // Практическая онкология. – 2003. – Т.4, № 3. – С. 127–130.
3. Киселева Е.П. Механизмы инволюции тимуса при опухолевом росте // Успехи современной биологии. – 2004. – Т. 124. – С. 589–601.

4. 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.

5. Стоменская И.С. Влияние спленэктомии на морфофункциональное состояние надпочечников / И.С. Стоменская, Л.М. Меркулова, Г.Ю. Стручко // Аллергология и иммунология: материалы V съезда иммунологов и аллергологов СНГ. – 2003. – т. 4. – № 2.

6. Стручко Г.Ю. Морфофункциональное исследование тимуса и иммунобиохимических показателей крови после спленэктомии и иммунокоррекции: автореф. дис. ... д-ра мед. наук. – Саранск, 2003. – 23 с.

7. Clarke S.L. CD4 + CD25 + FOXP3 + regulatory T cells suppress anti-tumor immune responses in patients with colorectal cancer / S.L. Clarke, G.J. Betts, A. Plant // PLoS One. 2006 – Vol.1. – № 27. – P. 129.

8. De Souza AP. The immune system: endogenous anticancer mechanism / De Souza AP, Bonorino C. // Front Biosci. – 2012 Jun. – Vol. 1. – № 4. – P. 2354–2364.

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

10. 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.

11. 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.

12. 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. – № 4. – P. 758–763.

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

#### References

1. Aparcin K.A. Autotransplantation of spleen tissue in splenectomized rats in conditions of surgical infection // Fundamental Research. – 2013. – № 5. – P. 104–108.

zhivota / Aparcin K.A., Grigor'ev E.G., Kogan A.S. // Hirurgija tjazhelyh gnojnyh processov.- Novosibirsk: Nauka, 2000. Gl. 8. pp. 193–209.

2. Baryshnikov Ju.A. Vzaimodejstvie opuholi i immunnoj sistemy // Prakticheskaja onkologija 2003, T.4, no. 3. pp. 127–130.

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

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

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

6. Struchko G.Ju. Morfofunkcional'noe issledovanie timusa i immunobiohimicheskikh pokazatelej krovi posle splenjektomii i immunokorrekcii // Avtoref. dis... dokt. med. nauk. Saransk, 2003. 23 p.

7. 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.

8. 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.

9. Furco A. Metastatic cancer of the prostate in a young 40 year-old HIV-infected male patient / Furco A.,

Bani-Sadr F., Guymar S. // Presse Med., 2003 Jun 7. Vol. 32. no. 20. P. 930–931.

10. 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

11. 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.

12. 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.

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

**Рецензенты:**

Валькович Э.И., д.м.н., профессор, заведующий кафедрой гистологии и эмбриологии ГБОУ ВПО «Санкт-Петербургский государственный педиатрический медицинский университет» Минздрава РФ, г. Санкт-Петербург;

Ямщиков Н.В., д.м.н., профессор, заведующий кафедрой гистологии и эмбриологии, ГБОУ ВПО «Самарский государственный медицинский университет» Минздрава РФ, г. Самара.

Работа поступила в редакцию 04.04.2013.