

© Г. Ю. Стручко, Л. М. Меркулова, Е. В. Москвичев, 2014  
УДК 611.438:616-006-02:599.323.4

*Г. Ю. Стручко, Л. М. Меркулова и Е. В. Москвичев*

## МОРФОЛОГИЧЕСКАЯ И ИММУНОГИСТОХИМИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ТИМУСА ПРИ ХИМИЧЕСКОМ КАНЦЕРОГЕНЕЗЕ, ВЫЗВАННОМ ВВЕДЕНИЕМ 1,2-ДИМЕТИЛГИДРАЗИНА

Кафедра нормальной и топографической анатомии с оперативной хирургией (зав. — проф. Л. М. Меркулова), Чувашский государственный университет им. И. Н. Ульянова, г. Чебоксары

Цель исследования — изучение гистологической и иммуногистохимической характеристики тимуса через 5 мес после внутрибрюшинного введения канцерогена (1,2-диметилгидразина в дозе 20 мг/кг 1 раз в неделю в течение 2 нед). Исследования проведены на 50 белых нелинейных крысах-самцах. Парафиновые срезы тимуса окрашивали гематоксилином — эозином и обрабатывали иммуногистохимическим методом с использованием антител к CD3, CD30, CD68, синаптофизину, белкам S-100, p53, bcl-2, Ki-67, а также к IgM и IgG. Установлено, что введение канцерогена приводит к увеличению в тимусе числа клеток, экспрессирующих bcl-2, S-100 и Ki-67, активных Т-лимфоцитов и клеток тимопоэтического микроокружения, изменению соотношения между CD3<sup>+</sup>-тимоидами мозгового и коркового вещества с преобладанием последних. Таким образом, развивающаяся в толстой кишке опухоль, с одной стороны, угнетает поступление предшественников тимопоэза в тимус, с другой — усиливает пролиферацию и дифференцировку тимоцитов в зрелые формы.

**Ключевые слова:** тимус, инволюция, апоптоз, канцерогенез

Иммунная система и растущая опухоль находятся в сложных многоуровневых взаимодействиях, изучение и понимание которых открывают новые подходы к терапии [7]. Иммунотерапия опухолей в настоящее время является одним из перспективных направлений в онкологии. Синтезированы и успешно апробированы в клинике ряд моноклональных противоопухолевых антител. При некоторых опухолях эти соединения существенно повышают эффективность лечения и выживаемость пациентов даже в запущенных стадиях, а также при неэффективности классической химиотерапии [5, 6].

Рост злокачественных новообразований зачастую сопровождается продукцией ими веществ, угнетающих защитные силы организма. Это, в свою очередь, приводит либо к снижению, либо к полному блокированию противоопухолевого иммунного ответа [16]. При этом опухоль перестает распознаваться клетками иммунной системы как чужеродная или дефектная ткань и становится биологически более агрессивной. Кроме подавления локального иммунного ответа, опухоль обладает прямым угнетающим влиянием на иммунные органы, что приводит к снижению продукции ими иммунокомпетентных клеток либо к выработке дефектных цитотоксических лимфоцитов, которые также могут служить источни-

ком происхождения иммуносупрессивных Т-reg-клеток [9].

Тимус является важным звеном иммунной защиты, функция которого направлена на поддержание пула периферических Т-лимфоцитов. Однако он, как никакой другой орган иммунной системы, подвержен инволютивным процессам, в том числе на фоне роста злокачественной опухоли [4]. Атрофия тимуса сопровождается перестройкой архитектоники долек, уменьшением объема паренхимы, замещением ее жировой и волокнистой соединительной тканями, а также снижением способности тимуса к выработке периферических наивных CD4<sup>+</sup>- и CD8<sup>+</sup>-тимоцитов. В конечном итоге это приводит к снижению иммунной и противоопухолевой защиты организма [2, 10].

В этой связи изучение клеточных и молекулярных механизмов инволюции тимуса на фоне развития злокачественной опухоли необходимо для создания целостного представления о канцерогенезе, что в дальнейшем позволит разработать более эффективные методы прогнозирования, мониторингирования и лечения злокачественных новообразований.

Цель настоящей работы — гистологический и иммуногистохимический анализ тимуса через 5 мес после введения канцерогена.

### Сведения об авторах:

Стручко Глеб Юрьевич (e-mail: [glebstr@mail.ru](mailto:glebstr@mail.ru)), Меркулова Лариса Михайловна, Москвичев Евгений Васильевич, кафедра нормальной и топографической анатомии с оперативной хирургией, Чувашский государственный университет им. И. Н. Ульянова, 428015, г. Чебоксары, Московский пр., 15

**Материал и методы.** Работа выполнена на 50 белых нелинейных крысах-самцах массой 180–220 г. Животных содержали в виварии, уход за ними осуществляли в соответствии с «Правилами проведения работ с использованием экспериментальных животных». Животные были разделены на 2 группы: интактного контроля (20 крыс) и подопытную с внутрибрюшинным введением канцерогена (1,2-диметилгидразин) из расчета 20 мг/кг 1 раз в неделю в течение 4 нед (30 крыс) в соответствии с моделью индукции опухолей толстой кишки R.F.Jacoby и соавт. [12]. Выведение из эксперимента осуществляли через 5 мес после окончания курса введения канцерогена путем декапитации.

При аутопсии животных подопытной группы проводили ревизию органов брюшной полости с вскрытием толстой кишки. При патоморфологическом исследовании учитывали частоту развития новообразований, их морфологические особенности, локализацию. Животные, у которых не произошло формирования опухоли, в исследование не включены.

При исследовании тимуса использовали следующие методы.

1. *Окраску гематоксилином — эозином.* Материал фиксировали в 10% нейтральном забуференном формалине в течение 24 ч, промывали проточной водой, затем выполняли стандартную проводку на тканевом гистопроцессоре Leica ASP 200 (Leica, Германия) и заливали в парафин. Парафиновые срезы материала толщиной 3 мкм наносили на отрицательно заряженные стекла (Mentzel Glasses super frost, Германия) и окрашивали гематоксилином—эозином по стандартной методике.

2. *Иммуногистохимический метод* [3]. Исследования выполняли в соответствии со стандартными протоколами. Парафиновые срезы толщиной 3 мкм наносили на высокоадгезивные стекла, обработанные полилизинном, высушивали при комнатной температуре в течение 24 ч. Проводили иммуногистохимические реакции ручным и аппаратным способом с использованием иммуногистохимических автостейнеров Autostainer-360 (Thermo, Великобритания) и Leica Bond-Max (Leica, Германия) с применением систем визуализации En-vision (DAKO, Дания) и NovoLink polymer (NovoCastra, Великобритания). Для иммуногистохимического исследования использовали моно- и поликлональные антитела (МКАТ и ПКАТ) (Santa Cruze, США и NovoCastra, Великобритания): 1) МКАТ к панцитокератину для неселективной идентификации эпителиальных клеток тимуса; 2) МКАТ к CD3 для идентификации зрелых тимоцитов; 3) МКАТ к CD30 для идентификации активированных Т-лимфоцитов коркового вещества; 4) ПКАТ к белку S-100 для идентификации клеток нейроэктодермального генеза и дендритных клеток; 5) ПКАТ к синаптофизину для идентификации клеток нейроэндокринного происхождения; 6) МКАТ к CD68 для идентификации макрофагов долек тимуса; 7) ПКАТ к белку p53 для идентификации апоптотически измененных клеток в структурах дольки тимуса; 8) ПКАТ к белку bcl-2 для определения направленности апоптотических реакций в структурах дольки тимуса; 9) МКАТ к IgM и IgG для идентификации В-лимфоцитов и плазматических клеток в структурах негемопоэтического микроокружения; 10) МКАТ к маркеру клеточной пролиферации Ki-67 для идентификации клеток, находящихся в митотической, G1-, S- и G2-фазах клеточного цикла.

3. *Компьютерную морфометрию.* Цифровые снимки микропрепаратов получены с применением системы архивирования на базе микроскопа Leica DM4000B (Leica, Германия) с использованием цветной фотокамеры Leica DFC 425 и

лицензионной программы Leica Application Suite 3.6.0 (Leica, Германия). Микрофотографии для проведения морфометрических измерений были получены при увеличениях 50, 100 и 400 с обозначением градуировочной линейки на каждом снимке. Линейные морфометрические измерения площади мозгового вещества и толщины коркового вещества долек, а также площади долек выполнены с использованием лицензионной программы Leica Application Suite 3.6.0. Измерения интенсивности мембранных и цитоплазматических иммуногистохимических реакций выполнены с применением лицензионной программы Микро-Анализ (ТелеМедТехника, Россия), а также демо-версии программы Sigma Scan Pro (Systat Software Inc, Япония).

Интенсивность мембранной и цитоплазматической иммуногистохимической реакции оценивали методом автоматического выделения и подсчета площади интересующего цветового спектра (окрашенного DAB) по отношению к площади снимка. Затем определяли долю площади структур, обладающих позитивной иммуногистохимической реакцией, по отношению к общей площади фотографии. Для каждого среза измерения выполнены не менее чем в 10 репрезентативных полях зрения при увеличении 400. При малом количестве клеток, дающих цитоплазматическую или мембранную окраску, применен метод их визуального подсчета в 10 репрезентативных полях зрения при увеличении 400.

При статистической обработке определяли среднюю арифметическую величину и ее ошибку. Оценку статистической значимости полученных данных проводили по t-критерию Стьюдента.

**Результаты исследования.** Через 5 мес после введения канцерогена в толстой кишке у крыс на фоне предопухолевых изменений в виде пролиферации крипт и клеточной дисплазии различной степени формируются 1–2 опухоли, имеющие строение высокодифференцированной аденокарциномы.

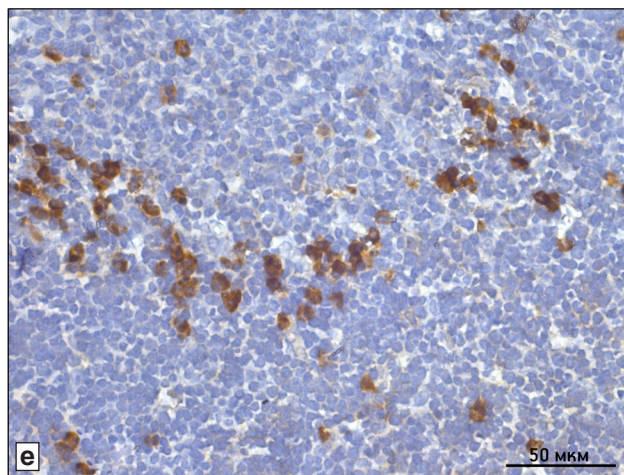
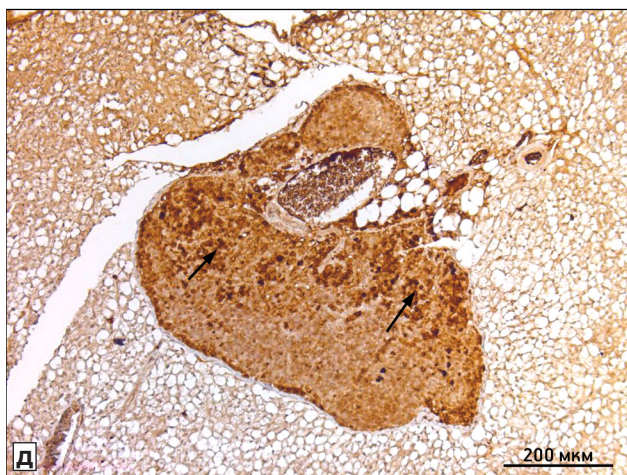
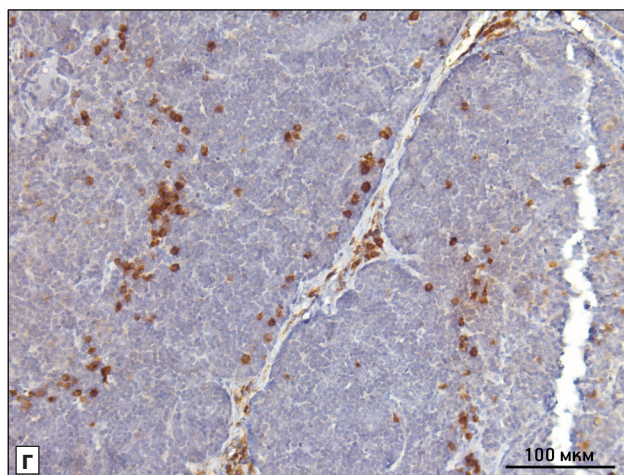
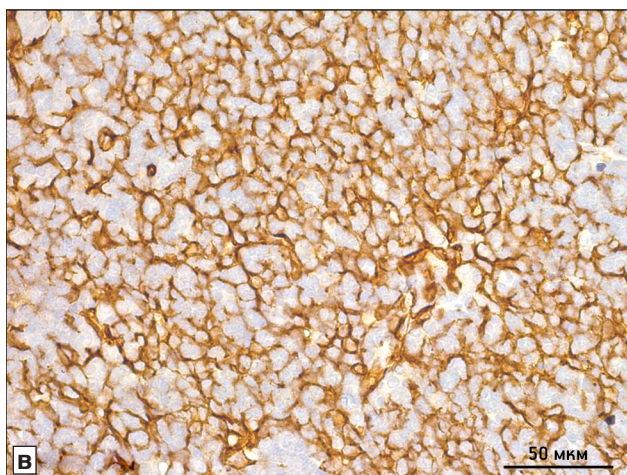
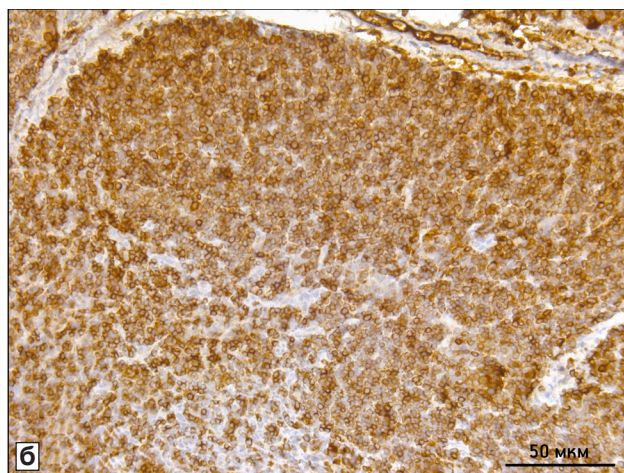
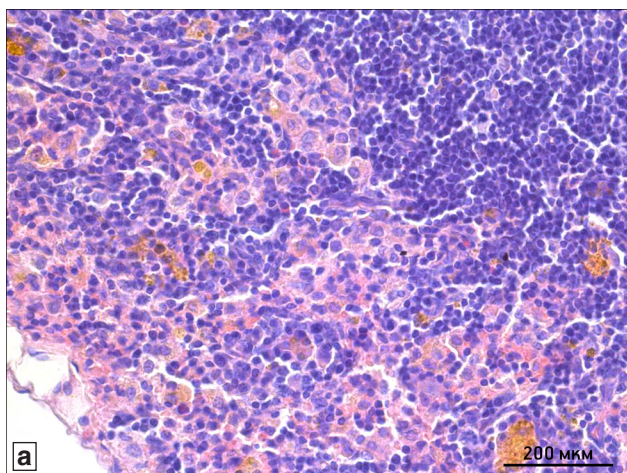
Строение тимуса крыс на фоне развития опухоли значительно отличается от такового у интактных животных. Если в норме дольки тимуса имеют полигональную форму с хорошо различной границей между корковым и мозговым веществом, то введение канцерогена сопровождается выраженными инволютивными изменениями. Это проявляется уменьшением размеров и формированием «многолопастных» долек тимуса. Местами граница между дольками теряется, и формируется картина «сливающихся» долек с общим корковым веществом, при этом в центре органа располагаются крупные дольки с хорошо различной границей коркового и мозгового вещества, а на периферии — более мелкие, с плохо различной границей зон. В периферических отделах тимуса также встречаются атрофированные дольки, изолированные от основной массы жировой тканью.

Изолированные периферические дольки — небольшого размера, в них практически неразличима граница коркового и мозгового вещества. Клеточный состав атрофичных периферических долек существенно отличается от долек, рас-

положенных центрально. Сохраненные тимоциты присутствуют лишь по краю дольки в виде ободка, а основную массу клеток составляют плазматические клетки, макрофаги, а также эпителиальные клетки и эозинофильные гранулоциты. Макрофаги этих долек содержат в цитоплаз-

ме зерна коричневого пигмента, напоминающего гемосидерин, а также фрагменты ядер фагоцитированных лимфоцитов (рисунк, а).

В дольках регистрируется значимое уменьшение их площади на 29% при одновременном снижении относительной массы тимуса на 22%.



Тимус крысы через 5 мес после введения канцерогена.

а — долька (в центре) с проявлениями акcidentalной инволюции; б — высокая экспрессия CD3 в кортикальных и медуллярных тимоцитах; в — густая сеть кортикальных эпителиоцитов; г — CD30<sup>+</sup>-клетки в мозговом веществе и субкапсулярной зоне дольки; д — скопления IgG<sup>+</sup>-плазматических клеток (стрелки) в периферической дольке, подверженной атрофии; е — bcl-2<sup>+</sup>-клетки в дольке тимуса. Окраска гематоксилином—эозином (а); иммуногистохимические реакции на: CD3 (б), панцитокератин (в), CD30 (г), IgG (д), bcl-2 (е)

При канцерогенезе отмечается существенное уменьшение как площади мозгового вещества (на 37%), так и толщины коркового (на 16%). Кроме того, при иммуногистохимическом исследовании выявлено значительное увеличение числа CD3<sup>+</sup>-timoцитов в корковом веществе в 1,65 раза и мозговом веществе — на 14% (см. рисунок, б).

Значительно изменяются количество и цитоархитектоника эпителиальных клеток тимуса, выявляемых иммуногистохимической реакцией с панцитокератином: происходит увеличение их количества в корковом веществе более чем в 2 раза, а в мозговом — в 1,86 раза (таблица). Отростки кортикальных эпителиоцитов анастомозируют между собой и формируют густую сеть, в ячейках которой располагаются лимфоциты. Медуллярные эпителиоциты, напротив, формируют компактные скопления из большого числа клеток, которые лежат периваскулярно в центральных отделах мозговой зоны, но с кортикальными эпителиоцитами не контактируют (см. рисунок, в).

При иммуногистохимическом исследовании тимуса после введения канцерогена отмечалось значимое повышение содержания активированных CD30<sup>+</sup>-лимфоцитов коркового вещества (см. рисунок, г), CD68<sup>+</sup>-макрофагов, S-100<sup>+</sup>-клеток нейроэктодермального гистогенеза и дендритных клеток, а также синаптофизин<sup>+</sup>-клеток нейроэндокринного происхождения (см. таблицу).

Иммуногистохимическое исследование мозгового вещества атрофированных периферических долек демонстрирует существенное отличие клеточного состава от такового у интактных крыс. Основная масса клеток представлена зрелыми плазматическими клетками, дающими интенсивную реакцию с МКАТ к IgM и IgG, число которых составляет 44 и 55% в поле зрения соответственно (см. рисунок, д). Кроме мозгового вещества долек, расположенных на периферии, значитель-

ное число IgM- и IgG-позитивных клеток присутствуют в междольковых септах центральной части органа. В сохраненных долях количество IgM- и IgG-позитивных клеток значимо выше, чем у интактных крыс, почти в 5 раз.

При определении белков-регуляторов апоптоза в структурах долики тимуса животных, получавших канцероген, установлено повышение экспрессии bcl-2 более чем в 8 раз (см. рисунок, е), а также снижение белка p53 более чем на 25% в тимоцитах как коркового, так и мозгового вещества. Использование МКАТ к белку Ki-67 позволило установить повышение его экспрессии в тимоцитах коркового и мозгового вещества на 24 и 41% соответственно.

**Обсуждение полученных данных.** В ходе настоящего исследования установлено, что введение канцерогена приводит к увеличению в тимусе числа клеток, экспрессирующих bcl-2, S-100 и синаптофизин. Как известно, антиапоптотический белок bcl-2 локализуется в иммунных клетках памяти, и повышение его экспрессии служит маркером высокой интенсивности клеточного деления при иммунных нарушениях [14]. Белок p53 также является регулятором апоптоза и осуществляет надзор за состоянием ДНК. Экспрессия этого белка в клетке может указывать на высокую интенсивность апоптоза, а при опухолевой трансформации — на наличие мутации этого гена. При активации в цитоплазме клетки bcl-2 последний вступает в комплекс с белком p53 и инактивирует его, тем самым блокирует апоптоз [11]. Кроме того, изменения в экспрессии белков-регуляторов апоптоза в совокупности с увеличением числа дендритных клеток и клеток APUD-серии свидетельствуют о реакции тимуса на развитие опухоли еще на стадии предопухолевых изменений.

Повышение экспрессии маркера клеточной пролиферации Ki-67, которое совпадает с увеличением числа активных Т-лимфоцитов и клеток тимопоэтического микроокружения, может свидетельствовать о повышении тимопоэза. Эти изменения обусловлены как ответом иммунной системы на рост опухоли, так и, возможно, гиперпродукцией Т-хелперов II типа, необходимых для формирования опухолевой иммунной толерантности [1, 13].

Развитие злокачественной опухоли толстой кишки сочетается с изменением соотношения между CD3<sup>+</sup>-timoцитами мозгового и коркового вещества с преобладанием последних. Уменьшение количества зрелых мозговых CD3<sup>+</sup>-timoцитов можно объяснить их усиленным выходом на периферию в связи с опухолевым ростом, а также увеличением количества клеток

**Содержание эпителиальных клеток в структурах тимуса у контрольных крыс и получавших канцероген ( $\bar{x} \pm s_{\bar{x}}$ )**

| Исследованные показатели          | Интактный контроль | Через 5 мес после введения канцерогена |
|-----------------------------------|--------------------|----------------------------------------|
| Относительное содержание, %:      |                    |                                        |
| кортикальные эпителиоциты         | 15,7±1,6           | 32±3**                                 |
| медуллярные эпителиоциты          | 16,9±1,7           | 31,5±2,8**                             |
| Количество в поле зрения:         |                    |                                        |
| CD68 <sup>+</sup> -клетки         | 48±4               | 70±3*                                  |
| S-100 <sup>+</sup> -клетки        | 34±5               | 67±5**                                 |
| синаптофизин <sup>+</sup> -клетки | 22±3               | 50±6**                                 |
| CD30 <sup>+</sup> -клетки         | 20±3               | 34±5**                                 |

\* Различия по сравнению с показателями в контроле значимы при P<0,01, \*\* при P<0,001.

окружения вследствие инволютивных изменений тимуса. Повышение количества кортикальных CD3<sup>+</sup>-клеток может указывать как на усиление дифференцировки тимоцитов, так и на уменьшение числа незрелых CD3<sup>-</sup>-форм вследствие недостаточного поступления из костного мозга.

Большое значение в способности тимуса к выработке лимфоцитов принадлежит эпителиальной сети коркового вещества. Известно, что эпителиальные клетки вырабатывают тимические гормоны, в том числе тимулин и тимопоэтин, которые необходимы для реаранжировки клеточных рецепторов в процессе дифференцировки тимоцитов [15]. Нами установлено, что инволютивные изменения при введении канцерогена приводят к изменению цитоархитектоники сети кортикальных эпителиоцитов и сопровождаются значимым увеличением их числа. Возможно, сохранение сети эпителиальных клеток является обязательным условием для поддержания тимопоэза при инволюции [8].

Таким образом, мы полагаем, что развивающаяся опухоль через 5 мес способна оказывать кратковременное стимулирующее влияние на продукцию Т-хелперов, которое сочетается с ее токсическим влиянием на костный мозг и нарушением поступления предшественников тимопоэза в тимус. Развивающаяся опухоль, по-видимому, с одной стороны, угнетает поступление предшественников тимопоэза в железу, с другой — усиливает пролиферацию и дифференцировку тимоцитов в зрелые формы.

#### ЛИТЕРАТУРА

- Барышников А.Ю. Взаимодействие опухоли и иммунной системы. *Практ. онкол.*, 2003, т. 4, № 3, с. 127–130.
- Кострова О.Ю., Михайлова М.Н., Стручко Г.Ю. и др. Акцидентальная инволюция тимуса крыс на фоне развития аденокарциномы толстой кишки, индуцируемой 1,2-диметилгидразином на фоне удаления селезенки. *Вестн. Чувашск. ун-та*, 2012, № 3, с. 416–423.
- Кумар Г.Л. и Рудбек Л. Иммуногистохимические методы: руководство. М., изд. ЗАО Амтео, 2011.
- Москвичев Е.В., Меркулова Л.М. и Стручко Г.Ю. Иммуногистохимическая характеристика апоптоза и клеточной пролиферации в тимусе при экспериментальной опухоли толстой кишки. *Иммунология*, 2012, т. 33, № 6, с. 303–305.
- Brtnicky T., Podrazil M., Bartunkova J. et al. Active cellular immunotherapy of ovarian cancer using dendritic cells. *Ceska Gynkol.*, 2012, v. 77, № 3, p. 215–220.
- Buss N.A., Henderson S.J., McFarlane M. et al. Monoclonal antibody therapeutics: history and future. *Curr. Opin. Pharmacol.*, 2012, v. 12, № 5, p. 615–622.
- De Souza A.P. and Bonorino C. The immune system: endogenous anticancer mechanism. *Front. Biosci.*, 2012, v. 1, № 4, p. 2354–2364.
- Flores K.G., Li J., Sempowski G.D. et al. Analysis of the human thymic perivascular space during aging. *J. Clin. Invest.*, 1999, v. 104, № 8, p. 1031–1039.
- Ghiringhelli F., Puig P.E., Roux S. et al. Tumor cells convert immature myeloid dendritic cells into TGF- $\beta$ -secreting cells inducing CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> regulatory T cell proliferation. *J. Exp. Med.*, 2005, v. 202, p. 919–929.
- Gress R.E. and Deeks S.G. Reduced thymus activity and infection prematurely age the immune system. *J. Clin. Invest.*, 2009, v. 119, № 10, p. 2884–2887.
- Israels L.G. and Israels E.D. Apoptosis. *The Oncologist*, 1999, v. 4, № 4, p. 332–339.
- Jacoby R.F., Lior X., Teng B.B. et al. Mutations in the K-ras oncogene induced by 1,2-dimethylhydrazine in preneoplastic and neoplastic rat colonic mucosa. *J. Clin. Invest.*, 1991, v. 87, № 2, p. 624–630.
- Nishimura T., Nakui M., Sato M. et al. The critical role of Th1-dominant immunity in tumor immunology. *Cancer Chemother. Pharmacol.*, 2000, v. 46, p. 52–61.
- Reed J.C., Tsujimoto Y., Alpers J.D. et al. Regulation of bcl-2 proto-oncogene expression during normal human lymphocyte proliferation. *Science*, 1987, v. 236, p. 1295–1299.
- Sempowski G.D., Rhein, M.E., Searce, R.M. and Haynes B.F. Leukemia inhibitory factor is a mediator of Escherichia coli lipopolysaccharide-induced acute thymic atrophy. *Eur. J. Immunol.*, 2002, v. 32, p. 3066–3070.
- Whiteside T.L. Immune responses to malignancies. *J. Allergy Clin. Immunol.*, 2010, v. 125, p. 272–283.

Поступила в редакцию 16.04.2014

Получена после доработки 16.07.2014

#### MORPHOLOGICAL AND IMMUNO-HISTOCHEMICAL CHARACTERISTICS OF THE THYMUS DURING CHEMICAL CARCINOGENESIS INDUCED BY 1,2-DIMETHYLHYDRAZINE ADMINISTRATION

*G. Yu. Struchko, L. M. Merkulova and Ye. V. Moskvichyov*

The aim of the study was to examine the histological and immunohistochemical characteristics of the thymus 5 months after the intraperitoneal administration of the carcinogen (1,2-dimethylhydrazine in the dose of 20 mg/kg once a week for 2 weeks). The study was conducted on 50 outbred albino male rats. Paraffin sections of the thymus were stained with hematoxylin-eosin and were processed by an immunohistochemical method using antibodies against CD3, CD30, CD68, synaptophysin, S-100 protein, p53, bcl-2, Ki-67, as well as against IgM and IgG. It was found that carcinogen administration resulted in the increased number of thymic cells expressing bcl-2, S-100 and Ki-67, active T-lymphocytes and thymopoietic microenvironment cells, as well as in the change of the correlation between medullary and cortical CD3<sup>+</sup>-thymocytes with a predominance of the latter. Thus, the malignant tumor, developing in the colon, on the one hand, inhibits the supply of the precursors of thymopoiesis to the thymus, while on the other — enhances the proliferation and differentiation of thymocytes into mature forms

**Key words:** *thymus, involution, apoptosis, carcinogenesis*

Department of Normal and Topographic Anatomy with Operative Surgery, I.N.Ulyanov Chuvash State University, Cheboksary