

ВОЗРАСТНАЯ ИНВОЛЮЦИЯ И ОСТРАЯ АТРОФИЯ ТИМУСА ПРИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОМ КАНЦЕРОГЕНЕЗЕ

Е. В. Москвичев, Л. М. Меркулова, Г. Ю. Стручко, М. Н. Михайлова, О. Ю. Кострова

Чувашский государственный университет им. И. Н. Ульянова

Исследовано влияние развивающейся экспериментальной опухоли толстой кишки на тимус крысы. Установлено, что при канцерогенезе число зрелых медуллярных тимоцитов остается на постоянном уровне в отличие от возрастной атрофии железы, при которой их количество уменьшается. В тимусе крыс при канцерогенезе увеличивается число клеток нейроэндокринного и нейроэктодермального происхождения в тимопоэтическом микроокружении. Это позволяет предположить, что при канцерогенезе наряду с явлениями атрофии тимической паренхимы имеются признаки сохранения тимопоэза в отличие от возрастной инволюции, при которой продукция тимоцитов снижается.

Ключевые слова: канцерогенез, иммунодефицит, возрастная инволюция тимуса, острая атрофия тимуса, клетки APUD-серии, дендритные клетки.

AGE-RELATED INVOLUTION AND ACUTE THYMIC ATROPHY IN EXPERIMENTAL CARCINOGENESIS

E. V. Moskvichev, L. M. Merkulova, G. Yu. Struchko, M. N. Mychailova, O. Yu. Kostrova

The influence of developing an experimental colon tumors on the thymus in rats. Established that the number of mature medullar thymocytes remains constant during carcinogenesis, in contrast to age-atrophy of thymus, where their number is reduced. Also in tumorogenesis notes an increases number of neuroendocrine and neuroectodermal cells in thymocite microenvironment. This suggests that during carcinogenesis, along with signs of atrophy of the thymic parenchyma there are signs of conservation timopoiesis together as opposed to age involution in which the production of thymocytes is reduced.

Key words: carcinogenesis, immunodeficiency, age-related involution of the thymus, acute thymic atrophy, APUD cells, dendritic cells.

Известно, что рост злокачественных новообразований, зачастую, сопровождается продукцией ими веществ, угнетающих защитные силы организма. Это, в свою очередь, приводит либо к снижению противоопухолевого иммунного ответа, либо к полному его блокированию [12]. При этом опухоль перестает распознаваться иммунными клетками как чужеродная или дефектная ткань и становится биологически более агрессивной. Было установлено, что одну из ключевых ролей в этом процессе играют T-reg клетки, а также дендритные клетки, присутствующие в большом количестве в зоне локального иммунного ответа на границе роста опухоли [2]. Иммуносупрессивные T-reg клетки имеют фенотип CD3+/CD4+/CD25+/Foxp3 и могут происходить из зрелых периферических T-лимфоцитов с фенотипом CD3+/CD 4+/CD25- [11]. Есть мнение, что увеличение в опухоли числа T-reg клеток сочетается с плохим прогнозом и низкой эффективностью лечения [13].

Кроме подавления локального иммунного ответа, опухоль обладает прямым угнетающим влиянием на иммунные органы, что приводит к снижению ими продукции иммунокомпетентных клеток либо к выработке дефектных цитотоксических лимфоцитов, которые также могут служить источником происхождения иммуносупрессивных T-reg клеток [6, 10]. Однако механизм прямого супрессорного влияния опухоли на иммунные органы до конца не ясен.

Немаловажное значение в развитии злокачественных новообразований принадлежит иммунодефицитам. Известно, что старение сопровождается угнетением многих звеньев иммунитета, при этом страдают как клеточный, так и гуморальный иммунный ответ [7]. В настоящее время снижение иммунной реактивности организма вследствие старения считается одной из причин более высокой заболеваемости раком у пожилых по сравнению с молодыми [3]. Есть мнение, что это может быть обусловлено возрастной инволюцией вилочковой железы [5].

ЦЕЛЬ РАБОТЫ

Установление морфологических характеристик, отражающих влияние развивающейся злокачественной опухоли толстой кишки на центральный орган иммуногенеза — тимус и сравнение их с изменениями при возрастной инволюции железы.

МЕТОДИКА ИССЛЕДОВАНИЯ

Работа выполнена на 32 белых нелинейных крысах-самцах 5 месяцев массой 180—220 г. Уход и содержание животных проводили в соответствии с «Правилами проведения работ с использованием экспериментальных животных». Животные были разделены на две группы. Первой группе (22 крысы) внутрибрюшинно ввели 1,2-диметилгидразин из расчета 20 мг/кг массы 1 раз в неделю в течение 5 недель в соответ-

ствии с экспериментальной моделью [4]. Контролем служили 10 интактных крыс соответствующего возраста, которым вводили изотонический раствор хлорида натрия. Выведение животных из эксперимента проводилось через 30 и 150 сут. 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 трех коммерческих моноклональных антител фирмы Santa Cruze (США) и Novocastra (Великобритания):
 - к кластеру дифференцировки лимфоцитов 3 типа;
 - к белку нейроэктодермы S-100 для идентификации дендритных клеток и некоторых популяций эпителиоцитов;
 - к гликопротеиду пресинаптических везикул synaptophysin для идентификации нейроэндокринных клеток.

Материал для исследования методами иммуногистохимии фиксировали 10%-м нейтральным формалином в течение 24 ч, заливали в парафин, готовили срезы толщиной 4 мкм, которые наносили на высокоадгезивные стекла и высушивали при температуре 37 °С в течение 18 ч. Восстановление антигенной активности проводили в цитратном буфере рН 6,0 в автоклаве при температуре 96 °С в течение 20 мин с последующим остыванием в течение 90 мин. Для выявления иммуногистохимической реакции использовалась система визуализации Novolink Polymer Detection System (Novocastra), контролем иммуногистохимической реакции служила неиммунизированная кроличья сыворотка. Результат реакции оценивали путем подсчета позитивно окрашенных клеток на 100 клеток в десяти полях зрения, выражая результаты в процентах.

2. Окраска срезов тимуса гематоксилином и эозином для проведения морфометрических измерений.

3. Компьютерная морфометрия с использованием лицензионных программ Leica application suite 3.6.0 и Микроанализ. Данные обрабатывались статистически, достоверность определялась t-критерием Стьюдента.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Возрастная инволюция тимуса сопровождается структурной перестройкой органа и проявляется в постепенном уменьшении лимфоидной ткани с увеличением количества жировой и фиброзной. Атрофия железы выражается в снижении средней площади тимической дольки с $(1,522 \pm 0,02)$ мм² у крыс 6 месяцев до $(0,976 \pm 0,06)$ мм² у крыс 10 месяцев. При этом регистрируется снижение толщины коркового вещества с $(0,347 \pm 0,018)$ мм до $(0,197 \pm 0,014)$ мм, а также площади мозгового вещества с $(0,597 \pm 0,07)$ мм² до $(0,468 \pm 0,05)$ мм². Отмечается замещение тимической паренхимы жировой тканью, при этом процесс замещения идет с периферических отделов органа. При

окраске гистологических препаратов антителом к кластеру дифференцировки лимфоцитов 3 типа в корковом и мозговом веществе выявляются многочисленные зрелые тимоциты. Установлено, что у молодых интактных крыс позитивную реакцию с CD 3 дают 13 % клеток коркового и 56,9 % клеток мозгового вещества (рис. 1). По мере развития возрастной инволюции регистрируется увеличение числа этих клеток в корковом веществе до 38,7 % и уменьшение их количества в мозговой зоне до 25,6 % (рис. 2). Окраска препаратов молодых крыс к маркеру нейроэктодермы S-100 и белку нейроэндокринной дифференцировки synaptophysin выявляет немногочисленные клетки, локализованные в мозговом веществе и на границе коркового и мозгового вещества. Их количество достигает 18,4 и 12,8 соответственно в поле зрения. Через десять месяцев регистрируется достоверное увеличение числа этих клеток до 34,2 и 22,4 в поле зрения соответственно.

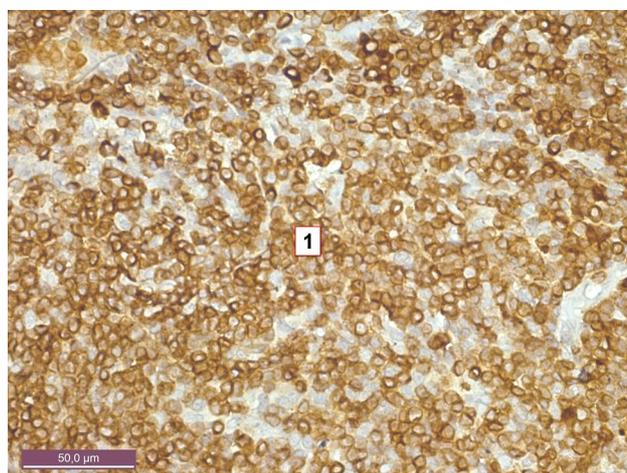


Рис. 1. Тимус интактной крысы 5 месяцев. Экспрессия CD 3 в тимоцитах мозгового вещества. 1 — тимоциты, дающие мембранную окраску с CD 3. Иммуногистохимический метод с CD 3. Ув. 400

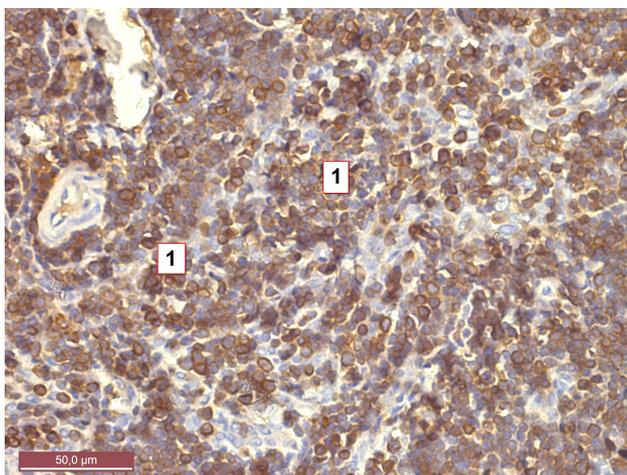


Рис. 2. Тимус интактной крысы 10 месяцев. Уменьшение тимоцитов, экспрессирующих CD 3 в мозговом веществе. 1 — тимоциты, дающие мембранную окраску с CD 3. Иммуногистохимический метод с CD 3. Ув. 400

Введение канцерогена по указанной выше схеме вызывает развитие злокачественной опухоли толстой кишки через пять месяцев эксперимента. Опухоль имеет морфологию дифференцированной аденокарциномы. Формированию опухоли предшествует пролиферация и клеточная дисплазия крипт слизистой оболочки кишки. Морфология тимуса через один месяц после окончания введения канцерогена повторяет изменения у интактных крыс. Это выражается в постепенном снижении площади дольки и мозгового вещества, а так же толщины корковой зоны. Однако на поздних сроках канцерогенеза морфологическая картина существенно отличается от возрастной инволюции. Через пять месяцев эксперимента отмечается двукратное уменьшение площади тимической дольки и мозгового вещества, а также толщины корковой зоны. При окраске препаратов тимуса моноклональными антителами к CD 3 отмечается достоверное увеличение числа позитивных тимоцитов в корковом веществе, тогда как количество этих клеток в медуллярной зоне существенно не меняется, в отличие от возрастной инволюции, при которой регистрировалось достоверное снижение CD 3+ тимоцитов. Окраска препаратов тимуса маркерами нейроэктодермальной и нейроэндокринной дифференцировки выявляет достоверные отличия от возрастной инволюции, которые регистрируются уже на ранних сроках после воздействия. Отмечено, что через месяц после введения канцерогена достоверно увеличивается число клеток, дающих позитивную реакцию к белку S-100 и synaptophysin, а через пять месяцев число этих клеток превышает значения у интактных животных в 2,5 и 3,3 раза соответственно (рис. 3, 4).

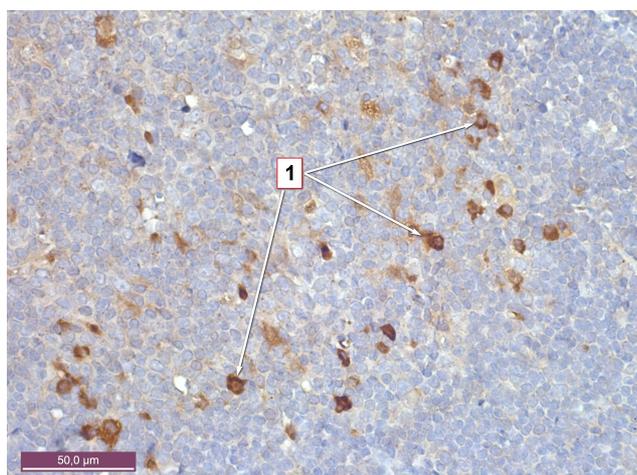


Рис. 3. Тимус крысы 6 месяцев с введением канцерогена. Экспрессия S-100 в дендритных клетках мозгового вещества крысы. 1 — клетки мозгового вещества, позитивные к S-100. Иммуногистохимическая реакция к белку S-100. Ув. 400

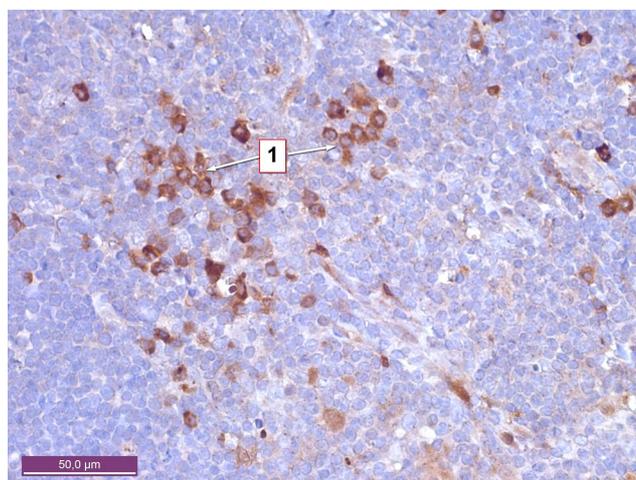


Рис. 4. Тимус крысы 10 месяцев с введением канцерогена. Увеличение клеток, экспрессирующих S-100 в мозговом веществе крысы. 1 — клетки мозгового вещества, позитивные к S-100. Иммуногистохимическая реакция к белку S-100. Ув. 400

Обсуждая полученные результаты, можно сделать вывод, что развившаяся опухоль толстой кишки ускоряет инволютивные процессы в тимусе, что выражается в уменьшении массы органа и морфометрических показателей. Кроме того, по-видимому, имеет место токсическое влияние опухоли на костный мозг, что проявляется в нарушении поступления клеток-предшественников в железу и, как следствие, — относительном увеличении числа зрелых CD3+ кортикальных тимоцитов. В отличие от возрастной инволюции, при которой по мере старения происходит постепенное уменьшение числа CD3+ тимоцитов мозгового вещества, число их при канцерогенезе остается на постоянном уровне. Мы считаем, что это может быть обусловлено усилением тимопоэза в ответ на рост опухоли. На это указывает и значительное увеличение числа клеток, дающих позитивную реакцию с S-100 и synaptophysin. Известно, что в тимусе позитивную реакцию с маркером нейроэктодермальной дифференцировки S-100 дают медуллярные дендритные клетки и некоторые популяции эпителиальных клеток, входящие в состав PVS (периваскулярных пространств медуллярной зоны), а с synaptophysin — нейроэндокринные клетки медуллярной зоны, которые причисляют к клеткам АПУД-серии [8, 1]. Нейромедиаторы, выделяемые нейроэндокринными клетками, регулируют деятельность клеток микроокружения тимоцитов и секрецию ими гормонов и интерлейкинов, которые, в свою очередь, необходимы для созревания и дифференцировки Т-лимфоцитов [9]. Мы полагаем, что одновременное увеличение числа клеток, регулирующих выработку тимоцитов, но имеющих разный гистогенез и механизм действия, может указывать на активизацию тимопоэза. Вероятно, эти клетки одними из первых реагируют на ранний канцерогенез и регулируют инициацию клеточно-иммунного ответа на рост опухоли.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, нами установлено, что на ранних сроках канцерогенеза развивается инволюция тимуса, которая в целом повторяет изменения при возрастной атрофии. Исключения составляют популяция клеток АПУД серии и клетки нейроэктодермального происхождения, которые, по-видимому, первыми из клеток тимуса реагируют на начальном этапе роста опухоли. Канцерогенез, соответствующий этапу инвазивной карциномы, существенно изменяет морфологию тимуса и его клеточную популяцию по сравнению с возрастной атрофией, при этом в железе, наряду с инволютивными изменениями, наблюдаются признаки усиления тимопоэза.

Исследование проведено в рамках гос. контракта №02.740.11.0708 ФЦП «Научные и научно-педагогические кадры инновационной России» на 2009—2013 гг.

ЛИТЕРАТУРА

1. Bai M., Papoudou-Bai A., Karatzias G., et al. // *Anticancer Res.* — 2008 — Vol. 28, № 1A. — P. 295—303.
2. Clarke S. L., Betts G. J., Plant A., et al. // *PLoS One.* — 2006. — Vol. 27, № 1. — P. 129.
3. Dominguez A. L., Lustgarten J. // *Cancer Res.* — 2008. — Vol. 68, № 13. — P. 5423—5431.

4. Gilbert J. M. // *Ann R Coll Surg Engl.* — 1987. — Vol. 69, № 2. — P. 48—53.
5. Gress R. E., Deeks S. G. // *J Clin Invest.* — 2009. — Vol. 119, № 10. — P. 2884—2887.
6. Mailloux A. W., Young M. R. // *Crit Rev Immunol.* — 2010. — Vol. 30, № 5. — P. 435—447.
7. Malaguarnera L., Ferlito L., Di Mauro S., et al. // *Arch Gerontol Geriatr.* — 2001. — Vol. 32, № 2. — P. 77—93.
8. Raica M., Encica S., Motoc A., et al. // *Ann Anat.* — 2006. — Jul, Vol. 188, № 4. — P. 345—352.
9. Savino W., Smaniotto S., Dardenne M. // *Adv Exp Med Biol.* — 2005. — Vol. 567. — P. 167—185.
10. Stewart T. J., Smyth M. J. // *Cancer Metastasis Rev.* — 2011. — Vol. 30, № 1. — P. 125—140.
11. Valzasina B., Piconese S., Guiducci C., et al. // *Cancer Res.* — 2006. — Vol. 66, № 8. — P. 4488—4495.
12. Whiteside T. L. // *Cancer Treat Res.* — 2006. — Vol. 130. — P. 103—124.
13. Wolf D., Wolf A. M., Rumpold H., et al. // *Clin Cancer Res.* — 2005. — Vol. 11, № 23. — P. 8326—8331.

Контактная информация

Москвичев Евгений Васильевич — к. м. н., доцент кафедры нормальной и топографической анатомии с оперативной хирургией, Чувашский государственный университет им. И. Н. Ульянова, e-mail: moskvichev@rambler.ru

УДК 616.91/93(252.247.41): 616-078.7: 576.8077: 616.61-008.6

СЕРОЭПИДЕМИОЛОГИЧЕСКИЙ МОНИТОРИНГ ГЕМОРРАГИЧЕСКОЙ ЛИХОРАДКИ С ПОЧЕЧНЫМ СИНДРОМОМ В ВОЛГОГРАДСКОЙ ОБЛАСТИ

Т. П. Пашанина, Е. А. Жукова, В. П. Смелянский, В. А. Антонов, В. В. Мананков, С. Т. Савченко, А. Н. Чайка, Г. В. Шумакевич, Г. И. Фролова, А. Ю. Фролов

Волгоградский научно-исследовательский противочумный институт, Центр гигиены и эпидемиологии в Волгоградской области

Проведен анализ заболеваемости геморрагической лихорадкой с почечным синдромом среди населения Волгоградской области в 1999—2011 гг. Выявлено, что большинство больных зарегистрировано в северных районах области. Представлены данные о грызунах, зараженных геморрагической лихорадкой с почечным синдромом.

Ключевые слова: геморрагическая лихорадка с почечным синдромом, вирус геморрагической лихорадки с почечным синдромом, природно-очаговая инфекция, заболеваемость геморрагической лихорадкой с почечным синдромом, эпидемиологический анализ.

SEROEPIDEMIOLOGICAL MONITORING OF HEMORRHAGIC FEVER WITH RENAL SYNDROME IN THE VOLGOGRAD REGION

T. P. Pashanina, E. A. Zhukova, V. P. Smelyansky, V. A. Antonov, V. V. Manankov, S. T. Savchenko, A. N. Chaika, G. V. Shumakevich, G. I. Frolova, A. Yu. Frolov

Morbidity of hemorrhagic fever with renal syndrome among the population in the Volgograd region in 1999—2011 has been analyzed. It has been determined that the most number of patients was registered in the north districts of the region. Presented are the data on rodents infected by hemorrhagic fever with renal syndrome.

Key words: hemorrhagic fever with renal syndrome, hemorrhagic fever with renal syndrome virus, feral nidal infection, morbidity of hemorrhagic fever with renal syndrome, epidemiological analysis.

Природно-очаговые инфекции всегда представляли серьезную угрозу здоровью населения Российской

Федерации. Наиболее распространенным нетрансмиссивным зоонозом в РФ является геморрагическая ли-