

## РЕАКЦИЯ CD68<sup>+</sup>, CD45RO<sup>+</sup> И КАТЕХОЛАМИНСОДЕРЖАЩИХ КЛЕТОК СЕЛЕЗЕНКИ НА РАЗВИТИЕ ОПУХОЛИ В ТОЛСТОЙ КИШКЕ У ПОТОМСТВА СПЛЕНЭКТОМИРОВАННЫХ КРЫС-САМОК

© 2021 г. О. М. Арлашкина<sup>1</sup>\*, Г. Ю. Стручко<sup>1</sup>, Л. М. Меркулова<sup>1</sup>, М. Н. Михайлова<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Кафедра нормальной и топографической анатомии с оперативной хирургией  
Чувашского государственного университета им. И.Н. Ульянова, Чебоксары, 428015 Россия

\*E-mail: olgaruz1202@mail.ru

Поступила в редакцию 22.05.2021 г.

После доработки 12.06.2021 г.

Принята к публикации 16.06.2021 г.

Глобальная проблема последних десятилетий — высокая распространенность иммунодефицитных состояний. Факторы, приводящие к иммунной недостаточности, многообразны, в том числе — удаление селезенки (спленэктомия), которая приводит к развитию постспленэктомического синдрома, характеризующегося проявлениями вторичного иммунодефицита и акцидентальной инволюцией тимуса. Это может негативно отражаться и на реактивности клеток иммунной системы потомства и увеличивать риск развития опухолей. Целью исследования явилось изучение реактивности популяций макрофагально-моноцитарного ряда (CD68<sup>+</sup>-клеток), Т-лимфоцитов (CD45RO<sup>+</sup>-клеток) и клеток, содержащих катехоламины, в селезенке потомства спленэктомированных крыс-самок в возрасте 3 и 6 мес. в ответ на развитие опухоли в толстой кишке. Объектом исследования служила селезенка. С помощью люминесцентно-гистохимических и иммуногистологических методов изучены особенности изменения числа CD68<sup>+</sup>-, CD45RO<sup>+</sup>-клеток и уровня биогенных катехоловых аминов. Показано, что у потомства спленэктомированных крыс на фоне низкого уровня катехоламинов в люминесцирующих структурах белой и красной пульпы селезенки реактивность клеток макрофагально-моноцитарной системы и Т-лимфоцитов селезенки на развитие опухоли в толстой кишке менее выражена, чем у потомства интактных крыс. Таким образом, течение беременности в состоянии иммунодефицита, вызванной спленэктомией, приводит к снижению уровня катехоламинов в селезенке потомства на фоне канцерогенеза, что сопровождается низкой реактивностью макрофагов и Т-лимфоцитов.

**Ключевые слова:** иммунодефицит, канцерогенез, катехоламины, потомство, селезенка, спленэктомия, CD68<sup>+</sup>-клетки, CD45RO<sup>+</sup>-клетки

DOI: 10.31857/S0041377121050023

Глобальной проблемой последних десятилетий по-прежнему остается высокая распространенность иммунодефицитных состояний как у взрослых, так и у детей. Известно, что на фоне иммунодефицита значительно увеличивается риск развития злокачественных новообразований (Антоненко и др., 2013; Князева и др., 2018; Венёв и др., 2019). Увеличение числа иммунодефицитов у детей первого года жизни указывает на причинную значимость факторов, действующих пренатально (Реутова, Дроздова, 2008; Слабкая и др., 2015). Имеются сведения о том, что течение беременности в состоянии недостаточности иммунной системы приводит к нарушению развития иммунных органов у плода (Рекалова, 2013).

Факторы, приводящие к нарушению иммунитета, многообразны (Хаитов, 2000). Среди них — оперативные вмешательства на селезенке (Ахметзянов, Гайнаншин, 2018). Известно, что удаление селезенки приводит к развитию широкого спектра осложнений (Uraski, 1982). Одним из наиболее опасных является постспленэктомический гипоспленизм, характеризующийся проявлениями вторичного иммунодефицита и акцидентальной инволюцией тимуса (Апарцин, 2000; Москвичев и др., 2012; Ахметзянов, Гайнаншин, 2018; Меркулова и др., 2018). Кроме того, есть сведения о том, что у спленэктомированных крыс-самок рождается потомство с признаками преждевременной инволюции тимуса (Драндрова и др., 2018).

Известно, что течение онкогенеза сопровождается не только количественными нарушениями компонентов адаптивного и врожденного иммунитета, но и изменениями некоторых функций иммунокомпетентных клеток (Хаитов, 2000; Богданова и др.,

**Принятые сокращения:** ДМГ — 1,2-диметилгидразин; ЛГК — люминесцирующие гранулярные клетки; МКАТ — моноклональные антитела; ПАЛМ — периаартериальные лимфоидные муфты; DAB — 3,3'-диаминобензидин.

2019). Важную роль в иммунных реакциях в селезенке играют субпопуляции CD68<sup>+</sup>- и CD45RO<sup>+</sup>-клеток. Белок CD68 экспрессирован на фагоцитирующих клетках – моноцитах крови и тканевых макрофагах (Шатских, Лузикова, 2012; Regh et al., 2012). Известно, что белок CD68 процессирует антиген путем постепенного ферментативного расщепления фагоцитируемых клеткой объектов, после чего презентует антиген лимфоцитам, а далее запускается антиген-зависимый иммунный ответ и миграцию лимфоцитов (Holness et al., 1993). В результате иммунного реагирования на тот или иной антиген в периферических органах иммунитета накапливаются клетки памяти В- и Т-типа. В периартериальных лимфоидных муфтах и периартериальной зоне лимфоидных узелков определяются CD45RO<sup>+</sup>-иммунореактивные клетки (Федоровская и др., 2012). CD45RO – это специфический маркер всех лимфоцитов, чаще идентифицируется как маркер наивных Т-клеток памяти (Сохоневич и др., 2015). Он больше экспрессируется в Т-зависимых зонах белой пульпы и значительно слабее – в красной пульпе на моноцитах, макрофагах и В-клетках.

Из литературы известно, что важную роль в регуляции деятельности клеток иммунной системы играют люминесцирующие гранулярные клетки и продуцируемые ими катехоламины – дофамин, норадреналин (Гордон, 1982). К настоящему времени доказано, что люминесцирующие гранулярные клетки селезенки участвуют в регуляции локальных механизмов клеточной пролиферации и дифференцировки. К таким клеткам-регуляторам относятся люминесцирующие гранулярные клетки лимфоидного узелка и красной пульпы (Гордон, 1982; Табаева, 2008; Мельникова, 2016).

Имеются сведения о том, что катехоламины способны оказывать различное влияние на лимфоциты и другие иммунокомпетентные клетки, что подтверждается наличием рецепторов к ним на лимфоидных клетках (Кузьмичева, Киселёва, 2004). В частности, показано, что норадреналин способен влиять на активность клеток макрофагально-моноцитарного ряда, усиливать дегрануляцию тучных клеток, стимулировать продукцию антител и повышать активность Т-хелперов (Гордон, 1982; Стручко, 2003).

Кроме того, в литературе имеются данные о том, что опухоль-ассоциированная иммунопатология, индуцированная введением 1,2-диметилгидразина (ДМГ), сопровождается развитием гипотрофических процессов в белой пульпе селезенки (Lisnychuk et al., 2018; Арлашкина и др., 2019). Однако в доступной литературе сведения о влиянии постспленэктомического синдрома на реакцию и взаимосвязь катехоламинов, клеток макрофагально-моноцитарного и лимфоидного происхождения в селезенке у потомства спленэктомированных крыс при 1,2-диметилгидразин-индуцированном канцерогенезе отсутствуют. Исходя из вышесказанного, исследование

реакции CD68<sup>+</sup>-клеток, относящихся к макрофагально-моноцитарному ряду и Т-лимфоцитов, несущих маркеры к CD45RO<sup>+</sup>, с учетом изменений уровня катехоламинов в люминесцирующих гранулярных клетках селезенки у потомства крыс с вторичным иммунодефицитом на фоне канцерогенеза в толстой кишке, является весьма актуальным.

В настоящей работе поставлены следующие задачи: 1) оценить численность клеток макрофагально-моноцитарного (CD68<sup>+</sup>-клеток) и клеток лимфоидного происхождения (CD45RO<sup>+</sup>-клеток) в селезенке у потомства интактных и спленэктомированных крыс при индуцировании у него канцерогенеза в толстой кишке; 2) оценить изменения уровней катехоловых аминов в структурах селезенки и их взаимосвязь с изменениями числа исследуемых клеток на той же модели исследования.

## МАТЕРИАЛ И МЕТОДИКА

**Животные.** Эксперименты выполнены на 110 белых нелинейных крысах-самцах, которые были разделены на 3 группы: 1 – группа контроля, потомство интактных здоровых крыс ( $n = 30$ ); 2 – потомство интактных крыс, которому вводили ДМГ ( $n = 40$ ); 3 – потомство спленэктомированных самок, которому вводили ДМГ ( $n = 40$ ). Все манипуляции с животными производили в соответствии с требованиями “Европейской конвенции о защите животных, используемых в экспериментах” (Директива 86/609/ЕЕС). Потомство интактных животных получали путем спаривания 4-месячных здоровых крыс-самок со здоровыми самцами. Для моделирования у крыс вторичного иммунодефицитного состояния проводили спленэктомию у крыс-самок (Стручко, 2003). Потомство спленэктомированных самок получали через спаривание спленэктомированных крыс-самок (через 1 мес. после операции по удалению селезенки) со здоровыми самцами.

**Экспериментальная модель аденокарциномы толстой кишки.** В качестве канцерогена использовали ДМГ (Acros organics, Бельгия) (Jacoby et al., 1991). Водный раствор ДМГ начинали вводить животным через 1 мес. после рождения внутрибрюшинно 1 раз в неделю в дозе 20 мг/кг в течение 1 мес., согласно известной модели (Jacoby et al., 1991). Выведение животных из эксперимента осуществляли путем декапитации по достижению ими возраста 3 и 6 мес. Объектом исследования служила селезенка. Использовали селезенку только тех крыс, у которых патоморфологически были подтверждены неопластические новообразования в толстой кишке. Срезы селезенки изучали разными методами.

**Иммуногистохимия.** Использовали моноклональные антитела к кластеру дифференцировки 68 типа (CD68), клон ED-1 (Santa Cruse. США) и к кластеру дифференцировки CD45RO, клон UCHL1 (Dako, Дания) (Kumar et al., 2011). Иммуногистохимиче-

ские реакции визуализировали с помощью оптической системы Leica ChromoPlex™ 1 Dual Detection for BOND (США). Чувствительность и специфичность иммуногистохимических реакций оценивали с помощью неиммунизированной кроличьей сыворотки. Положительной иммуногистохимической реакцией на антитела считали коричневую окраску мембраны клетки. С помощью МКАТ к CD68 идентифицировали клетки макрофагальной природы (Шатских, Лузикова, 2012; Regh et al., 2012), а с помощью МКАТ к CD45RO – лимфоциты, преимущественно наивные Т-клетки памяти (Сохоневич и др., 2015).

**Морфометрия.** Для оценки количественной характеристики иммуногистохимических реакций получали цифровые изображения микропрепаратов селезенки с помощью люминесцентного микроскопа Микромед 3 Люм (Россия), цифровой фотокамеры Canon DS126191 (Тайвань) и персонального компьютера. С помощью лицензионной программы “Микро-Анализ” (Санкт-Петербург, 2010) осуществляли количественную оценку интенсивности мембранных иммуногистохимических реакций. На каждом срезе измеряли не менее 10 интересующих полей зрения. Площадь мембранной иммуногистохимической реакции определяли посредством автоматического выделения интересующего цветового спектра (окрашенного DAB). Далее определяли долю окрашенного участка от площади всего снимка в %.

**Визуализация катехоламинов.** Идентификацию катехоламинов в структурах селезенки осуществляли с помощью люминесцентно-гистохимического метода Falk B., Hillarp N. (Falk et al., 1962, в модификации Крохиной и Александровой (1969)). Для выявления структур селезенки, содержащих катехоламины (дофамин, норадреналин) полученные криостатные срезы селезенки подвергали воздействию паров параформальдегида в течение 60 мин при температуре 80°C, после чего срезы высушивали в воздушной среде и заключались в полистирол. Готовые микропрепараты рассматривали под люминесцентным микроскопом Люмам-4 (Россия). Катехоламины обнаруживали по реакции конденсации формальдегидом с образованием конечных продуктов – 3,2-дигидроизохинолинов с ярко-зеленой флуоресценцией.

Уровень катехоламинов в аминокислотных структурах селезенки определяли цитоспектрофлуориметрически (Калмыков, 1982), использовали люминесцентный микроскоп Люмам-4 и фотонасадку ФМЭЛ-1А. Выходное напряжение составляло 600 В. Свет флуоресценции продуктов реакции катехоламинов на препарате, попадая в насадку, проходил через специальное отверстие (зонд) диаметром 0.5 мм, вырезающий в плоскости препарата область, проходящий через интерференционный светофильтр с определенной длиной волны. Использовали светофильтр № 6 с длиной волны пропускания 480 нм. Содержание биогенных катехоловых аминов в структурах селезенки оценивали в усл. ед. флуоресценции по

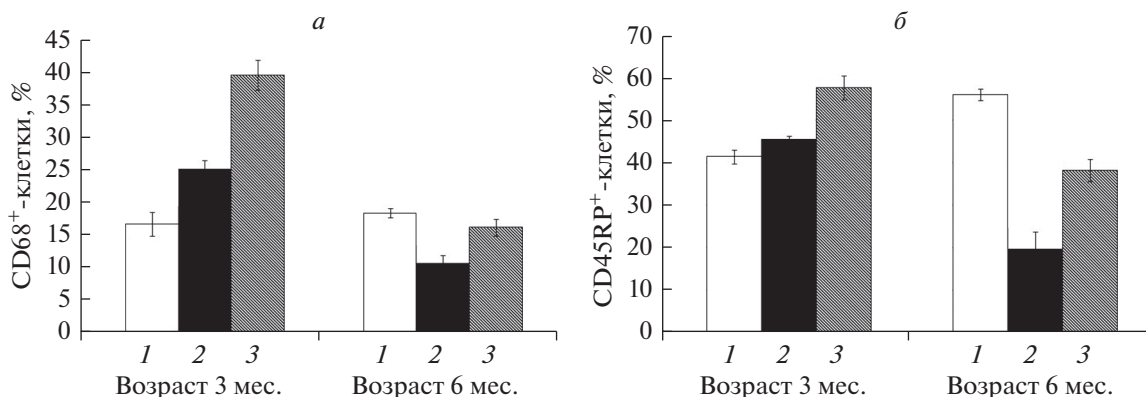
цифровым показаниям шкалы регистрирующего прибора-усилителя.

**Статистическая обработка.** Обработку цифровых данных проводили с помощью электронных таблиц Microsoft Office Excel 2016 и программы Statistica 8.0 (Stat Soft Inc.) с использованием стандартных методов параметрической и непараметрической статистики (Sokal, 1981). Тип распределения устанавливали с помощью критерия Колмогорова–Смирнова с поправкой Лиллиефорса (Siegel, 1988). Для описания данных применяли такие стандартные статистические показатели, как средняя арифметическая величина  $M$  и ее средняя ошибка  $m$ . Последующее множественное сравнение проводили с помощью LSD-критерия Фишера. Различия между группами считали статистически значимыми при  $p < 0.01$  (Гублер, Генкин, 1973; Реброва, 2002).

## РЕЗУЛЬТАТЫ

С помощью иммуногистохимической обработки срезов селезенки моноклональными антителами к CD68 установлено, что большинство CD68<sup>+</sup>-клеток у потомства интактных крыс в возрасте 3 мес. локализованы в красной пульпе. Это мелкие клетки, расположенные чаще небольшими скоплениями в 1–2 слоя. У крыс в возрасте 6 мес. численность популяции CD68<sup>+</sup>-клеток в красной пульпе значительно не изменяется (рис. 1а). В периартериальных лимфоидных муфтах (ПАЛМ) CD68<sup>+</sup>-клетки представлены крупными клетками с интенсивным мембранным окрашиванием, расположенными в наружной зоне небольшими скоплениями. В лимфоидных узелках – единичные CD68<sup>+</sup>-клетки с меньшим накоплением хромогена, но крупные и локализованы преимущественно на границе между центром размножения и зоной мантии. Их численность у 6-месячных крыс по сравнению с 3-месячными уменьшается практически вдвое ( $p < 0.01$ ).

CD45RO<sup>+</sup>-клетки локализируются, преимущественно, группами в наружной зоне ПАЛМ. В основном, это Т-клетки памяти. Также встречаются единичные клетки в лимфоидных узелках и в красной пульпе. Число CD45RO-положительных клеток в ПАЛМ и в красной пульпе у крыс больше в возрасте 6 мес., чем в 3 мес. (рис. 1б). При параллельном люминесцентно-гистохимическом исследовании в селезенке выявляется специфическое свечение люминесцирующих гранулярных клеток (ЛГК) в темно-зеленой белой пульпе и более светлой оранжево-зеленой красной пульпе. В герминативном центре лимфоидного узелка люминесцирующие клетки имеют преимущественно округлую форму с яркой желто-белой люминесценцией, расположены компактно на границе с зоной мантии аналогично CD68<sup>+</sup>-клеткам. В ПАЛМ выявляются немногочисленные гранулярные клетки с неярым желтовато-оранжевым свечением, размер и форма которых



**Рис. 1.** Изменение численности CD68<sup>+</sup>-клеток в красной пульпе селезенки (а) и CD45RO<sup>+</sup>-клеток в периартериальных лимфоидных муфтах селезенки (б) у потомства от крыс интактных (1, 2) и спленэктомированных (3). Потомство: 1, 3 – интактное, 2 – интактное с введенным канцерогеном ДМГ.

сильно варьирует. Численность и локализация люминесцирующих клеток у крыс 3-х и 6-месячного возраста не различаются, однако у них изменяется содержание катехоламинов. Их уровень наиболее значительно увеличивается в структурах белой пульпы, а в красной пульпе, наоборот, уменьшается (табл. 1).

Введение ДМГ потомству интактных крыс привело к развитию у него небольших опухолевидных образований с умеренной дисплазией эпителия кишечных крипт в возрасте 3 мес. (через 1 мес. после окончания курса инъекций). А у крыс в возрасте 6 мес. (через 4 мес. после инъекций) в 85% случаев развивается аденокарцинома с высокой или умеренной степенью дифференцировки. У потомства спленэктомированных крыс в возрасте 3-х мес. после инъекций канцерогена была выявлена выраженная дисплазия эпителия кишечных крипт, а через 4 мес. у них в 100% случаев выявлялась аденокарцинома умеренной или низкой степени дифференцировки.

Исследовали селезенку только тех крыс, в толстой кишке которых были выявлены неопластические образования.

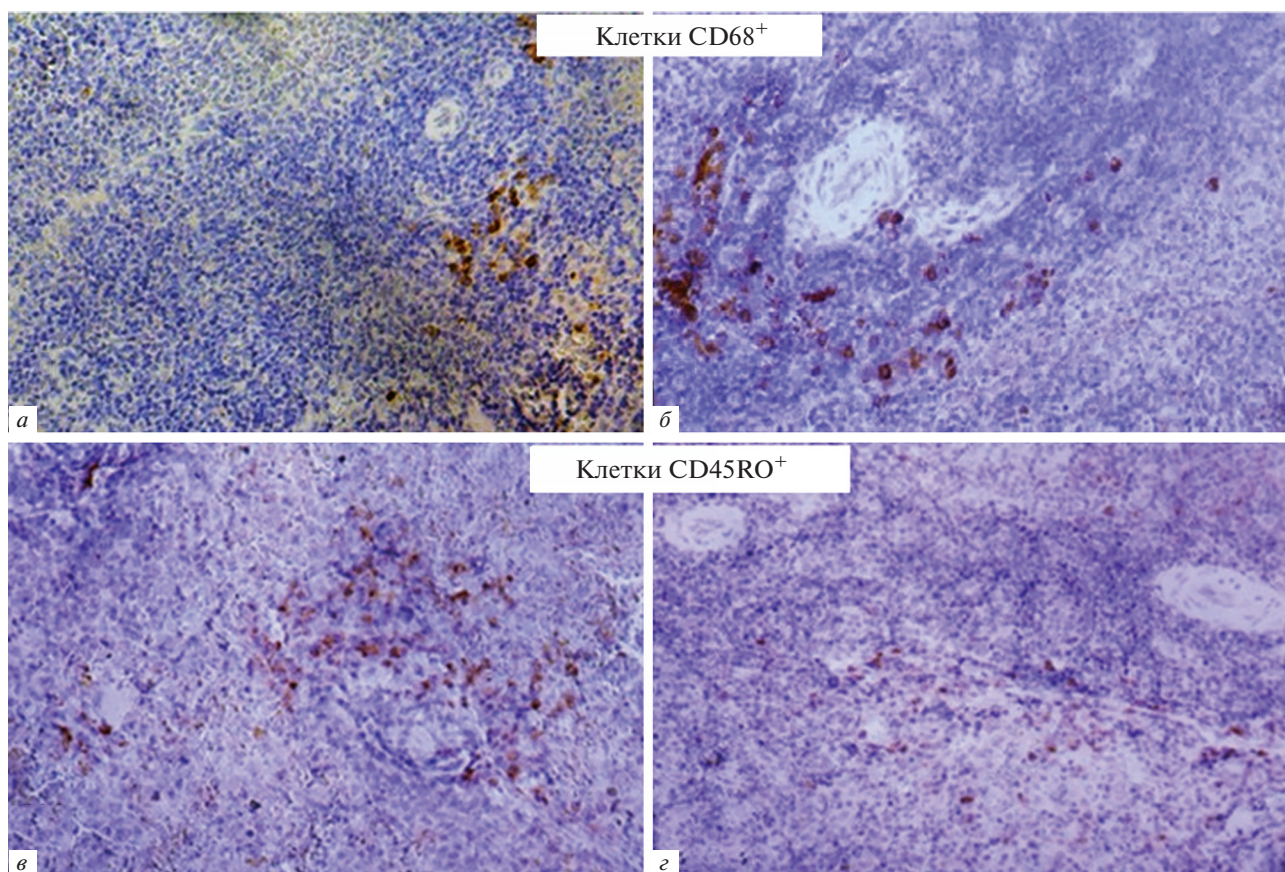
Развитие опухоли в толстой кишке у потомства интактных крыс привело к перераспределению субпопуляций CD68<sup>+</sup>- и CD45RO<sup>+</sup>-клеток в структурах селезенки. В возрасте 3 мес. в красной пульпе селезенки количество CD68<sup>+</sup>-клеток увеличивается у потомства интактных крыс на 51%, а у потомства спленэктомированных крыс – более чем в 2 раза (рис. 2б). Однако в возрасте 6 мес. численность этих клеток уменьшается с более низким значением у потомства интактных крыс (рис. 1а). Число CD68<sup>+</sup>-клеток в герминативном центре и ПАЛМ по сравнению с контролем значимо не изменяется. Изменения числа клеток, экспрессирующих CD45RO, имеют ту же направленность, что и изменения числа CD68<sup>+</sup>-клеток. Так, в 3 мес. численность CD45RO<sup>+</sup>-

**Таблица 1.** Уровень катехоламинов в люминесцирующих структурах селезенки крыс в возрасте 3-х и 6 мес. в контроле и после введения канцерогена ДМГ

Структура	Уровень катехоламинов, усл. ед. (M ± m)					
	контроль		потомство с введенным ДМГ от интактных крыс		потомство с введенным ДМГ от спленэктомированных крыс	
	3 мес.	6 мес.	3 мес.	6 мес.	3 мес.	6 мес.
ЛГК-ГЦ	168.5 ± 9.3	242.0 ± 22.5	70.2 ± 5.6 <sup>б</sup>	103.8 ± 7.2 <sup>б</sup>	157.7 ± 3.8	83.5 ± 5.2 <sup>б</sup>
МО-ГК-ГЦ	110.09 ± 7.9	171.3 ± 11.4	112.6 ± 2.4	59.5 ± 4.9 <sup>б</sup>	100.5 ± 1.2	44.6 ± 2.3 <sup>б</sup>
ЛГК-ПАЛМ	87.6 ± 3.9	114.1 ± 0.5	178.6 ± 7.2 <sup>б</sup>	265.1 ± 3.0 <sup>б</sup>	72.9 ± 1.8 <sup>б</sup>	47.6 ± 0.6 <sup>б</sup>
МО-ЛГК-ПАЛМ	47.6 ± 0.6	70.0 ± 10.9	47.3 ± 0.5	138.8 ± 16.9 <sup>а</sup>	35.3 ± 1.5	131.4 ± 12.2 <sup>б</sup>
ЛГК-КП	242.9 ± 24.9	199.8 ± 12.9	285.6 ± 2.3	73.7 ± 3.4 <sup>б</sup>	213.4 ± 26.1	73.3 ± 4.6 <sup>б</sup>
МО-ЛГК-КП	204.3 ± 23.2	195.8 ± 12.5	215.3 ± 23.5	53.1 ± 1.8 <sup>б</sup>	212.8 ± 8.5	41.3 ± 2.7 <sup>б</sup>

**Примечание.** ГЦ – герминативный центр, КП – красная пульпа, ЛГК – люминесцирующие гранулярные клетки, МО – микроокружение, ПАЛМ – периартериальные лимфоидные муфты. Различия по сравнению с группой контроля того же возраста достоверны при <sup>а</sup>p < 0.01 или <sup>б</sup>p < 0.001.





**Рис. 2.** Увеличение численности  $CD68^+$ -клеток при развитии опухоли в толстой кишке у потомства спленэктомированных крыс в возрасте 3 мес. (*a, б*) и уменьшение численности  $CD45RO^+$ -клеток при развитии той же опухоли у потомства intactных крыс в возрасте 6 мес. (*в, г*). Иммуноцитохимия. Клетки  $CD68^+$  и  $CD45RO^+$  окрашены коричневым цветом. *a* – потомство intactных крыс без воздействия; *б* – потомство спленэктомированных крыс, которому вводили канцероген ДМГ; *в* – потомство intactных крыс без воздействия; *г* – потомство intactных крыс, которому вводили ДМГ. Увел. об.:  $40\times$ .

клеток в ПАЛМ увеличивается у потомства intactных крыс на 10%, а у потомства спленэктомированных крыс – на 39%. В возрасте 6 мес., наоборот, происходит уменьшение числа  $CD45RO^+$ -клеток: у потомства intactных крыс – на 64% (рис. 2*г*), а у потомства спленэктомированных крыс – всего на 31% (рис. 1*б*).

В ходе экспериментов было выявлено, что изменения числа клеток селезенки, экспрессирующих  $CD68$  и  $CD45RO$ , сопровождаются изменением уровня катехоламинов в ЛГК и лимфоцитах их микроокружения. На фоне ДМГ-индуцированного канцерогенеза у потомства intactных крыс в возрасте 3 мес. происходит увеличение уровня катехоламинов в ПАЛМ в 2 раза, а в ЛГК герминативных центров, напротив, отмечается их 2-кратное уменьшение. При этом катехоламиновая обеспеченность лимфоцитов их микроокружения, а также красной пульпы остается такой же, как у контрольных крыс (табл. 1). На более позднем сроке канцерогенеза (у крыс в возрасте 6 мес.) уровень катехоламинов в ЛГК герминативных центров по сравнению с кон-

тролем также сокращается (в 2, 3 раза), в их микроокружении – практически в 3 раза. На этом сроке исследования в ПАЛМ (как в ЛГК, так и микроокружении) уровень катехоламинов так же, как и на раннем сроке канцерогенеза, остается повышенным в 2 раза, однако в красной пульпе уменьшается в 2.7 раз (табл. 1).

Таким образом, увеличение числа  $CD68^+$ - и  $CD45RO^+$ -клеток при канцерогенезе в толстой кишке у потомства intactных крыс в возрасте 3 мес. коррелирует с уменьшением уровня катехоламинов в ЛГК герминативных центров и с увеличением их содержания в ЛГК периартериальных лимфоидных муфт. Уменьшение числа  $CD68^+$ -клеток в красной пульпе и сокращение численности  $CD45RO^+$ -клеток в возрасте 6 мес. сопровождается уменьшением уровня катехоламинов в ЛГК и микроокружении герминативных центров и красной пульпы и в то же время – возрастанием уровня катехоламинов в ПАЛМ.

Развитие опухоли на фоне врожденного иммунодефицитного состояния сопровождается несколько

иными изменениями уровня катехоламинов в структурах селезенки. У 3-месячного потомства спленэктомированных крыс эти изменения в ЛГК в ПАЛМ носят противоположный характер по сравнению с таковыми показателями у потомства интактных крыс с ДМГ-индуцированным канцерогенезом (табл. 1), что сочетается с более значимым возрастанием числа CD45RO<sup>+</sup>-клеток у этой группы крыс. В других исследуемых структурах селезенки потомства спленэктомированных самок значения катехоламинов остаются на уровне контрольных показателей, что указывает на их низкую реактивность. В возрасте 6 мес. при канцерогенезе на фоне иммунодефицита уровень катехоламинов уменьшается практически во всех исследуемых структурах, при этом в ЛГК в ПАЛМ их изменение противоположно изменению аналогичного показателя у потомства здоровых крыс (табл. 1). Поскольку CD45RO<sup>+</sup>-клетки локализируются преимущественно в наружной зоне ПАЛМ на границе с красной пульпой, вероятно, на изменение числа этих клеток оказывают влияние катехоламины красной пульпы.

### ОБСУЖДЕНИЕ

В ходе эксперимента была выявлена взаимосвязь изменений числа клеток макрофагально-моноцитарной природы (CD68<sup>+</sup>), лимфоидного происхождения (CD45RO<sup>+</sup>) и уровня катехоламинов в люминесцирующих гранулярных клетках селезенки и их микроокружении при развитии опухоли в толстой кишке. Было выявлено, что на ранних сроках онкогенеза у потомства интактных крыс (в возрасте 3 мес.) наблюдается увеличение числа CD68<sup>+</sup>-клеток в красной пульпе и CD45RO<sup>+</sup>-клеток в наружной зоне ПАЛМ, что, вероятно, можно расценивать как ответную реакцию этих клеток на антигенную стимуляцию при развитии опухоли в толстой кишке (Ato et al., 2004). На более позднем этапе онкогенеза (у крыс в возрасте 6 мес.) происходит уменьшение CD68<sup>+</sup>-клеток красной пульпы и CD45RO<sup>+</sup>-клеток ПАЛМ, что может свидетельствовать о миграции клеток из органа к растущей опухоли (Perse, Cerar, 2011). Известно, что на активность клеток макрофагально-моноцитарной природы и миграцию лимфоцитов способны влиять катехоламины (Кузьмичева, Киселёва, 2004). Нами экспериментально показано, что при росте числа клеток CD68<sup>+</sup> и CD45RO<sup>+</sup> у 3-месячных крыс снижается уровень катехоламинов в ЛГК герминативных центров и увеличивается их содержания в ЛГК в ПАЛМ, а в возрасте 6 мес. при уменьшении числа этих клеток, наоборот, происходит уменьшение уровня катехоламинов в ЛГК и микроокружении герминативных центров и красной пульпы и, в то же время, параллельно возрастает их уровень в ПАЛМ.

Исследование показало, что у потомства спленэктомированных крыс при развитии опухоли тол-

стой кишки отмечаются несколько иные изменения в реакции клеток макрофагально-моноцитарной природы и Т-лимфоцитов, а также катехоламинового обеспечения клеток и паренхимы селезенки. Так, уровень катехоламинов в люминесцирующих гранулярных клетках ПАЛМ уменьшается и в возрасте 3 мес., и более значимо в возрасте 6 мес., что ведет к недостаточной реактивности и уменьшению миграции к опухоли CD68<sup>+</sup>- и CD45RO<sup>+</sup>-клеток (Ato, 2004; Perse, Cerar, 2011).

### ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, у потомства спленэктомированных крыс в селезенке наблюдается менее выраженная, чем у потомства интактных крыс, реактивность клеток макрофагально-моноцитарной системы и Т-лимфоцитов в ответ на развитие опухоли в толстой кишке. Важную роль при этом играют катехоламины. По нашему мнению, ведущим патогенетическим звеном недостаточной реактивности клеток селезенки является напряжение гипоталамо-гипофизарно-надпочечниковой системы (Стручко и др., 2011), ускорение процессов инволюции тимуса и уменьшение миграции Т-лимфоцитов в селезенку, что, в конечном итоге, может привести к усугублению опухолевой прогрессии.

### ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа выполнена за счет бюджетного финансирования Чувашского государственного университета имени И.Н. Ульянова.

### СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Все манипуляции с животными проводили в соответствии с требованиями “Европейской конвенции о защите животных, используемых в экспериментах” (Директива 86/609/ЕЕС) и приказом Министерства здравоохранения РФ № 26Э от 19.06.03 “Об утверждении правил лабораторной практики”. Исследование единогласно одобрено на заседании Локального этического комитета медицинского факультета Чувашского государственного университета им. И.Н. Ульянова (протокол № 20-01 от 29.01.2020 г.).

### КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликтов интересов.

### ВКЛАД АВТОРОВ

О.М. Арлашкина: сбор и обработка материала, статистическая обработка и написание текста; Г.Ю. Стручко, Л.М. Меркулова: концепция и дизайн исследования, редактирование; М.Н. Михайлова: сбор и обработка материала, редактирование текста.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Апарцин К.А., Григорьев Е.Г., Коган А.С.* 2000. Аутотрансплантация ткани селезенки при вынужденной спленэктомии в условиях хирургической инфекции живота. Хирургия тяжелых гнойных процессов. Новосибирск: Наука. Гл. 8. С. 193. (*Apartsin K.A., Grigor'ev E.G., Kogan A.S.* 2000. Spleen tissue autotransplantation during forced splenectomy under conditions of surgical infection of the abdomen. Surgery of severe purulent processes. Novosibirsk: Science. Ch. 8. P. 193.)
- Антонеева И.И., Абакумова Т.В., Генинг Т.П.* 2013. Иммунофенотип синдрома вторичного иммунодефицита при раке яичников. Медицинский альманах. Т. 29. № 5. С. 77. (*Antoneeva I.I., Abakumova T.V., Gening T.P.* 2013. Immunophenotype of secondary immunodeficiency syndrome in ovarian cancer. Med. Almanac. V. 29. № 5. P. 77.)
- Арлашкина О.М., Стручко Г.Ю., Меркулова Л.М., Михайлова М.Н.* 2019. Изменения белой пульпы селезенки у потомства спленэктомизированных крыс разных возрастных периодов после введения 1,2-диметилгидразина. Клиническая и экспериментальная морфология. Т. 8. № 4. С. 49. (*Arlashkina O.M., Struchko G.Yu., Merkulova L.M., Mikhailova M.N.* 2019. Changes in the white pulp of the spleen in the offspring of splenectomized rats of different age periods after administration of 1,2-dimethylhydrazine. Clinical Exper. Morphol. V. 8. № 4. P. 49.) <https://doi.org/10.31088/CEM2019.8.4.49-58>
- Ахметзянов Ф.Ш., Гайнанишин Р.Р.* 2018. Клеточные и гуморальные изменения после спленэктомии. Казанский медицинский журнал Т. 99. № 5. С. 802. (*Akhmetzyanov F.Sh., Gainanshin R.R.* 2018. Cellular and humoral changes after splenectomy. Kazan Med. J. V. 99. № 5. С. 802.) <https://doi.org/10.17816/KMJ2018-802>
- Богданова И.М., Болтовская М.Н., Рахмилевич А.Л., Артемьева К.А.* 2019. Ключевая роль опухолевых ассоциированных макрофагов в прогрессии и метастазировании опухолей. Иммунология. Т. 40. № 4. С. 41. (*Bogdanova I.M., Boltovskaya M.N., Rakhmylevich A.L., Artemyeva K.A.* 2019. The key role of tumor-associated macrophages in tumor progression and metastasis. Immunology. V. 40. № 4. P. 41.)
- Венёв Д.А., Дерипана Е.В., Ронпельт А.А., Лаберко А.Л., Абрамов Д.С., Варламова Т.В., Мухина А.А., Балашов Д.Н., Щербина А.Ю.* 2019. Лимфома как редкое осложнение тяжелой комбинированной иммунной недостаточности. Вопросы гематологии/онкологии и иммунопатологии в педиатрии. Т. 18. № 1. С. 104. (*Venev D.A., Deripana E.V., Roppelt A.A., Laberko A.L., Abramov D.S., Varlamova T.V., Mukhina A.A., Balashov D.N., Shcherbina A.Yu.* 2019. Lymphoma as a rare complication of severe combined immune deficiency. Issues Hematol. Oncol. Immunopathol. Pediatrics. V. 18. № 1. P. 104.)
- Гордон Д.С., Сергеева В.Е., Зеленова И.Г.* 1982. Нейротрансмиттеры лимфоидных органов. М.: Наука. (*Gordon D.S., Sergeeva V.E., Zelenova I.G.* 1982. Neurotransmitters of Lymphoid Organs. Moscow: Nauka.)
- Гублер Е.В., Генкин А.А.* 1973. Применение критериев непараметрической статистики для оценки различий двух групп наблюдений в медико-биологических исследованиях. Москва: Медицина. (*Gubler E.V., Genkin A.A.* 1973. Application of criteria for nonparametric statistics to assess the differences between two groups of observations in biomedical research. Moscow: Meditsina.)
- Драндрова Е.Г., Стручко Г.Ю., Меркулова Л.М., Москвичев Е.В.* 2018. Морфология тимуса при экспериментальном канцерогенезе потомства самок с вторичным иммунодефицитом. Чебоксары: Чувашский государственный университет имени И.Н. Ульянова. 140 с. (*Drandrova E.G., Struchko G.Yu., Merkulova L.M., Moskvichev E.V.* 2018. Morphology of the thymus in experimental carcinogenesis of the offspring of females with secondary immunodeficiency. Cheboksary: Chuvashskiy gosudarstvennyy universitet imeni I.N. Ul'yanova. 140 p.)
- Калмыков В.Л.* 1982. Современные методы количественного определения катехоламинов и серотонина. Лечебное дело. № 7. С. 31. (*Kalmykov V.L.* 1982. Modern methods for the quantitative determination of catecholamines and serotonin. Lechebnoe Delo. № 7. P. 31.)
- Князева О.А., Уразаева С.И., Усачев С.А., Конкина И.Г.* 2018. Влияние глюкагонов 3D-металлов на поглотельную и метаболическую активность фагоцитов при экспериментальном иммунодефиците. Современные проблемы науки и образования. № 4. С. 205. (*Knyazeva O.A., Urazaeva S.I., Usachev S.A., Konkina I.G.* 2018. Influence of 3D-metal glucagons on the absorption and metabolic activity of phagocytes in experimental immunodeficiency. Modern Problems Sci. Edu. № 4. P. 205.)
- Крохина Е.М., Александрова П.Н.* 1969. Симпатический (адренергический) компонент эффекторной иннервации сердечной мышцы. Кардиология. № 3. С. 97. (*Krokhina E.M., Alexandrova P.N.* 1969. Sympathetic (adrenergic) component of the effector innervation of the heart muscle. Kardiologiya. № 3. P. 97.)
- Кузьмичева Л.В., Киселёва Л.В.* 2004. Адаптационные возможности иммунокомпетентных клеток. Саранск: Издательство Мордовского университета. 180 с. (*Kuzmicheva L.V., Kiseleva L.V.* Adaptive capabilities of immunocompetent cells. Saransk: Publishing house of the Moravian University. 180 p.)
- Мельникова О.В.* 2016. Морфологическая и иммуногистохимическая характеристики селезенки при поступлении солей кальция с питьевой водой. Автореф. дис. ... канд. биол. наук. 20 с. Оренбург. (*Melnikova O.V.* 2016. Morphological and immunohistochemical characteristics of the spleen upon intake of calcium salts with drinking water: Abstract of Ph.D. Thesis. 20 p. Orenburg.)
- Меркулова Л.М., Стручко Г.Ю., Драндрова Е.Г., Михайлова М.Н.* 2018. Морфологическое исследование тимуса потомства крыс при экспериментальном канцерогенезе на фоне иммунодефицитной беременности самок. Морфология. Т. 153. № 3. С. 181. (*Merkulova L.M., Struchko G.Yu., Drandrova E.G., Mikhailova M.N.* 2018. Morphological study of the thymus of rat offspring during experimental carcinogenesis against the background of immunodeficient pregnancy in females. Morphology. V. 153. № 3. P. 181.)
- Москвичев Е.В., Меркулова Л.М., Стручко Г.Ю., Михайлова М.Н., Кострова О.Ю.* 2012. Иммуногистохимическая характеристика акцидентальной инволюции после спленэктомии. Вестник национального медико-хирургического центра им. Н.И. Пирогова. Т. 7. № 12. С. 40. (*Moskvichev E.V., Merkulova L.M., Struchko G.Yu., Mikhailova M.N., Kostrova O.Yu.* 2012. Immunohistochemical characterization of accidental involution of the thymus after splenectomy. Bulletin of Pyrogov Nat. Med. Surgical Center. V. 7. № 12. P. 40.)

- Реброва О.Ю. 2002. Статистический анализ медицинских данных. Применение пакета прикладных программ STATISTICA. М.: Медиа Сфера. (Rebrova O.Yu. 2002. Statistical Analysis of Medical Data. Application of the STATISTICA application package. Moscow: Publishing Media Sphere.)
- Рекалова Е.М. 2013. Механизмы формирования вторичной иммунной недостаточности и возможности ее коррекции. Астма та алергія. № 1. С. 13. (Rekalova E.M. 2013. Mechanisms of the formation of secondary immune deficiency and the possibility of its correction. Asthma and Allergies. № 1. P. 13)
- Реутова Е.А., Дроздова Е.А. 2008. Основные морфологические и морфометрические изменения показателей селезенки в системе “мать–плод” в условиях коррекции. Вестник Красноярского государственного аграрного университета. № 3. С. 245. (Reutova E.A., Drozdova E.A. 2008. Main morphological and morphometric changes in spleen indices in the mother-fetus system under conditions of correction. Bull. Krasnoyarsk State Agrarian University. № 3. P. 245.)
- Слабкая Е.В., Сазоненкова Л.В., Андреевкова Ю.С., Мешкова Р.Я. 2015. Клинические особенности селективной недостаточности IgG у детей младшего возраста. Вестник Смоленской государственной медицинской академии. Т. 14. № 3. С. 27. (Slabkaya E.V., Sazonenkova L.V., Andreenkova Yu.S., Meshkova R.Ya. 2015. Clinical features of selective IgG deficiency in young children. Bull. Smolensk State Med. Acad. V. 14. № 3. P. 27.)
- Сохоневич Н.А., Хазиахматова О.Г., Юрова К.А. 2015. Фенотипическая характеристика и функциональные особенности Т- и В-клеток иммунной памяти. Цитология. Т. 57. № 5. С. 311. (Sokhonevich N.A., Khaziakhmatova O.G., Yurova K.A. 2015. Phenotypic characteristics and functional characteristics of T and B cells of immune memory. Tsitologiya. V. 57. № 5. P. 311.)
- Стручко Г.Ю. 2003. Морфофункциональное исследование тимуса и иммунобиохимических показателей крови после спленэктомии и иммунокоррекции. Автореф. дис. ... докт. биол. наук. 40 с. Саранск. (Struchko G.Yu. 2003. Morphofunctional study of the thymus and immunobiochemical parameters of blood after splenectomy and immunocorrection. Doctor Thesis. 40 p. Saransk.)
- Стручко Г.Ю., Меркулова М.Н., Москвичев Е.В., Кострова О.Ю., Михайлова М.Н., Драндрова Е.Г., Мухаммад З. 2011. Морфологическая и иммуногистохимическая характеристика опухолей желудочно-кишечного тракта на фоне иммунной недостаточности. Вестник Чувашского университета. № 3. С. 450. (Struchko G.Yu., Merkulova M.N., Moskvichev E.V., Kostrova O.Yu., Mikhaylova M.N., Drandrova E.G., Mukhammad Z. 2011. Morphological and immunohistochemical characteristics of tumors of the gastrointestinal tract against the background of immune deficiency. Bull. Chuvash University. № 3. P. 450.)
- Табеева Н.Н. 2008. Люминесцентно-гистохимический анализ биоаминсодержащих структур селезенки при ауто- и изотрансплантации костного мозга. Автореф. канд. дисс. 20 с. Саранск. (Tabaeva N.N. 2008. Luminescence-histochemical analysis of bioamine-containing structures of the spleen during auto- and isotransplantation of bone marrow. Abstract of Ph.D. Thesis. 20 p. Saransk.)
- Федоровская Н.С., Дьяконов Д.А., Федоровская Н.С. 2012. Изменения микроциркуляции селезенки у больных иммунной тромбоцитопенией. Гематология и трансфузиология. Т. 57. № S3. С. 83. (Fedorovskaya N.S., Dyakonov D.A., Fedorovskaya N.S. 2012. Changes in spleen microcirculation in patients with immune thrombocytopenia. Hematol. Transfusiol. V. 57. № S3. P. 83.)
- Хаитов Р.М., Игнатьева Г.А., Сидорович И.Г. 2000. Иммунология: учебник. Москва: Медицина. 432 с. (Khaitov P.M., Ignat'eva G.A., Sidorovich I.G. 2000. Immunology: Textbook. Moscow: Medicine. 432 p.)
- Шатских О.А., Лузикова Е.М. 2012. Морфофункциональная реакция натуральных киллеров и макрофагов селезенки на введение мелатонина животным, содержащимся при различных световых режимах. Морфология. Т. 141. № 1. С. 43. (Shatskikh O.A., Luzikova E.M. 2012. Morphofunctional response of natural killer cells and macrophages of the spleen to the introduction of melatonin to animals kept under different light conditions. Morphology. V. 141. № 1. P. 43.)
- Kumar G.L., Rudbeck L. (Eds.). 2011. Иммуногистохимические методы: руководство. М.: ЗАО АМТЕО-М. 224 с. (Kumar G.L., L. Rudbeck (Eds.). 2009. Education Guide Immunohistochemical Staining Methods. Dako Denmark A/S, An Agilent Technologies Company. 172 p.)
- Ato M., Nakano H., Kakiuchi T., Kaye P. 2004. Localization of marginal zone macrophages is regulated by C-C chemokine ligands. J. Immunol. V. 173. P. 4815.
- Lisnychuk N., Soroka Y., Andrijchuk I. 2018. Histological changes in spleen under condition of toxic carcinogenesis. Georgian Med. News. № 280–281. P. 160.
- Holness C.L., R.P. do Silva, Fawcett J. 1993. Macrosialin, a mouse macrophage – restricted glycoprotein, is a member of the lamp. J. Biol. Chem. 1993. V. 268. P. 9661.
- Jacoby R.F., Llor X., Teng B.B., Davidson N.O., Brasitus T.A. 1991. Mutations in the K-ras oncogene induced by 1,2-dimethylhydrazine in preneoplastic and neoplastic rat colonic mucosa. J. Clin. Invest. V. 87. P. 624.
- Falk B., Hillarp N.A., Thieme G. 1962. Fluorescence of catechol-amines and related compounds condensed with formaldehyde. J. Histochem. Cytochem. V. 10. P. 348.
- Perse M., Cerar A. 2011. Morphological and molecular alterations in 1,2-dimethylhydrazine and azoxymethane induced colon carcinogenesis in rats. J. Biomed. Biotechnol. V. 2011. P. 14.
- Regh J.E., Bush D., Ward J.M. 2012. The utility of immunohistochemistry for the identification of hematopoietic and lymphoid cells in normal tissues and interpretation of proliferative and inflammatory lesions of mice and rats. Toxicolopathol. V. 40. P. 345. <https://doi.org/10.1177/0192623311430695>
- Siegel S., Castellan Jr. 1988. Nonparametric Statistics for the Behavioral Sciences. N.Y.: McGrawHill, 2nd Edition.
- Sokal R. 1981. The principles and practice of statistics in biological research. N.-Y.: W.H. Freeman and Company, Biometry. 859 p.
- Struchko G.Yu., Merkulova L.M., Sergeeva V.E., Stomenskaya I.S. 2000. Response of bioamine-containing rat thymic structures to experimental removal of the spleen. Immunol. (Moscow). V. 21. № 2. P. 13.
- Uraski U. 1982. Splenektomia w swiete wspoecznych pogladow. Polski Tigodnik Lekarski. V. 37. P. 1109.



## Reaction of Cd68<sup>+</sup>, Cd45RO<sup>+</sup>, and Catecholamine-Containing Spleen Cells to the Development of a Colon Tumor in the Offspring of Splenectomized Rat Females

O. M. Arlashkina<sup>a, \*</sup>, G. Yu. Struchko<sup>a</sup>, L. M. Merkulova<sup>a</sup>, and M. N. Mikhailova<sup>a</sup>

<sup>a</sup> Ulyanov Chuvash State University. Department of Normal and Topographic Anatomy with Operative Surgery, Cheboksary, 428015 Russia

\*e-mail: olgaruz1202@mail.ru

The global problem of recent decades is the high prevalence of immunodeficiency states. The factors leading to immune deficiency are manifold. One of them is removal of the spleen. It was shown that splenectomy leads to the development of post-splenectomy syndrome. It is characterized by manifestations of secondary immunodeficiency and accidental involution of the thymus. This can negatively affect the reactivity of the cells of the offspring's immune system. The aim of the research was to study the reactivity of populations of CD68<sup>+</sup>, CD45RO<sup>+</sup>, and cells containing catecholamines in the spleen of the offspring of splenectomized female rats at the age of 3 and 6 months in response to tumor development in the colon. It was shown that in the offspring of splenectomized rats against the background of a low level of catecholamines in the luminescent structures of the white and red pulp of the spleen, the reactivity of cells of the macrophage-monocytic system and spleen T-lymphocytes to tumor development in the colon is less pronounced than in the offspring of intact rats. Thus, the course of pregnancy in a state of immunodeficiency caused by splenectomy leads to a decrease in the level of catecholamines in the spleen of the offspring against the background of carcinogenesis, which is accompanied by low reactivity of macrophages and T-lymphocytes.

**Keywords:** immunodeficiency, carcinogenesis, catecholamines, offspring, spleen, splenectomy, CD68<sup>+</sup>-cells, CD45RO<sup>+</sup>-cells