

Н.В. Бубнова, О.Ю. Кострова, Е.С. Самакина, Н.Ю. Тимофеева

ИММУНОГИСТОХИМИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ТИМУСА КРЫС ПРИ ВВЕДЕНИИ УРЕТАНА

*ФГБОУ ВО «Чувашский государственный университет имени И.Н.
Ульянова», г. Чебоксары Россия*

В статье представлены результаты исследования иммуногистохимических изменений тимуса крыс при однократной внутрибрюшинной инъекции уретана. Исследование выполнено на 50 крысах-самцах линии Wistar. Гистологические препараты тимуса изготавливали по общепринятым методикам и в дальнейшем оценивали иммуногистохимическими методами и статистической обработкой данных.

Ключевые слова: *тимус, уретан, иммуногистохимические реакции.*

N.V. Bubnova, O.Yu. Kostrova, E.S. Samakina, N.Yu. Timofeeva

IMMUNOHISTOCHEMICAL CHARACTERISTIC OF RAT THYMUS WHEN URETHANE IS ADMINISTERED

The article presents the results of a study of immunohistochemical changes in the rat thymus after a single intraperitoneal injection of urethane. The study was performed on 50 male Wistar rats. Histological preparations of the thymus were prepared according to generally accepted methods and were further evaluated using immunohistochemical methods and statistical data processing.

Keywords: *thymus, urethane, immunohistochemical reactions.*

Актуальность. Злокачественные новообразования являются серьезной проблемой общественного здоровья во всем мире. По данным Всемирной организации здравоохранения за 2022 год рак легких занимает лидирующую позицию как среди вновь выявленных новообразований, так и в структуре смертности онкобольных. Уретан относится к группе «вероятных канцерогенов для человека», а при введении лабораторным животным парентеральным методом приводит к развитию аденофибром легких [2, 3]. Тимус является органом первичной иммунной системы, который играет ведущую роль в развитии противоопухолевого иммунитета [1]. В связи с чем изучение изменений, происходящих в тимусе на ранних стадиях процессов канцерогенеза, является актуальным в настоящее время.

Цель исследования – изучить иммуногистохимические изменения тимуса крыс при однократной внутрибрюшинной инъекции уретана.

Материалы и методы. Эксперимент выполнен на 50 крысах-самцах линии Wistar. Условия содержания и обращение с используемыми в эксперименте животными соответствовали Директиве Европейского парламента и Совета от 22 сентября 2010 г. «О защите животных, которых используют для научных целей» (2010/63/EU). Животные были разделены на две группы: первая (контрольная) – интактная (n=20) и вторая (опытная) –

крысы (n=30) с однократным внутрибрюшинным введением уретана в дозировке 1,0 г/кг массы тела.

Животных выводили из эксперимента через 1, 2 и 3 месяца с момента парентерального введения уретана. Объект исследования – тимус крыс-самцов. Гистологические препараты изготавливали по стандартным методикам. Иммуногистохимические реакции проводили с применением моноклональных антител (МКАТ) и поликлональных антител (ПКАТ) фирмы Santa Cruze (США) и NovoCastra (Великобритания):

- 1) МКАТ к CD3 для идентификации зрелых тимоцитов;
- 2) МКАТ к CD 21 для идентификации дендритных клеток;
- 3) МКАТ к CD68 для идентификации макрофагов в структурах тимопоэтического и нетимопоэтического микроокружения долек тимуса;
- 4) ПКАТ к белку p53 для идентификации апоптотически измененных клеток в структурах дольки тимуса;
- 5) МКАТ к маркеру клеточной пролиферации Ki-67 для идентификации клеток, находящихся в митотической, G1-, S- и G2-фазах клеточного цикла.

Площадь мембранной и цитоплазматической иммуногистохимической реакции определяли посредством автоматического выделения и подсчета площади интересующего цветового спектра (окрашенного DAB) по отношению к площади всего снимка.

Полученные числовые значения переводились в процентное отношение к общей площади снимка.

Статистическая обработка полученных цифровых данных проводилась с помощью пакета программ Microsoft Office.

Результаты. Во время работы над исследованием было обнаружено, что однократное внутрибрюшинное введение уретана приводит к изменениям в тимусе, выявляемых иммуногистохимическими реакциями.

Через 1 месяц после внутрибрюшинного введения уретана количество CD3-положительных клеток достоверно увеличилось в 1,3 раза в корковом и мозговом веществе по сравнению с интактными крысами и составляло $48,97 \pm 0,93\%$ ($p=1,3861E-08$) и $26,8 \pm 0,48\%$ ($p=3,5073E-06$) соответственно. Через 2 месяца число CD3-положительных клеток по сравнению с предыдущим сроком достоверно снизилось на 17% в корковом веществе и увеличилось на 10% в мозговом веществе, а через 3 месяца достоверно уменьшилось в корковом веществе на 15%, увеличилось в мозговом веществе на 6% и составляло $34,7 \pm 0,18\%$ ($p=1,5432E-13$) и $31,6 \pm 0,2\%$ ($p=1,7376E-06$) соответственно.

Количество дендритных клеток в корковом и мозговом веществе дольки тимуса через 1 месяц после введения уретана распределено равномерно, при этом максимальная концентрация клеток располагалась в кортико-медуллярной зоне и составляла $13 \pm 0,1\%$, через 2 месяца – равномерно увеличилось в корковом $1,11 \pm 0,03\%$ ($p=6,3414E-07$) и мозговом $1,11 \pm 0,02\%$ ($p=7,1023E-08$) веществе дольки тимуса, при этом максимальная концентрация клеток сохранялась в кортико-медуллярной зоне и составляла

15±0,1%, через 3 месяца количество дендритных клеток в корковом и мозговом веществе дольки тимуса увеличилось в 1,2 раза – 1,42±0,1% (p=0,01081653) и 1,22±0,04% (p=0,04308169), при этом максимальное скопление клеток также сохранялось в кортико-медуллярной зоне.

При иммуногистохимической обработке срезов тимуса антителами к CD68 через 1 месяц после парентерального введения уретана выявляли небольшое увеличение количества макрофагов в корковом веществе тимуса в 1,7 раза – 0,57±0,02% (p=5,561E-06) и мозговом веществе – в 1,3 раза 0,54±0,02% (p=0,00034504) по сравнению с контрольной группой. Через 2 месяца выявляли небольшое увеличение количества макрофагов в корковом и мозговом веществе доли тимуса, составляя 0,62±0,04% и 0,6±0,04% (p=0,00711751) соответственно.

Через 3 месяца определяли достоверное увеличение количества макрофагов в корковом веществе в 1,5 раза – 0,92±0,12% (p=2,3968E-18).

Реакция к маркеру апоптоза p53 у крыс через 1 месяц после инъекции уретана практически не отличалась от реакции у интактных животных, через 2 месяца экспрессия белка p53 увеличилась в 1,5 раза как в корковом, так и в мозговом веществе и равна 0,71±0,003% (p=3,3455E-12) и 0,3±0,004% (p=2,7949E-08) соответственно, через 3 месяца – снизилась в корковом веществе в 1,4 раза, в мозговом веществе, наоборот, увеличилась в 1,3 раза.

При обработке срезов тимуса маркером Ki-67 через 1 месяц после введения уретана ядерная реакция увеличивалась в 1,5 раза в клетках коркового вещества и составила 55,93±0,47% (p=4,0089E-16), мозговом веществе, наоборот, снижалась в 1,7 раза – 7,16±0,3% (p=2,3992E-08), через 2 месяца клеточная пролиферация увеличилась на 5% в клетках коркового вещества и составила 58,38±0,29% (p=0,00037931), в мозговом веществе – в 1,7 раза и равна 8,2±0,06% (p=0,0033918), через 3 месяца показатель клеточной пролиферации снизился в клетках коркового вещества и составил 56,17±0,15% (p=3,0945E-06), в мозговом веществе, наоборот, увеличился на 23%.

Выводы. Наблюдаемые изменения количества CD3-положительных клеток могут свидетельствовать об усилении процессов тимопоэза, а затем о миграции зрелых лимфоцитов на периферию, развитии инволюции, а также о возможном токсическом действии развивающейся опухоли на костный мозг, что приводит к нарушению поступления клеток-предшественников в тимус.

Эти изменения подтверждаются увеличением показателей клеточной пролиферации и экспрессии белка апоптоза p53. Ген p53 и кодируемый им белок регулируют апоптоз и проводят контроль за состоянием ДНК.

В случае повреждения ДНК клетки данный ген стимулирует репарацию ДНК, а если это невозможно, то происходит запрограммированная гибель клеток путем апоптоза. Увеличение числа макрофагов и дендритных клеток также свидетельствует о развитии акцидентальной инволюции тимуса.

Литература

1. Gonzalez, H., Hagerling C., Werb Z. Roles of the Immune System in cancer: from Tumor Initiation to Metastatic Progression. *Genes & Development*. 2018 Oct 1; 32(19-20): 1267–84. doi: 10.1101/gad.314617.118
2. Radwan, E., Ali M., Faied SMA., Omar HM., Mohamed WS., Abd-Elghaffar SK., et al. Novel therapeutic regimens for urethane-induced early lung cancer in rats: Combined cisplatin nanoparticles with vitamin-D3. *IUBMB Life*. 2020 Dec 17;73(2):362–74. doi: 10.1002/iub.2432
3. Zheng, J, Guo X., Nakamura Y., Zhou X., Yamaguchi R., Zhang J, et al. Overexpression of PRDX4 Modulates Tumor Microenvironment and Promotes Urethane-Induced Lung Tumorigenesis. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*. 2020 Dec 28; 2020:1–11. doi: 10.1155/2020/8262730