

Реакция нейроэндокринных клеток и макрофагов селезенки на развитие опухоли в толстой кишке

М.Н. Михайлова, О.М. Арлашкина, Г.Ю. Стручко, Л.М. Меркулова, И.С. Стоменская, О.Ю. Кострова

ФГБОУ ВО Чувашский государственный университет имени И.Н. Ульянова, Чебоксары, Россия

Резюме. Введение. Высокая распространенность онкологических заболеваний требует от современной медицины поиска новых путей всестороннего изучения канцерогенеза. Важной задачей является исследование нейроэндокринных механизмов реакции и взаимодействия клеток иммунных органов в патогенезе развития опухолей. Цель настоящей работы – изучение Synaptophysin⁺, CD68⁺-клеток и биогенных аминов в селезенке крыс при развитии опухоли в толстой кишке на этапах формирования дисплазии и аденокарциномы.

Материалы и методы. Гистологические срезы селезенки 110 половозрелых нелинейных крыс-самцов через 1 и 4 месяца после введения канцерогена 1,2-диметилгидразина изучены с помощью иммуногистохимических, морфометрических и люминесцентно-гистохимических методов.

Результаты. На фоне предопухолевых изменений в толстой кишке (через 1 месяц после введения канцерогена) в селезенке наблюдаются дисбаланс продукции биогенных аминов – серотонина, гистамина, катехоламинов и, соответственно, снижение функциональной активности клеток герминативных центров лимфоидных узелков, а также некоторая активация клеток периартериальных лимфоидных муфт (ПАЛМ) и красной пульпы. В это же время отмечается увеличение числа CD68⁺-макрофагов и Synaptophysin⁺-клеток в красной пульпе. На этапе развития аденокарциномы (через 4 месяца после введения канцерогена) значительно возрастают уровень катехоламинов в люминесцирующих гранулярных клетках ПАЛМ и функциональная активность данных клеток. При этом численность макрофагов снижается во всех изучаемых компартментах селезенки, а количество Synaptophysin⁺-клеток на фоне снижения уровня всех биогенных аминов в красной пульпе возрастает еще больше.

Заключение. На процесс канцерогенеза в толстой кишке реагируют клетки всех компартментов селезенки. Наиболее выражена реактивность клеток ПАЛМ и красной пульпы. Быстрым изменениям подвергается популяция макрофагов селезенки: на фоне предопухолевых процессов их количество возрастает в красной пульпе, тогда как на этапе развития аденокарциномы, наоборот, снижается во всех структурах селезенки. Важную роль в реакции селезенки на развитие опухоли играют Synaptophysin⁺ нейроэндокринные клетки красной пульпы, численность которых в динамике возрастает. Непосредственное участие в процессах взаимодействия клеток селезенки между собой и с опухольассоциированными клетками принимают биогенные амины.

Ключевые слова: селезенка, биогенные амины, нейроэндокринные клетки, синаптофизин, канцерогенез

Для корреспонденции: Марина Николаевна Михайлова. E-mail: mar3007@mail.ru

Для цитирования: Михайлова М.Н., Арлашкина О.М., Стручко Г.Ю., Меркулова Л.М., Стоменская И.С., Кострова О.Ю. Реакция нейроэндокринных клеток и макрофагов селезенки на развитие опухоли в толстой кишке. Клин. эксп. морфология. 2023;12(3):72–81. DOI: 10.31088/CEM2023.12.3.72-81.

Финансирование. Исследование выполнено в рамках государственного бюджетного финансирования.

Статья поступила 12.08.2022. Получена после рецензирования 29.09.2022. Принята в печать 12.12.2022.

Response of neuroendocrine cells and splenic macrophages to tumor development in the colon

M.N. Mikhailova, O.M. Arlashkina, G.Yu. Struchko, L.M. Merkulova, I.S. Stomenskaya, O.Yu. Kostrova

IN Ulyanov Chuvash State University, Cheboksary, Russia

Abstract. Introduction. High cancer incidence requires finding new ways for comprehensive studying carcinogenesis. Therefore, it is crucial to understand immune organ cell response and cell interaction in tumor

development. The aim of the research was to study Synaptophysin⁺, CD68⁺-cells, and biogenic amines in rat spleens during tumor development in the colon during dysplasia stages and adenocarcinoma formation. *Materials and methods.* Spleen histological slides of 110 mature male rats were studied 1 and 4 months after 1,2-dimethylhydrazine carcinogen administration using immunohistochemical, morphometric, and luminescent histochemical methods.

Results. We found imbalanced production of biogenic amines (serotonin, histamine, and catecholamines) in the spleen and, therefore, a decrease in the cellular activity of the germinal centers of the lymphoid nodules. We also observed activation of periarteriolar lymphoid sheath (PALS) and red pulp in rats with precancerous colon lesions (1 month after carcinogen administration). At the same time, there was an increase in the number of CD68⁺ macrophages and Synaptophysin⁺ cells in the red pulp. In animals with adenocarcinoma (4 months after carcinogen introduction), the level of catecholamines in the luminescent granular cells of the PALS and the functional activity of these cells increased significantly. Simultaneously, the number of macrophages decreased in all the studied spleen compartments. Amid the decreased level of all biogenic amines in the red pulp, the quantity of Synaptophysin⁺ cells grew even more.

Conclusion. The cells of all spleen compartments react to colon carcinogenesis, with reactivity of PALS cells and the red pulp being the most pronounced. The population of spleen macrophages undergoes rapid changes: their number increases in the red pulp in animals with precancerous lesions, while it decreases in all the splenic structures of rats with adenocarcinoma. Synaptophysin⁺ neuroendocrine cells of the red pulp play an important role in the reaction of the spleen to tumor development, and the number of these cells rises over time. Biogenic amines participate in the interaction of spleen cells with each other and with tumor-associated cells.

Keywords: spleen, biogenic amines, neuroendocrine cells, synaptophysin, carcinogenesis

Corresponding author: Marina N. Mikhailova. E-mail: mar3007@mail.ru

For citation: Mikhailova M.N., Arlashkina O.M., Struchko G.Yu., Merkulova L.M., Stomenskaya I.S., Kostrova O.Yu. Response of neuroendocrine cells and splenic macrophages to tumor development in the colon. Clin. exp. morphology. 2023;12(3):72–81 (In Russ.). DOI: 10.31088/CEM2023.12.3.72-81.

Funding. The study was carried out within the framework of state budget funding.

Received 12.08.2022. **Received in revised form** 29.09.2022. **Accepted** 12.12.2022.

Введение

По данным Международного агентства по изучению рака (МАИР/IARC), в 2020 году рак колоректальной области занимал третье место среди всех впервые выявленных случаев в мире. Известно, что опухоли толстой кишки являются вторыми по частоте новообразованиями, которые выявляются на поздних стадиях канцерогенеза [1, 2]. Высокая распространенность онкологических заболеваний требует от исследователей поиска новых путей всестороннего изучения канцерогенеза. Среди активно развивающихся направлений экспериментальной и клинической иммунологии особое место занимает нейроиммуноэндокринология, предметом исследования которой является изучение экстраиммунных (нервных, гуморальных) механизмов регуляции функций иммунной системы в организме [3]. В литературе появляется все больше данных о значении взаимодействия нервной, иммунной и эндокринной систем в патогенезе воспалительных, аутоиммунных и онкологических процессов [4].

Известно, что в качестве главного вегетативного центра, регулирующего функции иммунной системы, выступает гипоталамус [3], способный напрямую влиять на цитотоксичность натуральных киллеров (НК-клеток) селезенки. Связь между гипоталамусом и иммунными органами осуществляется через нейромедиаторы, гормоны и другие нейропептиды, для которых на мембра-

не лимфоцитов и макрофагов имеются специфические рецепторы, в том числе к гамма-аминомасляной кислоте (ГАМК), серотонину (СТ), гистамину (ГСТ), катехоламинам (КА) и т.д. [3, 5, 6]. Иммунные клетки могут сами синтезировать и высвобождать нейротрансмиттеры, используя таким образом аутокринные и паракринные механизмы регуляции иммунного ответа [5]. Известно, что усиление влияния допаминергической и ГАМК-ергической систем приводит к активации иммуногенеза, а серотонинергической, напротив, к ослаблению иммунологической реактивности [3, 7]. При этом имеющиеся сведения о влиянии биогенных аминов на иммунные клетки носят противоречивый характер. Так, по одним данным, катехоловые амины (дофамин, адреналин, норадреналин) способствуют активации Т-, В-лимфоцитов, НК-клеток и фагоцитов [8]. По другим данным, они путем ускорения дифференцировки Т-супрессоров приводят к ингибированию антителообразования плазматическими [3], повышенные концентрации катехоламинов сопровождаются снижением активности НК-клеток [5].

Важную роль в реакции организма на стрессовые состояния, канцерогенные воздействия играют нейроэндокринные клетки APUD-системы (Amine Precursor Uptake Decarboxylation), которые присутствуют во многих органах, в том числе лимфоидных [3, 4, 9]. Влияние на рост и развитие опухолей они оказывают через вырабатываемые ими биологически активные

вещества, в том числе биогенные амины СТ, ГСТ и КА. При этом действие одних и тех же биоаминов может меняться на разных стадиях опухолевого роста. В зависимости от этиологического фактора разные амины могут выступать и в качестве активаторов, и в качестве ингибиторов клеточной пролиферации. Исследования показали, что развитие в организме злокачественной опухоли независимо от ее локализации и гистогенеза сопровождается изменениями структурно-функциональной организации апудоцитов [9].

Из литературы известно, что важную роль в нейроиммуноэндокринной регуляции противоопухолевого иммунного ответа играет селезенка, в том числе через макрофаги, дендритные клетки, клетки APUD-системы и вырабатываемые ими цитокины, нейромедиаторы и биогенные амины [7, 9–11]. Тем не менее роль клеток селезенки в процессах опухолевого роста недостаточно ясна. Нет понимания значения ее клеток и биологически активных факторов в феномене крайне редкого метастазирования в этот орган. В литературе имеются данные о морфологических изменениях, протекающих в селезенке при развитии опухоли в толстой кишке [12–14], однако многие вопросы о роли нейроэндокринных клеток и биогенных аминов селезенки в этом процессе остаются нераскрытыми. С учетом изложенного выше целью исследования стало изучение Synaptophysin⁺, CD68⁺-клеток и биогенных аминов селезенки крыс при развитии опухоли в толстой кишке.

Материалы и методы

Исследование выполнено на 110 белых нелинейных крысах-самцах, которые были разделены на три группы: 1-я – интактные крысы (n=30); 2-я – крысы через 1 месяц после введения канцерогена 1,2-диметилгидразина (n=40); 3-я – крысы через 4 месяца после введения этого же канцерогена (n=40). Канцероген начинали вводить по достижении крысами возраста 1 месяц. Все манипуляции с животными проводили в соответствии с требованиями Европейской конвенции о защите позвоночных животных, используемых для экспериментов или в иных научных целях (Страсбург, 1986). Исследование одобрено на заседании локального этического комитета медицинского факультета Чувашского государственного университета им. И.Н. Ульянова (протокол № 20-01 от 29.01.2020).

Аденокарциному толстой кишки моделировали с помощью водного раствора 1,2-диметилгидразина (Acros organics, Бельгия) согласно модели R.F. Jacoby et al. (1991). С целью исключения влияния стрессового фактора от инъекций канцерогена на результаты исследования животным контрольной группы (n=30) внутрибрюшинно вводили изотонический раствор хлорида натрия в дозе 0,5 мл 1 раз в неделю в течение одного месяца. Выведение животных из эксперимента осуществляли путем декапитации через 1 и 4 месяца после окончания курса инъекций 1,2-диметилгидразина. Объектом исследования служила селезенка.

Срезы селезенки изучали следующими методами.

Иммуногистохимия. Использовали моноклональные антитела (МКАТ) к кластеру дифференцировки 68 типа (CD68), клон ED-1 (Santa Cruz, США) и к Synaptophysin (Santa Cruz, США). Иммуногистохимические реакции визуализировали с помощью системы ChromoPlex™ 1 Dual Detection for BOND (Leica Biosystems, Германия). Чувствительность и специфичность иммуногистохимических реакций оценивали с помощью неиммунизированной кроличьей сыворотки. Положительной иммуногистохимической реакцией на антитела считали коричневое окрашивание мембран. С помощью CD68 идентифицировали клетки макрофагальной природы [15], а с помощью Synaptophysin – клетки APUD-системы [10]. У всех животных 2-й и 3-й групп патоморфологически были подтверждены неопластические новообразования в толстой кишке: через 1 месяц после инъекций выявлялись умеренная дисплазия эпителия кишечных крипт в виде гиперхромии ядер, появление двуядерных клеток, псевдомногорядности эпителиального пласта, увеличение ядерно-цитоплазматического соотношения; через 4 месяца – аденокарцинома с высокой и умеренной степенью дифференцировки.

Морфометрия. Для количественной оценки использовали цифровые изображения микропрепаратов селезенки, полученные с помощью люминесцентного микроскопа «Микромед 3 Люм» («Микромед», Россия) и цифровой фотокамеры Canon DS126191 (Canon, Тайвань). Количественную оценку интенсивности мембранных иммуногистохимических реакций осуществляли с помощью программы «Микро-Анализ» (Labor-microscopes, Россия, 2010). На каждом срезе измерения проводили не менее чем в 10 полях зрения [16].

Визуализация биогенных аминов. Идентификацию серотонина и катехоламинов в структурах селезенки осуществляли с помощью люминесцентно-гистохимического метода В. Falck, N. Hillarp (1962) в модификации Е.М. Крохиной и П.Н. Александровой (1969), а идентификацию гистамина – с помощью люминесцентно-гистохимического метода S. Cross, S. Ewen, F. Rost (1971). Уровень биогенных аминов в структурах селезенки определяли цитоспектрофлуориметрически, используя люминесцентный микроскоп «Люмам-4» и фотонасадку ФМЭЛ-1А (АО «ЛМО», Россия) [16]. Содержание биогенных аминов оценивали в условных единицах флуоресценции по цифровым показаниям шкалы регистрирующего прибора-усилителя. Далее рассчитывали соотношение (СТ+ГСТ)/КА, повышение которого косвенно указывает на ослабление функциональной активности клеток, а снижение – на ее усиление.

Обработку цифровых данных проводили с помощью программы Statistica 10.0 (StatSoft, США) с использованием стандартных методов параметрической и непараметрической статистики. Тип распределения устанавливали с помощью критерия Колмогорова–Смирнова с поправкой Лиллиефорса. В случае нормального

распределения данных применяли t-критерий Стьюдента и такие стандартные статистические показатели, как средняя арифметическая величина M и средняя ошибка средней m . При распределении, отличающемся от нормального, использовали U-критерий Манна–Уитни для двух групп и Краскела–Уоллиса при сравнении трех исследуемых групп, при этом выборки описывали через медиану (Me), нижний и верхний квартили ($Q1$ и $Q3$). Различия между группами считали статистически значимыми при $p < 0,01$.

Результаты

В регуляции локальных механизмов клеточной пролиферации и дифференцировки в органах иммунной системы участвуют клетки, продуцирующие биогенные амины, названные люминесцирующими гранулярными клетками (ЛГК) [17]. К таким клеткам-регуляторам в селезенке относятся ЛГК, выявляемые как в белой, так и в красной пульпе. В наших экспериментах при обработке срезов с помощью люминесцентно-гистохимических методов было выявлено, что люминесцентная морфология селезенки у крыс контрольной группы исследования имеет типичную картину (рис. 1). В герминативных центрах лимфоидных узелков визуализируются 5–6 крупных ЛГК с яркой желто-белой люминесценцией (рис. 2), расположенные компактно, часто цепочкой на границе с зоной мантии, большая часть из которых при параллельном иммуногистохимическом исследовании дает положительную реакцию на CD68. ЛГК также есть в маргинальной зоне, периаfterиальных лимфоидных муфтах (ПАЛМ) и красной пульпе. Лимфоидные узелки с герминативными центрами, появляющимися после антигенной стимуляции, являются В-зависимыми зонами, а ПАЛМ относятся к Т-зависимым зонам. Выявлено, что в красной пульпе небольшие клетки, расположенные диффузно, экспрессируют CD68, а клетки, локализующиеся группами, дают положительную реакцию на Synaptophysin. И те, и другие клетки также встречаются в области наружной зоны ПАЛМ. Люминесценция ЛГК и паренхимы микроокружения обусловлена содержанием в них биогенных аминов. В лимфоидных узелках и красной пульпе преобладает серотонинергическое обеспечение люминесцирующих клеток, тогда как в ПАЛМ преобладающим амином является гистамин (табл. 1).

В ходе исследования выявлено, что у крыс через 1 месяц после окончания введения канцерогена (на фоне развития дисплазии кишечных крипт в толстой кишке) и у животных контрольной группы селезенка при люминесцентной микроскопии имеет схожую морфологию. Однако в герминативных центрах лимфоидных узелков число ЛГК уменьшается до 4–5 в поле зрения, падает уровень всех биоаминов (табл. 1), при этом соотношение (СТ+ГСТ)/КА в этих клетках возрастает (рис. 3), что указывает на подавление их функциональной активности. Напротив, во всех остальных изучаемых структурах селезенки это

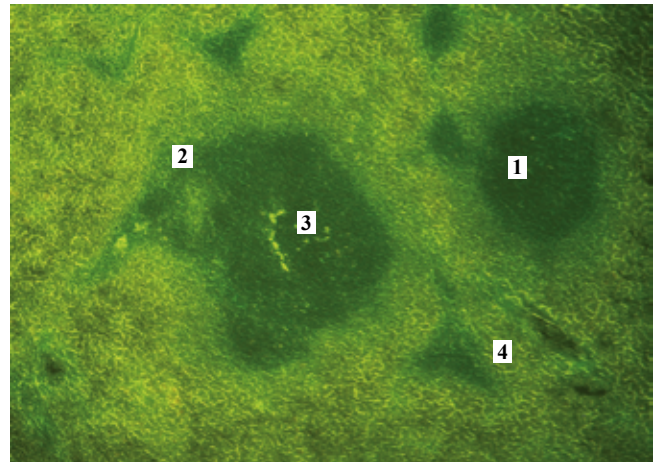


Рис. 1. Селезенка интактной крысы.

1 – лимфоидный узелок, 2 – периаfterиальная лимфоидная муфта, 3 – герминативный центр, 4 – красная пульпа. Люминесцентно-гистохимический метод Фалька–Хилларпа. $\times 10$

Fig. 1. Spleen of an intact rat.

1 – lymphoid nodule, 2 – periafterial lymphoid sheaths, 3 – germinal center, 4 – red pulp. Luminescent-histochemical Falck-Hillarp method. $\times 10$

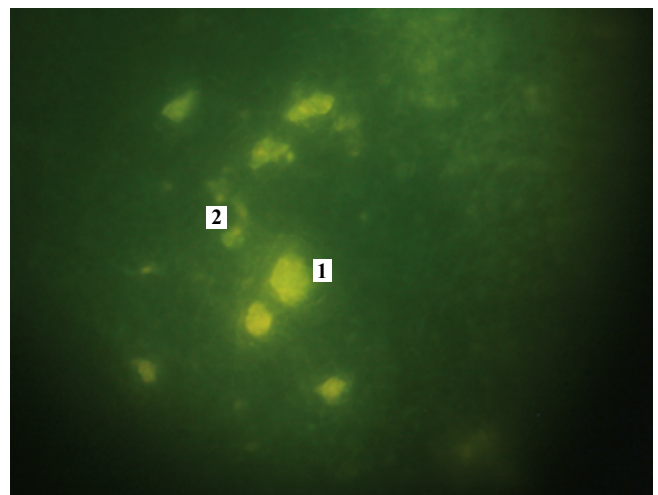


Рис. 2. Герминативный центр селезенки интактной крысы.

1 – яркие люминесцирующие гранулярные клетки с плотными гранулами, 2 – люминесцирующие гранулярные клетки с погасшими гранулами. Люминесцентно-гистохимический метод Фалька–Хилларпа. $\times 60$

Fig. 2. Germinal center of the spleen of an intact rat.

1 – bright luminescent granular cells with dense granules, 2 – luminescent granular cells with extinguished granules. Luminescent-histochemical Falck-Hillarp method. $\times 60$

соотношение снижается, что может свидетельствовать о некоторой стимуляции функциональной активности клеток. В люминесцирующих клетках ПАЛМ происходит повышение уровня серотонина и катехоламинов ($p=0,001$), но резко падает содержание гистамина (табл. 1). При этом число CD68⁺- и Synaptophysin⁺-клеток и в лимфоидных узелках, и в ПАЛМ на этом

Уровень биогенных аминов в люминесцирующих структурах селезенки крыс через 1 и 4 месяца после введения канцерогена | The level of biogenic amines in the luminescent structures of the spleen of rats from the control group, 1 and 4 months after carcinogen introduction

Структуры селезенки Structures of the spleen	Биогенные амины Biogenic amines	Контрольная группа Control group, Me (Q1; Q3)	Канцерогенез Carcinogenesis	
			через 1 месяц после введения канцерогена 1 month after carcinogen introduction, Me (Q1; Q3)	через 4 месяца после введения канцерогена 4 months after carcinogen introduction, Me (Q1; Q3)
ЛГК _{ГЦ} LGC _{GC}	СТ ST	766 (514,5; 863)	432,5 (289; 546) P=0,000478**	604,5 (432,5; 685,5) P=005497*
	ГСТ HST	651 (625; 1084)	587,5 (581; 608) P=0,000105**	531,5 (360; 596) P=0,000000... **
	КА CA	148 (131; 191)	69 (53; 88) P=0,00001**	90 (69; 170) P=0,000002**
М/о ЛГК _{ГЦ} М/е LGC _{GC}	СТ ST	362 (310; 534)	537 (529; 555) P=0,006983*	156 (115; 601) P=0,000012**
	ГСТ HST	442 (411,5; 705,5)	417,5 (408; 425) P=0,0455	251 (206; 326) P=0,000000... **
	КА CA	83,5 (76; 143)	112 (107; 116) P=0,1987	45,5 (40; 82) P=0,000000... **
ЛГК _{ПАЛМ} LGC _{PALS}	СТ ST	459 (450; 466)	616 (589; 647) P=0,000280**	783 (752; 810) P=0,000183**
	ГСТ HST	612,5 (595; 638)	254 (225; 274) P=0,000124**	398 (340; 411) P=0,000183**
	КА CA	92,5 (89; 95)	187 (169; 198) P=0,000124**	265 (260; 272) P=0,000183**
М/о ЛГК _{ПАЛМ} М/е LGC _{PALS}	СТ ST	599 (594; 604)	207,5 (200; 211) P=0,001376**	184,5 (131,5; 202) P=0,001376**
	ГСТ HST	334,5 (297,5; 371)	351 (324; 358) P=1,0	351 (326; 362) P=1,0
	КА CA	47,5 (46; 49)	49 (48; 113) P=0,1025	114 (48; 203) P=0,003855*
ЛГК _{КП} LGC _{RP}	СТ ST	973,5±71,8 751,5 (590; 1165)	677 (660; 692) P=0,3512	404,5 (297,5; 472) P=0,000000... **
	ГСТ HST	615,5 (463; 858)	458 (454; 463) P=0,006195*	332,5 (288; 415) P=0,000000... **
	КА CA	148 (140; 288)	209 (203; 387) P=0,0418	70 (56; 82,5) P=0,000000... **
М/о ЛГК _{КП} М/е LGC _{RP}	СТ ST	516 (487; 654)	515 (461; 553) P=0,402	319,5 (188; 435) P=0,000000... **
	ГСТ HST	535 (500,5; 574)	336,5 (299; 350) P=0,002268*	141,5 (134; 289) P=0,000000... **
	КА CA	133,5 (106; 165)	202 (192; 272) P=0,082	54,5 (43,5; 64) P=0,000000... **

М/о – микроокружение. Различия по сравнению с группой контроля достоверны при * – p<0,01 или ** – p<0,001

GC – germinal center, RP – red pulp, LGC – luminescent granular cells, М/е – microenvironment, PALS – periarterial lymphoid sheaths, ST – serotonin, HST – histamine, CA – catecholamines. The differences compared to the control group are significant at * – p<0.01 or ** – p<0.001

Таблица 2 | Table 2

Число CD68⁺- и Synaptophysin⁺-клеток селезенки крыс в контроле, через 1 и 4 месяца после введения канцерогена |
The number of CD68⁺ and Synaptophysin⁺ cells of spleen in rats from the control group, 1 and 4 months carcinogen introduction

Клетки селезенки Cells of the spleen	Контрольная группа Control group, Me (Q1; Q3)	Канцерогенез Carcinogenesis	
		через 1 месяц после введения канцерогена 1 month after carcinogen introduction, Me (Q1; Q3)	через 4 месяца после введения канцерогена 4 months after carcinogen introduction, Me (Q1; Q3)
CD68 ⁺ -клетки КП CD68 ⁺ - cells RP	16 (9; 20)	22 (15; 31) p=0,009294*	10 (6; 13) p=0,01402*
CD68 ⁺ -клетки ГЦ CD68 ⁺ - cells GC	8 (6; 12)	6 (4; 8) p=0,0307	5 (3,5; 6) p=0,01429*
CD68 ⁺ -клетки ПАЛМ CD68 ⁺ - cells PALS	16 (13; 23)	13 (9; 19,5) p=0,0657	11 (7; 12) p=0,003614*
Synaptophysin ⁺ -клетки КП Synaptophysin ⁺ - cells RP	31 (11; 40)	57 (30; 69) p=0,002195*	79 (58,5; 82,5) p=0,00...**
Synaptophysin ⁺ -клетки ГЦ Synaptophysin ⁺ - cells GC	10 (9; 11)	14 (13; 15) p=0,0828	15,5 (13,5; 17) p=0,0864
Synaptophysin ⁺ -клетки ПАЛМ Synaptophysin ⁺ - cells PALS	16,5 (15; 30)	22 (15; 30) p=0,2297	19 (16; 24) p=0,3565

Различия по сравнению с группой контроля достоверны при * – p<0,01 или ** – p<0,001

GC – germinal center, RP – red pulp, LGC – luminescent granular cells, M/e – microenvironment, PALS – periarterial lymphoid sheaths, ST – serotonin, HST – histamine, CA – catecholamines.

The differences compared to the control group are significant at * – p<0.01 or ** – p<0.001

сроке наблюдения (1 месяц после окончания введения канцерогена) изменяется недостоверно (табл. 2).

В красной пульпе на этом сроке наблюдения численность ЛГК увеличивается, но в них снижаются серотониновая и гистаминовая обеспеченность (табл. 1) и биоаминное соотношение. Число Synaptophysin⁺-клеток в этой зоне возрастает в 1,8 раза, p=0,01, при этом в 1,5 раза увеличивается (p=0,01) число CD68⁺ макрофагов (табл. 2).

На более поздних сроках, то есть через 4 месяца после окончания введения канцерогена (на фоне роста аденокарциномы в толстой кишке), в лимфоидных

узлах селезенки отмечается сокращение числа ЛГК до 2–3 в поле зрения, клетки располагаются диффузно, отсутствует характерная цепочка из клеток. При этом происходит перераспределение биогенных аминов в белой пульпе: резко падает их уровень в спленоцитах микроокружения ЛГК герминативных центров, хотя в самих ЛГК их содержание по сравнению с начальным периодом канцерогенеза незначительно увеличивается, а соотношение (СТ+ГСТ)/КА остается на уровне контрольных значений (рис. 3). В то же время в ПАЛМ на фоне более значимого роста катехоламиновой обеспеченности люминесцентных

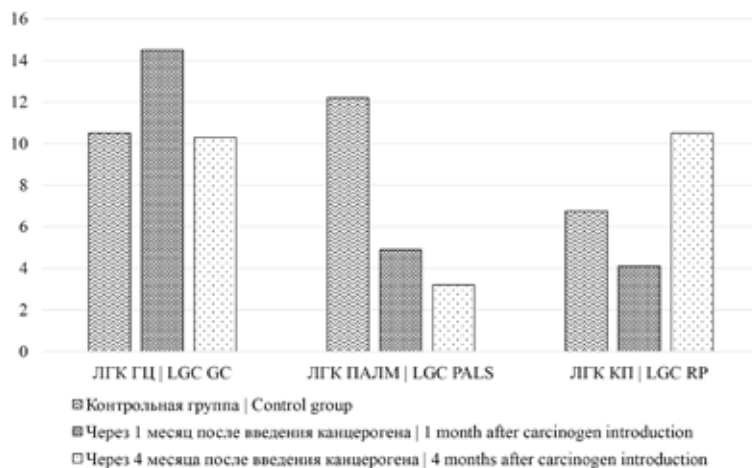


Рис. 3. Изменение соотношения (СТ+ГСТ)/КА в люминесцирующих гранулярных клетках (ЛГК) красной пульпы (ЛГК КП), герминативных центров лимфоидных узлов (ЛГК ГЦ), периартериальных лимфоидных муфт (ЛГК ПАЛМ) селезенки крыс в контрольной группе, через 1 и 4 месяца после введения канцерогена

Fig. 3. Changes in the ratio (ST+HST)/CA of the luminescent granular cells of the red pulp (LGC RP), germinal centers of lymphoid nodules (LGC GC), and periarterial lymphoid sheaths (LGC PALS) of the rat spleen in the control group, 1 and 4 months after carcinogen introduction

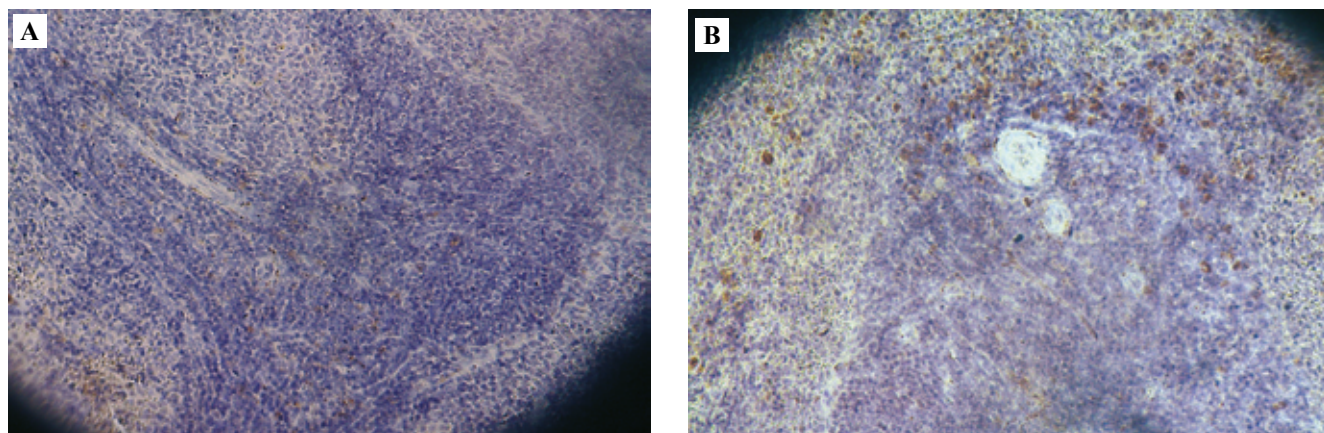


Рис. 4. Synaptophysin⁺ клетки в селезенке крысы.

А – контроль. В – увеличение численности иммунопозитивных клеток в красной пульпе через 4 месяца после введения канцерогена. ИГХ реакция с антителами к Synaptophysin, ×40

Fig. 4. Synaptophysin⁺ cells in the rat spleen.

A – control group. B – increased number of the immunopositive cells in the red pulp 4 months after carcinogen introduction. IHC assay with Synaptophysin, ×40

клеток и их микроокружения (увеличение уровня КА в 3 раза, $p=0,001$) значительно снижается соотношение (СТ+ГСТ)/КА. Число CD68⁺-клеток уменьшается ($p=0,01$) во всех исследуемых зонах селезенки (табл. 2). Количество Synaptophysin⁺-клеток в белой пульпе не изменяется, но в красной пульпе нарастает еще больше по сравнению с предыдущим сроком наблюдения, превышая контрольные значения в 2,6 раза, $p=0,001$ (рис. 4). Это сопровождается выраженным падением уровня биогенных аминов и значительным ростом показателя (СТ+ГСТ)/КА как в люминесцирующих клетках красной пульпы, так и их микроокружении (рис. 3).

Обсуждение

Влияние функциональной активности клеток селезенки на индукцию и рост опухолей, по данным разных авторов, носит противоречивый характер. Имеются сведения как о стимуляции, так и о торможении онкогенеза в результате спленэктомии [14, 18–20]. Именно селезенка является основным источником клеток микроокружения опухоли. К таким клеткам относятся опухольассоциированные макрофаги и опухольинфильтрирующие дендритные клетки, способные влиять на рост, прогрессирование и метастазирование опухоли [11, 21]. Наши исследования показали, что выявляемые люминесцентно-гистохимическими методами биоаминсодержащие люминесцирующие гранулярные клетки реагируют на развитие опухоли изменением численности, уровня и соотношения биогенных аминов, что, вероятно, свидетельствует об их участии в межклеточных взаимодействиях при регуляции процессов канцерогенеза. Из литературы известно, что среди ЛГК присутствуют макрофаги, дендритные и нейроэндокринные клетки APUD-системы [17].

Нейротрансмиттеры, в том числе биологически активные амины, продуцируемые этими клетками,

в частности серотонин, дофамин, адреналин, гистамин, выступают как посредники в межклеточных взаимодействиях в ходе иммунного реагирования на различные антигены, в том числе опухолевые [5]. В зависимости от этиологического фактора разные амины могут выступать и в качестве активаторов, и в качестве ингибиторов клеточной пролиферации. Известно, что серотонин способен активировать фагоцитоз, стимулировать цитотоксичность NK-клеток, влиять на продукцию цитокинов и усиливать миграцию клеток [5, 22]. Гистамин тормозит дегрануляцию тучных клеток и способен угнетать выработку макрофагами компонентов комплемента, тем самым может выступать как антагонист иммунного реагирования. В то же время имеются сведения, что гистамин способен усиливать цитотоксичность Т-лимфоцитов и NK-клеток, стимулируя тем самым клеточный иммунный ответ [23]. Содержание катехоламинов после антигенной стимуляции увеличивается в лимфоцитах через сигнальные пути, инициируемые протеинкиназой С, играющей ключевую роль в активации Т- и В-лимфоцитов, NK-клеток и фагоцитов [3, 8]. Наблюдаемые нами на этапе предопухолевых процессов в толстой кишке изменения уровней биоаминов и снижение соотношения (СТ+ГСТ)/КА как в ЛГК ПАЛМ селезенки, так и в паренхиме их микроокружения свидетельствуют о некоторой активации иммунологической реактивности клеток Т-зависимых зон селезенки на начальных стадиях канцерогенеза. Такая реакция клеток Т-зависимой зоны на предопухолевые изменения в толстой кишке может быть следствием того, что в тимусе на этом сроке наблюдаются признаки первой фазы акцидентальной инволюции [24]. Выявленные изменения в белой пульпе сопровождаются уменьшением диаметра лимфоидных узелков и их герминативных центров, уменьшением процента CD79a⁺-клеток (В-лимфоциты) и увеличением числа

S100⁺ дендритных клеток через 1 месяц после окончания введения 1,2-диметилгидразина, показанным в наших предыдущих работах [12, 13]. Вероятно, суммарно направленное действие биогенных аминов ЛГК в герминативном центре приводит к уменьшению числа пролиферирующих клеток, в результате чего уменьшается и численность В-лимфоцитов. Рост численности Synaptophysin⁺-клеток в красной пульпе селезенки, наблюдаемый нами уже на этапе предопухолевых изменений в толстой кишке, может свидетельствовать об активном участии этих клеток APUD-системы в реакции иммунной системы на канцерогенез [3, 7].

Через 4 месяца после введения канцерогена наиболее значимые изменения в биоаминном обеспечении мы наблюдали в ПАЛМ, где при 3-кратном повышении содержания катехоламинов отмечалось падение соотношения (СТ+ГСТ)/КА. Это происходит на фоне уменьшения ширины ПАЛМ и числа Т-лимфоцитов, показанного в нашей предыдущей работе [12], что, вероятно, обусловлено процессами акцидентальной инволюции тимуса, вызванной введением 1,2-диметилгидразина. Выявлено, что в тимусе при этом также изменяется численность ЛГК, отмечается дисбаланс уровней биогенных аминов, возрастает экспрессия синаптофизина [24]. На модели опухоли у мышей, индуцированной диметилбензантраценом, обнаружено уменьшение числа и активности кортикальных тимоцитов с параллельным увеличением числа спленоцитов, при этом активность селезеночных Т-лимфоцитов снижалась [25]. W. Jiang et al. на модели подкожной гепатомы у мышей выявили уменьшение числа CD4⁺ и CD8⁺ Т-лимфоцитов и возрастание числа макрофагов в селезенке на 21-й день после инокуляции опухолевых клеток [26]. Наблюдаемое нами уменьшение числа CD68⁺-клеток во всех исследуемых зонах селезенки через 4 месяца после введения канцерогена может быть связано с усиленной миграцией макрофагов селезенки в растущую опухоль [11], тем более что экспрессия CD68 всегда обнаруживается в клетках стромы колоректальной раковой опухоли [21], а продолжающееся нарастание экспрессии синаптофизина на этапе роста аденокарциномы в толстой кишке свидетельствует об усилении нейроэндокринного влияния при канцерогенезе.

Заключение

В ходе эксперимента было выявлено, что на фоне роста опухоли толстой кишки на этапе дисплазии в селезенке выявляются снижение функциональной активности биоаминсодержащих клеток герминативных центров лимфоидных узелков (В-зависимых зон) и некоторая активация биоаминсодержащих клеток периартериальных лимфоидных муфт (Т-зависимых зон). При этом наиболее выраженная реакция на начало онкогенеза наблюдается в красной пульпе, где на фоне увеличения численности CD68⁺-макрофагов возрастает и функциональная активность клеток. На этапе разви-

тия аденокарциномы на фоне развития акцидентальной инволюции тимуса напряжение Т-клеточного звена возрастает еще больше, а число макрофагов снижается во всех изучаемых компартментах селезенки. Следует отметить, что важную роль в реакции селезенки на развитие опухоли играют Synaptophysin⁺ нейроэндокринные клетки красной пульпы, численность которых в динамике возрастает. При этом непосредственное участие в процессах взаимодействия клеток селезенки между собой и с опухольассоциированными клетками принимают биогенные амины.

Вклад авторов

Концепция и дизайн исследования – Г.Ю. Стручко,

Л.М. Меркулова.

Сбор и обработка материала – О.М. Арлашкина, М.Н. Михайлова.

Написание текста – М.Н. Михайлова, О.М. Арлашкина.

Редактирование – Л.М. Меркулова, И.С. Стоменская,

О.Ю. Кострова.

Author contributions

Conceived the study and designed the experiment – G.Yu. Struchko,

L.M. Merkulova.

Collected the data and performed the analysis – O.M. Arlaskina,

M.N. Mikhailova.

Wrote the paper – M.N. Mikhailova, O.M. Arlaskina.

Edited the manuscript – L.M. Merkulova, I.S. Stomenskaya,

O.Yu. Kostrova.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликтов интересов.

Disclosure. The authors declare no conflict of interest.

Литература/References

1. Colorectum fact sheet. International Agency for Research on Cancer (IARC). Available from: http://gco.iarc.fr/today/data/factsheets/cancers/10_8_9-Colorectum-fact-sheet.pdf (accessed 04.08.2022).
2. Thangaraj K, Natesan K, Settu K, Palani M, Govindarasu M, Subborayan V et al. Orientin mitigates 1, 2-dimethylhydrazine-induced lipid peroxidation, antioxidant and biotransforming bacterial enzyme alterations in experimental rats. *J Cancer Res Ther.* 2018;14(6):1379–88. DOI: 10.4103/jcrt.JCRT_1363_16.
3. Самотруева М.А., Ясенявская А.Л., Цибизова А.А., Башкина О.А., Галимзянов Х.М., Тюренков И.Н. Нейроиммуноэндокринология: современные представления о молекулярных механизмах. *Иммунология.* 2017;38(1):49–59. DOI: 10.18821/0206-4952-2017-38-1-49-59. Samotrueva MA, Yasenyavskaya AL, Tsbizova AA, Bashkina OA, Galimzyanov HM, Tyurenkov IN. Neuroimmunoenocrinology: modern concepts of molecular mechanisms. *Immunology.* 2017;38(1):49–59 (In Russ.). DOI: 10.18821/0206-4952-2017-38-1-49-59.
4. Парахонский А.П. Молекулярно-биологические аспекты изучения нейроэндокринных механизмов регуляции функционирования иммунной системы. *Заметки ученого.* 2018;4(29):21–29. Доступно по адресу: <https://elibrary.ru/item.asp?id=35396340> (получено 04.08.2022). Parakhonsky AP. Molecular biological aspects of the neuroendocrine mechanisms of regulation functioning of the immune

- system. *Zametki uchenogo (Scholar's Notes)*. 2018;4(29):21–29 (In Russ.). Available from: <https://elibrary.ru/item.asp?id=35396340> (accessed 04.08.2022).
5. *Capellino S, Claus M, Watzl C*. Regulation of natural killer cell activity by glucocorticoids, serotonin, dopamine, and epinephrine. *Cell Mol Immunol*. 2020;17(7):705–11. DOI: 10.1038/s41423-020-0477-9.
 6. *Murray K, Barboza M, Rude KM, Brust-Mascher I, Reardon C*. Functional circuitry of neuro-immune communication in the mesenteric lymph node and spleen. *Brain Behav Immun*. 2019;82:214–23. DOI: 10.1016/j.bbi.2019.08.188.
 7. *Shimojo G, Joseph B, Shah R, Consolim-Colombo FM, De Angelis K, Ulloa L*. Exercise activates vagal induction of dopamine and attenuates systemic inflammation. *Brain Behav Immun*. 2019;75:181–91. DOI: 10.1016/j.bbi.2018.10.005.
 8. *Cosentino M, Marino F, Bombelli R, Ferrari M, Lecchini S, Frigo G*. Unravelling dopamine (and catecholamine) physiopharmacology in lymphocytes: Open questions. *Trends Immunol*. 2003;24(11):581–2. DOI: 10.1016/j.it.2003.09.002.
 9. *Суходоло И.В., Геренг Е.А.* Структурно-функциональная организация клеток диффузной эндокринной системы в дыхательных путях в норме и патологии. *Бюллетень сибирской медицины*. 2008;7(1):71–75. DOI: 10.20538/1682-0363-2008-1-71-75.
Sukhodolo IV, Gereng YeA. The structurally functional organization of cells in respiratory ways to norm and at a pathology. *Bulletin of Siberian Medicine*. 2008;7(1):71–75 (In Russ.). DOI: 10.20538/1682-0363-2008-1-71-75.
 10. *Колос Е.А., Григорьев И.П., Коржевский Д.Э.* Маркер синаптических контактов – синаптофизин. *Морфология*. 2015;147(1):78–82. DOI: 10.17816/morph.398838.
Kolos YeA, Grigoriyev IP, Korzhevskiy DE. A synaptic marker synaptophysin. *Morfologiya*. 2015;147(1):78–82 (In Russ.). DOI: 10.17816/morph.398838.
 11. *Андрюхова Е.С., Таширева Л.А., Вторушин С.В., Завьялова М.В., Перельмутер В.М.* Макрофаги селезенки: особенности популяционного состава и функции. *Цитология*. 2022;64(1):14–25. DOI: 10.31857/S0041377122010023.
Andryuhova ES, Tashireva LA, Vtorushin SV, Zavyalova MV, Perelmuter VM. Spleen macrophages: Features of population composition and function. *Tsitologiya = Cell and Tissue Biology*. 2022;64(1):14–25 (In Russ.). DOI: 10.31857/S0041377122010023.
 12. *Меркулова Л.М., Стручко Г.Ю., Арлашкина О.М., Михайлова М.Н.* Морфологические изменения селезенки в условиях экспериментального канцерогенеза. *Acta medica Eurasica*. 2016;3:54–58. Доступно по адресу: <https://elibrary.ru/wmiehl> (получено 04.08.2022).
Merkulova L, Struchko G, Arlashkina O, Mikhailova M. Morphological changes of the lien in the conditions of the experimental carcinogenesis. *Acta Medica Eurasica*. 2016;3:54–58 (In Russ.). Available from: <https://elibrary.ru/wmiehl> (accessed 04.08.2022).
 13. *Арлашкина О.М., Стручко Г.Ю., Меркулова Л.М., Михайлова М.Н.* Морфологические характеристики белой пульпы и дендритных клеток селезенки при экспериментальном канцерогенезе. *Иммунология*. 2019;40(2):17–22. DOI: 10.24411/0206-4952-2019-12003.
Arlashkina OM, Struchko GYu, Merkulova LM, Mikhailova MN. Morphological characteristics of white pulp and spleen dendritic cells at the experimental carcinogenesis. *Immunology*. 2019;40(2):17–22 (In Russ.). DOI: 10.24411/0206-4952-2019-12003.
 14. *Lisnychuk N, Soroka Y, Andriychuk I, Nebesna Z, Volkov K*. Histological changes in spleen under condition of toxic carcinogenesis. *Georgian Med News*. 2018;280–281:160–4. PMID: 30204117.
 15. *Regh JE, Bush D, Ward JM*. 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. *Toxicol Pathol*. 2012;40(2):345–74. DOI: 10.1177/0192623311430695.
 16. *Арлашкина О.М., Стручко Г.Ю., Меркулова Л.М., Михайлова М.Н.* Реакция CD68⁺, CD45RO⁺ и катехоламинсодержащих клеток селезенки на развитие опухоли в толстой кишке у потомства спленэктомизированных крыс-самок. *Цитология*. 2021;63(5):474–482. DOI: 10.31857/S0041377121050023.
Arlashkina OM, Struchko GYu, Merkulova LM, Mikhailova MN. Reaction of CD68⁺, CD45RO⁺, and Catecholamine-Containing Spleen Cells to the Development of a Colon Tumor in the Offspring of Splenectomized Rat Females. *Cell and Tissue Biology*. 2021;63(5):474–482 (In Russ.). DOI: 10.31857/S0041377121050023
 17. *Любовцева Л.А., Ефремова О.А., Голубцова Н.Н., Руссов А.В., Шамитова Е.Н., Леонова Л.К. и др.* Свойства гранулярных люминесцирующих клеток. *International Journal on Immunorehabilitation*. 2009;11(1):25a–26. Доступно по адресу: <https://elibrary.ru/item.asp?id=12959971> (получено 04.08.2022).
Lubovtseva LA, Efremova OA, Golubtsova NN, Russov AV, Shamitova EN, Leonova LK et al. Properties of the granular luminescent cells. *International Journal on Immunorehabilitation*. 2009;11(1):25a–26 (In Russ.). Available from: <https://elibrary.ru/item.asp?id=12959971> (accessed 04.08.2022).
 18. *Higashijima J, Shimada M, Chikakiyo M, Miyatani T, Yoshikawa K, Nishioka M et al*. Effect of splenectomy on antitumor immune system in mice. *Anticancer Res*. 2009;29(1):385–93. PMID: 19331177.
 19. *Stöth M, Freire Valls A, Chen M, Hidding S, Knipper K, Shen Y et al*. Splenectomy reduces lung metastases and tumoral and metastatic niche inflammation. *Int J Cancer*. 2019;145(9):2509–20. DOI: 10.1002/ijc.32378.
 20. *Steenbrugge J, De Jaeghere EA, Meyer E, Denys H, De Wever O*. Splenic hematopoietic and stromal cells in cancer progression. *Cancer Res*. 2021;81(1):27–34. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-20-2339.
 21. *Ковалева О.В., Грачев А.Н., Подлесная П.А., Рашидова М.А., Самойлова Д.В., Соколов Н.Ю. и др.* PU.1 – ядерный маркер иммунокомпетентных клеток опухолевой стромы при колоректальном раке. *Клиническая и экспериментальная морфология*. 2021;10(2):32–39. DOI: 10.31088/CEM2021.10.2.32-39.
Kovaleva OV, Gratchev AN, Podlesnaya PA, Rashidova MA, SamoiloVA DV, Sokolov NYu et al. PU.1 is a nuclear factor of immunocompetent cells of tumor stroma in colorectal cancer.

- Clinical and experimental morphology. 2021;10(2):32–39 (In Russ.). DOI: 10.31088/CEM2021.10.2.32–39.
22. Herr N, Bode C, Duerschmied D. The effects of serotonin in immune cells. *Front Cardiovasc Med.* 2017;4:48. DOI: 10.3389/fcvm.2017.000480.
23. Branco ACCC, Yoshikawa FSY, Pietrobon AJ, Sato MN. Role of histamine in modulating the immune response and inflammation. *Mediators Inflamm.* 2018;2018:9524075. DOI: 10.1155/2018/9524075.
24. Struchko GY, Merkulova LM, Moskvichev EV, Kostrova OY, Mikhailova MN, Drandrova EG. Morphological and immunohistochemical features of thymus in the presence of colon cancer. *The New Armenian Medical Journal.* 2015;9(2):60–67. Available from: <https://ysmu.am/website/documentation/files/72f503a7.pdf> (accessed 04.08.2022).
25. Дубинина Н.В. Изменение функциональной активности Т-лимфоцитов селезенки на фоне химического канцерогенеза. *Проблемы экологической и медицинской генетики и клинической иммунологии.* 2013;4(118):56–62. Доступно по адресу: http://ecoproblemflug.ucoz.ua/4_118/56-62.pdf (получено 04.08.2022).
Dubinina NV. Changes in functional activity of T lymphocytes of spleen on the background of chemical carcinogenesis. *Problems of Ecological and Medical Genetics and Clinical Immunology.* 2013;4(118):56–62 (In Russ.). Available from: http://ecoproblemflug.ucoz.ua/4_118/56-62.pdf (accessed 04.08.2022).
26. Jiang W, Li Y, Zhang S, Kong G, Li Z. Association between cellular immune response and spleen weight in mice with hepatocellular carcinoma. *Oncol Lett.* 2021;22(2):625. DOI: 10.3892/ol.2021.12886.

Информация об авторах

Марина Николаевна Михайлова – кандидат медицинских наук, доцент кафедры нормальной и топографической анатомии с оперативной хирургией Чувашского государственного университета имени И.Н. Ульянова.

Ольга Михайловна Арлашкина – кандидат медицинских наук, старший преподаватель кафедры нормальной и топографической анатомии с оперативной хирургией Чувашского государственного университета имени И.Н. Ульянова.

Глеб Юрьевич Стручко – доктор медицинских наук, профессор, заведующий кафедрой нормальной и топографической анатомии с оперативной хирургией Чувашского государственного университета имени И.Н. Ульянова.

Лариса Михайловна Меркулова – доктор медицинских наук, профессор кафедры нормальной и топографической анатомии с оперативной хирургией Чувашского государственного университета имени И.Н. Ульянова.

Ирина Станиславовна Стоменская – кандидат медицинских наук, доцент кафедры инструментальной диагностики с курсом фтизиатрии Чувашского государственного университета имени И.Н. Ульянова.

Ольга Юрьевна Кострова – кандидат медицинских наук, заведующая кафедрой инструментальной диагностики с курсом фтизиатрии Чувашского государственного университета имени И.Н. Ульянова.

Author information

Marina N. Mikhailova – Cand. Sci. (Med.), Associate Professor, Department of Normal and Topographic Anatomy with Operative Surgery, IN Ulyanov Chuvash State University.
<http://orcid.org/0000-0001-6957-940X>

Olga M. Arlashkina – Cand. Sci. (Med.), Senior Lecturer, Department of Normal and Topographic Anatomy with Operative Surgery, IN Ulyanov Chuvash State University.
<http://orcid.org/0000-0001-7686-5914>

Gleb Yu. Struchko – Dr. Sci. (Med.), Professor, Head of the Department of the Normal and Topographic Anatomy with Operative Surgery, IN Ulyanov Chuvash State University.
<https://orcid.org/0000-0002-0549-5116>

Larisa M. Merkulova – Dr. Sci. (Med.), Professor, Department of the Normal and Topographic Anatomy with Operative Surgery, IN Ulyanov Chuvash State University.
<https://orcid.org/0000-0001-7460-6791>

Irina S. Stomenskaya – Cand. Sci. (Med.), Associate Professor, Department of the Instrumental Diagnostics with Phthysiology Course, IN Ulyanov Chuvash State University.
<https://orcid.org/0000-0001-7332-4477>

Olga Yu. Kostrova – Cand. Sci. (Med.), Head of the Department of the Instrumental Diagnostics with Phthysiology Course, IN Ulyanov Chuvash State University.
<https://orcid.org/0000-0002-7057-9834>