

## Изменения белой пульпы селезенки у потомства спленэктомированных крыс различных возрастных периодов после введения 1,2-диметилгидразина

*О.М. Арлашкина, Г.Ю. Стручко, Л.М. Меркулова, М.Н. Михайлова*

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

*Введение.* Онкозаболеваемость остается одной из самых актуальных проблем человечества. На запуск малигнизации клеток в организме могут влиять канцерогены разной природы. Установлено, что канцероген 1,2-диметилгидразин вызывает акцидентальную инволюцию тимуса, удаление селезенки у самок крыс до наступления беременности приводит к преждевременной инволюции тимуса у их потомства, а 1,2-диметилгидразининдуцированные опухоли у таких животных развиваются чаще. Тем не менее работы, посвященные изучению селезенки на фоне 1,2-диметилгидразининдуцированной опухоли у потомства спленэктомированных крыс, единичны. Цель исследования – изучение влияния 1,2-диметилгидразина на морфофункциональные изменения белой пульпы селезенки у потомства спленэктомированных крыс в разных возрастных периодах.

*Материалы и методы.* Гистологическими и морфометрическими методами исследована селезенка 150 белых нелинейных крыс-самцов в возрасте 3 и 6 месяцев. Животные были разделены на четыре группы: 1-я группа – интактные животные; 2-я группа – животные, которым вводили 1,2-диметилгидразин, вызывающий рак толстой кишки. 3-я группа – потомство спленэктомированных самок; 4-я группа – потомство спленэктомированных самок, которым вводили 1,2-диметилгидразин.

*Результаты.* Установлено, что у потомства спленэктомированных крыс размеры лимфоидных узелков, герминативных центров и маргинальной зоны меньше, чем у интактных животных. Введение 1,2-диметилгидразина привело к более выраженной дезорганизации морфологии селезенки у потомства спленэктомированных крыс. Это характеризовалось вдвое меньшей, чем у потомства интактных крыс, площадью лимфоидных узелков, резким уменьшением числа крупных лимфоидных узелков, значительным сокращением площади и диаметра герминативных центров, ширины маргинальной зоны и периартериальных лимфоидных муфт.

*Заключение.* Канцероген 1,2-диметилгидразин у потомства спленэктомированных крыс оказывает более выраженное негативное воздействие на селезенку, чем у потомства интактных крыс, и влияние это тем сильнее, чем больше времени прошло от момента окончания курса инъекций.

**Ключевые слова:** селезенка, белая пульпа, 1,2-диметилгидразин, канцерогенез.

**Для корреспонденции:** Ольга Михайловна Арлашкина. E-mail: olgaruz1202@mail.ru

**Для цитирования:** Арлашкина О.М., Стручко Г.Ю., Меркулова Л.М., Михайлова М.Н. Изменения белой пульпы селезенки у потомства спленэктомированных крыс разных возрастных периодов после введения 1,2-диметилгидразина. Клини. эксп. морфология. 2019;8(4):49–58. DOI:10.31088/CEM2019.8.4.49–58

**Конфликт интересов.** Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Статья поступила 28.08.2019. Получена после рецензирования 30.10.2019. Принята в печать 19.11.2019.

## Changes in the spleen white pulp in the offspring of splenectomized rats of various ages exposed to 1,2-dimethylhydrazine

*O.M. Arlashkina, G.Yu. Struchko, L.M. Merkulova, M.N. Mikhailova*

I.N. Ulyanov Chuvash State University, Cheboksary, Russia

*Introduction.* Oncological morbidity remains one of the most pressing problems of mankind. Carcinogens of a different nature can influence the triggering of malignancy of cells in the body. 1,2-dimethylhydrazine is known to cause the accidental thymus involution. It has been also established that spleen removal in female rats before pregnancy leads to premature thymus involution in their offspring, and 1,2-dimethylhydrazine-induced tumors

develop more often in such animals. However, the papers describing spleen morphology in the offspring of splenectomized rats with 1,2-dimethylhydrazine-induced tumors are rare. The aim of the work was to study the effect of 1,2-dimethylhydrazine on morphological and functional changes in the white pulp of the spleen in the offspring of splenectomized rats at different ages.

**Materials and methods.** The spleen of 150 white outbred male rats aged 3 and 6 months was studied histologically and morphometrically. Animals were divided into 4 groups. The 1st group consisted of the intact animals. Rats of the 2nd group were injected with 1,2-dimethylhydrazine, which caused colon cancer. 3rd group was represented by the offspring of splenectomized rats without exposure to carcinogen. The offspring of splenectomized rats that were injected with 1,2-dimethylhydrazine comprised group 4.

**Results.** It was found that in the offspring of splenectomized rats, lymphoid nodules, germinal centers and marginal zone were smaller than in intact animals. The introduction of 1,2-dimethylhydrazine resulted in more pronounced disorganization of the spleen morphology in the offspring of splenectomized rats. This was characterized by half the area of lymphoid nodules than in the offspring of intact rats, sharp decrease in the number of large lymphoid nodules, significant reduction of the area and the diameter of germinal centers, the width of the marginal zone and periarterial lymphoid sheaths.

**Conclusion.** Thus, 1,2-dimethylhydrazine has a more pronounced negative effect on the spleen in the progeny of splenectomized rats than in the offspring of intact rats. The effect is the stronger, the more time has passed from the end of the injection course.

**Keywords:** spleen, white pulp, 1,2-dimethylhydrazine, carcinogenesis.

**For correspondence:** Olga M. Arlashkina. E-mail: olgaruz1202@mail.ru

**For citation:** Arlashkina O.M., Struchko G. Yu., Merkulova L.M., Mikhailova M.N. Changes in white pulp of the spleen in the offspring of splenectomized rats of different age periods after administration of 1,2-dimethylhydrazine. Clin. exp morphol. 2019;8(4):00-00 (In Russ.). DOI:10.31088/CEM2019.8.4.49–58

**Conflict of interest.** The authors declare no conflict of interest.

**Received 28.08.2019. Received in revised form 30.10.2019. Accepted 19.11.2019.**

## Введение

Проблема онкозаболеваемости остается одной из самых актуальных для всего человечества. По данным Международного агентства по изучению рака (МАИР/IARC, Лион, Франция), в 2018 году во всем мире зафиксировано рекордное число случаев онкологических заболеваний – более 18 млн. В Российской Федерации число заболевших, выявленных впервые, также продолжает увеличиваться. Так, с 2000 по 2017 год оно увеличилось с 1 млн 226 тыс. до 1 млн 674 тыс., что составило 36% роста [1]. Помимо ухудшающейся экологии, хронического стресса, гормональных сдвигов и наследственности на запуск малигнизации клеток могут влиять продукты питания с химическими красителями и консервантами, а также канцерогены химической, физической или биологической природы [2]. Канцероген 1,2-диметилгидразин дигидрохлорид (ДМГ) – производное гидразина – относится к группе веществ, потенциально канцерогенных для человека. Его используют для моделирования рака толстой кишки у лабораторных животных [3, 4]. Эта модель достаточно изучена [5–7], она в отличие от клеточных культур позволяет воспроизводить опухолевый ангиогенез и метастазирование [8]. Известно, что опухоль, растущая под действием ДМГ, приводит к развитию акцидентальной инволюции тимуса [9], а также к морфологическим изменениям в органах эндокринной системы [10]. Имеются единичные сведения о некоторых морфологических изменениях в селезенке под действием ДМГ [11].

Селезенка является периферическим органом иммуногенеза, который играет важную роль в поддержании антигенного гомеостаза и противоопухолевой резистентности [12, 13]. Показано, что у пациентов, которым по вынужденным причинам была удалена селезенка, развивается постспленэктомический гипоспленизм [14, 15]. Это характеризуется общими проявлениями вторичного иммунодефицита, в том числе низкой пролиферативной активностью популяции периферических иммунокомпетентных клеток [16]. Известно, что у пациентов с иммунодефицитом значительно выше риск развития злокачественных опухолей, так же, как у тех, кто получает иммуносупрессивную терапию или перенес трансплантацию какого-либо органа [17, 18].

Имеются данные, что активация иммунной системы у матери во время беременности приводит к нарушению противоопухолевого иммунного ответа у потомства [19]. Известно, что удаление селезенки у самок крыс до наступления беременности приводит к преждевременной инволюции тимуса [20], а опухоли под действием ДМГ у таких животных развиваются в 1,5 раза чаще [21]. В связи с этим более углубленное изучение морфологии селезенки у потомства спленэктомированных самок после введения канцерогена с использованием гистологических и морфометрических методов является весьма актуальным.

Целью исследования было изучение морфологических изменений в структуре белой пульпы селезенки на фоне развития 1,2-диметилгидразининдуцированной

опухоли толстой кишки у потомства спленэктомированных крыс.

### Материалы и методы

Исследования выполнены на 150 белых нелинейных крысах-самцах. Животные содержались в виварии, уход за ними осуществляли по нормам и правилам проведения работ с лабораторными животными согласно Европейской конвенции по защите позвоночных животных и действующему ГОСТ 33216-2014 [22]. Работа выполнена на базе медицинского факультета Чувашского государственного университета имени И.Н. Ульянова.

Потомство было получено путем спаривания 4-месячных самок крыс с самцами того же возраста. Спаривание спленэктомированных самок проводилось через месяц после операции по удалению селезенки. Операцию выполняли под местной анестезией с соблюдением всех правил асептики и антисептики через разрез по белой линии живота. Для создания экспериментальной модели рака толстой кишки в качестве канцерогена использован ДМГ производства компании Acros organics (Бельгия). Животные были разделены на четыре группы: 1-я – потомство здоровых самок (n=30); 2-я – потомство здоровых самок с постнатальным введением ДМГ (n=40); 3-я – потомство спленэктомированных самок (n=40); 4-я – потомство спленэктомированных самок с постнатальным введением канцерогена (n=40). Инъекции ДМГ осуществляли внутрибрюшинно 1 раз в неделю в дозе 20 мг/кг в течение одного месяца согласно модели R.F. Jacoby et al. (1991). С целью исключения влияния стрессового фактора от инъекций канцерогена на результаты исследования контрольным животным (n=10) внутрибрюшинно вводили изотонический раствор хлорида натрия в дозе 0,5 мл 1 раз в неделю в течение одного месяца. Было выявлено, что инъекции изотонического раствора контрольным животным не оказывали никакого влияния на исследуемые структуры селезенки по сравнению с потомством здоровых крыс в используемых в данной работе сроках. Выведение из эксперимента осуществляли через 3 и 6 месяцев после рождения путем декапитации. Исследовали селезенку только тех крыс, у которых патоморфологически была подтверждена аденокарцинома толстой кишки.

В работе применяли следующие методы.

1. Окраска гематоксилином и эозином для исследования морфологии селезенки и проведения морфометрических измерений. Ткань селезенки фиксировали в 10% нейтральном забуференном формалине в течение 24 часов, промывали проточной водой, затем выполняли стандартную проводку в тканевом гистопроцессоре Leica ASP 200 (Leica, Германия). После проводки кусочки селезенки заливали в парафин и готовили парафиновые блоки. Парафиновые срезы толщиной 4 мкм переносили на отрицательно заряженные стекла Mentzel Glasses super frost (Германия)

и окрашивали гематоксилином и эозином по стандартной методике.

2. Компьютерная морфометрия. Цифровые снимки микропрепаратов получены с применением системы архивирования на базе микроскопа Leica DM4000B с использованием цифровой фотокамеры Leica DFC 425 и персонального компьютера с набором прикладных программ Leica Application Suite 3.6.0 (Leica, Германия). Микрофотографии для проведения морфометрических измерений получены при  $\times 100$  и  $\times 400$ . Количественные морфометрические измерения выполнены с применением лицензионной программы «Микро-Анализ» (ООО «ТелеМедТехника», Санкт-Петербург, Россия). Для каждого среза выполнены измерения не менее чем в 10 интересующих полях зрения.

3. Определение индексов, характеризующих морфофункциональное состояние изучаемых структур белой пульпы селезенки [23]:

а) ГФИ (герминативно-фолликулярный индекс) – для определения степени развития герминативных центров:

$$\text{ГФИ} = \frac{D_{\text{ГЦ}}}{D_{\text{ЛФ}}},$$

где  $D_{\text{ГЦ}}$  – диаметр герминативных центров,  $D_{\text{ЛФ}}$  – диаметр лимфоидных узелков.

б) ИК (индекс Керногана) – для определения пропускной способности микрососудов селезенки:

$$\text{ИК} = \frac{2 \times L}{D},$$

где  $L$  – толщина стенки центральной артериолы,  $D$  – внутренний диаметр центральной артериолы;

в) ЛК (лимфоидный коэффициент) – для определения соотношения Т- и В-зависимых зон:

$$\text{ЛК} = \frac{D_{\text{ЛФ}}}{L_{\text{ПМ}}},$$

где  $D_{\text{ЛФ}}$  – диаметр лимфоидных узелков,  $L_{\text{ПМ}}$  – ширина периартериальных лимфоидных муфт.

4. Статистическая обработка цифровых данных проводилась с использованием лицензионного пакета Microsoft Office 2003 (Word и Excel) и программы STATISTICA, достоверность определяли критерием Стьюдента (t). В работе приводятся следующие показатели:  $M$  – средняя арифметическая величина;  $m$  – средняя ошибка средней арифметической величины. Достоверными считались отличия при  $p < 0,05$  [24].

### Результаты и обсуждение

В работе использованы крысы двух возрастных групп – 3 и 6 месяцев. Интактные животные в возрасте 3 месяцев имели массу 150–200 граммов, а крысы в возрасте 6 месяцев – 250–400 граммов. В ходе исследования выявлено, что ДМГ приводит к уменьшению массы животных. Наиболее выраженное сокращение массы

отмечалось у потомства спленэктомированных крыс без воздействия в возрасте 3 месяцев – на 16% ( $p < 0,01$ ) и у потомства спленэктомированных крыс с введением канцерогена в возрасте 6 месяцев – на 25% ( $p < 0,001$ ). В других группах статистически значимое уменьшение массы крыс не наблюдалось. Изменения таких антропометрических данных как длина тела, хвоста, ушей имеют недостоверный характер. Стоит отметить, что абсолютная масса селезенки также имела тенденцию к уменьшению. Так, статистически значимое уменьшение массы селезенки отмечается у потомства спленэктомированных крыс 3 месяцев как без воздействия (на 28%), так и с введением канцерогена (на 20%). У крыс в возрасте 6 месяцев уменьшение массы селезенки достоверно лишь у потомства спленэктомированных крыс с введением ДМГ и составляет 25% ( $p < 0,01$ ).

При гистологическом исследовании селезенка 3-месячного потомства здоровых самок имеет типичное строение – как отмечают многие ученые, наиболее сложное среди периферических органов иммунитета [25]. Паренхима органа представлена красной и белой пульпой. Красная пульпа составляет 75–85% от массы органа, включая в себя пульпарные тяжи и синусоиды. Белая пульпа представлена лимфоидными узелками и периартериальными лимфоидными муфтами (ПАЛМ). Среди лимфоидных узелков встречаются первичные без герминативных центров и вторичные с центрами размножения, которые появились в них после антигенной стимуляции. Соотношение между первичными и вторичными лимфоидными узелками составляет 1:2,6. Лимфоидные узелки имеют четкое зональное строение, в каждом из которых определяется эксцентрично расположенная центральная артерия, периартериальная Т-зависимая зона, герминативный центр (В-зависимая зона), мантийная и маргинальная зоны (рис. 1). Селезенка интактных животных в возрасте 6 месяцев не имеет существенных отличий от селезенки 3-месячных крыс. Присутствует красная и белая пульпа, границы между ними по-прежнему четкие, однако соотношение между первичными и вторичными лимфоидными узелками составляет 1:1,3.

Удаление селезенки у самок до наступления беременности приводит к морфологическим изменениям паренхимы этого органа как у 3-месячного, так и у 6-месячного потомства. В 3 месяца при сохраняющейся площади и диаметре лимфоидных узелков уменьшаются размеры их герминативных центров – площадь на 28% и диаметр на 17%, маргинальная зона сокращается на 19% (табл. 1). Сокращается число крупных лимфоидных узелков (более 500 мкм в диаметре) – на 10% (рис. 2), а также доля лимфоидных узелков с герминативными центрами, поскольку их отношение к лимфоидным узелкам без центров размножения составляет 1:0,26, что свидетельствует о снижении В-клеточной иммунореактивности. Увеличение размеров ПАЛМ носит недостоверный характер. У крыс в возрасте 6 месяцев статистически значимо уменьшаются размеры

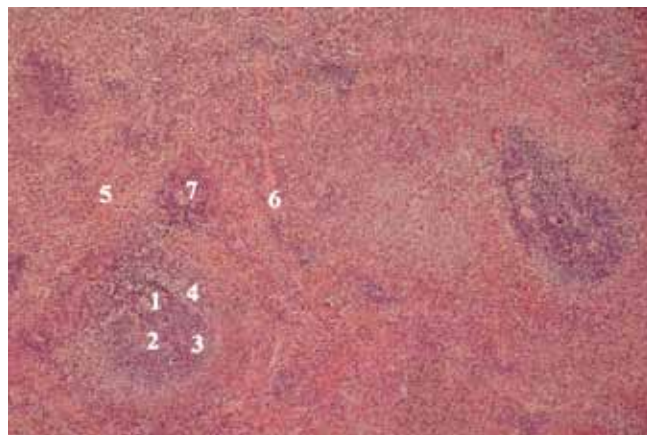


Рис. 1. Селезенка потомства интактных крыс в возрасте 3 месяцев.

1 – центральная артерия в периартериальной зоне лимфоидного узелка, 2 – герминативный центр, 3 – мантийная зона, 4 – маргинальная зона, 5 – красная пульпа, 6 – соединительнотканнные трабекулы, 7 – периартериальная лимфоидная муфта.  
Окраска гематоксилином и эозином.  $\times 100$

Fig. 1. Spleen in offspring of intact rats at the age of 3 months.  
1 – central artery in the periarterial zone of the lymphoid nodule, 2 – germinal center, 3 – mantle zone, 4 – marginal zone, 5 – red pulp, 6 – connective tissue trabeculae, 7 – periarterial lymphoid coupling. H&E.  $\times 100$

площади лимфоидных узелков и их диаметра – на 22%. Значительно сокращается число крупных лимфоидных узелков при увеличении числа мелких (менее 300 мкм) (рис. 2), а на один первичный лимфоидный узелок приходится всего 0,6 вторичного (соотношение 1:0,6). Герминативно-фолликулярный индекс, оценивающий степень развития В-клеточного звена иммунитета, сокращается у крыс в возрасте 3 месяцев на 2,39 условной единицы (у.е.), а у крыс в возрасте 6 месяцев, напротив, возрастает на 5,53 у.е. (табл. 1). Соотношение численности между популяциями В- и Т-лимфоцитов отражает лимфоидный коэффициент. Медленное уменьшение его значений у потомства спленэктомированных крыс, ассоциированное с возрастом (табл. 1), свидетельствует об определенном преобладании темпов сокращения именно В-клеточного пула лимфоцитов [23]. Другими словами, популяция Т-лимфоцитов селезенки потомства оказывается достаточно устойчивой к влиянию спленэктомии у матери, поэтому ПАЛМ в меньшей степени подвержены данному влиянию по сравнению с лимфоидными узелками. Это, вероятно, связано с компенсаторной реакцией Т-зависимых зон селезенки в ответ на запуск преждевременной инволюции тимуса [26].

У потомства интактных крыс с введением ДМГ в возрасте 3 месяцев белая пульпа селезенки сохраняет зональное строение, однако контуры лимфоидных узелков и ПАЛМ становятся менее отчетливыми. Соотношение между первичными и вторичными лимфо-



Таблица 1 / Table 1

**Морфометрические параметры белой пульпы селезенки: 1 – потомства интактных крыс, 2 – потомства спленэктомированных крыс, 3 – потомства интактных крыс с постнатальным введением канцерогена, 4 – потомства спленэктомированных крыс с постнатальным введением канцерогена**

**Morphometric parameters of the white pulp of the spleen: 1 – offspring of intact rats, 2 – offspring of splenectomized rats, 3 – offspring of intact rats with postnatal exposure to carcinogen, 4 – offspring of splenectomized rats with postnatal exposure to carcinogen**

	3 месяца 3 months				6 месяцев 6 months			
	1	2	3	4	1	2	3	4
Диаметр ЛУ, мкм LN diameter, $\mu\text{m}$	620,85 $\pm$ 23	550,45 $\pm$ 15 **	502,33 $\pm$ 18 ***	466,86 $\pm$ 19 ***	561,87 $\pm$ 22	435,8 $\pm$ 10 ***	437,71 $\pm$ 14 ***	390,06 $\pm$ 14 ***
Площадь ЛУ, $\times 10^3$ мкм LN area, $\times 10^3 \mu\text{m}$	470,214 $\pm$ 20	424,280 $\pm$ 17	402,776 $\pm$ 14 **	235,967 $\pm$ 18 ***	530,303 $\pm$ 31	316,648 $\pm$ 26 ***	394,218 $\pm$ 30 **	212,308 $\pm$ 17 ***
Диаметр ГЦ ЛУ, мкм GC diameter in LN, $\mu\text{m}$	218,53 $\pm$ 8,5	180,08 $\pm$ 3,7 **	191,59 $\pm$ 8,3 *	138,47 $\pm$ 6,1 ***	202,025 $\pm$ 9,2	180,45 $\pm$ 4,3 *	171,78 $\pm$ 5,9 **	148,34 $\pm$ 5,5 ***
Площадь ГЦ ЛУ, $\times 10^3$ мкм GC area in LN, $\times 10^3 \mu\text{m}$	49,317 $\pm$ 3,3	35,199 $\pm$ 1,5 *	38,901 $\pm$ 1,9 **	20,479 $\pm$ 1,9 *	60,765 $\pm$ 3,5	47,64 $\pm$ 3 **	49,453 $\pm$ 4,1 *	39,649 $\pm$ 3 **
Ширина МЗ, мкм MZ width, $\mu\text{m}$	121,365 $\pm$ 6	98,69 $\pm$ 0,2 **	118,352 $\pm$ 2,2	88,495 $\pm$ 3,5 ***	122,856 $\pm$ 2,7	111,95 $\pm$ 1,8 **	109,737 $\pm$ 2,1 ***	90,642 $\pm$ 1,3 ***
Ширина ПАЛМ, мкм PALC width, $\mu\text{m}$	118,317 $\pm$ 4,8	120,87 $\pm$ 7,2	125,06 $\pm$ 4,8	100,01 $\pm$ 4,6 **	119,33 $\pm$ 3,3	123,89 $\pm$ 2,01	111,11 $\pm$ 3,9	87,94 $\pm$ 2,4 ***
Внутренний диаметр ЦА, мкм CA inner diameter, $\mu\text{m}$	21,61 $\pm$ 1,2	20,78 $\pm$ 0,5	18,98 $\pm$ 1,3	11,48 $\pm$ 0,6 ***	16,47 $\pm$ 1,4	17,07 $\pm$ 1,8	13,28 $\pm$ 0,7 *	12,66 $\pm$ 0,5 **
Толщина стенки ЦА, мкм CA wall thickness, $\mu\text{m}$	15,90 $\pm$ 0,7	17,09 $\pm$ 0,55 *	17,82 $\pm$ 0,51 *	13,31 $\pm$ 0,5 **	20,78 $\pm$ 1,5	19,88 $\pm$ 2,3	15,06 $\pm$ 0,4 ***	16,05 $\pm$ 0,59 ***
ГФИ GFI	35,19	32,71	38,14	29,65	35,95	41,48	39,24	38,03
ЛК LC	5,24	4,5	4,01	4,66	4,7	3,5	3,93	4,43
ИК KI	1,47	1,6	1,87	2,31	2,52	2,3	2,83	3,54

ЛУ – лимфоидный узелок, ГЦ – герминативный центр, МЗ – маргинальная зона, ПАЛМ – периартериальная лимфоидная муфта, ЦА – центральная артерия, ГФИ – герминативно-фолликулярный индекс, ЛК – лимфоидный коэффициент, ИК – индекс Керногана

\* p<0,05, \*\* p<0,01, \*\*\* p<0,001 по сравнению с интактными животными

LN – lymphoid nodule, GC – germinal center, MZ – marginal zone, PALC – periarterial lymphoid coupling, CA – central artery, GFI – germinative follicular index, LC – lymphoid coefficient, KI – Kernogan index

\* p < 0.05, \*\* p < 0.01, \*\*\* p < 0.001 compared with intact animals



Рис. 2. Процентное соотношение числа лимфоидных узелков разного диаметра в селезенке крыс.

А – у крыс в возрасте 3 месяца, Б – у крыс в возрасте 6 месяцев

Figure 2. Percentage ratio of the number of lymphoid nodules that have various diameters in the rat spleen.

А – in rats aged 3 months, B – in rats aged 6 months

идными узелками у крыс в 3 месяца составляет 1:1,9, а в 6 месяцев – 1:1,5. Введение канцерогена приводит к относительно увеличению числа мелких и средних (от 300 до 500 мкм в диаметре) лимфоидных узелков при относительно уменьшении числа крупных (рис. 2). При этом незначительно сокращаются площадь лимфоидных узелков (на 14%) и их диаметр – на 19%. Площадь герминативных центров уменьшается более значительно – на 21%, а диаметр – всего на 12%. Замечено, что у крыс в 6 месяцев наиболее выражено в сравнении с 3-месячными сокращаются площадь и диаметр лимфоидных узелков – на 25% и 22%, соответственно. ГФИ у 3-месячных крыс увеличивается на 3,04 у.е., а у 6-месячных – на 3,29 у.е. (табл. 1). Показатели ГФИ выше, чем у интактных животных, и значительно выше, чем у потомства спленэктомированных крыс, которым также вводили ДМГ. Это свидетельствует о том, что в ответ на введенный канцероген В-зависимая зона оказалась более устойчива, нежели Т-зависимая [23]. Несмотря на то, что изменения ширины ПАЛМ носят недостоверный характер, показатель лимфоидного коэффициента у 3-месячных крыс уменьшается на 1,23 у.е. и у 6-месячных на 0,77 у.е., что отражает напряженность клеточного звена иммунитета и может быть обусловлено преждевременной ин-

волюцией тимуса при химическом канцерогенезе [10]. Значительно увеличиваются диаметр центральной артерии и толщина ее стенки (табл. 1). Это приводит к увеличению индекса Керногана, свидетельствующему о снижении пропускной способности центральной артерии [23].

Моделирование опухоли толстой кишки путем инъекций ДМГ у потомства спленэктомированных крыс вызвало еще большие морфологические изменения в селезенке. При увеличении общего числа крупных лимфоидных узелков (рис. 3) их количество существенно уменьшается (рис. 2). Соотношение первичных к вторичным лимфоидным узелкам составляет у крыс в 3 месяца 1:0,44, а в 6 месяцев – 1:1,3. Границы между зонами стерты, лимфоидные узелки трудноотличимы от ПАЛМ (рис. 3). Капсула рыхлая, трабекулы утолщены. Значительно сокращается площадь лимфоидных узелков: в 3 месяца в 2 раза, в 6 месяцев – в 2,5 раза, их диаметр, соответственно, – на 24% и 30%. Значимо уменьшается диаметр герминативных центров в лимфоидных узелках (табл. 1). Их площадь у 3-месячных крысят в 2,5 раза меньше, чем у интактных животных, а у 6-месячных – в 1,5 (табл. 1). Выраженное снижение герминативно-фолликулярного индекса у потомства крыс в возрасте 3 месяцев свидетельствует о резко выражен-

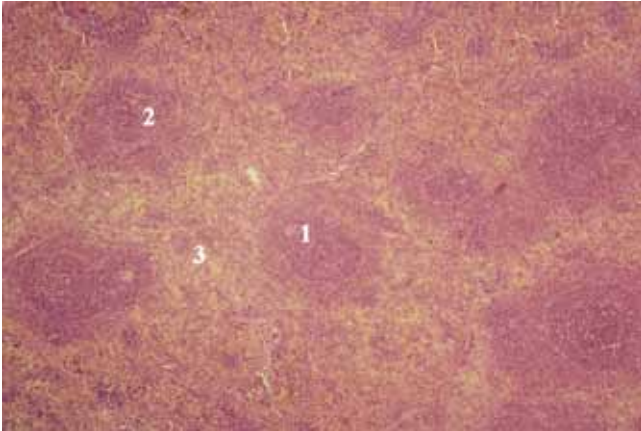


Рис. 3. Селезенка потомства спленэктомированных крыс в возрасте 6 месяцев.

1 – лимфоидный узелок, 2 – периартериальная лимфоидная муфта, 3 – красная пульпа.  
Окраска гематоксилином и эозином.  $\times 100$

Fig. 3. Spleen of the offspring of splenectomized rats aged 6 months. Hematoxylin and eosin stain.

1 – lymphoid nodule, 2 – periarterial lymphoid coupling, 3 – red pulp. H&E.  $\times 100$

ной гипоплазии иммунокомпетентных В-зависимых зон белой пульпы селезенки. У спленэктомированного потомства инъекции канцерогена привели к самому выраженному уменьшению ширины ПАЛМ среди всех исследуемых групп: в 3 месяца это сокращение составило 15%, а в 6 месяцев – 26% (табл. 1). Лимфоидный коэффициент при этом изменяется незначительно, что свидетельствует о том, что Т-зависимые зоны селезенки оказались более устойчивы к действию канцерогена у этих животных. Нарастание индекса Керногана с возрастом, как показано в таблице 1, свидетельствует о недостаточном кровоснабжении белой пульпы ввиду снижения пропускной способности центральной артерии [23]. Таким образом, у потомства спленэктомированных крыс, которым после рождения не вводили ДМГ, были выявлены некоторые морфологические признаки незрелости лимфоидной ткани. Наиболее заметно произошло сокращение размеров лимфоидных узелков и их В-зависимых герминативных центров. Изменение размеров ПАЛМ, вероятно, связано с компенсаторной реакцией Т-зависимых зон на преждевременную инволюцию тимуса [27]. Введение ДМГ в дозе, достаточной для развития аденокарциномы толстой кишки, привело к выраженным нарушениям морфологического состояния всех структурных компонентов селезенки с разной степенью выраженности у исследуемых групп. Последствия введения канцерогена потомству интактных крыс в большей степени проявились у животных 6-месячного возраста и характеризовались уменьшением параметров белой пульпы и сосудистыми изменениями. Вероятно, эти изменения во второй возрастной группе связаны с усугублением действия канцерогенного фактора на фоне возрастной

гипоплазии органа. Наиболее выраженная гипоплазия селезенки была выявлена при введении ДМГ потомству спленэктомированных крыс в возрасте 6 месяцев. Очевидно, усиление эффекта канцерогена в данной группе обусловлено не только возрастной инволюцией органа, но может быть связано с угнетением противоопухолевого иммунитета потомства из-за снижения цитотоксической активности лимфоцитов селезенки вследствие активации иммунной системы матери во время беременности [19] и акцидентальной инволюции тимуса [27]. Обнаруженные нами изменения могут объяснить возможное ускользание опухоли от иммунного надзора, поскольку все морфологические изменения, выявленные нами, приводят в конечном счете к нарушению взаимодействия иммунокомпетентных клеток с антигенами. Это ведет к нарушению дифференцировки В- и Т-лимфоцитов и, следовательно, снижению интенсивности гуморального и клеточного звеньев противоопухолевого иммунного ответа. Возможно, именно поэтому у потомства спленэктомированных крыс, как было показано в предыдущих исследованиях нашего научного коллектива [20], опухоли формируются чаще и имеют более агрессивный фенотип.

## Выводы

В селезенке потомства спленэктомированных самок выявлены морфологические признаки гипоплазии лимфоидной ткани, проявляющиеся в сокращении размеров лимфоидных узелков и их В-зависимых герминативных центров: уменьшении площади лимфоидных узелков в 6 месяцев на 40%, центров размножения – на 28% и 24% в 3- и 6-месячном возрасте, соответственно; ширина маргинальной зоны наиболее значимо сократилась у 3-месячного потомства (19%).

У 6-месячного потомства спленэктомированных крыс отмечается наименьшее число вторичных лимфоидных узелков, приходящихся на один первичный лимфоидный узелок. Сокращение числа крупных лимфоидных узелков на 10% у 3-месячных крыс и в 2 раза у 6-месячных животных, а также выраженное изменение соотношения первичных к вторичным узелкам подтверждают недостаточную готовность иммунореактивных зон селезенки к антигенной стимуляции.

Введение ДМГ потомству интактных крыс привело к дезорганизации лимфоидных структур селезенки: число мелких лимфоидных узелков у 3-месячных крыс увеличилось в 2 раза, у 6-месячных – в 4 раза, число крупных, напротив, сократилось на 30% у животных обеих возрастных групп. Соотношение первичных и вторичных лимфоидных узелков значимо не изменилось. У крыс в возрасте 6 месяцев по сравнению с 3-месячными развитие индуцированной ДМГ опухоли привело к более выраженному уменьшению морфологических параметров белой пульпы и сосудистым изменениям: диаметр и площадь лимфоидных узелков сократились на 22% и 25%, площадь герминативных центров – на 19%, диаметр и ширина стенки централь-

ной артерии – на 19% и 28%, соответственно. Герминативно-фолликулярный индекс превышал таковой у интактных животных и был значительно больше, чем у потомства спленэктомированных крыс, которым вводили ДМГ. Лимфоидный коэффициент у 3-месячных крыс этой группы был самым низким среди показателей всех исследуемых групп.

При индукции ДМГ аденокарциномы толстой кишки морфологические изменения в селезенке потомства спленэктомированных самок наиболее выражены по сравнению с таковыми в предыдущих моделях. У 6-месячного потомства отмечается статистически более значимое, чем у 3-месячных крыс, сокращение площади и диаметра лимфоидных узелков (в 1,4 и 2,5 раза, соответственно), диаметра и площади герминативных центров на 26% и 35%, ширины маргинальной зоны и периартериальных лимфоидных муфт на 26%, а также уменьшение диаметра просвета и толщины стенки центральной артерии на 22% и 23%. У животных данной группы кроме перечисленных выше морфологических изменений отмечается также самый высокий индекс Керногана.

### Заключение

Спленэктомия у самок до наступления беременности приводит к нарушению развития селезенки у потомства. Введение ДМГ потомству спленэктомированных крыс оказывает более выраженное отрицательное влияние на селезенку, чем у потомства интактных животных. Чем больше времени проходит от момента окончания курса инъекций канцерогена, тем к более выраженным морфофункциональным изменениям селезенки приводит его воздействие.

### Вклад авторов

Концепция и дизайн исследования – Г.Ю. Стручко, Л.М. Меркулова.

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

Статистическая обработка – О.М. Арлашкина.

Написание текста – О.М. Арлашкина.

Редактирование – Г.Ю. Стручко, Л.М. Меркулова, М.Н. Михайлова.

М.Н. Михайлова.

### Author contributions

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

Collected and processed the material – O. M. Arlaskina, M. N. Mikhailova.

Performed the statistical analysis – O. M. Arlaskina.

Wrote the paper – O. M. Arlaskina.

Edited the manuscript – G. Yu. Struchko, L. M. Merkulova, M. N. Mikhailova.

### Литература/References

1. Заболеваемость населения по основным классам болезней. Федеральная служба государственной политики (Росстат). Москва, 2018. Доступно по адресу: <http://www.gks.ru>

The population incidence according to the main classes of diseases. Federal State Policy Service (Rosstat). Moscow, 2018. Available from: <http://www.gks.ru> (In Russ.).

2. Денишев П.П., Чирин А.С. Современное представление о факторах развития рака желудка, формирование групп риска данной онкопатологии. Бюллетень медицинских интернет-конференций. 2016;6(5):1073.  
*Denishev RR, Chirin AS.* A modern view on the development factors of gastric cancer, the formation of risk groups for this oncopathology. Bulletin of medical internet conferences. 2016;6(5):1073 (In Russ.).
3. Пожарицкий К.М. Успехи современной онкологии и проблемы изучения морфогенеза опухолей. Архив патологии. 1975;(4):82–92.  
*Pozharisskii KM.* Advances in modern oncology and the problems of tumor morphogenesis research. Archive of pathology. 1975;(4):82–92 (In Russ.).
4. Gershbein LL, Amir-Mokri E, Rezai VK, Brown ME. Tumors produced in rats with a single dosage of 1,2-dimethylhydrazine. Res Commun Chem Pathol Pharmacol. 1993;80(2):175–86.
5. Keisuke I, Otsuka E, Furuya K. Carcinogenicity of 1,2-dimethylhydrazine dihydrochloride in mice. Tokushima J. Exp. Med. 1980;(27):5–13.
6. Ohyama W. Markedly enhanced micronucleus induction by 1,2-dimethylhydrazine dihydrochloride in colonic cells of rats with bacterial colonization in the intestine. Mutat Res. 2019;(838):1–8. DOI: 10.1016/j.mrgentox.2018.11.007.
7. Shree A, Hasan SK, Islam J, Vafa A, Afzal SM, Barnwal P et al. Colono-protective Potentiality of Methanolic Bark Extract of Acacia catechu: A Medicinal Plant against 1,2-Dimethylhydrazine-Induced Toxicity in Wistar Rats. J. Environ Pathol Toxicol Oncol. 2018;37(4):273–89. DOI: 10.1615/JEnvironPatholToxicolOncol.2018026923.
8. DE-Souza ASC, Costa-Casagrande TA. Animal models for colorectal cancer. Arq Bras Cir Dig. 2018;31(2):1369. DOI: 10.1590/0102-672020180001e1369.
9. Стручко Г.Ю., Меркулова Л.М., Москвичев Е.В. Морфологическая и иммуногистохимическая характеристика тимуса при химическом канцерогенезе, вызванном введением 1,2-диметилгидразина. Морфология. 2014;146(5):35–39.  
*Struchko GYu, Merkulova LM, Moskvichev EV.* Morphological and immunohistochemical characteristics of the thymus during chemical carcinogenesis induced by 1,2-dimethylhydrazine administration. Morphology. 2014;146(5):35–39 (In Russ.).
10. Стручко Г.Ю., Меркулова М.Н., Москвичев Е.В., Кострова О.Ю., Михайлова М.Н., Драндрова Е.Г., Мухаммад З. Морфологическая и иммуногистохимическая характеристика опухолей желудочно-кишечного тракта на фоне иммунной недостаточности. Вестник Чувашского университета. 2011;(3):450–456.  
*Struchko GYu, Merkulova MN, Moskvichev EV, Kostrova OYu, Mikhailova MN, Drandrova EG, Mukhammad Z.* Morphological and immunohistochemical characteristics of gastrointestinal tract tumors in secondary immunodeficiency. Vestnik Chuvashskogo universiteta. 2011;3:450–456 (In Russ.).



11. *Lisnychuk N, Soroka Y, Andrijchuk I, Nebesna Z, Volkov K.* Histological changes in spleen under condition of toxic carcinogenesis. *Georgian Med News.* 2018;(280–281):160–4.
12. *Бойчук Н.В., Исламов Р.Р., Кузнецов С.Л., Улумбеков Э.Г., Чельшев Ю.А.* Гистология: Учебник для вузов. Москва: ГЭ-ОТАР-Медиа, 2001. 672 с.  
*Boychuk NV, Islamov RR, Kuznetsov SL, Ulumbekov EG, Chelyshev YuA.* Histology. Textbook. Moscow: GEOTAR-Media, 2001. 672 p. (In Russ.).
13. *Holness CL.* Macrosialin, a mouse macrophage – restricted glycoprotein, is a member of the lamp/Igp.family. *J. Biol. Chem.* 1993;(268):9661–2.
14. *Апарцин К.А.* Аутоотрансплантация ткани селезенки при вынужденной спленэктомии в условиях хирургической инфекции живота. Хирургия тяжелых гнойных процессов. Новосибирск: Наука, 2000. С. 193–209.  
*Apartsin KA.* Spleen tissue autotransplantation during forced splenectomy in conditions of abdominal surgical infection. *Surgery of severe purulent processes.* Novosibirsk: Nauka, 2000. P. 193–209 (In Russ.).
15. *Стручко Г.Ю., Меркулова Л.М., Сергеева В.Е., Стоменская И.С.* Реакция биоаминсодержащих структур тимуса у крыс на экспериментальное удаление селезенки. *Иммунология.* 2000;21(2):13–17.  
*Struchko GYu, Merkulova LM, Sergeeva VE, Stomenskaya IS.* The response of bioamine-containing structures of the thymus in rats to experimental removal of the spleen. *Immunology.* 2000;21(2):13–17 (In Russ.).
16. *Павлова И.Е.* Особенности функционирования иммунной системы после спленэктомии у пациентов с заболеваниями системы крови и травмами селезенки: Автореф. дисс. ... докт. мед. наук. Санкт-Петербург, 2007. 42 с.  
*Pavlova IE.* Features of the immune system function after splenectomy in patients with hematological diseases and spleen injuries: Avtoref. Dr. Diss. (Med. Sci.). Sankt-Peterburg, 2007. 42 p. (In Russ.).
17. *Engels EA, Pfeiffer RM, Fraumeni JF Jr, Kasiske BL, Israni AK, Snyder JJ et al.* Spectrum of cancer risk among US solid organ transplant recipients. *JAMA.* 2011;306(17):1891–901. DOI: 10.1001/jama.2011.1592.
18. *Rezaei N, Hedayat M, Aghamohammadi A, Nichols KE.* Primary immunodeficiency diseases associated with increased susceptibility to viral infections and malignancies. *J Allergy Clin Immunol.* 2011;127(6):1329–41. DOI: 0.1016/j.jaci.2011.02.047
19. *Обернихин С.С.* Влияние активации иммунной системы материнского организма в ранние сроки беременности на состояние противоопухолевого иммунитета потомства. *Бюллетень экспериментальной биологии и медицины.* 2013;156(7):78.  
*Obernikhin SS.* The effect of immune system activation in maternal organism in early pregnancy on the state of antitumor immunity in the offspring. *Bulletin of experimental biology and medicine.* 2013;156(7):78 (In Russ.).
20. *Драндрова Е.Г., Стручко Г.Ю., Михайлова М.Н.* Влияние иммунодефицитной беременности на противоопухолевый иммунитет потомства. *Успехи современного естествознания.* 2013;(3):84–86.  
*Drandrova EG, Struchko GYu, Mikhailova MN.* The effect of immunodeficiency pregnancy on the antitumor immunity in the offspring. *Uspekhi sovremennogo estestvoznaniya.* 2013;(3):84–86 (In Russ.).
21. *Кострова О.Ю., Михайлова М.Н., Стручко Г.Ю., Бессонова К.В., Драндрова Е.Г., Стромская И.С.* Акцидентальная инволюция тимуса крыс на фоне развития аденокарциномы толстой кишки, индуцируемой 1,2-диметилгидразином на фоне удаления селезенки. *Вестник Чувашского университета.* 2012;(3):416–423.  
*Kostrova OYu, Mikhailova MN, Struchko GYu, Bessonova KV, Drandrova EG, Stromenskaya IS.* Accidental involution of the thymus in rats with colon adenocarcinoma induced by 1,2-dimethylhydrazine on the background of spleen removal. *Vestnik Chuvashskogo universiteta.* 2012;(3):416–423 (In Russ.).
22. *Руководство по содержанию и уходу за лабораторными грызунами и кроликами: ГОСТ 33216-2014. Введен 2016.07.01. Москва. Доступно по адресу: <http://docs.cntd.ru>*  
*Guidelines for the maintenance and care of laboratory rodents and rabbits: State All-Union standard (GOST) 33216-2014. From 2016.07.01. Moscow. Available from: <http://docs.cntd.ru> (In Russ.)*
23. *Волков В.П.* Новый алгоритм морфометрической оценки функциональной иммуноморфологии селезенки. *Медицина и фармакология: электронный научный журнал.* 2015;(18):5–6.  
*Volkov VP.* New algorithm of the morphometric assessment of functional immunomorphology of the spleen. *Meditina i farmakologiya: elektronnyi nauchnyi zhurnal.* 2015;(18):5–6 (In Russ.).
24. *Реброва О.Ю.* Статистический анализ медицинских данных. Применение пакета прикладных программ STATISTICA. Москва: Media Sfera, 2002. 312 с.  
*Rebrova OYu.* Statistical analysis of medical data. Application of the STATISTICA package. Moscow: Media Sfera, 2002. 312 p. (In Russ.).
25. *Auerbach A.* Diagnostic Pathology: Spleen. Lippincott Williams & Wilkins, 2014. 536 p.
26. *Москвичев Е.В., Меркулова Л.М., Стручко Г.Ю., Михайлова М.Н., Кострова О.Ю.* Иммуногистохимическая характеристика акцидентальной инволюции тимуса после спленэктомии. *Вестник Национального медико-хирургического центра Н.И. Пирогова.* 2012;7(2):4–43.  
*Moskvichev EV, Merkulova LM, Struchko GYu, Mikhailova MN, Kostrova OYu.* Immunohistochemical characterization of accidental involution of the thymus after splenectomy. *Bulletin of Pirogov national medical & surgical center.* 2012;7(2):4–43 (In Russ.).
27. *Стручко Г.Ю., Меркулова Л.М., Кострова О.Ю., Михайлова М.Н., Драндрова Е.Г., Арлашкина О.М.* Морфофункциональные изменения селезенки и тимуса крысят, родившихся от спленэктомированных крыс-самок. *Успехи современного естествознания.* 2014;(9):70–72.  
*Struchko GYu, Merkulova LM, Kostrova OYu, Mikhaylova MN, Drandrova EG, Arlashkina OM.* Morphofunctional changes of the spleen and thymus rats born to female rats after removal of the spleen. *Uspekhi sovremennogo estestvoznaniya.* 2014;(9):70–72 (In Russ.).

**Информация об авторах**

Ольга Михайловна Арлашкина – аспирант 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.

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

**Author information**

Olga M. Arlashkina – Post-graduate student, Department of normal and topographic anatomy with operative surgery, I.N. Ulyanov Chuvash State University.  
<http://orcid.org/0000-0001-7686-5914>

Gleb Yu. Struchko – Dr. Sci. (Med.), professor, head of the Department of normal and topographic anatomy with operative surgery, I.N. Ulyanov Chuvash State University.  
<http://orcid.org/0000-0002-0549-5116>

Larisa M. Merkulova – Dr. Sci. (Med.), professor, Department of normal and topographic anatomy with operative surgery, I.N. Ulyanov Chuvash State University.  
<http://orcid.org/0000-0001-7460-6791>

Marina N. Mikhailova – Cand. Sci. (Med.), associate professor, Department of normal and topographic anatomy with operative surgery, I.N. Ulyanov Chuvash State University.  
<http://orcid.org/0000-0001-6957-940X>