

Литература

1. Клиническое применение магнитно-резонансной томографии в диагностике и оценке состояния гипоталамо-гипофизарной системы/И.И. Дедов [и др.]. – М.: ЭНЦ РАМН РКНПК МЗ РФ, ММА им. И.М. Сеченова, 2003. – 57 с.
2. Коновалов, А.Н. Магнитно-резонансная томография в нейрохирургии/А.Н. Коновалов, В.Н. Корниенко, И.Н. Пронин. – М.: Медицина, 1997. – с. 168-229.
3. Сперанский, В.С. Форма и конструкция черепа/В.С. Сперанский, А.И. Зайченко. – М.: Медицина, 1980. – с. 32-35.
4. Терапология человека/под ред. Г.И. Лазюка. – М.: Медицина 1981. – с. 122-123.
5. Эндокринология по Вильямсу. Нейроэндокринология/ под ред. И.И. Дедова, Т.А. Мельниченко. – М.: Рид Элсивер, 2010. – с. 360-390.

МОРФОГИСТОХИМИЧЕСКАЯ РЕАКЦИЯ НАДПОЧЕЧНИКОВ ПОТОМСТВА ИНТАКТНЫХ И СПЛЕНЭКТОМИРОВАННЫХ КРЫС НА ВВЕДЕНИЕ КАНЦЕРОГЕНА

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

Кафедра нормальной и топографической анатомии
Чувашский государственный университет имени И. Н. Ульянова, Чебоксары, Россия

*Corresponding author: evkbiz@yandex.ru

Abstract

MORPHOHISTOCHEMICAL REACTION OF THE ADRENALS IN INTACT AND SPLENECTOMIZED RATS PROGENY ON THE BACKGROUND OF THE CARCINOGEN ADMINISTRATION

Background: One of the major problems in medicine is the increase in cancer incidence, which leads to deterioration of the environment, the impact of different mutagenic factors, increased stress load. Recently, it is recognized that the risk of cancer increases significantly on the background of immunodeficiency. Also, there were many works devoted to the “hormonal carcinogenesis” and hormonal status on the background of cancer.

Material and methods: The experiments were carried out on the progeny of intact and splenectomized females (80 white male infant rats) treated with the carcinogen 1,2-dimethylhydrazine. We used luminescent-histochemical methods for the detection of structures containing biogenic amines, cytospektrofluorimetry – for their quantitative assessment, the definition of the ratio of biogenic amines to assess the functional state of the cells, stain sections with hematoxylin and eosin and immunohistochemical methods using monoclonal antibodies – markers of cell APUD series.

Results: It is found that removal of the spleen in female rats, and administration of the carcinogen to their progeny leads to significant morphological changes in the adrenal glands in the offspring. This is reflected in a decrease in the area of the adrenal medulla, a slight increase in the width of the cortex, the disorganization of the secretion of biogenic amines, increasing the number of synaptophysin-positive and neuron-positive cells.

Conclusions: Installed changes in the bioamins containing and neuroendocrine cells of the adrenal glands in the offspring of splenectomized and intact rats on the background of offspring carcinogen administration indicates the involvement of these cells in the body’s response to carcinogenesis. Research has shown that, given the innate immune changes are more pronounced.

Key words: biogenic amines, adrenal gland, experimental carcinogenesis, splenectomy, immunodeficiencies.

Актуальность

В настоящее время отмечается постоянный рост иммунодефицитов как приобретенного, так и врожденного характера. Иммунодефицитные состояния сопровождаются развитием инфекционных и неинфекционных осложнений, которые могут привести к инвалидизации и даже к летальному исходу. Вопрос тем более актуален, что пациенты с вторичным иммунодефицитом желают вести обычный образ жизни и иметь здоровых детей.

На сегодняшний день вопрос о возможности развития нарушений в структурах надпочечников у потомства при развитии иммунодефицитного состояния матери недостаточно изучен, что, вероятно, связано с ограничением исследований беременных женщин и новорожденных со стороны этического комитета. В этой связи нами предпринята попытка изучения особенностей морфофункционального состояния надпочечников потомства крыс с врожденным иммунодефицитом в условиях роста злокачественной опухоли.

Цель исследования – выявить особенности в структурах надпочечников у потомства крыс, развитие которого происходило в условиях врожденного иммунодефицита и на фоне роста аденокарциномы толстой кишки.

Материал и методы

В качестве модели иммунодефицита было выбрано экспериментальное удаление селезенки половозрелым самкам, к которым через месяц после операции подсаживали самцов. Формирование иммунодефицита после спленэктомии верифицировали с помощью морфологических, иммуногистохимических и общегистологических методов исследования, что описано в наших предыдущих работах [3].

Эксперименты проведены на 80 белых нелинейных крысятах-самцах в возрасте 3 и 6 месяцев. Животные были разделены на 4 группы: 1 – потомство интактных крыс (n=20); 2 – потомство интактных крыс, которым через месяц после рождения интраперитонеально вводили канцероген (1,2-диметилгидразин) из расчета 10 мг/кг 1 раз в неделю в течение 4-х недель (n=20); 3 – потомство спленэктомированных самок (n=20); 4 – потомство спленэктомированных самок, которым вводили канцероген по такой же схеме (n=20). Животных содержали в стандартных условиях, рекомендуемых для грызунов [4]. Выведение крыс из эксперимента производили через 1 и 4 месяца (возраст крысят при этом 3 и 6 месяцев) после окончания курса введения канцерогена. Объект исследования – надпочечники.

В исследовании использовались:

1. Окраска гематоксилином и эозином с последующей морфометрией коркового и мозгового вещества надпочечников.

2. Иммуногистохимический метод с использованием моноклональных антител (МКАТ) фирмы Santa Cruse (США) к маркерам нейроэндокринных клеток [7]: 1) МКАТ к синаптофизину; 2) МКАТ к нейронспецифической енолазе (NSE).

Материал для исследования фиксировали 10% нейтральным формалином в течение 24 ч, заливали в парафин, готовили срезы толщиной 4 мкм, которые наносили на высокоадгезивные стекла и высушивали при температуре 37 С⁰ в течение 18 ч. Восстановление антигенной активности осуществлялось в цитратном буфере рН 6,0 в автоклаве при температуре 96С⁰ в течение 20 мин с последующим остыванием в течение 90 мин. Для выявления иммуногистохимических реакций в работе применялась система визуализации LSAB-2. В качестве внутреннего контроля реакции служила неиммунизированная кроличья сыворотка. Результаты реакции оценивали с применением микроскопа МИКРОМЕД 3 ЛЮМ путем подсчета позитивно окрашенных клеток на 100 клеток в 10 полях зрения, выражая результаты в процентах и единицах в поле зрения.

3. Люминесцентно-гистохимический метод Фалька-Хилларпа в модификации Е.М. Крохиной – для избирательного выявления серотонина и катехоламинов.

4. Люминесцентно-гистохимический метод Кросса, Эвена, Роста – для идентификации гистаминсодержащих структур надпочечников.

5. Метод цитоспектрофлуориметрии – для количественной оценки уровней серотонина (СТ), катехоламинов (КА) и гистамина (ГСТ) в структурах надпочечников. Измерения производили с помощью насадки ФМЭЛ-1А, установленной на люминесцентный микроскоп ЛЮМАМ-4 при выходном напряжении 600 В.

6. Для характеристики суммарно-направленного действия биогенных аминов вычислялось соотношение (СТ+ГСТ)/КА, свидетельствующее о функциональном состоянии клеток надпочечников.

7. Морфометрический метод с использованием программы Микро-Анализ для измерения толщины коркового и площади мозгового вещества надпочечников.

8. Для оценки способности крыс к воспроизводству потомства рассчитывали в процентах индекс плодовитости (ИП) по соотношению числа оплодотворенных самок к числу самок, подсаженных к самцам, и индекс беременности (ИБ) по соотношению числа родивших самок к числу беременных. Всех беременных самок оставляли до естественных родов и вели наблюдение за выживаемостью и физическим развитием потомства. При этом фиксировали количество крысят в помете, сроки покрытия шерстью, «отлипания» ушной раковины, открытия глаз.

9. При анализе числовых данных применена описательная статистика: подсчитаны средние значения выборок и стандартное отклонение ($M \pm SD$). Определение значимости межгрупповых различий проводили с использованием критерия Стьюдента. Различия определяли при уровне доверительной вероятности 90%. Статистическая обработка результатов проводилась с применением лицензионной компьютерной программы Statistica 8.

Результаты и обсуждение

При анализе показателей выявлены различия в индексах плодовитости и беременности между контрольной и опытными группами. Отмечено, что способность к зачатию и вынашиванию у спленэктомированных крыс понижена: лишь 63% смогли забеременеть и родить. У самок с удаленной селезенкой рождалось по 5-7 крысят, при этом жизнеспособными из них были лишь 57%, в то время как здоровая самка приносит в помете 10-12 крысят.

При обработке росто-весовых показателей выявлено, что трехмесячные крысята, родившиеся от спленэктомированных самок, отстают от своих сверстников: наблюдалось достоверное снижение массы тела и роста в 1,5 раза (таблица 1).

Некоторые животные выглядели истощенными. Однако, к 6 месяцам эти показатели практически равны таковым у потомства интактных крыс. Введение канцерогена сопровождается ростом массы надпочечников у 3-х месячных крысят, в 6 месяцев отмечается снижение массы надпочечников только у потомства спленэктомированных самок в 1,2 раза (таб. 1).

Таблица 1

Изменение массы крысят и массы надпочечников

Условия эксперимента	Интактные крысята		Потомство крысят от с/э самки		Потомство крысят от интактной самки + введение канцерогена		Потомство крысят от с/э самки + введение канцерогена	
	3 месяца	6 месяцев	3 месяца	6 месяцев	3 месяца	6 месяцев	3 месяца	6 месяцев
Масса крысы, г	175,25	295,75	116,5*	293,25	156,25	212	181	272,75
Масса надпочечников, мг	14,8±0,9	16,9±0,7	13,5±1,3	17,1±0,7	17,1±0,6	17,1±0,7	16,3±0,8	15,6±0,5**

*- $p \leq 0,01$ по сравнению с интактными крысами;

** - $p \leq 0,01$ по сравнению с потомством интактных крыс с введением канцерогена.

Проведенная морфометрия показала, что площадь мозгового вещества у трехмесячных крысят, родившихся от спленэктомированной самки, достоверно снижается в 1,3 раза, а при введении канцерогена – в 1,5 раза. Площадь коркового вещества, наоборот, незначительно увеличивается на 13% и 18% соответственно.

При окраске препаратов люминесцентно-гистохимическим методом Фалька и Кросса, Эвена, Роста у животных всех групп хорошо различаются корковое и мозговое вещество надпочечника, люминесцирующие ярко-зеленым свечением (рис. 1).

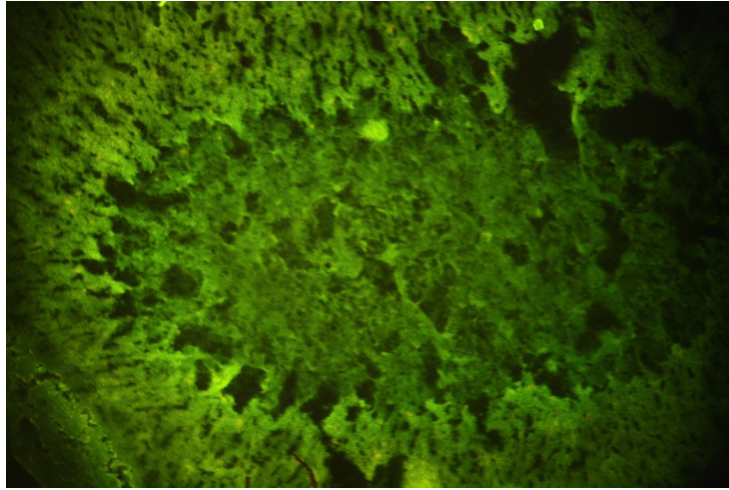


Рис. 1. Надпочечники. Потомство спленэктомированных крыс, возраст 3 месяца: 1 – мозговое вещество; 2 – корковое вещество. Люминесцентно-гистохимический метод Кросса, Эвена, Роста. Микроскоп МИКРОМЕД 3 ЛЮМ. Увеличение 10х.

В надпочечниках животных всех групп свечение СТ, ГСТ и КА выявляется в капсуле, корковом и мозговом веществе, а также в люминесцирующих гранулярных клетках (ЛГК) и их микроокружении. Цитоспектрофлуориметрия показала, что у интактных животных преобладает серотонин, а уровни гистамина и катехоламинов в корковом и мозговом веществе приближаются друг к другу. ЛГК расположены преимущественно на границе коркового и мозгового вещества, среди них преобладают крупные клетки с хорошо различимыми отдельными гранулами. Их количество в поле зрения составляет в среднем $2,89 \pm 0,26$.

У 3-х месячного потомства интактных крыс на фоне введения канцерогена отмечается лишь возрастание уровня гистамина в корковом и мозговом веществе надпочечников на 30 и 15% соответственно. В возрасте 6 месяцев наблюдается крайне низкий уровень всех биогенных аминов во всех исследуемых структурах надпочечников. При этом в сетчатой зоне коркового вещества выявляется множество мелких ЛГК кирпично-желтого свечения.

У потомства спленэктомированных самок на фоне введения канцерогена в возрасте 3 месяцев выявляется увеличение уровня гистамина только в корковом веществе, но в 6-ти месячном возрасте резко снижается уровень СТ и КА, при этом отмечен высокий уровень ГСТ в капсуле, мозговом веществе, ЛГК и их микроокружении. Количество ЛГК достоверно увеличивается в 1,5 раза по сравнению с крысятами, которым канцероген не вводили.

Иммуногистохимическое окрашивание препаратов надпочечников крысят антителами к синаптофизину и нейронспецифической енолазе позволило зарегистрировать клетки нейроэндокринного происхождения (рис. 2).

Наблюдалось достоверное увеличение количества нейроэндокринных клеток у потомства спленэктомированных самок, по сравнению с интактной группой животных соответствующего возраста. Особенно было повышено количество NSE-позитивных клеток в корковом веществе надпочечников шестимесячных крыс ($30,5 \pm 1,2\%$ против $10,3 \pm 2,2\%$ в контрольной группе) (рис. 3).

Таким образом, нами установлено, что вторичный иммунодефицит самок снижает способность к зачатию и уменьшает количество рождающихся крысят. При этом масса тела и масса надпочечников у 3-месячного потомства достоверно снижена, к 6-ти месяцам приближается к таковой у интактного потомства. Площадь мозгового вещества снижается в 1,3 раза, а площадь коркового вещества увеличивается на 13%.

Введение канцерогена крысятам, особенно на фоне врожденного иммунодефицита, приводит к дезорганизации секреции биоаминов: отмечается рост уровня гистамина на фоне крайне низких значений серотонина и катехоламинов. Можно предположить отсутствие на этом фоне достаточной секреции кортизола для поддержания планомерного течения синдрома адаптации. Поэтому выявленные изменения уровня биогенных аминов надпочечников показывают, что наблюдается нарушение течения адаптационного синдрома [5].

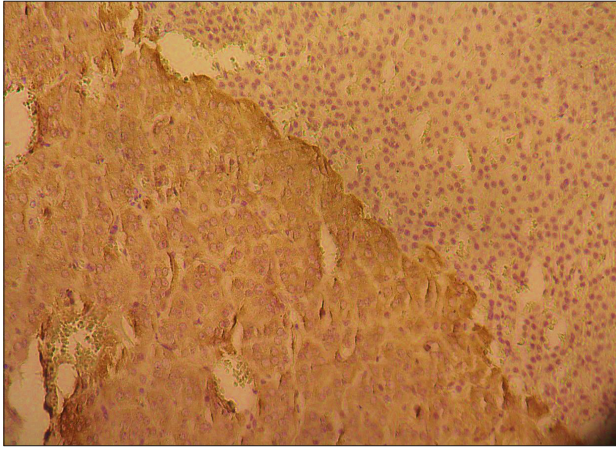


Рис. 2. Надпочечники. Интактные крысы, возраст 3 месяца. Синаптофизин-положительные клетки в мозговом веществе надпочечников. Иммуногистохимическая реакция. Микроскоп МИКРОМЕД 3 ЛЮМ. Увеличение 40х.

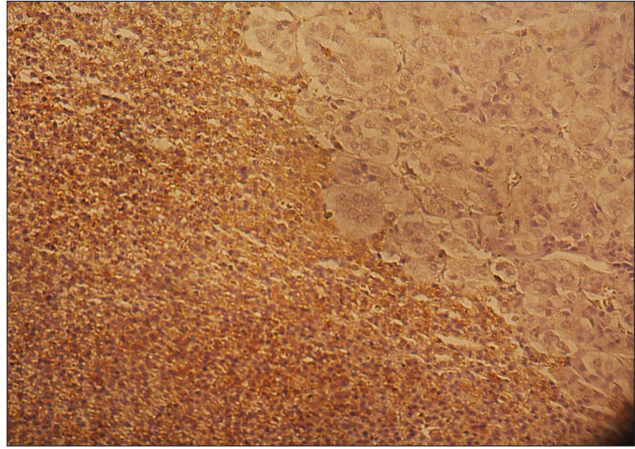


Рис. 3. Надпочечники. Потомство спленэктомированных крыс, возраст 6 месяцев. Увеличение числа NSE-положительных клеток в корковом веществе надпочечников. Иммуногистохимическая реакция. Микроскоп МИКРОМЕД 3 ЛЮМ. Увеличение 40х.

Также у опытной группы животных нами выявлено повышение количества синаптофизин-положительных и нейронспецифически-положительных клеток, которые причисляются к клеткам АПУД-серии.

По-нашему мнению, основной причиной таких изменений является дисфункция в системе надпочечники-гипофиз-тимус.

Согласно данным литературы, тимус участвует в регуляции гормонального равновесия, действуя параллельно с гипофизарно-надпочечниковым комплексом на иммуногенез и лимфопоэз [1].

В свою очередь, функциональное состояние надпочечников зависит от активности тимуса. В наших последних работах показано развитие акцидентальной инволюции тимуса у потомства крыс с врожденным иммунодефицитом на фоне введения канцерогена, что, несомненно, отражается на состоянии надпочечников [2].

Как показало настоящее исследование, в этом процессе принимают участие клетки АПУД-серии, выступая посредниками взаимодействия между иммунной и эндокринными системами путем секреции различных иммунорегуляторных веществ, в том числе и биогенных аминов [6].

Литература

1. Григорьева В.Н. Структурно-функциональные взаимосвязи иммунной и эндокринной систем у детей раннего возраста: Автореф. дис. ... канд. мед. наук / В.Н. Григорьева // Москва, 2007.
2. Драндрова Е.Г. Иммуногистохимические исследования клеточного состава тимуса при канцерогенезе в условиях врожденного иммунодефицита / Е.Г. Драндрова, Г.Ю. Стручко, Л.М. Меркулова, О.Ю. Кострова и др. // Электронный журнал «Современные проблемы науки и образования».- 2015.- №3.- URL: <http://www.science-education.ru/123-19825>.
3. Меркулова Л.М. Возможные исходы развития инволюции тимуса в разных экспериментальных моделях / Л.М. Меркулова и др.// Научно-теоретический Медицинский журнал «Морфология». – 2014.- Т. 145. №3. С. 189.
4. Рыбалкин С.П. Экспериментальная оценка влияния препарата Кагоцел на генеративную функцию животных / С.П. Рыбалкин, Е.В. Ковалева, Т.А. Гуськова, Т.Б. Савинова // Токсикологический вестник – 2013. – № 2(119).- С.33- 38.
5. Стоменская И.С. Биогенные амины надпочечников при введении канцерогена на фоне постспленэктомического иммунодефицита / И.С. Стоменская и др. // Астраханский медицинский журнал. 2013. Т. 8. № 1. С. 253-256.
6. Улитко М.В. Роль моноцитов-макрофагов в адаптивных реакциях кроветворной ткани при действии на организм экстремальных факторов / М.В. Улитко // Дис... канд. биол. наук: 03.00.13. – Екатеринбург. – 2008. – 183 с.
7. Dabbs D.J. Diagnostics immunohistochemistry / D. J. Dabbs // Edinburg: Churchill Livingstone. – 2002. – 673 p.