

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ
ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ
«ЧУВАШСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ
ИМЕНИ И.Н. УЛЬЯНОВА»
МИНИСТЕРСТВА НАУКИ И ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ
РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

На правах рукописи

Котёлкина Анастасия Андреевна

**Цитоархитектоника тимуса при экспериментальном канцерогенезе
в условиях стресса**

03.03.04 – Клеточная биология, цитология, гистология
(медицинские науки)

Диссертация
на соискание ученой степени
кандидата медицинских наук

Научный руководитель:
доктор медицинских наук, профессор
Меркулова Л.М.

Москва - 2020

ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ.....	4
Глава 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ	13
1.1. Современные представления о морфологии тимуса и его роли в функционировании иммунной системы	13
1.2. Современный взгляд на возрастную и акцидентальную инволюцию тимуса	28
1.3. Современные данные о влиянии канцерогена N-метил-N- нитрозомочевины	34
1.4. Стресс и его влияние на организм в целом и на морфологию тимуса ...	37
1.5 Современные данные о состоянии иммунной системы при развитии рака молочной железы. Стресс, как пусковой механизм и его роль в изменении течения и развития опухоли.....	42
Глава 2. МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ	46
Глава 3. РЕЗУЛЬТАТЫ СОБСТВЕННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ	52
3.1. Морфологическое состояние молочной железы после введения канцерогена N-метил-N-нитрозомочевины.....	52
3.2. Морфофункциональная характеристика тимуса после введения канцерогена N-метил-N-нитрозомочевины:	
3.2.1 через 1 месяц после введения канцерогена	55
3.2.2 через 2 месяца после введения канцерогена	66
3.2.3 через 3 месяца после введения канцерогена	74

3.3 Морфофункциональное состояние тимуса после воздействия водно-иммобилизационного стресса:

3.3.1 через 1 месяц после воздействия	81
3.3.2 через 2 месяца после воздействия	85
3.3.3 через 3 месяца после воздействия	92

3.4 Морфофункциональная характеристика тимуса крыс после сочетанного воздействия введения канцерогена N-метил –Nнитрозомочевины и водно-иммобилизационного стресса:

3.4.1 через 1 месяц после сочетанного воздействия	100
3.4.2 через 2 месяца после сочетанного воздействия	107
3.4.3 через 3 месяца после сочетанного воздействия	115

Глава 4. ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ И ЗАКЛЮЧЕНИЕ.....	124
ВЫВОДЫ	144
ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКМЕНДАЦИИ	146
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ.....	147
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....	148

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность темы исследования

Рост злокачественных новообразований в нашей стране и в мире является не только ведущей проблемой в медицине, но и вопросом государственного масштаба. В 2016 году в Российской Федерации выявлено 599 348 случаев злокачественных опухолей, при этом 325 763 случая приходится на долю женского населения. Прирост данного показателя с 2015 года составил 1,7%. [1]. На сегодняшний день в России ежегодный прирост больных раком различной локализации составляет 600 000 человек, почти половине заболевших грозит летальный исход [2, 3]. Заболеваемость раком молочной железы при этом составляет 46 пациенток на 100 000 населения и занимает первое место по заболеваемости и смертности у женщин в мире и в Российской Федерации [3, 4].

Среди всех онкологических заболеваний основной объем составляют женщины, больные раком молочной железы - 18,3%. По данным литературы, 90% впервые диагностированного рака приходится на эпителиальные формы, из них первое место занимает рак молочной железы [1, 5, 6].

Большое число исследований показало, что все факторы риска развития рака молочной железы можно разделить на экзогенные и эндогенные. Так, среди экзогенных факторов риска выделяют ионизирующее излучение, вредные привычки - курение и употребление алкоголя в больших дозах, нарушение питания, избыточный вес, гормональный дисбаланс (употребление оральных контрацептивов, заместительная гормональная терапия в постменопаузальном периоде), стресс. К эндогенным факторам относят эндогенный гормональный дисбаланс (гиперэстрогемия), генетические мутации, функциональные особенности и заболевания репродуктивной системы организма [7, 8, 9].

Многочисленные исследования выявили негативное воздействие на здоровье человека стресса, однако четко определить механизмы его влияния на организм до сих пор не удается [10]. Научные труды разных школ

подтверждают огромное влияние стресса на иммунитет, что характеризуется подавлением иммунной системы при подобном воздействии [11]. Достаточно много экспериментальных работ направлены на изучение влияния стресса различной степени длительности и характера на иммунитет, также есть данные, что иммунные реакции зависят от типа стрессового воздействия. Однако до сих пор остается не выясненным, каким образом это ведет к развитию соматических заболеваний и увеличению смертности [12].

Особенности образа жизни, факторы окружающей среды, нарушение психоэмоционального состояния – всё это может послужить развитию хронического стресса. Известно, что хронический стресс приводит к истощению психо – нейро – эндокринно - иммунной оси [13]. Среди трех известных ранее химического, физического и биологического видов канцерогенеза на первое место выходит новый вид - психогенный канцерогенез [14]. Запускается механизм этого вида канцерогенеза в условиях хронического психоэмоционального стресса, сопровождающегося состоянием постоянной тревоги, депрессией, а также состояниями беспомощности и безысходности в жизненных ситуациях [15].

Иммунная и нейроэндокринная системы играют ведущую роль в реализации канцерогенного эффекта [16]. На функцию центральных органов иммунитета оказывает влияние экспрессия из мозгового слоя надпочечников в кровь адреналина, а также синтез клетками иммунной системы биогенных аминов [17]. Последние, а именно катехоламины, воздействуют на пролиферацию и дифференцировку иммунокомпетентных клеток посредством специфических рецепторов [18]. Все чаще на ранних стадиях заболевания у онкологических больных в периферической крови обнаруживается высокий уровень андрогенов, кортизола, прогестерона и эстрогенов [201, 202].

Исход развития опухоли напрямую зависит от состояния иммунной системы. Определение иммунного статуса помогает точно оценить состояние

организма онкологического больного и прогнозировать тактику ведения пациента [19].

Тимус является центральным органом, регулирующим процессы иммунитета, однако до сих пор остается одним из загадочных и до конца не изученных органов. Регуляторные функции тимуса и иммунной системы в целом стоят на одной ступени с нервной и эндокринной системами. Из многочисленных исследований стало известно, что регуляторные пептиды и биогенные амины вырабатываются нейронами и клетками глиии головного мозга, а также источниками этих веществ могут являться и иммунокомпетентные клетки [20]. Уникальность тимуса заключается в том, что его структуры – тимические лимфоциты и эпителиальные клетки, непосредственно участвуют в обеспечении нейроэндокринных процессов [21].

Г. Селье было установлено, что тимус принимает непосредственное участие в адаптационном синдроме, и уже в его первую фазу – фазу тревоги, возникают первые процессы акцидентальной инволюции. В ходе исследований было установлено, что акцидентальная инволюция является закономерным процессом, возникающим на фоне стресса, случайной может быть только причина, вызвавшая стресс [20].

Существуют экспериментальные работы, которые изучали центральные органы иммунитета при канцерогенезе в условиях нормального функционирования иммунной системы [22] и канцерогенезе в сочетании с исходной вторичной недостаточностью иммунитета [23], а также канцерогенеза на фоне врожденного иммунодефицита [24].

Известны работы, в которых изучались взаимодействие психоэмоциональных стрессовых факторов на рецидив развития рака молочной железы и динамику смертности [12]. Но мы не встречали данных об экспериментальном изучении взаимодействия иммунной системы и процесса канцерогенеза на фоне стрессового воздействия.

Цель исследования: Изучить морфофункциональное состояние тимуса крыс при экспериментальном канцерогенезе молочной железы, после воздействия водно-иммобилизационного стресса и сочетанного влияния этих факторов.

В соответствии с целью были поставлены следующие **задачи**:

1. Измерить массу тимуса, толщину коркового и площадь мозгового вещества через 1, 2, 3 месяца после прекращения изолированного введения канцерогена и изолированного воздействия водно-иммобилизационного стресса.
2. Измерить массу, толщину коркового и площадь мозгового вещества тимуса через 1, 2 и 3 месяца после окончания сочетанного введения канцерогена и воздействия водно-иммобилизационного стресса.
3. Провести иммуногистохимический анализ и дать характеристику количественного распределения дендритных клеток, CD3⁺, CD68⁺, Bcl-2⁺, Pancytokeratin⁺ клеток тимуса у крыс через 1, 2, 3 месяца во всех экспериментальных моделях.
4. Изучить люминесцирующие структуры тимуса, определить в них уровень биогенных аминов (серотонина, гистамина, катехоламинов) и вычислить соотношение (серотонин + гистамин)/ катехоламины через 1, 2, 3 месяца после прекращения введения канцерогена, воздействия водно-иммобилизационного стресса и сочетанного воздействия канцерогена и водно-иммобилизационного стресса.
5. Исследовать популяцию тучных клеток тимуса у крыс после введения канцерогена N-метил-N-нитрозомочевина, воздействия водно-иммобилизационного стресса и сочетанного влияния этих факторов.
6. Сделать анализ и сравнить полученные результаты эксперимента для выявления особенностей развивающихся изменений в тимусе в изучаемых экспериментальных группах.

Научная новизна работы

1. Впервые в динамике зарегистрированы морфологические изменения в структуре тимуса при введении N-метил-N-нитрозомочевины, индуцирующей рак молочной железы, и сочетанном воздействии канцерогена и водно-иммобилизационного стресса. Это сопровождается уменьшением массы тимуса, изменением формы тимических долек, заполнением междольковых промежутков жировой тканью, что развивается раньше при сочетанном воздействии факторов.
2. Все воздействия в изученных моделях вызывают разнонаправленные изменения числа S-100⁺ клеток, CD3⁺, CD68⁺, Bcl-2⁺, Pan-cytokeratin⁺ клеток.
3. Показано волнообразное изменение уровня гистамина. При изолированном введении канцерогена его увеличение происходит через 1 и 3 месяца, снижение - через 2 месяца. При сочетанном воздействии двух факторов, напротив, уровень гистамина через 1 и 3 месяца незначительно снижается, через 2 месяца – возрастает. Уровень серотонина и катехоламинов остается сниженным на всех сроках исследования.
4. Впервые при этих воздействиях определено соотношение (серотонин + гистамин)/ катехоламины, позволяющее косвенно судить о функциональной активности клеток. Показано, что оно изменяется также волнообразно. Через 1 и 3 месяца после изолированного введения канцерогена наблюдается увеличение этого показателя. При сочетанном воздействии двух факторов наблюдается увеличение этого показателя в Т-клетках коркового вещества, в остальных структурах его значение изменяется неоднозначно.
5. Установлено, что и введение N-метил-N-нитрозомочевины, и сочетанное воздействие двух факторов вызывает рост числа тучных клеток за счет дегранулированных и полностью опустошенных форм на всех сроках исследования. Стресс приводит к снижению общего количества тучных клеток, при этом большую часть составляют дегранулированные формы.

Научно-теоретическая значимость работы

Результаты диссертационной работы дополняют представление о цитоархитектонике тимуса на разных стадиях онкогенеза, воздействия стресса и сочетанного влияния этих факторов на иммунный ответ организма, предоставляют данные о возможных вариантах взаимодействия тимуса и развивающегося злокачественного образования на фоне влияния хронического стресса. Полученные материалы исследования имеют фундаментальное значение и представляют большое значение для специалистов гистологов, онкологов и патофизиологов.

Практическая значимость

Работа имеет экспериментально-теоретическую направленность, однако, благодаря проведенным исследованиям расширены знания о механизмах развития инволюции тимуса при экспериментальном канцерогенезе молочной железы на фоне стрессового воздействия. Данные результаты могут быть полезны для врачей целого ряда специальностей. Полученные данные применяются в образовательном процессе при чтении курса лекций, проведении семинаров и практических занятий на кафедре общей и клинической морфологии и судебной медицины, кафедре общей хирургии и онкологии федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Чувашский государственный университет имени И.Н. Ульянова». Итоги исследования изложены в статьях и тезисах печатных изданий.

Основные положения, выносимые на защиту:

1. Введение канцерогена приводит к снижению массы тимуса, замещению жировой тканью ее паренхимы, особенно проявляющееся через 3 месяца после окончания воздействия. Отмечается количественное изменение тучных и дендритных клеток, Т-лимфоцитов и макрофагов, волнообразное изменение уровня гистамина и стабильное снижение серотонина и катехоламинов,

волнообразное изменение функциональной активности клеточных элементов. Это может быть расценено как развитие признаков 2 фазы акцидентальной инволюции тимуса.

2. Сочетанное воздействие канцерогена и водно-иммобилизационного стресса вызывает более раннюю и выраженную дезорганизацию морфофункционального состояния тимуса, которая сопровождается уменьшением в динамике площади мозгового и толщины коркового вещества, снижением CD3⁺, S-100⁺ и Pan-cytokeratin⁺ клеток, выраженным уменьшением функциональной активности клеток (в 2 раза) по сравнению с изолированным введением канцерогена, с характерным началом развития атрофии и склероза органа уже через 1 месяц, прогрессирующее по мере увеличения срока наблюдения. Все это может свидетельствовать о развитии признаков 4 фазы акцидентальной инволюции тимуса.

Апробация работы

Результаты научной работы были презентованы на Всероссийской научно-практической конференции с международным участием, посвященной 100-летию со дня рождения доцента Бриллиантовой Анны Николаевны (Чебоксары, 2015); Международной научной конференции «Современные проблемы медицины и естественных наук» (Йошкар-Ола, 2016); Межрегиональной научно-практической конференции, посвященной памяти зав. кафедрой госпитальной терапии №1 д.м.н., профессора Саперова В.Н. «Спешите делать добро» (Чебоксары, 2016); 89-й Международной научно-практической конференции студентов и молодых ученых «Теоретические и практические аспекты современной медицины» (Симферополь, 2017); Международной научной конференции, посвященной 80-летию со дня рождения профессора Асфандиярова Растяма Измайловича «Структурные преобразования органов и тканей в норме и при воздействии антропогенных факторов» (Астрахань, 2017); Всероссийской научно-практической конференции с международным участием, посвященной 95-летию со дня

рождения доктора медицинских наук, профессора Дины Семеновны Гордон «Морфология в теории и практике» (Чебоксары, 2017); Всероссийской научной конференции «Гистогенез, реактивность и регенерация тканей», посвященной 150-летию кафедры гистологии с курсом эмбриологии Военно-медицинской академии имени С.М. Кирова (Санкт-Петербург, 2018); Международной научно-практической конференции «Единство науки, образования и практики - медицине будущего» (Москва, 2018); научно-практической конференции с международным участием «Общегистологические аспекты современной медицины», посвященной 100-летию ВГМУ им. Н.Н. Бурденко и преподавания гистологии (Воронеж, 2018); Всероссийской научно-практической конференции с международным участием «Морфологические науки и клиническая медицина», посвященной 100-летию со дня рождения заслуженного деятеля науки РСФСР и ЧАССР, доктора медицинских наук, профессора Амосовой В.В. (Чебоксары, 2019).

Личный вклад автора

Данная научная работа представляет личный труд Котёлкиной Анастасии Андреевны. Автору принадлежит роль в моделировании и проведении эксперимента. Определение этапов, методов диссертационного исследования и выполнение работы проводились лично автором. Были определены цель и задачи диссертационной работы. Автор провел постановку серий экспериментов, забор исследуемого материала, изготовление гистологических препаратов, статистическая обработка и анализ данных собственных результатов. При написании главы по обзору литературы автором проведены сбор и анализ результатов исследований в работах отечественных и зарубежных авторов. Данные диссертационного исследования опубликованы в личных печатных работах и в соавторстве. Все микрофотографии, рисунки и графики, представленные в диссертационном исследовании выполнены автором.

Публикации

По результатам диссертационной работы опубликованы 11 научных статей, из них 2 - в ведущих рецензируемых российских научных журналах из перечня ВАК, рекомендованных для публикаций основных результатов диссертаций на соискание учёных степеней.

Соответствие диссертации паспорту научной специальности

Представленные в работе основные положения по теме диссертации соответствуют паспорту специальности 03.03.04 – Клеточная биология, цитология, гистология (медицинские науки), согласно пункту 5 области исследования (исследование адаптации тканевых элементов к действию различных биологических, физических, химических и других факторов).

Структура и объем диссертации

Научно-экспериментальная работа включает введение и 6 глав: обзор литературы, материал и методы исследования, результаты собственных исследований, обсуждение результатов и заключение, выводы, список литературы. Диссертация представлена на 180 страницах машинописного текста, содержит 76 рисунков, из них 40 микрофотографий и 8 таблиц. Список литературы состоит из 294 литературных источников, в том числе 94 зарубежных.

ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1 Современные представления о морфологии тимуса и его роли в функционировании иммунной системы

Тимус или вилочковая железа является железой внутренней секреции, центральным органом иммуногенеза и лимфопоэза, в нем происходят пролиферация предшественников Т-лимфоцитов из костного мозга, отбор антигенспецифичных Т-клеток и селективная миграция на периферию зрелых Т-лимфоцитов [25, 26]. Следует отметить, что с XX века тимусу отводится ведущая роль в регуляции иммунного ответа [27, 203]. Тимус, как железа, выполняет аутокринную и паракринную функции, а также оказывает системное влияние на организм за счет вырабатываемых в эпителиальных клетках железы ряда гормонов [25, 204, 205].

Тимус – это непарный орган, состоящий из двух долей, они могут тесно соприкасаться друг с другом [28, 29, 30], либо частично соединены между собой рыхлой соединительной тканью [31, 206]. Доли вилочковой железы имеют удлиненную форму, суживающуюся кверху, с более широким основанием. В тимусе есть правая и левая доли, при этом левая примерно в 2/3 случаев длиннее [26, 32]. В некоторых случаях в железе выделяют третью, промежуточную, долю [33]. У тимуса различают переднюю выпуклую поверхность, которая прилежит к грудины и заднюю вогнутую. Располагается тимус позади грудины в передней части верхнего средостения, между правой и левой медиастинальными плеврами, занимая область верхнего межплеврального поля [26, 31, 34]. Кзади от тимуса лежат трахея, верхняя часть перикарда и крупные сосуды, левая плечеголовная вена и верхняя полая вена, основание тимуса обращено к сердцу с покрывающим его перикардом [30, 207]. Особенность тимуса заключается в том, что к моменту рождения железа уже полностью сформирована и активно функционирует с первых дней жизни. Тимус новорожденных является самым крупным лимфоидным органом, который начинает активно продуцировать лимфоциты. Абсолютная масса железы активно растет до периода полового созревания,

после начинается возрастная инволюция [35]. По данным многих исследователей, масса тимуса новорожденных колеблется в пределах от 5 до 25 г., к периоду полового созревания этот показатель составляет 30 – 40 г [30, 35, 208].

Железа покрыта соединительнотканной капсулой, от которой в паренхиму отходят междольковые перегородки. Снаружи капсула покрыта жировой и рыхлой волокнистой соединительной тканью, благодаря которой вилочковая железа фиксируется к лежащим рядом органам верхнего средостения [30, 36]. Паренхима тимуса представлена лимфоэпителиальной тканью, в основе которой лежат клетки эпителиоретикулоциты. Каждая доля, благодаря соединительнотканным перегородкам, делится на дольки, состоящие из мозгового и окружающего его коркового вещества [37, 209]. Дольки образованы трехмерной сетью эпителиоретикулоцитов, в петлях которых локализуются тимоциты.

Корковое вещество долек расположено по периферии от мозгового вещества и имеет темный цвет, т.к. здесь локализуется до 90% числа всех тимоцитов. Субкапсулярная зона коркового вещества заполнена лимфобластами – предшественниками Т - лимфоцитов [24, 38, 39, 40]. Внутритимусная дифференцировка клеток до зрелых Т -лимфоцитов зависит от экспрессии фенотипических Т – клеточных маркеров: CD4 (Т - хелперы), CD8 (Т - киллеры), альфа-бета ТКР (Т – клеточный антигенраспознающий рецептор). Пре – Т – клетки, мигрирующие из красного костного мозга в субкапсулярную зону, несут набор поверхностных молекул, но лишены CD4 и CD8 - главных маркеров дифференцировки. По мере созревания тимоциты из субкапсулярной зоны продвигаются в толщу коркового вещества, данные тимоциты имеют фенотип CD4⁺-CD8⁺-бетаТКР⁺. В кортикомедуллярной зоне происходят процессы положительной и отрицательной селекции тимоцитов, по мере продвижения к медуллярной зоне [37]. По данным некоторых авторов, Т- лимфоциты коркового вещества попадают в кровоток и заселяют периферические иммунные органы, минуя

мозговое вещество [39], по данным других источников, зрелые Т-лимфоциты из кортикомедуллярной зоны оказываются в мозговом веществе долики [37, 40].

Мозговое вещество на срезе гистологических препаратов имеет светлую, по сравнению с корковым веществом, окраску. Это связано с содержанием меньшего количества зрелых Т-клеток в медуллярной зоне. Среди Т-лимфоцитов мозгового вещества выделяют дозревающие Т-лимфоциты, мигрирующие из коркового вещества, и рециркулирующие Т-лимфоциты. Последние поступают в мозговое вещество из кровяного русла, составляя большую часть тимоцитов мозгового вещества [41]. Вещество медуллярной зоны также представлено сетью эпителиальных клеток, интердигитирующими дендритными клетками, макрофагами и В-лимфоцитами [42]. В процессе развития тимуса площадь мозгового вещества увеличивается и начинает преобладать над площадью коркового вещества [43].

В строме коркового вещества тимуса выделяют следующие ретикулоэпителиальные клетки: 1) секреторные (звездчатые) клетки, которые продуцируют тимулин, альфа - тимозин, тимопоэтины; 2) «клетки-няньки», выполняющие трофическую функцию; 3) опорные клетки, участвующие в образовании гематотимического барьера. В мозговом веществе особая роль отводится слоистым эпителиальным клеткам – тельцам Гассалья [41]. Эти клетки представлены участками концентрического наложения ороговевающих эпителиальных клеток [44]. В норме тельца, пребывающие в стадии разрушения, встречаются менее 1% [45]. Мозговое вещество одной долики содержит от 3 до 12 телец Гассалья различной формы и размеров, которые находятся на разных этапах развития [46]. Роль тимусных телец вызывает неподдельный интерес среди исследователей. Имеются данные, что ими секретруется ряд важных хемокинов и лимфопоэтинов [47, 210, 211], к их числу относят и MDC (macrophage-derived chemokine), TSLP, Mig. Известно, что тельца Гассалья участвуют в уничтожении аутореактивных

тимоцитов, являясь единственным местом апоптоза в мозговом веществе. Этот процесс происходит за счет секреции MDC–хемоаттрактанта к CD4+CD30+ клеткам. Т-клетки, содержащие CD30, становятся чувствительны к этому хемокину и начинают мигрировать к тельцам Гассалья, которые, в свою очередь, продуцируют CD30L. При взаимодействии CD30L/CD30 запускается процесс апоптоза аутореактивных Т-лимфоцитов. Хемокин тимический стромальный лимфопоэтин (TLSP) влияет на созревание дендритных клеток, которые активно участвуют в образовании Т-регуляторов из не погибших при апоптозе ауто – средне - и высокореактивных тимоцитов. Таким образом, благодаря участию телец Гассалья, происходит вторичная положительная селекция тимоцитов [48]. Синтезируемый клетками телец хемокин Mig вызывает взаимодействие между тельцами Гассалья, которые вырабатывают IL-1, TGF и CD8 и NE- клетками, что приводит к активации данных субпопуляций тимоцитов [48, 212].

Наличие вилочковой железы характерно для всех позвоночных животных, она развивается из энтодермы [30, 213, 214]. Эпителиальная закладка железы у человека происходит на 4 неделе эмбрионального развития в виде тяжей из 3 и 4 пар глоточных карманов. Дистальная часть 3 пары утолщается, формируя тело тимуса. Проксимальная часть вытягивается и подобно выводному протоку экзокринной железы, который носит название тимофарингеального протока при дальнейшем развитии железы исчезает [22, 39]. На 5 неделе он начинает выделять ряд субстанций, которые участвуют в формировании Т-лимфоцитов, впервые появляющихся в печени [49]. Выделяют три стадии формирования тимуса в пренатальном периоде: с 4 по 7 неделю – стадия эпителиальной закладки; с 7 по 10 неделю - стадия лимфоэпителиальной закладки; 10-12 неделя - дифференцировка вещества органа на зоны [37, 50]. Рост органа на сроке 5-6-й недели обеспечивается за счет активного размножения локализованных по периферии эпителиальных клеток. До 6-й недели тимус имеет эпителиальное строение, а начиная с 7-8 недели, когда происходит прорастание мезенхимальных элементов

и кровеносных сосудов, появляются лимфоциты [51]. По данным других авторов, тимус имеет строение эпителиального органа до 8 недели своего эмбрионального развития [52]. Период с 7 по 12 неделю эмбриогенеза является критическим, так как в этот срок происходит закладка всех функциональных структур железы. С 8 недели эмбрионального развития в тимусе начинают образовываться Т-лимфоциты и с этого момента он становится органом формирования, пролиферации и дифференцировки этих клеток [49]. В дольках тимуса формируется корковое и мозговое вещество, тельца Гассалья, образуются зоны роста в центре долек и на их периферии, а также происходит дифференцировка и последующая миграция лимфоцитов к периферическим органам системы иммунитета [30, 52, 53, 215]. На 16 -17-й неделе эмбриогенеза становится заметно преобладание коркового вещества над мозговым [37]. Более темная окраска коркового вещества свидетельствует о высоком содержании здесь лимфоцитов. К 17-й неделе завершается формирование морфофункциональных зон тимуса: субкапсулярной, внутренней кортикальной зоны, мозгового вещества и внутридольковой периваскулярной зоны [52]. В субкапсулярной зоне тимуса локализуются предшественники Т-лимфоцитов, происходит их встреча с нелимфоидными клеточными структурами, пролиферация Т-клеток, а также первый этап их созревания. Во внутренней кортикальной зоне осуществляется следующий этап созревания Т-лимфоцитов, благодаря тесному контакту с локализуемым в этой зоне макрофагам и эпителиальным клеткам. Созревая, Т-клетки приобретают рецепторы. Здесь же осуществляется апоптоз до 95% клеток. Мозговая зона характеризуется наличием большого числа зрелых Т-лимфоцитов, которые покидают эту область и попадают в периферические органы иммунной системы. В медуллярной зоне окончательное созревание происходит под действием интерлейкинов и тимических гормонов, а их антигеннезависимое развитие осуществляется при взаимодействии тимоцитов с интердигитирующими и эпителиальными клетками.

Внутридольковые периваскулярные пространства пронизывают корковое и мозговое вещество тимуса. К основным функциям пространств относят участие в транспортировке Т-лимфоцитов и формирование гематотимического барьера на границе между корковым и мозговым веществом. В плодном периоде во внутридольковых периваскулярных пространствах активно идет процесс гемопоэза [53, 54, 55, 56]. К третьему месяцу эмбрионального развития происходит окончательное образование железы, когда становятся сформированы доли с корковым и мозговым веществом и тельца Гассала. Дальнейшее развитие железы связано с увеличением ее массы и объема [51].

К сроку 7,5-й недель в тимусе визуализируются кровеносные сосуды, через которые происходит миграция предшественников тимоцитов [52]. Лимфоциты – главные клетки иммунной системы. Около пяти процентов клеток, проходя через гематотимический барьер, из костного мозга поступают в корковое вещество, где получили название тимоциты. Для дифференцировки Т-лимфоцитов необходимо наличие тимического микроокружения и биологически активных веществ. Так, тимопоэтин – гуморальный тимический фактор, который принимает участие в ранней дифференцировке тимоцитов, снижает активность аутоаллергических процессов; тимулин участвует в заключительном этапе дифференцировки Т-клеток и образования CD8 лимфоцитов; альфа1-тимозин оказывает влияние на поздние этапы созревания Т-клеток, образование CD4 лимфоцитов, увеличивает синтез ИЛ-2; альфа2-тимозин характеризуется инсулиноподобным и кортиколибериноподобным свойствами; альфа7-тимозин в плазме крови способствует снижению уровня триглицеридов; бета4-тимозин участвует в дифференцировке тимоцитов на ранних сроках [56].

Первостепенная функция тимуса заключается в регуляции Т-клеточного иммуногенеза [57]. Свои функции тимус начинает выполнять на седьмой день после рождения. Поступающие из костного мозга

предшественники Т-клеток заполняют специальные ниши в тимусе. Исследования ученых показали, что в тимусе находится около 200 специальных ниш [35]. Т-лимфоциты происходят от полипотентной стволовой гемопоэтической клетки. В тимусе происходит активная антигеннезависимая дифференцировка Т-лимфоцитов. В результате дифференцировки на поверхности Т-лимфоцитов появляется специальный Т-клеточный рецептор (ТКР, ТсR), который наделяет Т-клетки способностью к распознаванию антигенов. На поверхности зрелых Т-лимфоцитов появляются молекулы антигенов: CD4+, CD8+, ТсR+, CD4-, CD8- и другие. В среднем, в тимусе около 95% всех лимфоцитов погибает путем прохождения селекции. Поддержание выборочной выживаемости является основой позитивной селекции. Выживают только те Т-лимфоциты, которые способны распознавать собственные тимические HLA стромальные клетки. Негативная селекция Т-лимфоцитов – запрограммированная гибель клеток (апоптоз), заключается в удалении аутореактивных Т-клеток [57]. Положительная селекция происходит в корковой зоне, а негативная – в мозговом веществе органа [58]. В ходе проходящей дифференцировки в мозговом веществе тимуса локализуются Т-хелперы и Т-киллеры [22, 37, 58, 59]. Созревшие Т-лимфоциты покидают тимус и эмигрируют в периферические иммунные органы, где осуществляют свою рециркуляцию, задерживаясь на время в Т-зонах периферических лимфоидных органов [58, 216].

К особым разновидностям лимфоцитов относятся NK – клетки («естественные киллеры»), которые отвечают за врожденный иммунитет. Повреждение или отсутствие МНС-I на поверхности клеток активируют работу этих клеток и приводит к выбросу ферментных белков и проапоптотических факторов. Цитотоксические белки - перфорины увеличивают образование пор в мембране патологической клетки, через которые проникают лизосомальные ферменты и проапоптотические факторы.

NK-клетки способны запускать запрограммированную гибель и напрямую, через взаимодействие с Fas – рецепторами [217].

В последние десятилетия вызвала интерес у исследователей особая фракция Т-лимфоцитов - RTE (resent thymic emigrant) – клетки. Речь идет о Т-лимфоцитах, недавно покинувших тимус и вышедших в периферическое русло. Покидая тимус на этой стадии, Т-клетки завершают свою антигеннезависимую дифференцировку [58].

К функциям тимуса относят продукцию Т-регуляторных лимфоцитов (T-reg). Образование субпопуляции Т-регуляторных лимфоцитов идет по принципам негативной и позитивной селекции [60]. Основная функция Т-регуляторной субпопуляции лимфоцитов и их цитокинов - это контроль и регуляция периферической толерантности [60, 218]. Мишенью при иммунной супрессии Т-регуляторными лимфоцитами могут стать многие иммунокомпетентные клетки. Исследования многих авторов подтверждают участие Т-регуляторных лимфоцитов в развитии злокачественных новообразований. Известно, что Т-регуляторные лимфоциты способны тормозить иммунный ответ на появление опухолевых клеток, одновременно с этим злокачественная опухоль способна накапливать количество данных лимфоцитов в месте своего роста [61]. Показано, что степень неблагоприятного прогноза развития опухоли зависит от высокого уровня Т-регуляторных клеток [61, 219, 220, 221].

Во внутритимическом развитии, дифференцировке и отборе Т-лимфоцитов важную роль играют клетки микроокружения: ретикулоэпителиальные клетки, тучные клетки, макрофаги и дендритные клетки, клетки APUD-серии [42].

В структуре тимуса по всей площади органа между лимфоидными элементами расположены клетки ретикулоэпителиоциты, содержащие округлые или вытянутые овальные ядра. Вследствие более редко расположенных лимфоцитов в мозговом веществе ретикулоэпителиоциты визуализируются лучше, чем в корковом веществе [62].

Эпителиоциты выделяют антигены МНС (Major histocompatibility complex), секретируют цитокины и гормоны. Эпителиоциты тимуса выполняют опорную функцию, выделяют интерлейкины: ИЛ-1, ИЛ-4, ИЛ-6 [63]. Среди эпителиальных клеток тимуса выделяют светлые и темные клетки [222]. Светлые субкапсулярные эпителиоциты секретируют гормоны местного действия – тимозин и тимопозтин, темные внутрикортикальные и медуллярные продуцируют дистантнодействующий тимулин [64]. Эти клетки тимуса человека вырабатывают в функционально значимых количествах HLA- DR молекулы, которые участвуют в селекции Т-клеток и элиминации аутореактивных лимфоцитов [63, 223].

Принято классифицировать эпителиоциты тимуса на субкапсулярные клетки, клетки корковой и клетки мозговой зоны, а также эпителиальные клетки тимических телец [48, 63, 224, 225]. В корковом веществе тимуса различают поддерживающие или периваскулярные эпителиальные клетки, входящие в состав гематотимического барьера; продуктивные или секреторные эпителиоциты, которые содержат секреторные гранулы для синтеза и депонирования биологически активных веществ; эпителиоциты с интрацитоплазматическими полостями, а также «клетки-няньки» (TNC)- это многоклеточные комплексы, в состав которых входят эпителиальные клетки [24, 63].

Важная роль в тимусе отводится специальным «клеткам – нянькам». Это крупные эпителиальные клетки, занимающие субкапсулярную зону тимуса. Внутри этих клеток располагаются делящиеся тимоциты. Клетки-няньки способны синтезировать тимозин [38], фагоцитировать подвергнутые апоптозу Т-клетки, участвовать в формировании белков II класса МНС комплекса [43, 54].

В мозговом веществе ретикулоэпителиальные клетки содержатся в значительном количестве, имеют более крупные размеры, они образуют тяжи, фолликулоподобные структуры и эпителиальные тельца тимуса [65]. Эпителиальные клетки мозгового вещества подразделяют на тельца Гассалья

и гипертрофированные эпителиоциты [63, 216]. Тельца Гассалья состоят из двух типов эпителиальных клеток мозгового вещества и семи типов вспомогательных клеток. Количество и состав вспомогательных клеток телец Гассалья зависит от стадии его развития. В состав вспомогательных клеток могут входить макрофаги, дендритные клетки, эозинофилы, тимоциты, В-лимфоциты, нейроэндокринные клетки [46]. Тельца Гассалья участвуют в процессе формирования специфического микроокружения для дифференцировки Т-клеток в мозговом веществе [66]. Некоторые авторы придерживаются точки зрения, что тельца Гассалья утилизируют погибшие Т-лимфоциты [67]. По мнению других авторов, количественная оценка стадий жизнедеятельности тимических телец играет важную роль в оценке структурно-функционального состояния ретикулоэпителиальных клеток мозгового вещества, а также в определении продолжительности стрессового воздействия по количеству обызвествленных тимических телец в структуре тимуса [68].

Известно, что эпителиоретикулоцитам отводится ряд функций. Во-первых, они обеспечивают целостность структуры органа, во-вторых, осуществляют контроль над процессами пролиферации и дифференцировки пре-Т-лимфоцитов; в – третьих, формируют гематотимический барьер [43]. Гематотимический барьер сформирован эндотелием капилляров с базальной мембраной, перикапиллярным пространством, содержащим межклеточное вещество с макрофагами и лимфоцитами, и слоем ретикулоэпителиальных клеток. Благодаря гематотимическому барьеру, попадание аутоантигенов в тимус с последующим развитием аутоиммунных реакций становится невозможным. Однако, тимоциты мозгового вещества способны поступать в кровоток, т.к. в этой зоне тимической долики гематотимический барьер отсутствует [44, 69].

Внимания заслуживает еще один тип клеток, участвующих в созревании тимоцитов – дендритные клетки. Это специальные антигенпредставляющие клетки, происходящие от гемопоэтических стволовых

клеток [70]. В созревании и дифференцировке дендритные клетки проходят несколько стадий развития: стадия клетки-предшественника; незрелой дендритной клетки и стадия зрелой дендритной клетки [71]. Функции данных клеток заключаются в их участии при дифференцировке Т-лимфоцитов [72, 226]. В мозговом веществе долики тимуса дендритные клетки играют ключевую роль в процессе негативной селекции созревающих Т-клеток и формировании их клеточной толерантности [70, 222, 227, 228]. Клеточная толерантность – это отсутствие специфического ответа на антиген. Такими свойствами обладают незрелые дендритные клетки [73, 229]. Все дендритные клетки можно дифференцировать на миелоидные и лимфоидные (плазмацитоидные) клетки. Большой процент приходится на миелоидные дендритные клетки, их обнаруживают в периферических лимфоидных органах и тканях, и кровяном русле. Периферические дендритные клетки способны мигрировать в тимус и презентировать тимическим лимфоцитам периферические аутоантигены для стимуляции негативной селекции и выработки Т-супрессоров [230, 231]. Плазмацитоидные дендритные клетки локализуются в тимусе, костном мозге, селезенке и лимфатических узлах. В тимусе основной локализацией для дендритных клеток выступают кортикомедуллярная зона, где отмечается наибольшее их количество, и мозговое вещество долики. Дендритные клетки участвуют в презентации антигена Т-лимфоцитам [73, 232, 233], в удалении опухолевых клеток путем апоптоза, процессируют новообразованные клетки и презентируют их Т-лимфоцитам, а также способствуют увеличению числа Т-супрессорных клеток [74, 75, 234].

К антигенпрезентирующим клеткам относят не только дендритные клетки, но и макрофаги. Макрофаги в тимусе локализуются в корковом, мозговом веществе и переходной кортико-медуллярной зоне. Все тимусные макрофаги участвуют в секреции ряда цитокинов (ФНО - альфа, IL-I, IL-II и другие) и удалении подвергнутых апоптозу Т-лимфоцитов [42, 235, 236]. В корковом веществе локализуются крупные макрофаги с отростками, внутри

этих клеток визуализируется большое ядро, в цитоплазме – части погибших Т-лимфоцитов. Макрофаги мозгового вещества тимуса имеют небольшие размеры. Они располагаются преимущественно около телец Гассалья, обладают меньшей фагоцитарной способностью, чем макрофаги коркового вещества, но активно участвуют в окончательном процессе дифференцировки и отрицательной селекции Т – лимфоцитов [24, 75, 76]. При активации макрофагов и увеличении дендритных клеток процессы негативной селекции ускоряются, в результате чего потенциально аутореактивные тимоциты подвергаются апоптозу [65, 77]. Макрофаги кортико-медуллярной зоны формируют границу между корковым и мозговым веществом, располагаясь в один ряд [237]. Открытые и впервые описанные П. Эрлихом еще в конце XIX века тучные клетки до сих пор вызывают большой интерес со стороны иммунологов, онкологов и других ученых. Тучные клетки, или мастоциты - это мультифункциональные гранулярные клетки, берут свое начало от костно-мозгового предшественника – плюрипотентной гемопоэтической стволовой клетки [78]. Образуясь в костном мозге, тучные клетки накапливаются в тимусе, а затем могут мигрировать в периферические органы и ткани. Тимус отличается высоким содержанием тучных клеток – около 8-9 кл/0,01мм² [79, 80]. Существует гипотеза, что тучные клетки имеют тимическое происхождение, а предшественниками тучных клеток могут служить ретикулярные клетки и тимоциты [81, 238]. Локализация тучных клеток совершенно многообразна, их обнаруживают в желудочно-кишечном тракте, дыхательных путях, молочной железе, в органах иммунной, нервной и эндокринной систем, мочеполовых органах, коже, где они располагаются по ходу кровеносных и лимфатических сосудов [22, 239, 240, 241]. В тимусе тучные клетки локализуются на периферии долек, окружают кровеносные сосуды, около ряда премедуллярных клеток и по ходу нервных волокон [79].

Роль тучных клеток в организме многообразна. Эта универсальная клетка принимает участие в реализации защитных реакций врожденного и приобретенного иммунитета, в трофике тканей, аллергических

и воспалительных реакциях, в адаптационных механизмах при внешних патологических воздействиях окружающей среды, при стрессе [82, 83]. Тучные клетки выходят в кровяное русло, где циркулируют в незрелом состоянии, затем они попадают в различные ткани, где происходит их окончательное созревание и дифференцировка [84, 242].

Тучные клетки имеют овальную или отростчатую форму. В них при микроскопии визуализируется ядро и органеллы, среди которых определяются секреторные гранулы. Характерной особенностью тучных клеток является их способность выделять широкий набор биологически активных веществ (БАВ). Продуктами для образования БАВ в тучных клетках являются аминокислоты, жирные кислоты, моносахариды и др. [83]. Тучные клетки способны поглощать и накапливать в секреторных гранулах БАВ из соединительной ткани, где они находятся в избыточном количестве [83, 85]. Известно, что различные виды воздействия на организм провоцируют ответную реакцию тучных клеток, проявляющееся в их количественном изменении и увеличении выброса медиаторов из гранул. Эти процессы зависят от продолжительности и силы воздействия, а также возрастных и индивидуальных особенностей организма [86, 87]. Существуют данные об их способности выделять ряд биологически активных веществ, участвовать в процессе тимопоза, влиять на межклеточные взаимодействия, проницаемость гемато-тимического барьера, миграцию лимфоцитов [88, 89]. Тучные клетки участвуют в активации ангиогенеза и ремоделировании соединительной ткани. Эти процессы осуществляются благодаря факторам роста, стимулирующим пролиферацию эндотелиальных и других включенных в процесс клеток, а также гистамину - повышается проницаемость сосудов микроциркуляторного русла, продукция TNF- α , IL-8. Все это стимулирует ангиогенез в активно растущих злокачественных новообразованиях [243]. Описаны регуляторные свойства тучных клеток, которые заключаются в способности активировать дендритные клетки, их созревание и миграцию в регионарные лимфатические узлы. Тучные клетки способны самостоятельно

осуществлять захват, процессинг и презентацию Т-лимфоцитов в сочетании с молекулами МНС I и II классов. Данная способность активировать Т-хелперы и NK-клетки может играть непосредственную роль в тканевом противоопухолевом контроле [90, 244]. На фоне развивающейся трансформации популяция тучных клеток тимуса возрастает, располагаясь по всей строме органа. В них наблюдается увеличение секреции фактора роста нервов, что приводит к их выживанию и дифференцировке [80].

Многие авторы отводят тучным клеткам ведущую роль в развитии патологических процессов, в частности при опухолевом росте [91], воспалительных реакциях [84, 245]. Известно также, что тучные клетки участвуют в разрушении тимоцитов коркового вещества на фоне развивающихся инволютивных процессов [92]. В настоящее время доказано участие тучных клеток в тимопозе, влияние на проницаемость гемато-тимического барьера, миграцию лимфоцитов и межклеточные взаимодействия [78, 93].

Особой клеточной популяцией в тимусе являются клетки APUD – серии или клетки диффузной эндокринной системы (ДЭС). Это диффузная нейроэндокринная клеточная организация, способная поглощать поступающие извне предшественники биогенных аминов, подвергая их декарбоксилированию, в результате чего образуются биогенные амины и ряд гормонов: адренокортикотропный гормон (АКТГ), соматостатин, паратгормон, нейротензин, кальцитонин, мелатонин и другие [20, 94, 95, 246]. На сегодняшний день известно более 50 видов клеток, которые можно отнести к клеткам APUD – серии. Их можно обнаружить в большей степени в слизистой оболочке пищеварительного тракта, в субсегментарных бронхах и в слизистой оболочке легких, в коже, в сердце, в поджелудочной железе, щитовидной и паращитовидных железах, в тимусе, гипофизе и эпифизе, а также в эпителии слизистой оболочки мочевыделительных путей [94, 96, 97].

Известно несколько предположений об источнике развития клеток-апудоцитов. Одни авторы считают, что данные клетки имеют

нейроэктодермальное происхождение, другие склоняются к энтодермальному происхождению клеток APUD - серии [94]. По современным данным считается, что клетки APUD-серии берут начало из всех зародышевых листков. Так, многочисленные клетки слизистой оболочки желудочно-кишечного тракта являются производными кишечной энтодермы; тучные клетки соединительной ткани являются производными мезенхимы; секреторные клетки сердечной мышцы-производные мезодермы; апудоциты надпочечников, эпифиза, гипоталамуса, щитовидной железы – производные нейроэктодермы [96].

Клетки APUD - серии - крупные, грушевидной или треугольной формы, для них характерно наличие хорошо развитой эндоплазматической сети, аппарата Гольджи, свободных рибосом, митохондрий и секреторных гранул, которые в каждой клетке отличаются формой, размерами и электронной плотностью их содержимого. Эти гранулы являются местом накопления биогенных аминов и пептидных гормонов [94, 96, 97]. Эндокринные клетки APUD-серии разделяют на клетки открытого и закрытого типа. Клетки открытого типа локализуются в слизистой оболочке полых органов. На контактной части этих клеток находятся микроворсинки, внутри которых содержатся рецепторные белки. Эндокринные клетки закрытого типа не контактируют с окружающей средой и получают информацию из эндогенной среды организма. Оба типа начинают выделять специфические гормоны [97]. Секреция гормонов клетками - апудоцитами осуществляется по паракринному типу, когда гормон выделяется в окружающую среду, и эпикринному типу - транспорт гормона из эндокринной в паренхиматозную клетку, без его попадания в окружающую среду [94, 98, 99]. Они играют важную роль в поддержании гомеостаза, оказывают влияние на клеточное деление и рост злокачественных опухолей. Следует отметить, что огромную роль в процессах дифференцировки, пролиферации и созревании злокачественных клеток играют пептидные гормоны и биогенные амины. Так, гистамин, инсулин, гастрин, пролактин

оказывают пролиферативное действие, а серотонин и мелатонин, напротив, антипролиферативный эффект [94].

Известно, что клетки APUD-серии являются носителями гуморальных эффекторов иммунной системы, а именно цитокинов, реагируя на воздействие стрессовых факторов, они выделяют биогенные амины. При канцерогенезе число клеток APUD – серии и их функциональная активность возрастает – это стимулирует иммунный ответ организма [72, 100]. Клетки APUD – серии и дендритные клетки участвуют в процессах пролиферации и апоптоза тимоцитов. Известно, что эпителиальные клетки тимуса выделяют гормон, влияющий на апоптоз в клетках тимуса [101, 247]. Выделяемые клетками-апудоцитами нейромедиаторы участвуют в регуляции деятельности клеток микроокружения тимоцитов и в продукции ими гормонов и интерлейкинов, влияющих на созревание и дифференцировку Т-лимфоцитов [102]. В постнатальном онтогенезе развитие тимуса проходит несколько периодов. Первый в возрасте 0-16 лет – период роста органа; 17 - 35 лет – стабильный период; третий – возрастная инволюция с 36 до 55, 56-74 года – замедленная инволюция, а в 75-80 лет вновь наступает ускоренная инволюция [103].

1.2. Современный взгляд на возрастную и акцидентальную инволюцию тимуса

К физиологическим процессам, которые происходят в организме человека, относят возрастную и акцидентальную инволюцию тимуса.

Тимус в организме выполняет ряд очень важных функций, являясь центральным органом иммунной и нейроэндокринной систем, поддерживает постоянство внутренней среды организма на клеточном и органном уровне. При этом тимус - единственный центральный орган иммунной системы, подвергающийся процессу возрастной инволюции [102, 104, 248]. Вероятно, в результате происходящей возрастной инволюции тимуса с возрастом заметно увеличивается риск возникновения аутоиммунных

заболеваний и появления злокачественных новообразований. К моменту рождения тимус оказывается полностью сформированным и уже с первых дней жизни начинает свое активное полноценное функционирование. Его активный рост заканчивается к моменту полового созревания, абсолютная масса органа к этому моменту составляет 30-40 г., после этого тимус начинает претерпевать изменения, характеризующие возрастную инволюцию. В организме человека зрелого возраста орган замещается жировой и соединительной тканью [35, 249]. Мнения ученых о том, когда начинается процесс возрастной или физиологической инволюции тимуса во многом расходятся. По некоторым данным, этот процесс начинается с первого года жизни [105, 250, 251]. В этот период происходят начальные стадии инволютивных изменений в тимусе, а именно во внутридольковых периваскулярных пространствах начинают появляться первые липоциты. Имеются данные, что до 3-х летнего возраста железа наиболее активна, затем запускается процесс возрастной инволюции [104]. В этом возрасте при неполноценной физиологической активности гуморального звена иммунитета именно тимус выполняет основную защиту организма от различных чужеродных агентов [49, 106]. Другие научные источники утверждают о начале процесса с десятилетнего возраста ребенка, когда масса лимфоидной ткани в органе достигает 75% от общей массы железы, а в дальнейшем начинает уменьшаться [107, 108]. Существует взгляд, что процесс функциональной инволюции запускается после 20 лет жизни [39, 44]. Возрастная инволюция тимуса характерна и для человека, и для животных [106, 109].

Для возрастной инволюции железы характерно уменьшение массы и объема органа, вместо лимфоидной ткани преобладает жировая и соединительная, постепенно снижается продукция Т-клеток и синтез гормонов [22, 39, 44, 107, 110, 249, 252]. В дольках нарушается структура и соотношение коркового и мозгового вещества, расположение эпителиоцитов, обнаруживается скопление макрофагов с различными

включениями, уменьшается количество и исчезают тельца Гассала [105, 111, 253, 254]. По данным некоторых авторов, возрастную инволюцию тимуса можно разделить на четыре этапа. Первый этап приходится на возраст от 1 до 10 лет, в этот период идет самая активная выработка железой тимических гормонов и Т-клеток, но при этом уже начинается процесс атрофии (~1,5% в год) и к 4 годам жировые клетки появляются не только во внутриводяковых периваскулярных пространствах, но и в строме органа [49, 53, 92, 255]. С 10 до 25 лет длится второй этап. Продолжается атрофия тимуса: значительно снижается выработка Т-лимфоцитов и гормонов, в паренхиме активно идут процессы жировой дистрофии. Третий этап длится до 40 лет, процесс атрофии вещества железы достигает максимальной скорости (до 5% в год), продолжается замена паренхимы на жировую ткань, строма подвергается склерозу. Происходит резкое снижение выработки полипептидов тимуса и Т-лимфоцитов. При микроскопии гистологических срезов заметно стирание границ между корковым и мозговым веществом, идет прогрессирование процесса деглимофотизации коры, уменьшается количество «клеток – нянек» и на их месте визуализируются обширные пустые участки [49]. В период после сорока лет процессы возрастной инволюции резко замедляются (до 0,1% в год), функционирование тимуса критически снижается, в результате чего организм становится уязвим к аутоиммунным, онкологическим и другим заболеваниям – это четвертый этап возрастной инволюции [56]. По данным иммуногистохимических исследований выявлено, что в IV периоде сохраняется гематотимический барьер, остаются эпителиальные клетки, которые продуцируют полипептиды тимуса [49]. Имеются данные, что к 70-90 годам в тимусе сохраняются островки эпителиальных клеток с минимальным количеством лимфоцитов. Продукция полипептидов сокращается до 70%, однако полная инволюция органа по математическим расчетам приходится на возраст 120 лет [49, 112].

Данные о том, что инволюция начинается с первых лет жизни, подтверждаются результатами некоторых исследователей. Было установлено,

что инволютивные процессы в нелимфоидных компонентах тимуса начинают развиваться довольно рано. Для объяснения раннего наступления возрастной инволюции следует рассмотреть действия антиапоптозного фактора mcl-1 и проапоптозного белка p53. Максимальная секреция белка mcl-1 отмечается в период эмбрионального развития, после рождения его уровень начинает снижаться. При этом активность белка p53 наиболее высокая в период первых лет жизни ребенка. К 40 годам процесс инволюции достигает своего пика, паренхима органа практически полностью замещена жировой тканью, после чего процессы инволюции резко замедляются, это связано с уменьшением секреции проапоптозного белка p53 в пожилом и старческом возрасте [113].

Причины развития возрастной инволюции до конца не ясны. Одна из причин возрастной инволюции - генетически запрограммированный механизм атрофии железы [53]. Предполагают, что функционирование органа в зрелом возрасте становится не целесообразным. Большое число патогенных агентов разной этиологии воздействуют на организм в период детского возраста, когда начинают формироваться Т-лимфоциты памяти, эти клетки сохраняют в себе информацию до 20 лет. Новые патогены всё реже поступают в организм, и необходимость в постоянном образовании Т-клеток с возрастом значительно снижается [60]. Экспериментально было доказано прямое влияние нарушений функций эндокринной системы, а именно нарушение продукции гормонов надпочечников, гипофиза, эпифиза. Так, при старении организма наблюдается тенденция к снижению секреции гипофизом соматотропного гормона, избыточная продукция глюкокортикоидов, уменьшение выработки мелатонина [104, 114, 115, 116]. Некоторые исследования показывают, что в развитии возрастной инволюции существенную роль играет изменение уровня цитокинов: снижение количества IL-7, IL-10, фактора роста кератиноцитов, лептина и тимического лимфопоэтина на фоне увеличения продукции IL-6, онкостатина М и других [110].

Результатом возрастной инволюции тимуса является снижение адаптивного иммунитета, состояние иммунодефицита приводит к нарушению распознавания своих и чужеродных клеток, в ходе чего повышается риск развития аутоиммунных и онкологических заболеваний. С возрастом все функции поддержания здоровья на себя берет врожденный клеточный иммунитет. Старение организма и инволютивные процессы в железе приводят к низкому содержанию Т-клеток на периферии, увеличению чувствительности клеток к ФНО – альфа и CD-опосредованному апоптозу. Еще одной причиной развития неблагоприятных процессов в стареющем организме, связанных с возрастной инволюцией тимуса, является снижение функциональной активности дендритных клеток [110, 256]. Проводимые учеными иммуногистохимические исследования подтверждают наличие серотонина в пре – Т - клетках, незрелых Т-лимфоцитах коркового, зрелых лимфоцитах мозгового вещества и тельцах Гассалья. Установлена взаимосвязь между секрецией тельцами Гассалья серотонина и соматостатина и увеличением пролиферативной активности Т-клеток. При исследовании нескольких возрастных групп людей от плодного периода до группы долгожителей, ученые пришли к заключению, что уровень серотонина остается на одном уровне с периода онтогенеза и до периода пожилого возраста, включая группу долгожителей. Этот факт свидетельствует о выполнении эндокринной функции тимусом на фоне развития возрастной инволюции [111].

Тимус претерпевает инволюцию не только в результате физиологического старения организма, но и под действием различных стрессовых факторов и чрезвычайно сильных раздражителей. Такой механизм проявления защитных свойств организма называется акцидентальная инволюция. Акцидентальная инволюция тимуса является временным и обратимым процессом, развивается быстро. В органе происходят многочисленные изменения: исчезает четкая граница между корковым и мозговым веществом доли, происходит выброс большого количества

Т-лимфоцитов в периферическое кровеносное русло, запустевает вещество дольки из-за массовой гибели и фагоцитоза макрофагами нормальных Т-лимфоцитов, эпителиальные клетки разрастаются, увеличивается их объем [39, 44].

Среди причин, вызывающих остро наступающие процессы акцидентальной инволюции, на первом месте стоит как психоэмоциональный, так и физический стресс, вызванный различными внешними факторами [257]. Запуск этого процесса связан с выбросом корой надпочечников глюкокортикоидных гормонов [117, 118]. Многообразие причин развития акцидентальной инволюции тимуса включает инфекционные заболевания и неинфекционные агенты, прием цитостатиков и стероидных лекарственных средств [30, 119]. Развитие злокачественных новообразований способствует развитию акцидентальной инволюции [23, 119, 258].

В условиях стресс-реакции снижение функциональной активности тимуса связано с развитием акцидентальной инволюции. Этот процесс, ведущий к гипотрофии, а затем и атрофии вилочковой железы, условно можно разделить на пять фаз. Первая фаза характеризуется начальными изменениями в структуре органа, которые приводят к его гипертрофии. В этой фазе усиливается кровенаполнение, развивается отек стромы, компенсаторно начинает расти количество лимфобластов в субкапсулярной зоне дольки тимуса. Вторая фаза характеризуется началом выраженных инволютивных изменений со стороны органа. Площадь мозгового вещества начинает преобладать над корковым. Кортикальная зона заполнена макрофагами, которые поглощают продукты распада Т-клеток. Количество Т-лимфоцитов в корковом и мозговом веществе уменьшается, в последнем происходит разрастание эпителиальных клеток. При световой микроскопии визуализируется картина «звездного неба» [89, 120, 121]. В третьей фазе продолжаются инволютивные изменения, запустевает корковый слой, а в мозговом веществе увеличивается количество телец Гассалья, в результате чего отмечается уменьшение относительной

и абсолютной массы тимуса. Для четвертой фазы характерно опустошение как коркового вещества, так и мозгового. Границы между зонами вещества дольки стираются. Количество тимических телец уменьшается, нарастают дистрофические изменения. Пятая фаза акцидентальной инволюции представлена атрофией вещества тимуса. Дольки склерозированны, имеют вид вытянутых тяжей, дольки едва различимы, в междольковой строме активно нарастает липоматоз [121, 122]. Таким образом, акцидентальная инволюция тимуса – это процесс, сопровождающийся быстрым уменьшением массы и объема органа под влиянием выделяемых глюкокортикостероидов в различных стрессовых ситуациях [123, 259]. Этот процесс сопровождается снижением секреции тимических гормонов, усилением миграции Т-клеток из тимуса и их усиленным распадом путем апоптоза внутри железы [100].

1.3 Современные данные о влиянии канцерогена

N-метил-N-нитрозомочевины

Злокачественное новообразование может возникнуть в любой ткани, в любом органе. Опухолевый рост наблюдается как в организме животных, так и человека. Наблюдается зависимость между возникновением опухолевого роста и различными факторами, к которым относят: условия окружающей среды, биологические, социальные, психо-эмоциональные факторы, пищевые предпочтения и др. Одним из основных пусковых звеньев в развитии опухоли является воздействие на организм канцерогенов [124]. При этом риск развития злокачественных новообразований увеличивается при различных врожденных и приобретенных видах иммуносупрессии [260, 261, 262]. По определению ВОЗ «канцерогеном называют агент, который в силу своих физических или химических свойств может вызывать необратимые изменения и повреждения в тех частях генетического аппарата, которые осуществляют контроль над соматическими клетками». Процесс канцерогенеза включает несколько этапов – это стадии инициации, промоции и прогрессии [125, 126, 263, 264]. В первой стадии инициации реактивные метаболиты канцерогенов

взаимодействуют с генами (онкогенами), ответственными за контроль клеточного роста, в результате чего образуются инициированные клетки. Стадия промоции характеризуется активным делением инициированных клеток с передачей вновь образованным клеткам дефектной генной информации. Деление вновь образованных патологических клеток и накопление их в организме приводит к неконтролируемому их росту и размножению в результате потери нормальных свойств патологически измененной клеткой [127]. К первой линии противоопухолевой защиты относят печеночные ферменты, благодаря которым происходит инаktivация канцерогенных факторов [265]. Вторая линия защиты обеспечивается иммунной системой, осуществляющей надзор над генетическим постоянством. Поддержание этой стабильности осуществляется за счет активации апоптоза при обнаружении повреждения в цепи ДНК. При нарушении работы этой системы происходит трансформация нормальных клеток в опухолевые [266, 267]. Благодаря подключению механизмов врожденного и приобретенного иммунитета, организм борется с различными онкогенными агентами, в том числе вирусами и другими канцерогенами [268]. Более 75% всех злокачественных опухолей развивается под действием химических факторов окружающей среды. Одной из распространенных групп канцерогенов являются нитрозосоединения – нитрозоэтилмочевина, нитрозометилмочевина, нитрозодиметиламины. Нитрозамины относятся к прямым канцерогенам, которые способны воздействовать на организм без предварительного метаболического превращения. Особенностью данной группы канцерогенов является их возможность синтезироваться внутри организма из нитратов и вторичных аминов [124]. Нитраты и нитриты являются естественными компонентами растительного организма. Азот является одним из главных элементов, необходимых для растений. Из почвы он поступает в растения из азотных удобрений, широко используемых в сельскохозяйственной промышленности. Минеральные и органические соединения, содержащиеся в азотсодержащих удобрениях,

проходя через процесс нитрификации преобразуются в нитраты. Избыточное использование азотных удобрений в сельском хозяйстве, несбалансированное минеральное питание почвы, сбор недозревшего урожая, и другие агротехнические и экологические факторы могут привести к избыточному накоплению нитратов в растительной пище. Продукты с высоким содержанием нитратов оказывают отрицательное действие на организм, т.к. внутри растений и в желудочно-кишечном тракте человека способны восстанавливаться до нитритов, обладающих высоким токсическим действием. Нитриты, вступая во взаимодействие с аминами, образуют обладающие канцерогенными свойствами нитрозоселины. Особое внимание и настороженность в применении в качестве удобрений почвы нужно проявлять и к пестицидам, т.к. они могут являться предшественниками N-нитрозосоединений [128]. Токсическое действие нитратов и нитритов проявляется в увеличении содержания в крови метгемоглобина, в результате чего в условиях развивающейся гипоксии происходят изменения во многих системах органов. К группе, наиболее подверженной токсическому воздействию нитратов, относят беременных женщин, детей, людей пожилого возраста и лиц с хроническими заболеваниями органов дыхания и сердечно-сосудистой системы [128, 129].

Большая часть N-нитрозаминов являются чрезвычайно активными канцерогенами и обладают эмбриотоксическим действием для животных и человекообразных обезьян. Многие из них обладают органоспецифическим канцерогенным действием [130].

N-метил-N-нитрозомочевина – органическое соединение, его химическая формула $\text{CH}_3\text{N}(\text{NO})\text{CONH}_2$. Вещество относят к супермутагенам – это вещества, не встречающиеся в природе и не распознающиеся ферментами защитных систем организма. В качестве супермутагена N-метил-N-нитрозомочевину применяют в селекции растений для выявления индуцированных мутаций [131], в низких концентрациях используют для стимуляции их роста. Доказано, что N-метил-N-

нитрозомочевина обладает мутагенным, эмбриотоксическим и канцерогенным эффектом для крыс и в их организме превращается в диазометан. Выраженный токсический эффект оказывает на гемопоэз, лимфоидную ткань и ткани, характеризующиеся быстрой клеточной регенерацией [132]. Соединение N-метил-N-нитрозомочевину следует относить к вероятно канцерогенным для человека веществам.

Известно, что при введении канцерогена N-метил-N-нитрозомочевины у большинства крыс развивается гормонозависимая аденокарцинома молочной железы [133, 134] и злокачественные эпителиальные опухоли прямой кишки, чаще в виде аденокарциномы, реже – плоскоклеточный ороговевающий рак или их сочетание [135]. На фоне введения данного канцерогена наблюдается поражения злокачественными опухолями почек, нервной системы и крови в виде лейкозов [136].

1.4 Стресс и его влияние на организм в целом и на морфологию тимуса

Стресс – это неспецифический ответ организма на любое предъявляемое ему требование [137]. Идеи о том, что стресс влияет на организм впервые появились задолго до возникновения теории стресса в конце XIX века. Именно тогда французский физиолог К. Бернар указал, что постоянство внутренней среды является обязательным условием для поддержания свободной и независимой жизни. Позже американским физиологом Б. Кенноном был введен термин «гомеостазис», что можно дословно перевести как «сила устойчивости». В дальнейшем, путем постановки ряда экспериментов, в которых изучалось влияние на организм холода и жары, инфекционных факторов, травм, нервного возбуждения и других факторов, Г. Селье выявил «синдром, вызываемый различными вредоносными агентами». Степень влияния различных вредоносных факторов можно определить по степени гипертрофии надпочечников и атрофии тимуса. Этот синдром стал называться «общим адаптационным

синдромом» или синдромом биологического стресса [137]. Так, стресс состоит из последовательно идущих фаз стрессовых реакций, среди которых выделяют: первую фазу - тревоги, вторую – резистентности или сопротивления, и третью – фазу истощения [137, 138, 139].

На фоне психоэмоционального, социального и других видов стресса происходят процессы, нарушающие систему гипоталамо-гипофизарно-надпочечниковой оси [140] и симпато-адрено-медуллярной оси [15]. Доказано влияние гормонов на развитие стресс-реакции. К ним относятся: адреналин, норадреналин, кортиколиберин, адренокортикотропный гормон. Так, в начальной стадии тревоги в ответ на стресс активно вырабатывается адреналин. Гипоталамо-гипофизарно-надпочечниковая ось представляет целостную координированную систему. Стрессор оказывает возбуждающее действие на гипоталамус, в свою очередь в гипоталамусе продуцируется вещество, которое активизирует гипофиз и происходит выделение в кровь адренокортикотропного гормона (АКТГ). Под влиянием АКТГ в коре надпочечников выделяются кортикоиды, которые ведут к атрофии тимуса, лимфатических узлов, к торможению воспалительных реакций и активному продуцированию глюкозы [137]. Следует отметить, что гормоны, вырабатываемые в процессе стресса, увеличивают потенциал раковых клеток, что ведет к прогрессированию роста опухоли [141]. Важным фактом является наличие внешних и внутренних «обуславливающих факторов». К внутренним относятся генетическая предрасположенность, возраст и пол, к внешним – прием лекарственных препаратов, гормонотерапия, качество питания [137].

На сегодняшний день известно, что на всех клетках иммунокомпетентной системы присутствуют глюкокортикоидные и катехоламиновые рецепторы различной плотности и чувствительности. На натуральных киллерах и Т-цитотоксических лимфоцитах (CD8⁺) находятся высокой плотности α - и β - адренорецепторы, у других Т-лимфоцитов присутствуют адренорецепторы ограниченной плотности.

В процессе развития стресса иммунные клетки подвергаются миграции, попадают в кровеносное русло, происходят изменения в способности их к пролиферации, синтезу и секреции цитокинов. Особое значение имеют противовоспалительные (ИЛ-4, ИЛ-10, ИЛ-13, ИЛ-23, трансформирующий фактор роста - β) и провоспалительные цитокины (ИЛ-1 β , ИЛ-6, ФНО- α , γ -интерферон). Высвобождение при стрессовой реакции адреналина и норадреналина, сопровождающееся гиперкатехоламинемией, приводит к изменениям в функциях иммунных клеток. По мере развития стресса происходит подавление пролиферативной активности лимфоцитов, снижение выработки ФНО – α , нарушение процессов активации Т-клеток, в частности, NK-клеток (CD3-, CD56+), снижение количества CD3+/CD4+ на фоне увеличения уровня CD8⁺ Т – лимфоцитов [269].

Сильный острый или длительный хронический стресс оказывают пагубное угнетающее действие на иммунную систему [270]. И острое, и хроническое воздействие стресса запускают механизм активации гормонов гипофиза и надпочечников, в результате этого включаются адаптационные механизмы организма. Действие стресса ведет к изменению функций органов и систем, что сопровождается истощением резервов организма, возникают изменения в структурах внутренних органов [138, 142]. При возникновении и развитии стресса в кровеносное русло выходит дополнительное количество Т-киллеров (CD3+/CD56+, CD3-/CD56+), цитотоксических лимфоцитов (CD8+) и снижается количество CD4+ лимфоцитов, уменьшается количество клеток, экспрессирующих рецепторы к ИЛ-2 [143, 271]. Экспериментально доказано, что при действии агентов, вызывающих острый стресс, происходит миграция лимфоцитов и их перераспределение по различным областям организма. При длительном воздействии стрессора и развитии хронического стресса, поступившие в кровоток иммунные клетки возвращаются в места своей постоянной локализации, что приводит к снижению эффективности иммунного ответа в периферических органах [272].

Ряд научных исследований подтверждает влияние стресса на иммунитет. Так, данные об изучении иммунного статуса у студентов во время сессии показали значительное подавление иммунного статуса, которое проявляется в снижении процентного содержания Т-хелперов и NK-клеток [12, 273]. Снижение пролиферативной активности Т-клеток и NK-клеток прослеживается в исследованиях пациентов с тревожно-депрессивными расстройствами [12]. При этом замечена линейная взаимосвязь между степенью тревожно-депрессивного расстройства и показателями клеточного иммунитета [12, 274].

Состояние иммунной системы и иммунный ответ крайне важны в борьбе с процессом развития злокачественных новообразований. Исследования, затрагивающие влияние стресса на иммунные органы, подтверждают угнетающее воздействие стресса на тимус и иммунный ответ. Острый стресс оказывает на иммунную систему стимулирующий эффект. Хронический стресс, напротив, обладает угнетающим действием на иммунитет и снижением эффективности его функций [143]. Известна трехфазная теория реагирования иммунной системы на хронический стресс. Согласно ей, хронический стресс вызывает как активацию, так и супрессию иммунного ответа через изменение секреции цитокинов [143, 275].

Так, во время первой стадии хронического стресса замедляется продукция провоспалительных (ИЛ-1 β , ИЛ-6, ФНО- α и γ -интерферон) и усиливается выработка противовоспалительных цитокинов (ИЛ-4, ИЛ-10, ИЛ-13 и др.). В результате этого выработка цитокинов Т-хелперами первого порядка угнетается, а их супрессия обеспечивает выход иммунорегуляторов второго порядка, в свою очередь они запускают гуморальный иммунитет, обеспечивая защиту органов от аутоантигенов, инфекционных и опухолевых антигенов. Вторая стадия характеризуется угнетением синтеза ядерного цитоплазматического белка Т-лимфоцитов карра-В. В норме данный активированный белок стимулирует выработку провоспалительных цитокинов. В результате наступления толерантности к катехоламинам

и глюкокортикоидам на фоне длительного влияния стрессорного агента происходит снижение провоспалительной активности иммунокомпетентной системы. В третьей стадии вновь активируются провоспалительные цитокины и медиаторы воспаления. В определенный момент происходит запуск воспалительного процесса, который сам по себе приводит к соматической патологии [143, 271].

Как острый, так и хронический стресс любой этиологии (физический, иммобилизационный, водный, психоэмоциональный, стресс ожидания) приводит к изменению структур тимуса, свидетельствующих о его акцидентальной инволюции [102, 276]. Так, в процессе стресс-реакции отмечается резкое уменьшение массы и объема тимуса, что свидетельствует об атрофии органа [140]. При иммобилизационном и других видах стресса в тимусе визуализируются стертые границы между корковым и мозговым веществом, толщина коркового вещества значительно уменьшается и в нем формируются очаги клеточного запустевания [140, 144, 145], вызванного уменьшением числа лимфоцитов. Площадь мозгового вещества под влиянием иммобилизационного стресса увеличивается, но количество лимфоцитов в нем также заметно снижается [146]. При водном и иммобилизационном стрессе отмечается, что дольки тимуса разобщены широкими прослойками соединительной ткани, фиброзированы [144, 147]. При иммобилизационном стрессе в тимусе уже на ранних сроках значительно снижается количество макрофагов в соединительной ткани, в разы снижается число лимфоцитов [147]. При иммобилизационном стрессе в костном мозге активируются процессы гранулопоэза и В-лимфопоэза [138]. Снижается количество мигрирующих из костного мозга в тимус предшественников клеток, что приводит к снижению в нем уровня хемокинов [140]. Стресс - реакция ведет к снижению уровня катехоламинов, серотонина и гистамина в тимусе, а также в других иммунокомпетентных органах [142]. Если сравнивать выраженность изменений при остром и хроническом стрессе, то хроническое воздействие влечет за собой более выраженные процессы

инволюции тимуса на фоне гипертрофии надпочечников [145]. Вызванная стрессовым воздействием инволюция тимуса, при которой отмечается атрофия железы, связана со снижением миграции клеток - предшественников Т-лимфоцитов, а также опосредованным воздействием веществ надпочечников, секретируемых во время стресса [140]. При хроническом стрессе большое значение в процессе атрофии вилочковой железы имеет избыточный апоптоз двойных позитивных Т-лимфоцитов коркового вещества, а также угнетением их пролиферации в корковом веществе тимуса [144].

1.5 Современные данные о состоянии иммунной системы при развитии рака молочной железы. Стресс, как пусковой механизм и его роль в изменении течения и развития опухоли

На сегодняшний день одной из наиболее распространенных эпителиальных форм рака во всем мире является рак молочной железы, показатель его достигает 31%, около 40% больных изначально имеют III-IV стадии заболевания. Кроме того, в половине случаев раннего обнаружения возникают отдаленные метастазы на разных сроках после окончания первично проведенного лечения [5, 148]. К 2012 году во всем мире зарегистрировано 1,67 млн случаев рака молочной железы. В России в 2013 году выявлено около 55 тысяч женщин с диагностированным раком молочной железы [8]. К 2018 году заболеваемость раком молочной железы в нашей стране составляет 46 пациентов на 100 000 населения [149]. При этом самая высокая заболеваемость зарегистрирована в индустриально развитых странах, самая низкая – в развивающихся странах мира. На сегодняшний день в России, странах Европы, Северной Америки, Канаде рак молочной железы занимает первое место, так по данным статистики одна из 12 женщин заболевает раком молочной железы [12]. Необходимо отметить, что на фоне числа всех злокачественных опухолей, рак молочной железы имеет очень высокий темп роста и превышает почти

в 3 раза риск развития злокачественных новообразований других локализаций репродуктивной системы [8, 150].

Учеными доказано, что развитие злокачественных опухолей происходит на фоне дисфункции иммунной системы организма [151, 152, 153]. Известно, что она способна бороться со злокачественными новообразованиями с помощью врожденного и приобретенного звеньев иммунитета [154], с другой стороны иммунная система может приводить к развитию и росту опухоли [151].

Иммунная система способна распознавать и элиминировать онкологический процесс, образовывать специфические антитела и контролировать рост опухоли. При этом известно, что способность опухоли ускользать от иммунной идентификации определяет прогноз болезни [155, 156]. Выявлены многочисленные супрессорные факторы, которые могут подавлять реакцию иммунной системы по отношению к опухоли [151, 155]. Исследования последних лет показали отрицательное влияние стресса на состояние организма. По данным литературы, выявлена взаимосвязь между функциональным состоянием иммунной, эндокринной систем, психологических факторов стресса и течением рака молочной железы. Так, одним из важных индикаторов позитивного или негативного прогноза при раке молочной железы является состояние иммунного статуса пациенток. А именно, при раке молочной железы главную роль играет функциональное состояние Т-лимфоцитов и NK-клеток [12]. Известно, что низкое содержание Т-лимфоцитов у больных раком молочной железы увеличивает риск метастазирования опухоли, по сравнению с нормальным их содержанием, а также возрастает риск рецидива болезни [12, 277]. На развитие и течение заболевания большую роль оказывают психоэмоциональный и посттравматический стрессы. Наиболее часто среди психоэмоциональных стрессовых факторов встречаются депрессии, потеря близких людей, трудности на работе и др. Посттравматический стресс при диагностировании рака молочной железы отличается трудным принятием диагноза и страхом

перед угрозой жизни и болезненным восприятием женщины потери эстетичности вида своего тела [157].

Исследования подтверждают взаимосвязь влияния стресса и реакцией иммунной системы у пациентов с раком молочной железы. Так, уровень Т-хелперов (CD4+) снижается у больных раком молочной железы, страдающих подавленным настроением, депрессией, навязчивыми мыслями и симптомами тревоги. Негативные мысли и страх заболевания отрицательно влияют на уровень Т-киллеров (CD8+), что приводит к снижению иммунитета у больных [12].

Отрицательная роль стресса на иммунную систему активизирует рост новообразований, ухудшает прогноз для онкологических больных [158]. Известно, что в механизм развития злокачественных опухолей вовлечены гормоны, регулирующие сложные процессы в организме [159, 278]. Одни гормоны принимают непосредственное участие в развитии рака, другие, напротив, тормозят его прогрессирование [160]. Выявлено, что у онкологических больных определяется высокий уровень андрогенов, кортизола, эстрогенов на самых ранних стадиях рака [279, 280].

В предыдущих работах, проводимых на нашей кафедре, была показана дисфункция иммунной системы на фоне развития опухоли толстой кишки, которая проявлялась развитием акцидентальной инволюции тимуса [22, 161]. Безусловно, тимус - главный орган иммунитета, его функция направлена на сохранение пула периферических Т-лимфоцитов. Этот орган подвержен инволютивным процессам, в результате чего происходит снижение иммунной реактивности организма и противоопухолевой защиты.

Однако в литературе мы не нашли данных, описывающих процессы, протекающие в иммунной системе на фоне сочетанного воздействия канцерогенеза и стресса. Нет и общей картины, демонстрирующей роль иммунной и эндокринной системы в канцерогенезе. Попытки объединения полученных данных приводят к выявлению значительных противоречий. В настоящей работе мы попытались показать роль иммунной системы

в формировании злокачественной опухоли на фоне воздействия стресса. Возможно, полученные нами данные будут полезны для более глубокого понимания функционирования оси тимус-гипофиз-надпочечники.

ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Эксперименты были проведены на 168 белых нелинейных крысах – самках в возрасте от 3 до 7 месяцев, массой 150-350 г. Экспериментальные животные содержались в условиях вивария в соответствии с ГОСТ 33216-2014 «Правила работы с лабораторными грызунами и кроликами» [162]. Проведенное научное исследование согласовано и единогласно одобрено на заседании Локального этического комитета медицинского факультета ФГБОУ ВО «ЧГУ имени И.Н. Ульянова» Министерства науки и высшего образования РФ (протокол № 19-01 от 04.12.2019 г.). Эксперименты проведены с 2015 года по 2017 год. Выведение животных из эксперимента проводилось через 1, 2 и 3 месяца и сопровождалось применением золетилового наркоза из расчета 5 мг на 100 г путем декапитации в соответствии с международными правилами проведения работ с экспериментальными животными [163, 281].

Животные были разделены на 4 группы:

I группа. Интактные (контрольные) животные – 24 крысы;

II группа. Экспериментальные животные, которым вводили канцероген N-метил-N-нитрозомочевину в дозе 2,5 мг на крысу в 0,2 мл воды подкожно в область одной и той же 2-ой молочной железы слева 1 раз в неделю в течение 5 недель (общая доза канцерогена составляет 12,5 мг/крысу) – 48 крыс;

III группа. Экспериментальные животные, подвергавшиеся воздействию водно-иммобилизационного стресса. Стресс моделировали путем фиксирования животных в специальных пластиковых пеналах. Затем эти пеналы погружались в ёмкости с водой (температура 16-17 °С) на 1 час на протяжении 10 дней, таким образом, чтобы крысы были погружены до головы [164] – 48 крыс;

IV группа. Экспериментальные животные с сочетанным воздействием введения канцерогена и водно-иммобилизационного стресса. В этой группе

крысам вводили канцероген N-метил-N-нитрозомочевину в дозе 2,5 мг на крысу в 0,2 мл воды подкожно в область одной и той же 2-ой молочной железы слева 1 раз в неделю в течение 5 недель. После окончания введения канцерогена моделировали стресс, как в III группе – 48 крыс.

При патоморфологическом исследовании учитывали частоту развития новообразований в молочной железе и их морфологические характеристики. Объект исследования - тимус.

Тимус иссекали через 1, 2 и 3 месяца после окончания воздействий, определяли вес, после этого из части материала изготавливали криостатные срезы органов толщиной 10 мкм, другая часть фиксировалась в 10% нейтральном забуференном формалине для использования в дальнейшем в постановке иммуногистохимических реакций.

Для исследования срезов тимуса использовали методы:

1. Метод окраски гематоксилином и эозином - для измерения морфометрических параметров органа – толщины коркового и площади мозгового вещества. С целью депарафинизации срезы последовательно обрабатывались в ксилоле в течение 4-5 минут и спиртах (по 2-3 минуты), после чего промывались в дистиллированной воде. Окраска ядер гематоксилином проводилась в течение 5 минут, дифференцировку проводили 1% солянокислым спиртом в течение 2 секунд, после чего срезы промывались в дистиллированной воде и подвергались окрашиванию в 1% растворе эозина (2 минуты). Промытые в дистиллированной воде срезы последовательно обрабатывались в спиртах и ксилоле, после чего микропрепараты заключались в бальзам.

2. Иммуногистохимические методы с использованием моноклональных (МКАТ) и поликлональных (ПКАТ) антител фирмы Santa Cruze (США) [282]:

а) ПКАТ к кластеру дифференцировки лимфоцитов 3 типа - CD3 (для идентификации зрелых Т-лимфоцитов);

- б) МКАТ к кластеру дифференцировки лимфоцитов 68 типа – CD68 (для определения макрофагов в структурах микроокружения тимических долек), клон ED-1 (Abcam, Великобритания);
- в) ПКАТ к белку S-100 – служит маркером клеток нейроэктодермального происхождения и дендритных клеток, Rtu (DAKO, Дания);
- г) МКАТ к Pan-cytokeratin, клон AE1/AE3 (NovoCastra, Великобритания) – для неселективного распознавания эпителиальных клеток долек тимуса;
- д) ПКАТ к белку Bcl-2 (Santa Cruze, США) - маркер долгоживущих клеток, ингибитор апоптоза.

Материал для исследования фиксировали 10% нейтральным формалином в течение суток, заливали в парафин, готовили срезы толщиной 4 мкм, далее срезы наносили на высокоадгезивные стекла и высушивали при температуре 37C⁰ в течение 18 ч. Восстановление антигенной активности осуществлялось в цитратном буфере pH 6,0 в автоклаве при температуре 96C⁰ в течение получаса с последующим остыванием в течение 90 мин. Для выявления иммуногистохимических реакций в работе применялась система визуализации Leica ChromoPlex™ 1 Dual Detection for BOND. С целью внутреннего контроля реакции использовали неиммунизированную кроличью сыворотку. Результаты реакций оценивали с применением микроскопа МИКРОМЕД 3 ЛЮМ. Положительной иммуногистохимической реакцией на антитела к кластерам дифференцировки CD служила коричневая окраска мембран клеток, положительная реакция на Bcl-2, Pan-cytokeratin и S - 100 - коричневая окраска цитоплазмы. Результаты оценивали путем применения подсчета позитивно окрашенных клеток в 10 полях зрения при увеличении 400х, результаты отображали в процентах и единицах в поле зрения.

3. Люминесцентно-гистохимический метод Фалька-Хилларна [283] в модификации Е.М. Крохиной [165] - для выявления серотонина и катехоламинов в люминесцирующих клетках тимуса. В результате проведения реакции конденсации катехоламинов формальдегидом образуются 1-4-тетрагидроизохинолины. Конечными продуктами реакции

дегидратации являются 3,2-дигидросоединения изохинолина, которые флуоресцируют ярко-зелёным свечением [284]. Выявление уровня серотонина основывается на образовании карболинов, которые обладают белым или светло-желтым свечением. Люминесцентно-гистохимический метод в модификации Е.М. Крохиной заключается в высушивании срезов только в воздушной среде, без использования лиофилизации. Криостатные срезы тимуса обрабатывались парами параформальдегида в течение 60 минут при температуре 70-80⁰С и заключались в полистирол. Препараты тимуса изучали под люминесцентным микроскопом ЛЮМАМ-4 не позднее 48 часов после окрашивания.

4. Люминесцентно-гистохимический метод Кросса, Эвена, Роста [285]

использовали для идентификации гистамина в структурах тимуса. Криостатные срезы органа подвергались обработке ортофталевым альдегидом в камере термостата при температуре 100⁰С в течение 15 секунд, после чего их помещали в другую камеру с парами воды при той же температуре на 120 секунд, затем срезы просушивали в термостате при 70⁰С в течение 5 минут, и заключали в полистирол. В результате взаимодействия ортофталевого альдегида с гистамином образовывались флуоресцирующие соединения из группы производных имидазолилэтиламина. Полученные соединения при высоком содержании гистамина дают жёлтое свечение, при среднем уровне гистамина выявляется зелёное свечение и при его низком уровне наблюдается голубое свечение. Препараты изучали с помощью люминесцентного микроскопа ЛЮМАМ-4.

5. Метод цитоспектрофлуориметрии [166, 167, 168]

- для количественного определения уровней биологически активных аминов - серотонина, катехоламинов и гистамина в клеточных элементах исследуемого органа. Уровень биоаминов замеряли с помощью спектрофлуориметрической насадки ФМЭЛ-1А на люминесцентном микроскопе ЛЮМАМ-4. Выходное напряжение при всех измерениях составляло 600 В. Оценку проводили в единицах флуоресценции (условные единицы по шкале регистрирующего

прибора). Для определения интенсивности люминесценции катехоламинов (КА) использовали интерференционный светофильтр №6 (длина волны - 480 нм); гистамина (ГСТ) - №7 (длина волны - 515 нм) и серотонина (СТ) - №8 (длина волны - 525 нм).

6. С целью оценки суммарно-направленного действия серотонина, гистамина, катехоламинов рассчитывалось соотношение *(серотонин+гистамин)/катехоламины*. Это соотношение позволяет определить функциональное состояние клеточных элементов тимуса. Так, повышение этого соотношения косвенно свидетельствует о подавлении физиологической активности клеток, снижение соотношения - о её стимуляции [169].

7. **Метод окраски полихромным толуидиновым синим по Унна** — для качественной и количественной оценки популяции тучных клеток вилочковой железы. Тучные клетки подсчитывали в десяти полях зрения микроскопа (объектив 40 и окуляр 15). По степени дегрануляции классифицируют 4 типа клеток: Т-0 — тучные клетки с плотно заполненными неразличимыми гранулами и ядром; Т-1 — клетки с отдельно различимыми гранулами и неполностью замаскированным ядром; Т-2 — клетки с хорошо различимыми гранулами как внутри, так и вокруг клетки и отчетливым ядром; Т-3 — опустошенные тучные клетки с единичными гранулами внутри и рассеянными гранулами вокруг клетки [22, 170, 171, 172, 173].

8. Оценку функциональной активности тучных клеток производили, вычисляя индекс дегрануляции по формуле $ИД = ((A \times 0) + (B \times 1) + (C \times 2) + (D \times 3)) / n$ [171, 174], где А – число недегранулирующих клеток (Т0); В – слабодегранулирующие тучные клетки, (Т1); С – клетки с умеренной степенью дегрануляции, (Т2); D – клетки высокой степени дегрануляции, (Т3); n – общее количество исследуемых клеток.

9. **Морфометрический метод** выполняли с помощью автоматизированного морфометрического комплекса, включавшего микроскоп МИКРОМЕД 3 ЛЮМ, цифровую фотокамеру и персональный компьютер

с набором прикладных программ. Использовались программы «Микро-Анализ» для измерения размеров люминесцирующих клеток, определения толщины коркового и площади мозгового вещества тимуса, а также количественных характеристик иммуногистохимических реакций.

10. Статистическая обработка

Накопление, корректировка, систематизация исходной информации и визуализация полученных результатов осуществлялись в электронных таблицах Microsoft Office Excel 2016. Материалы исследования были подвергнуты статистической обработке с использованием стандартных методов параметрической и непараметрической статистики [286]. Характер распределения установлен с помощью критерия Колмогорова-Смирнова с поправкой Лиллиефорса. Так как распределение в некоторых исследуемых выборках отличалось от нормального, применялись критерии непараметрической статистики. Сравнение средних значений более чем двух групп проведено с помощью H-критерия Краскела-Уоллиса с последующим множественным сравнением с помощью критерия post-hoc сравнения средних рангов [287]. Различия показателей считались статистически значимыми при уровне значимости $\alpha = 1\%$ ($p < 0,05$). Для описания данных использовались такие стандартные статистические показатели как среднее (m), стандартная ошибка среднего (SE), среднеквадратичное отклонение (σ), минимальное и максимальное значения Δ ($\min - \max$). При определении действия двух факторов для сравнения средних значений исследуемых выборок был проведен двухфакторный дисперсионный анализ (two-way ANOVA), а последующее множественное сравнение проведено с помощью LSD-критерия Фишера. Статистический анализ сделан с использованием программы Statistica 8.0 (Stat Soft Inc.).

ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ СОБСТВЕННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ

3.1 Морфофункциональное состояние молочной железы после введения N-метил-N-нитрозомочевины в общей дозе 12 мг/крысу

По данным литературы введение канцерогена N-метил-N-нитрозомочевины приводит к развитию рака молочной железы [133, 288].

В наших исследованиях через 1 и 2 месяца после изолированного введения канцерогена морфология молочной железы не отличается от таковой у животных контрольной группы (Рис. 1).

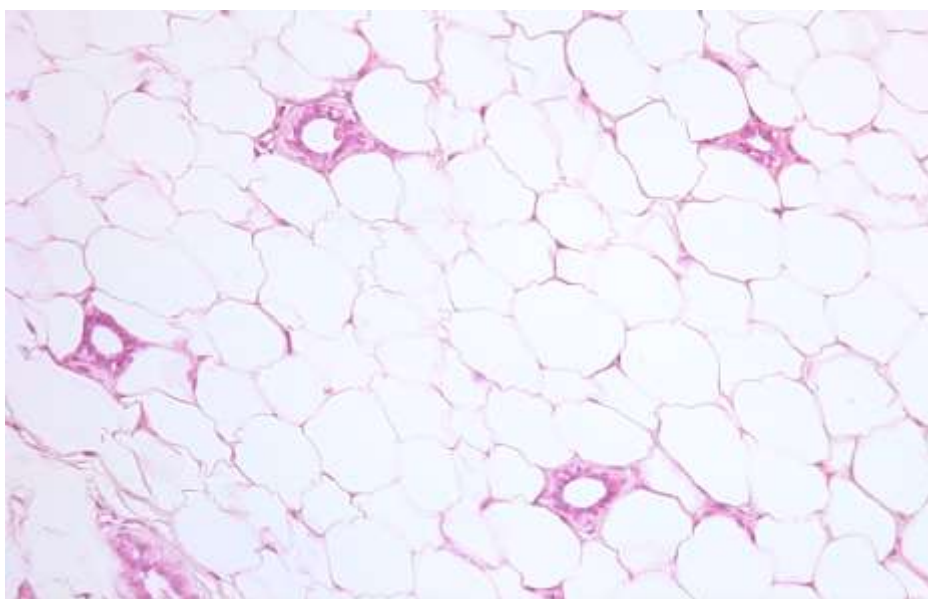


Рисунок 1 - Ткань молочной железы интактной крысы.

Окраска гематоксилином и эозином, Leica DFC. Ув. X200.

Через 3 месяца после изолированного введения канцерогена в молочной железе отмечаются многочисленные солитарные, реже мультифокальные очаги пролиферации долек и протоков. Вокруг пролифератов отмечены избыточные разрастания фиброзной ткани с кровеносными сосудами. В очагах пролиферации отмечаются явления клеточной атипии, характеризующиеся сдвигом ядерно-цитоплазматического отношения в сторону ядра, гиперхромностью или просветлением ядер, дисперсией хроматина, увеличением митотической активности и появлением фигур патологических митозов. В отдельных препаратах степень клеточной

атипии внутри пролифератов долек и протоков соответствовала изменениям, характерным для неинвазивного рака *in situ* (Рис. 2).

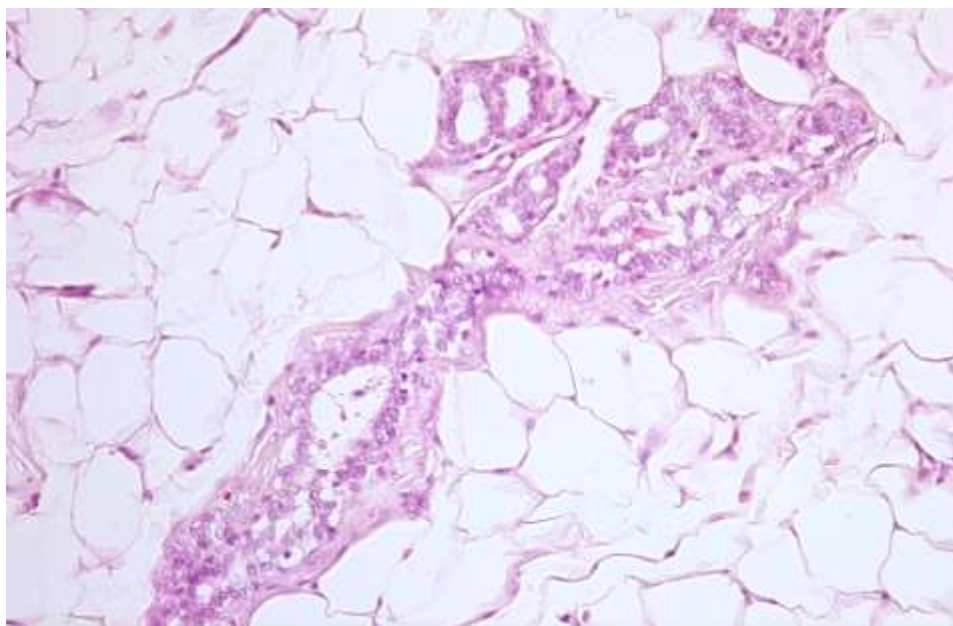


Рисунок 2 - Молочная железа через 3 месяца после окончания введения канцерогена. Выраженная клеточная атипия в пролифератах долек без признаков инвазии и нарушения целостности базальной мембраны пролифератов. Окраска гематоксилином и эозином, Leica DFC. Ув. X200.

Через 1 месяц после окончания сочетанного воздействия морфология молочной железы не отличается от строения у интактных животных и у крыс с изолированным введением канцерогена.

Через 2 месяца в ткани молочной железы крыс отмечаются, преимущественно, мультифокальные пролифераты протоков с перидуктальным фиброзом и очаговой атипией клеток.

Через 3 месяца после окончания сочетанного воздействия морфология очагов неоплазии в молочной железе имеет существенные отличия от группы с изолированным введением канцерогена. Помимо формирования клеточных пролифератов и фиброзирования стромы выявляются фокусы неинвазивного и инвазивного дуктального рака, схожего по морфологии с неспецифическим протоковым раком *low grade* у человека. В очагах неинвазивного рака

отмечаются фокусы внутрипротоковой комедокарциномы, имеющие связь с выводными протоками соска (Рис. 3).

В очагах инвазивного рака отмечается строение, соответствующее неспецифическому раку low grade.

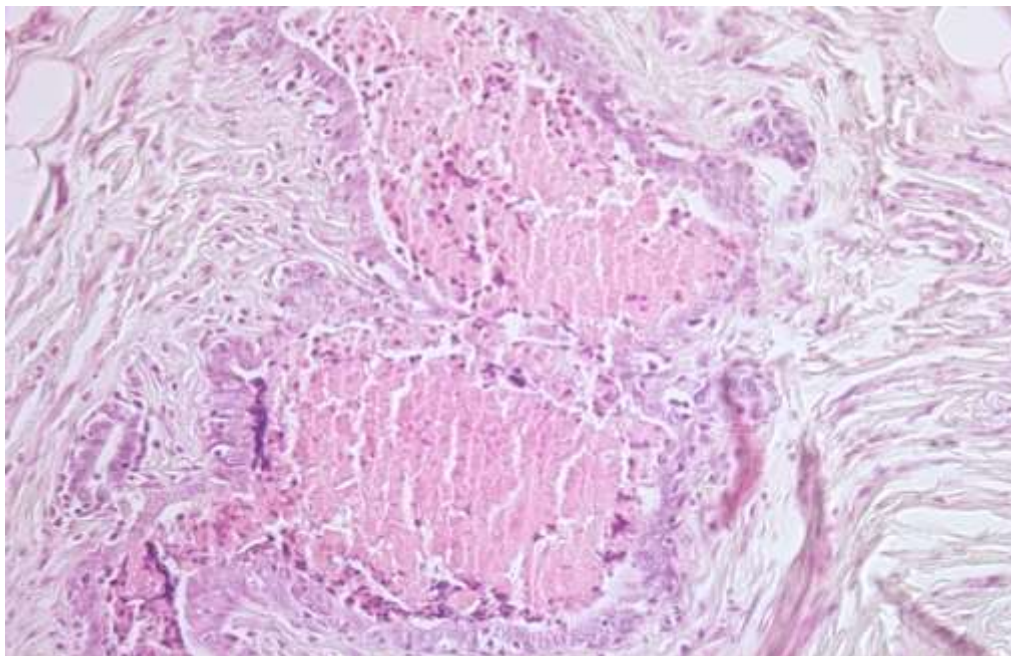


Рисунок 3 - Молочная железа через 3 месяца после сочетанного действия канцерогена и водно-иммобилизационного стресса. Неинвазивная комедокарцинома. Окраска гематоксилином и эозином, Leica DFC. Ув. X200.

Итак, результаты морфологического исследования показали, что при изолированном введении канцерогена изменения с выраженной клеточной атипией, соответствующей признакам неинвазивного рака *in situ*, в ткани молочной железы развиваются только через 3 месяца после окончания воздействия. Сочетанное воздействие двух факторов приводит к более ранним изменениям - очаговая атипия клеток выявляется уже через 2 месяца, а через 3 месяца эти процессы еще более выражены: признаки неинвазивного рака с фокусами внутрипротоковой комедокарциномы и инвазивного рака типа low grade. Стоит отметить, что при воздействии водно-иммобилизационного стресса ткань молочной железы не отличалась от таковой у интактных крыс.

3.2. Морфофункциональное состояние тимуса после введения N-метил-N-нитрозомочевины

3.2.1 Морфофункциональное состояние тимуса через 1 месяц после введения N-метил-N-нитрозомочевины

Через 1 месяц после окончания введения канцерогена масса тимуса по сравнению с интактными животными снижается в 1,6 раза и составляет $153,2 \pm 10,8$ мг.

Гистологические срезы, окрашенные гематоксилином и эозином, не имеют отличий от группы контрольных крыс. В них чаще визуализируются дольки овальной формы, в которых различается светлое мозговое вещество и темное корковое. Более темную окраску корковому веществу придают тесно расположенные в нем клетки небольших размеров с округлым ядром - лимфоциты. Дольки ограничены друг от друга отчетливо видимыми междольковыми септами, которые состоят из соединительной ткани и содержат в себе кровеносные сосуды, проникающие в вещество долек (Рис. 4).

Спустя 1 месяц после введения канцерогена проведенная морфометрия показала увеличение площади мозгового и толщины коркового вещества, которые достоверно возрастают в 3 и 2 раза соответственно по сравнению с группой интактных животных и составляют $1,07 \pm 0,02$ мм² и $0,8 \pm 0,8$ мм.

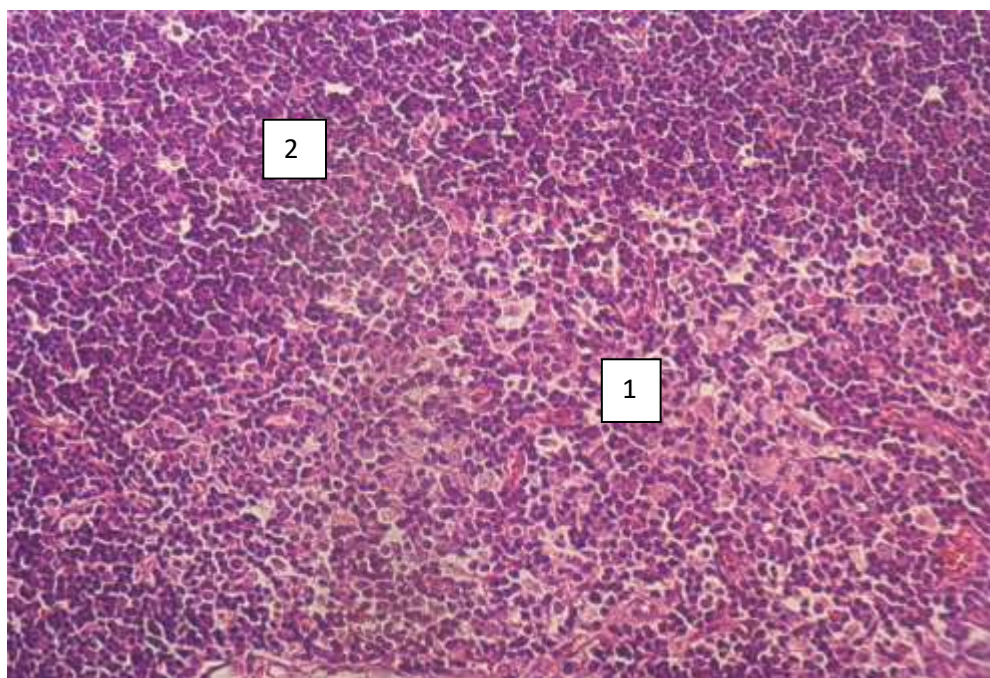


Рисунок 4 - Тимус. Интактная крыса. 1 - мозговое вещество овальной формы; 2 – корковое вещество. Окраска гематоксилином и эозином. Микромед 3 Люм. Ув. X400.

Постановка иммуногистохимических реакций позволила определить клеточный состав дольки тимуса и показала, что клетки кортико-медуллярной зоны дают положительную реакцию на маркер дендритных клеток – белок S-100.

У интактных животных выявляется маркер макрофагов - $CD68^{+}$ клетки, а также реакция к маркеру долгоживущих клеток, ингибитору апоптоза Bcl-2-клеток (Рис. 5), которая отмечается в клетках коркового вещества, кортико-медуллярной зоне и в незначительном количестве - в мозговом веществе.

Иммуногистохимическая окраска к Pan-cytokeratin выявляет эпителиальные клетки. Соотношение этих клеток к площади мозгового вещества составляет 1,33%, к площади коркового вещества 0,79%.

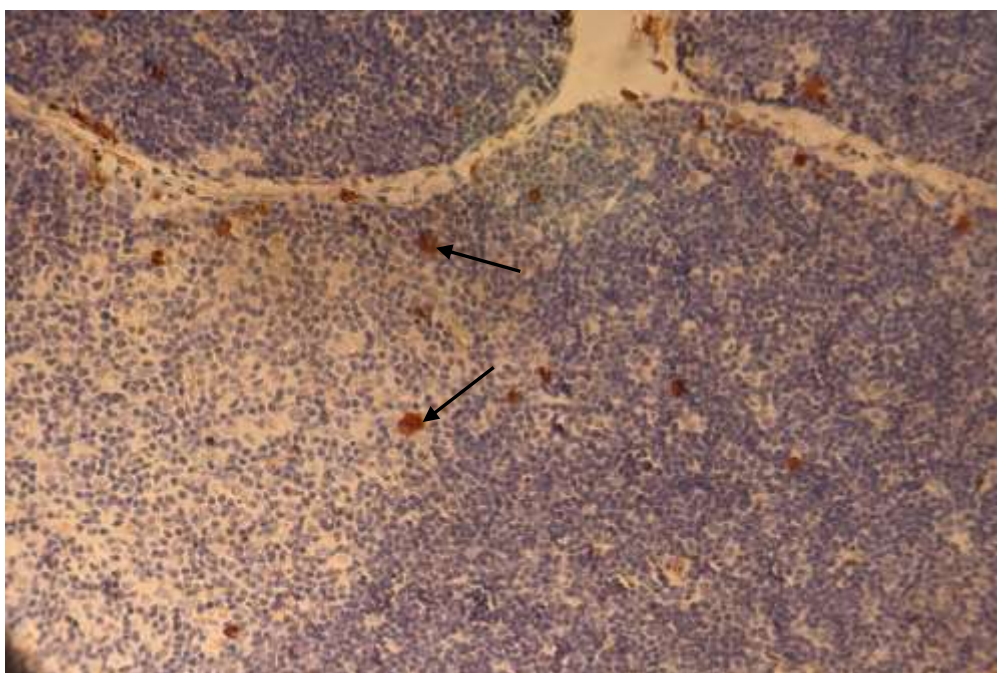


Рисунок 5 - Тимус интактной крысы. Bcl-2⁺ клетки в кортико-медуллярной зоне и корковом веществе. Иммуногистохимическая реакция на белок Bcl-2. Микромед 3 Люм. Ув. X400.

Для выявления зрелых Т-лимфоцитов были использованы антитела к CD3⁺- клеткам. Эти клетки локализуются по всей длине тимуса. Выявлено, что у контрольной группы количество CD3⁺- клеток представлено 35,6% в мозговом веществе и 50% в корковом веществе от общего числа лимфоцитов [175]. Более интенсивная окраска коркового вещества свидетельствует о большем количестве лимфоцитов по сравнению с мозговым веществом.

Спустя месяц после окончания введения N-метил-N-нитрозомочевины иммуногистохимическая картина отличается от таковой у контрольных животных. Так, количество S-100⁺- клеток снижается в мозговом веществе в 2 раза, а в кортико-медуллярной зоне почти в 3 раза (Рис. 6).

Количество CD68⁺ клеток достоверно снижается в зоне и коркового, и мозгового вещества в 4,5 и в 3,6 раза соответственно.

Число Bcl-2⁺ клеток в мозговом веществе снижается в 1,8 раз, при этом в корковом веществе их количество возрастает в 1,6 раза (Рис. 7).

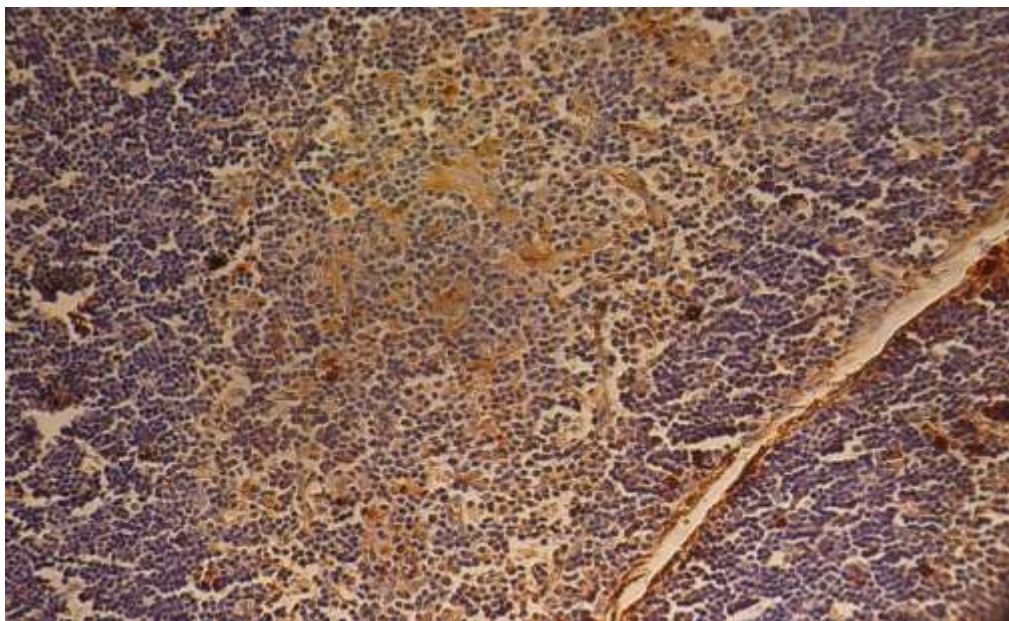


Рисунок 6 -Тимус. 1 месяц после окончания введения N-метил-N-нитрозомочевины. Увеличение количества S-100⁺ клеток в мозговом веществе тимуса. Иммуногистохимическая реакция на белок S-100. Микромед 3 Люм. Ув. X400.

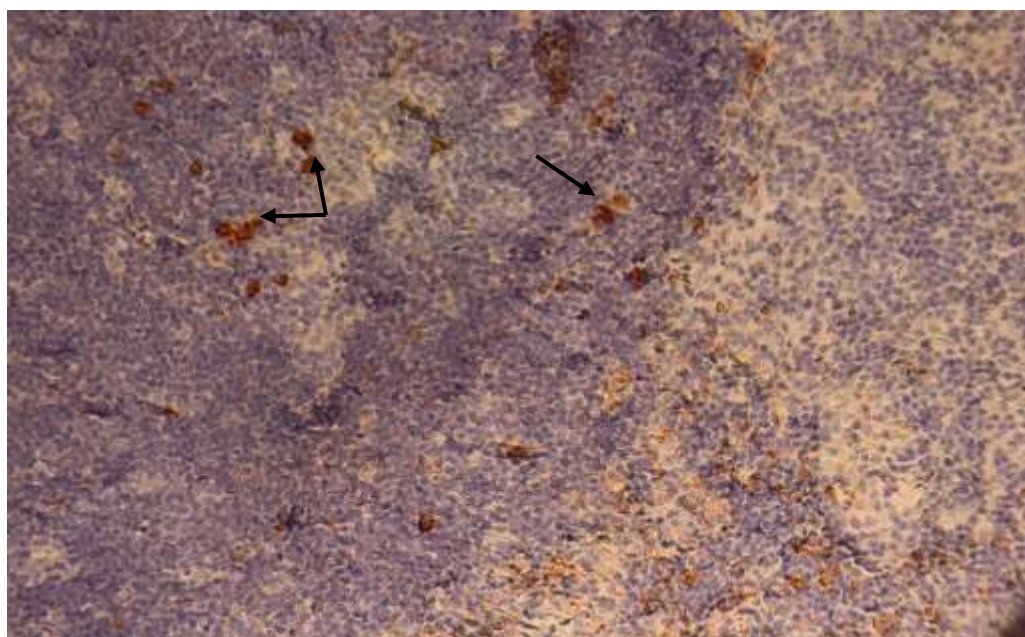


Рисунок 7 - Тимус. 1 месяц после окончания введения N-метил-N-нитрозомочевины. Увеличение Bcl-2⁺ клеток в корковом веществе. Иммуногистохимическая реакция на белок Bcl-2. Микромед 3 Люм. Ув. X400.

Число $CD3^+$ клеток достоверно увеличивается почти в 1,5 раза и в корковом (занимают $65,17 \pm 1,45\%$ всей площади), и в мозговом веществе ($52,5 \pm 1,2\%$ площади вещества дольки) (Рис. 8).

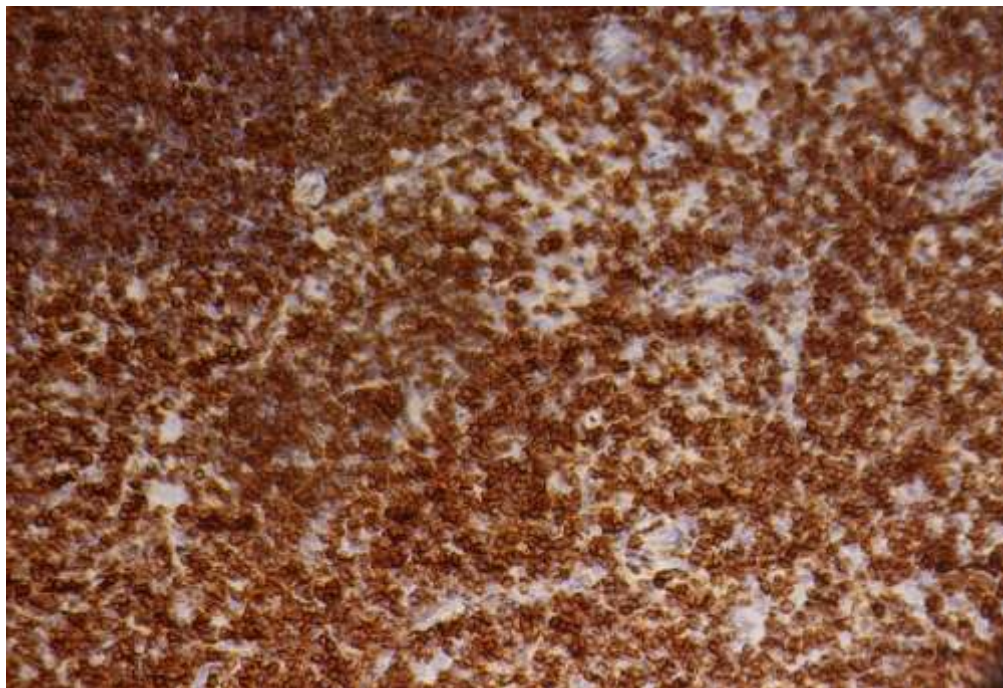


Рисунок 8 - Тимус. 1 месяц после окончания введения введения N-метил-N-нитрозомочевина. Увеличение числа $CD3^+$ клеток в мозговом и корковом веществе дольки. Иммуногистохимическая реакция на CD3. Микромед 3 Люм. Ув. X400.

Люминесцентно-гистохимические методы исследования показали, что через 1 месяц после введения канцерогена явные изменения в строении долек органа отсутствуют. Обнаруживаются дольки разной формы, с хорошо различимой границей между корковым и мозговым веществом. С помощью флюоресцентно-гистохимического метода Фалька-Хиларпа выявлены участки коркового и мозгового вещества желто-зеленого свечения. Подобное свечение органа свидетельствует о содержании в паренхиме долек таких моноаминов, как катехоламины и серотонин. Окраска срезов тимуса флюоресцентно-гистохимическим методом Кросса-Эвена-Роста позволяет обнаружить зеленое свечение паренхимы органа, которое определено

содержанием в ней гистамина. При люминесцентной микроскопии мозговое вещество тимических долек имеет более темную окраску по сравнению с корковым (Рис. 9).

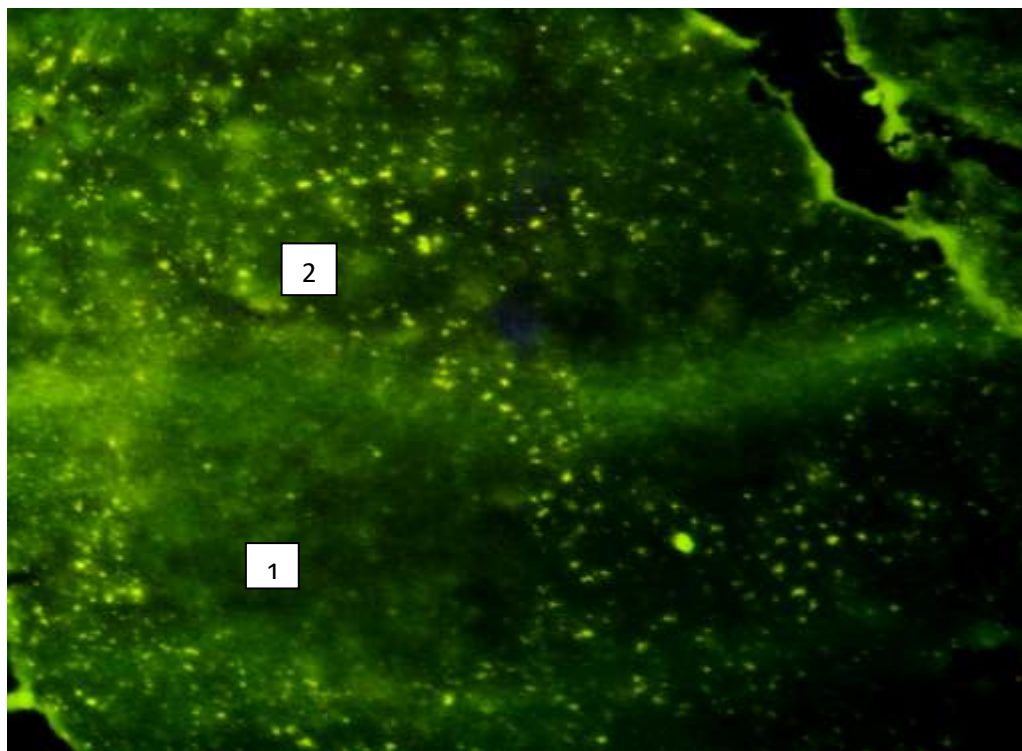


Рисунок 9 - Тимус. Интактная крыса. Клетки премедуллярной зоны окружают мозговое вещество округлой формы. Метод Фалька-Хилларпа. 1- мозговое вещество дольки; 2- корковое вещество дольки. Микромед 3 Люм. Ув. X100.

В ткани тимуса обнаруживаются флюоресцирующие гранулярные клетки, располагающиеся в премедуллярной и субкапсулярной зонах и тучные клетки. Премедуллярные клетки располагаются в один или в несколько рядов на границе коркового и мозгового вещества [176]. Это крупные клетки овальной или полигональной формы, в их цитоплазме содержатся гранулы с ярко-желтым или желто-оранжевым свечением. В корковом веществе диффузно располагаются меньших размеров субкапсулярные клетки желто-зеленого свечения. Единично или небольшими скоплениями тучные клетки располагаются по периферии коркового вещества на границе между

тимическими дольками. При люминесцентной микроскопии они визуализируются как клетки овальной формы, в их цитоплазме располагаются гранулы желтого свечения и не люминисцирующее ядро.

Через 1 месяц после введения канцерогена общее количество люминесцирующих гранулярных клеток увеличивается в 1,5 раза по сравнению с интактными животными. Клетки некрупные, но яркие и образуют скопления.

При измерении флюоресценции можно выявить, что гранулярные и Т-клетки коркового и мозгового вещества содержат серотонин, гистамин, катехоламины.

Введение N-метил-N-нитрозомочевина сопровождается изменением содержания биогенных аминов в структурах тимуса (Табл. 1).

Таблица 1. Интенсивность люминесценции биогенных аминов (у.е.) в структурах тимуса у интактных крыс и через 1 месяц после введения канцерогена.

Структуры тимуса	интактные крысы			1 месяц после введения канцерогена		
	СТ	ГСТ	КА	СТ	ГСТ	КА
Премедулярные клетки (ПМК)	5,384± 0,4	3,829± 0,3	0,689± 0,05	2,334± 0,2*	4,872± 0,5	0,579± 0,04*
Субкапсулярные клетки (СКК)	1,858± 0,17	1,42± 0,2	0,371± 0,01	1,005± 0,06*	2,127± 0,2*	0,245± 0,008*
Т-лимфоциты коркового вещества	1,596± 0,17	1,493± 0,09	0,485± 0,028	0,991± 0,06*	1,798± 0,11*	0,37± 0,04*
Т-лимфоциты мозгового вещества	0,857± 0,07	1,375± 0,14	0,261± 0,07	0,611± 0,043*	2,984± 0,41*	0,243± 0,06*
Тучные клетки (ТК)	2,234± 0,01	1,481± 0,17	0,45± 0,01	2,183± 0,01*	1,596± 0,01*	0,41± 0,003*
Т-лимфоциты микроокружения ТК	1,347± 0,06	1,189± 0,12	0,304± 0,03	1,159± 0,03	1,293± 0,02*	0,222± 0,01*

Достоверные отличия определялись от данных интактных крыс при * - $p \leq 0,05$ (two-way ANOVA).

Как видно из таблицы, в премедуллярных клетках содержание серотонина после введения канцерогена снижается в 2,3 раза по сравнению с интактными. Уровень гистамина, напротив, увеличивается в 1,3 раза. Уровень серотонина в субкапсулярных клетках после введения канцерогена снижается в 1,8 раза, а содержание гистамина достоверно увеличивается в 1,5 раза.

Описанные изменения в содержании биогенных аминов люминесцирующих гранулярных клеток оказывает влияние на содержание биоаминов в Т-клетках коркового и мозгового вещества. Так, наблюдается достоверное снижение уровня серотонина в Т-лимфоцитах коркового и мозгового вещества в 1,5 и 1,4 раза соответственно и достоверное увеличение гистамина в лимфоцитах мозгового вещества в 2,2 раза.

Известно, что функциональная активность структур тимуса зависит не только от содержания самих биогенных аминов, но и от их соотношения. Для определения показателя функциональной активности нами была использована формула $(СТ+ГСТ)/КА$. В ранее проводимых на нашей кафедре экспериментах было определено, что увеличение этого соотношения свидетельствует об угнетении функциональной активности клеток органа, а снижение, напротив, о повышении активности клеточных элементов тимуса. Если у интактных крыс этот показатель в премедуллярных и субкапсулярных клетках составил $13,3 \pm 0,4$ и $8,83 \pm 0,03$, то после введения канцерогена данное соотношение увеличилось в субкапсулярных клетках в 1,4 раза и составило $12,7 \pm 0,16$ (Рис. 10). В Т-лимфоцитах коркового и мозгового вещества после введения канцерогена данное соотношение также увеличивается по сравнению с интактными животными в 1,2 и 1,7 раз соответственно.

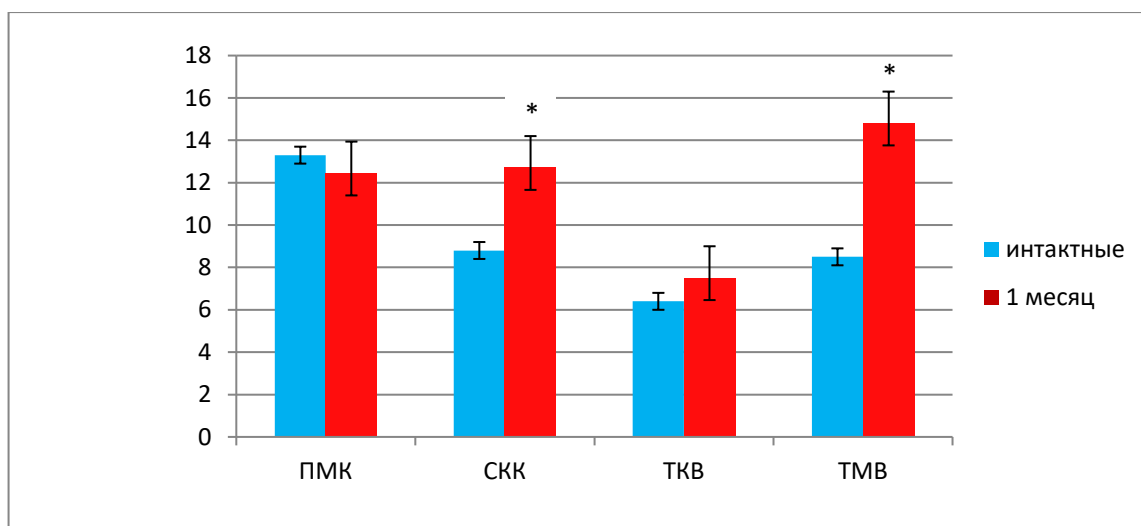


Рисунок 10 - Соотношение (СТ+ГСТ)/КА в биоаминсодержащих структурах тимуса у интактных крыс и через 1 месяц после введения N-метил-N-нитрозомочевины (two-way ANOVA), ($p \leq 0,05$).

При окраске срезов полихромным толуидиновым синим по методу Унна у крыс контрольной группы тучные клетки в рыхлой волокнистой соединительной ткани, в междольковых промежутках и по периферии долек определяются в минимальном количестве (Рис. 11).

По степени дегрануляции преобладают недегранулированные Т-0 и слабодегранулированные Т-1 клетки, их процентное отношение составило 40% и 30% соответственно, на долю дегранулированных Т-2 – 16% и полностью опустошенных тучных клеток приходится 14% (Рис. 12). Индекс дегрануляции тучных клеток составил 0,9.

После введения N-метил-N-нитрозомочевины отмечается незначительное увеличение количества тучных клеток в междольковых промежутках, они располагаются группами. Отмечается преобладание дегранулированных Т-2 клеток - 34% и полностью опустошенных Т-3 - 25% по сравнению с интактными животными, индекс дегрануляции увеличивается и составляет 1,58 (Рис. 13, 14).

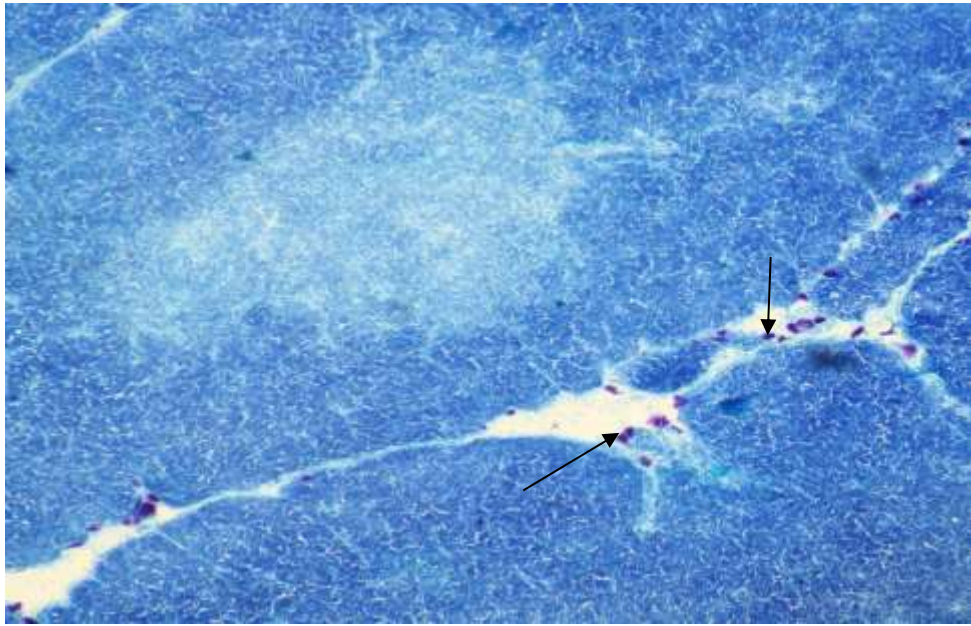


Рисунок 11 - Тимус. Интактная крыса. Тучные клетки в междольковых промежутках. Преобладание недегранулированных форм. Окраска полихромным толуидиновым синим по Унна. МИКРОМЕД 3 ЛЮМ. Ув. X100.

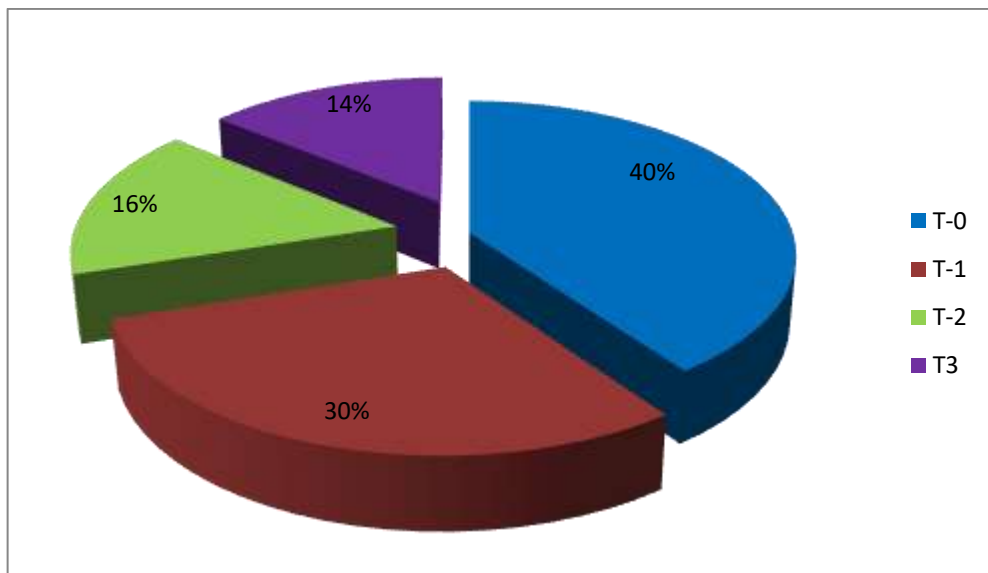


Рисунок 12 - Процентное содержание тучных клеток в тимусе у интактных крыс в зависимости от степени их дегрануляции.

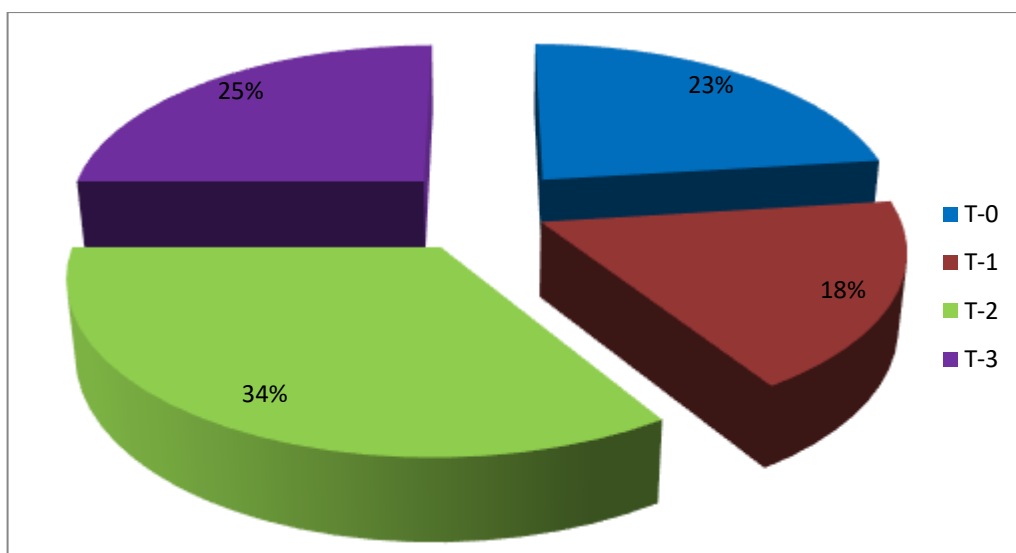
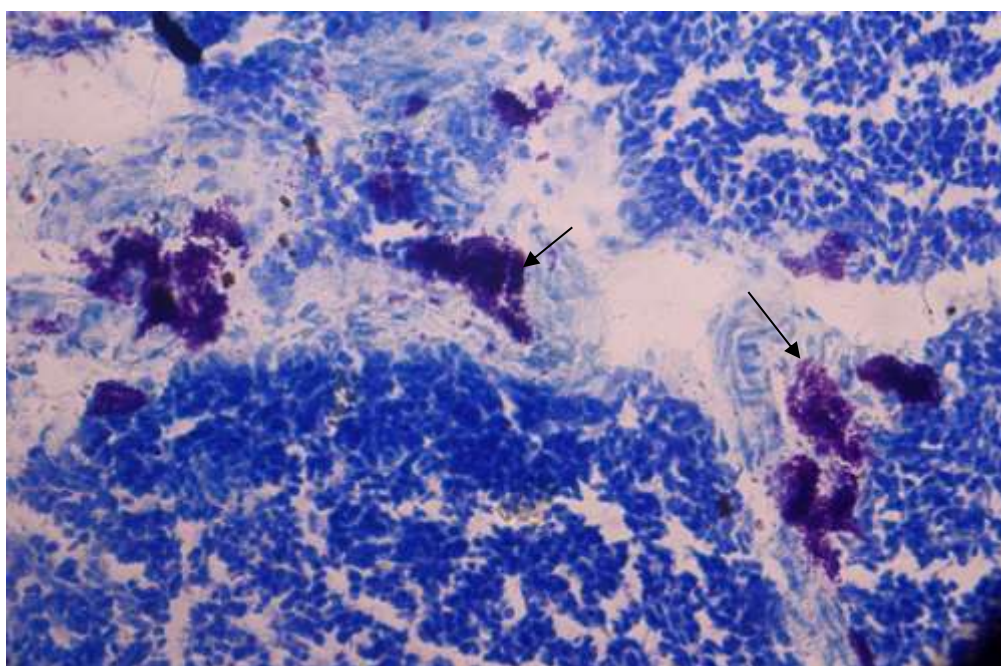


Рисунок 13 - Процентное содержание разных форм тучных клеток в тимусе через 1 месяц после введения канцерогена.



**Рисунок 14 - Тимус. 1 месяц после введения канцерогена.
Преобладание дегранулированных форм тучных клеток.
Окраска полихромным толуидиновым синим по Унна.
Микромед 3 Люм.Ув. X600.**

Таким образом, через 1 месяц после изолированного введения N-метил-N-нитрозомочевины масса органа становится меньше в 1,6 раза. Площадь

мозгового и толщина коркового вещества увеличивается в 3 и 2 раза соответственно.

Клетки мозгового вещества и премедуллярной зоны дают позитивную реакцию на белок S-100, его количество снижается в мозговом веществе в 2 раза, в кортико-медуллярной зоне – в 3 раза по сравнению с интактной группой. Количество CD68⁺ клеток снижается в зоне коркового и мозгового вещества в 4,5 и в 3,6 раза соответственно.

Количество люминесцирующих гранулярных клеток возрастает в 1,5 раза. Начинает изменяться уровень биогенных аминов, более выраженный в клетках премедуллярной зоны. Соотношение (СТ+ГСТ)/КА в клетках субкапсулярной зоны, в Т-клетках коркового и мозгового вещества свидетельствует об угнетении функциональной активности клеточных элементов.

3.2.2 Морфофункциональное состояние тимуса через 2 месяца после введения канцерогена

Окрашивание срезов тимуса гематоксилином и эозином помогает выявить дольки тимуса многогональной формы, между которыми расположены соединительнотканые перегородки. На этом сроке исследования макроскопически визуализируется увеличение междольковых промежутков. В некоторых препаратах промежутки заполнены жировой и соединительной тканью.

Среднее значение массы тимуса составляет $171,2 \pm 13,54$ мг, что выше на 11% по сравнению с предыдущим сроком.

Площадь мозгового вещества по сравнению с интактными животными и предыдущим сроком практически не изменяется. Толщина коркового вещества уменьшается в 1,6 раза по сравнению с предыдущим сроком исследования (Рис. 15).

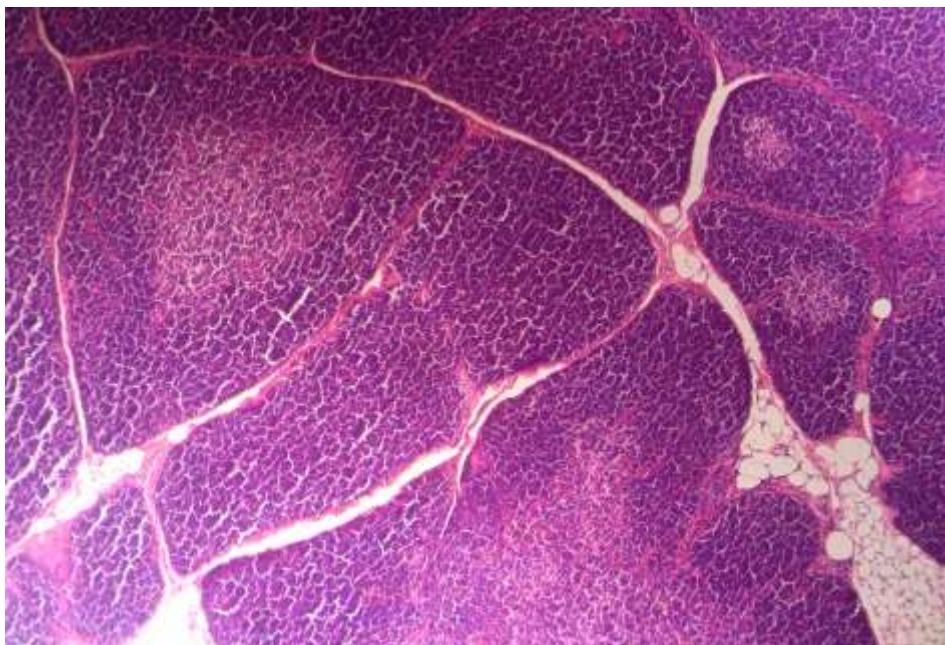


Рисунок 15 - Тимус. 2 месяца после окончания введения канцерогена.

Дольки треугольной и полигональной формы, мозговое вещество округлой формы, неравномерно увеличенные междольковые промежутки. Окраска гематоксилином и эозином.

Микромед 3 Люм. Ув. X100.

Число $CD3^+$ клеток по сравнению с первым месяцем достоверно снижается в корковом веществе почти в 2 раза, в мозговом - в 1,4 раза.

С увеличением срока наблюдения число $S-100^+$ клеток увеличивается наиболее достоверно в 1,7 раза в мозговом веществе, однако не достигает показателей группы контроля.

Количество $Bcl-2^+$, $CD68^+$ клеток превышает количество таковых у животных предыдущего срока исследования (Табл. 2).

Число $CD68^+$ в корковом веществе снижается в 1,7 раз, а в мозговом возрастает в 1,4 раза по сравнению с интактными крысами. По сравнению с предыдущим сроком исследования их число в корковом и в мозговом веществе возрастает в 2,7 и в 5 раз соответственно.

Таблица 2. Экспрессия Bcl-2, CD68, Pan-cytocera^{tin} в структурах тимуса у интактных крыс, через 1 и 2 месяца после введения канцерогена.

Группы	Bcl-2 ⁺ ,%		CD68 ⁺ ,%		Pan-cytocera ^{tin} ⁺ ,%	
	Корковое вещество	Мозговое вещество	Корковое вещество	Мозговое вещество	Корковое вещество	Мозговое вещество
Интактные животные	1,37	2,23	3,03	2,45	0,79	1,33
Введение канцерогена, 1 месяц	2,209	1,298*	0,66*	0,68*	0,77	2,27*
Введение канцерогена, 2 месяца	15,3*	3,83*	1,77*	3,463*	3,42*	6,7*

Достоверные отличия определялись от данных интактных крыс при * - $p \leq 0,05$ (two-way ANOVA).

Наиболее достоверное увеличение показателя происходит среди Bcl-2⁺ клеток, их количество в корковом веществе возрастает и по сравнению с контролем, и с предыдущим сроком исследования (Рис. 16).

Количество Pan-cytocera^{tin}⁺ клеток в мозговом веществе в 5 раз превышает данные контрольной группы и показатели животных предыдущего срока эксперимента, возрастая в мозговом веществе в 3 раза, в корковом веществе - в 4,4 раза.



Рисунок 16 -Тимус. 2 месяца после окончания введения канцерогена.

Увеличение Bcl-2⁺ клеток в мозговом веществе.

Иммуногистохимическая реакция на белок Bcl-2. Микромед 3 Люм.

Ув. X400.

При люминесцентной микроскопии структура долек исследованных животных сходна со структурой долек тимуса у интактных крыс. Форма тимических долек овальная, граница между корковым и мозговым веществом образована ЛГК, расположенными неравномерно со слабо различной границей. В корковом веществе эти клетки имеют различный размер, образуют скопления и неравномерно распределены. Мозговое вещество преимущественно имеет овальную и иногда округлую форму (Рис. 17).

При исследовании уровня биогенных аминов в структурах тимуса преимущественно отмечается их снижение. Так, уровень гистамина в премедуллярных клетках снижается в 1,8 раза, в Т-лимфоцитах мозгового вещества - в 1,5 раза, в тучных клетках - в 1,2 раза.

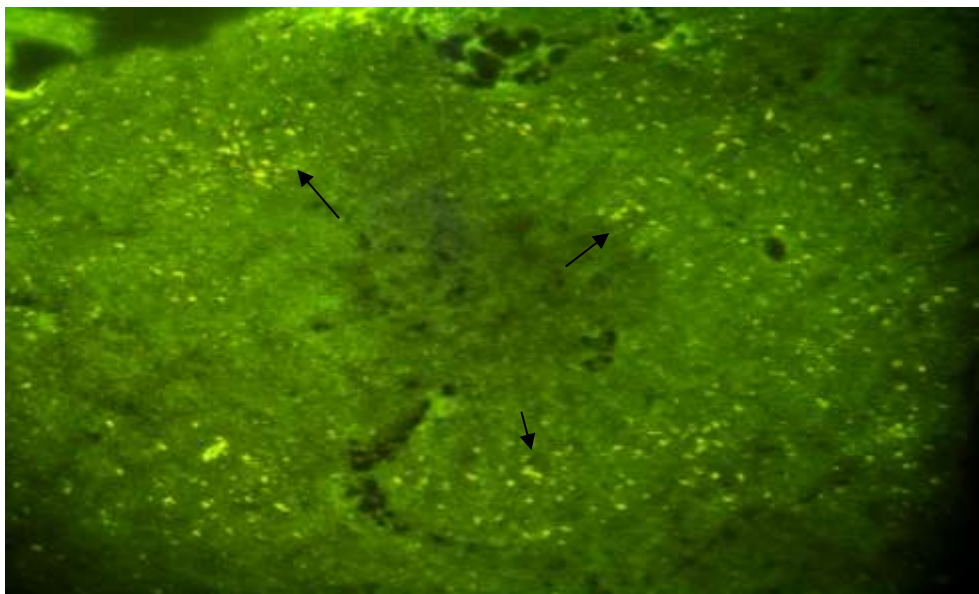


Рисунок 17 - Тимус. 2 месяца после окончания введения канцерогена. Стрелками обозначены клетки премедуллярной зоны, окружающие мозговое вещество. Метод Кросса. Микромед 3 Люм. Ув. X100.

Содержание катехоламинов в клетках премедуллярной и субкапсулярной зонах достоверно увеличивается в 1,5 и в 3 раза соответственно, в Т-лимфоцитах мозгового вещества – в 2 раза по сравнению с интактными. Уровень серотонина достоверно снижается в премедуллярных и в тучных клетках в 1,8 раза, в Т-клетках коркового вещества - в 2,2 раза.

По сравнению с предыдущим сроком в структурах тимуса происходит достоверное увеличение уровня серотонина и катехоламинов и достоверное снижение гистамина. Так, в премедуллярных клетках серотонин и катехоламины увеличиваются в 1,3 и 1,7 раз соответственно (Рис. 18), в субкапсулярных клетках серотонин - в 1,6, катехоламины - в 4,5 раза (Рис. 19). В Т-лимфоцитах мозгового вещества уровень серотонина возрастает в 1,2 раза, а катехоламинов - в 2,2 раза. Уровень гистамина достоверно снижается по сравнению с предыдущим сроком во всех структурах тимуса.

В лимфоцитах коркового вещества снижается уровень серотонина в 1,4 раза по сравнению с предыдущим сроком.

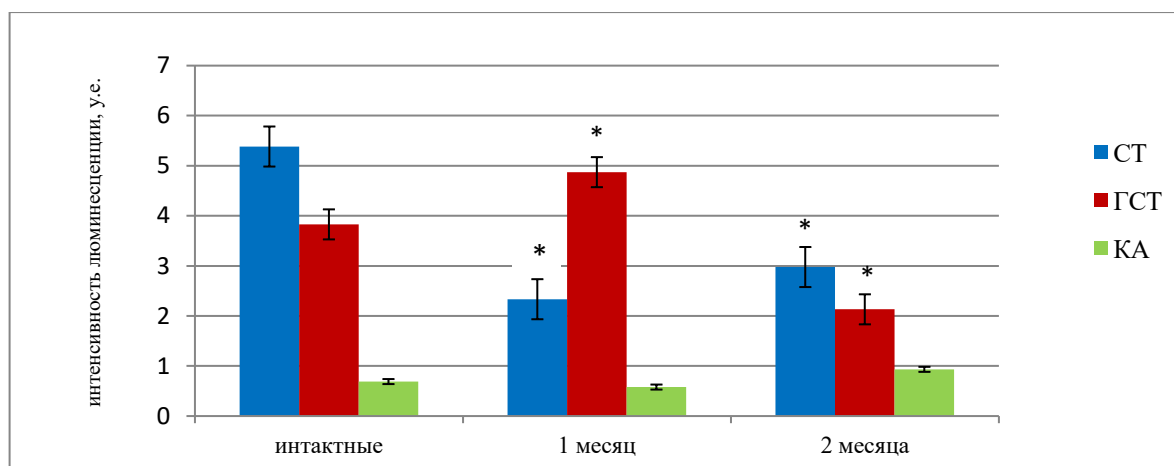


Рисунок 18 - Интенсивность люминесценции биогенных аминов (у.е.) в премедуллярных клетках у интактных крыс, через 1 и 2 месяца после введения канцерогена (two-way ANOVA), ($p \leq 0,05$).

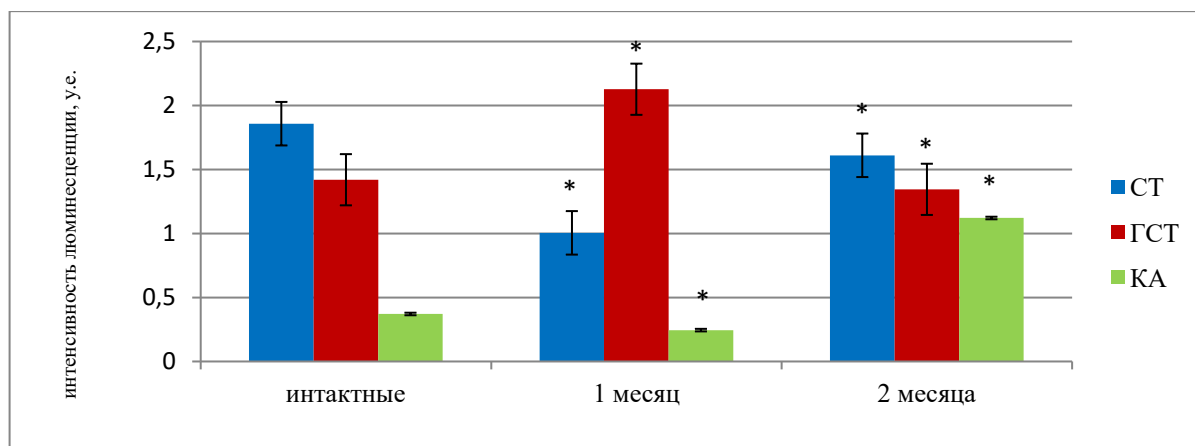


Рисунок 19 - Интенсивность люминесценции биогенных аминов (у.е.) в субкапсулярных клетках у интактных крыс, через 1 и 2 месяца после введения канцерогена (two-way ANOVA), ($p \leq 0,05$).

Уровень биогенных аминов в тучных клетках и их микроокружении через 2 месяца после введения канцерогена ниже по сравнению с предыдущим сроком, так уровень серотонина и гистамина достоверно снижен в 1,7 и 1,3 раза (Рис. 20).

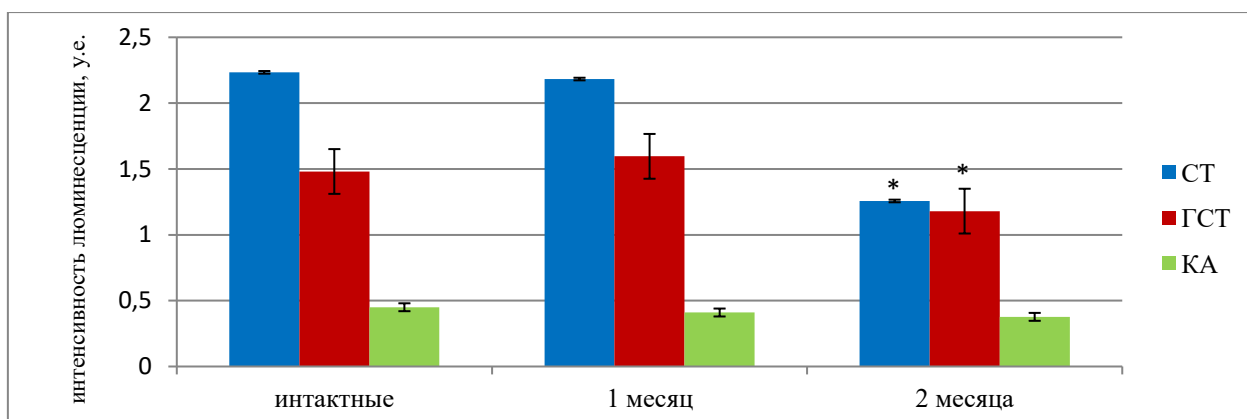


Рисунок 20 - Интенсивность люминесценции биогенных аминов (у.е.) в тучных клетках у интактных крыс, через 1 и 2 месяца после окончания введения канцерогена (two-way ANOVA), ($p \leq 0,05$).

Соотношение (СТ+ГСТ)/КА в лимфоцитах клеток коркового вещества возрастает в 1,8 раза, в премедуллярных клетках это соотношение снижается в 2,6 раза, в субкапсулярных клетках и Т - клетках мозгового вещества достоверно снижается в 3,4 и в 3 раза соответственно.

По сравнению с предыдущим сроком, соотношение (СТ+ГСТ)/КА снижается во всех структурах, кроме Т-клеток коркового вещества (Табл. 3).

При окраске гистологических срезов по Унна общее количество тучных клеток в полях зрения незначительно превышает количество в предыдущей группе и группе интактных крыс.

Преобладающее число клеток по степени дегрануляции представлено дегранулированными формами Т-2 -29% и полностью опустошенными клетками Т-3 – 35% (Рис. 21). При этом индекс дегрануляции возрастает в 2 раза по сравнению с интактными животными, и незначительно превышает показатель предыдущей группы, составляя 1,8.

Таблица 3. Соотношение (серотонин+гистамин)/катехоламины у интактных крыс, через 1 и 2 месяца после введения канцерогена.

Клетки	интактные	После введения канцерогена	
		1 месяц	2 месяца
ПМК	13,3±0,03	14,85±1,5	5,14±1,1
СКК	8,83±0,24	11,58±0,7*	2,63±0,5*
ТКВ	6,36±1,07	12,51±1,04*	11,38±1,1*
ТМВ	8,55±0,8	17,15±0,6*	3,13±0,4*
ТК	8,25±0,67	10,02±0,4	6,46±0,6*
М/О ТК	8,34±0,4	9,96±0,6	7,86±0,5

Достоверные отличия определялись от данных интактных крыс при * - $p \leq 0,05$ (two-way ANOVA).

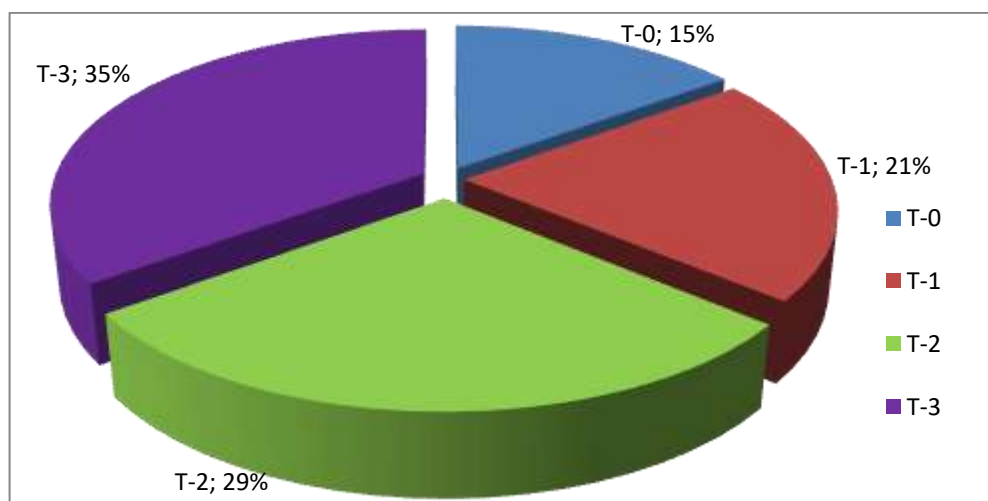


Рисунок 21 - Процентное содержание разных форм тучных клеток через 2 месяца после введения канцерогена.

Итак, через 2 месяца наблюдаются выраженные изменения и со стороны структуры тимусных долек, и значительные изменения клеточного состава в корковом и в мозговом веществе.

3.2.3 Морфофункциональное состояние тимуса крыс через 3 месяца после введения N-метил-N-нитрозомочевины

В морфологической картине тимуса через 3 месяца после введения канцерогена видны изменения по сравнению с предыдущим сроком наблюдения. Встречаются крупные дольки вытянутой, веретенообразной формы. Увеличиваются междольковые промежутки. Мозговое вещество разной величины, его контуры имеют неровные очертания (Рис. 22). При морфометрии выявлено, что в динамике площадь мозгового вещества достоверно уменьшается почти в 1,6 раза (Рис. 23). Толщина коркового вещества приближается к данным предыдущего срока. Однако, остается выше показателей интактных крыс.

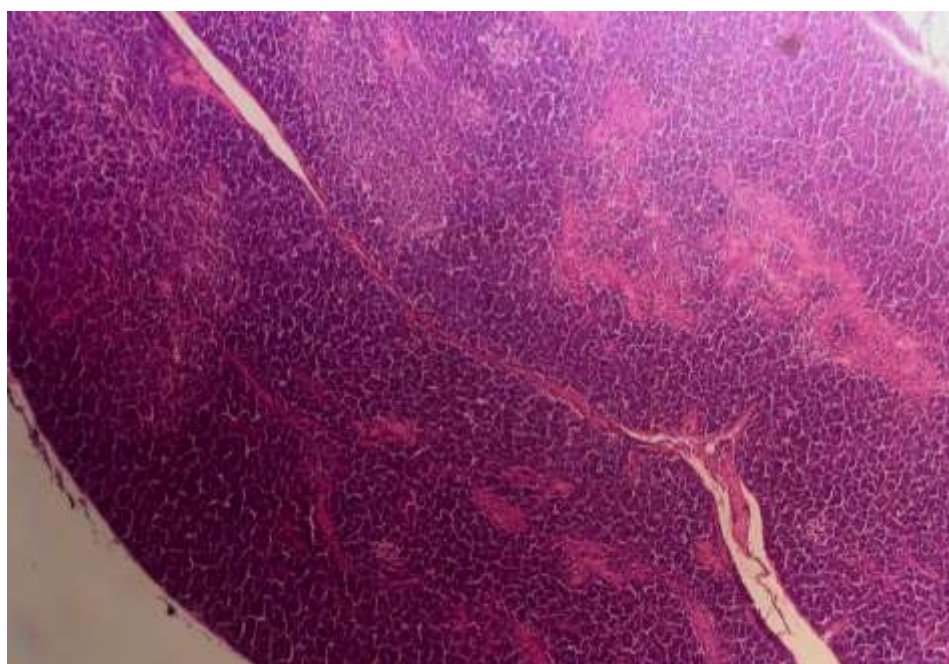


Рисунок 22 -Тимус. 3 месяца после окончания введения N-метил-N-нитрозомочевины. Веретенообразные дольки, неравномерно увеличенные междольковые промежутки.

Окраска гематоксилином и эозином. Микромед 3 Люм. Ув. X100.

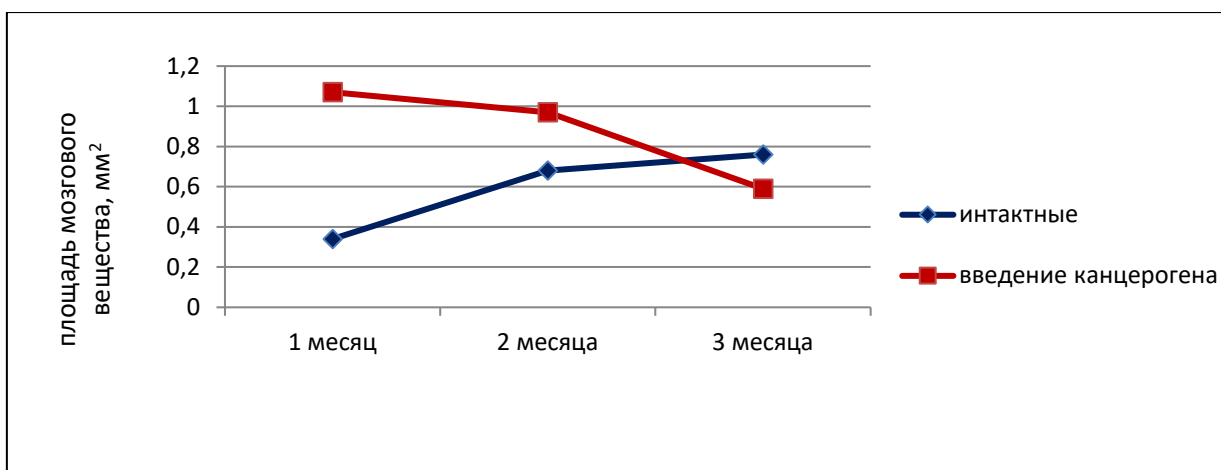


Рисунок 23 - Изменение площади мозгового вещества тимуса у интактных крыс и после введения канцерогена.

Масса тимуса – $183,3 \pm 14,4$ мг. Стоит отметить, что масса тимуса в динамике возрастает на 7%, но не достигает показателей контрольной группы (Табл. 4).

Таблица 4. Динамика изменения массы тимуса у интактных крыс и через 1, 2 и 3 месяца после окончания введения канцерогена.

группы крыс	интактная	введение канцерогена		
		1 месяц	2 месяца	3 месяца
Масса тимуса, мг	$243,5 \pm 10,5$	$153,2 \pm 10,8^*$	$171,2 \pm 13,54^*$	$183,3 \pm 14,2$

Достоверность при сравнении с интактной группой животных * - $p \leq 0,05$ (two-way ANOVA).

Результаты иммуногистохимического исследования показали, что в динамике почти вдвое возрастает по всему веществу дольки количество S-100⁺ клеток. Однако, по сравнению с интактными животными, уровень этих клеток в кортико-медуллярной зоне незначительно снижен (Рис. 24).

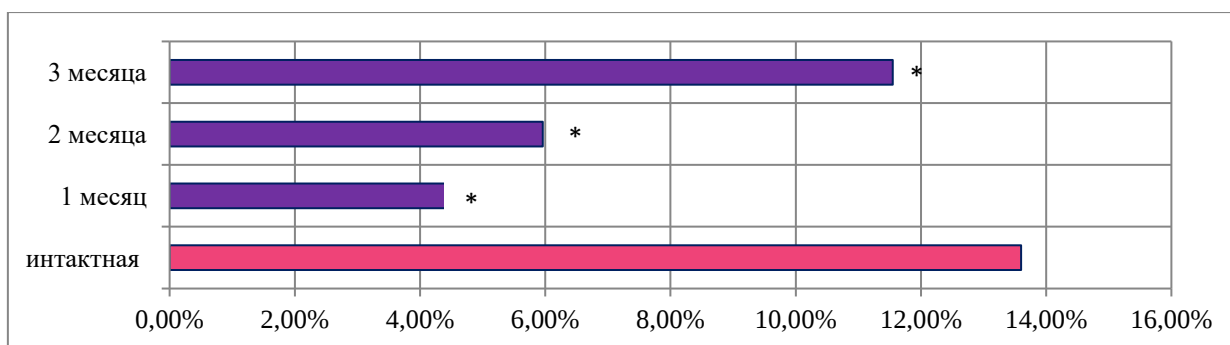


Рисунок 24 - Экспрессия S-100 в кортико-медуллярной зоне у интактных крыс и после введения канцерогена. Возрастаение количества S-100⁺ клеток с увеличением срока исследования (two-way ANOVA), ($p \leq 0,05$).

Количество Bcl-2⁺ клеток в мозговом веществе в 2 раза меньше по сравнению с предыдущим сроком исследования и незначительно снижено по сравнению с интактными животными (Рис. 25).

Уровень CD3⁺ клеток в мозговом веществе увеличивается почти в 1,2 раза по сравнению с интактными животными и незначительно превышает данные предыдущего срока.

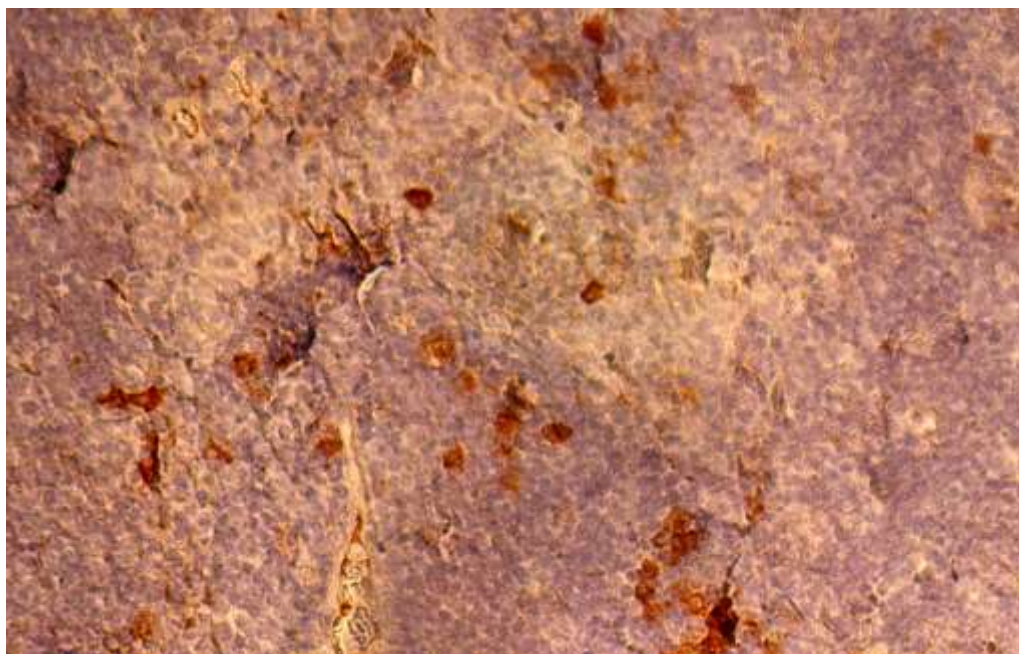


Рисунок 25 - Тимус 3 месяца после окончания введения N-метил-N-нитрозомочевина. Снижение количества Bcl-2⁺ клеток в мозговом веществе. Иммуногистохимическая реакция на белок Bcl-2. Микромед 3 Люм. Ув. X400.

Количество CD 68⁺ клеток возрастает в корковом веществе в 1,5 раза по сравнению с интактными животными и в 2 раза по сравнению с предыдущим сроком исследования.

Pan-cytokeratin⁺ клетки составляют 8,8% в мозговом веществе долек тимуса, что в 6 раз превышает этот показатель у интактных крыс и в 1,3 раза у крыс предыдущего срока (Рис. 26).

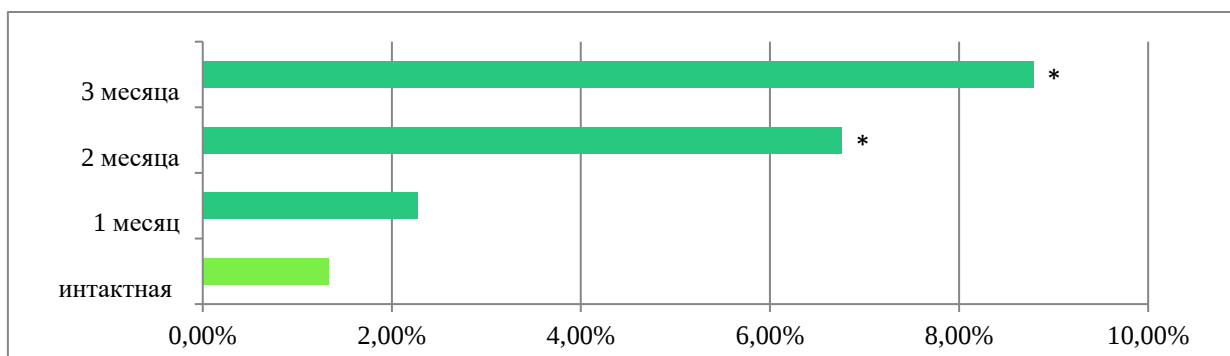


Рисунок 26 - Экспрессия Pan-cytokeratin в клетках мозгового вещества у интактных крыс и после введения канцерогена.

Отмечено возрастание количества Pan-cytokeratin⁺ клеток с увеличением срока исследования (two-way ANOVA), ($p \leq 0,05$).

При обработке срезов методами Фалька и Кросса обнаруживается мозговое вещество разной формы и размеров. Визуализируются люминесцирующие клетки, среди которых встречаются крупные единичные или в виде небольших скоплений клетки премедулярной зоны. Однако яркость свечения клеток не во всех случаях соответствует данным содержания биогенных аминов.

На этом сроке исследования при люминесцентной микроскопии выявляются как крупные премедулярные клетки, так и меньших размеров разной степени интенсивности люминесценции.

При исследовании содержания биогенных аминов по сравнению с интактными животными в люминесцирующих гранулярных клетках обнаруживается достоверное снижение уровня серотонина и катехоламинов,

наиболее выраженное в клетках коркового вещества, где уровень серотонина снижается в 1,6 раза, катехоламинов – в 2,6 раза. Уровень гистамина, напротив, возрастает в клетках коркового вещества - в 1,7 раза, в премедуллярных и субкапсулярных клетках – в 2 и в 3,2 раза соответственно.

По сравнению с предыдущим сроком уровень гистамина увеличивается: в клетках премедуллярной зоны - в 3,5 раза, в клетках субкапсулярной зоны - в 3,4 раза, в Т- клетках коркового вещества и в тучных клетках – в 1,8 и 1,5 раза соответственно (Табл. 5).

Соотношение (СТ+ГСТ)/КА во всех структурах, кроме лимфоцитов мозгового вещества, возрастает. В премедуллярных и субкапсулярных клетках в 1,4 и в 2,2 раза соответственно, клетках коркового вещества - в 3 раза (Рис. 27).

Таблица 5. Уровень биогенных аминов в структурах клеток тимуса у интактных крыс, через 1, 2 и 3 месяца после введения канцерогена.

структуры		Интактные	1 месяц после введения МНМ	2 месяца после введения МНМ	3 месяца после введения МНМ
ПМК	СТ	5,384±0,4	2,334 ± 0,2	2,977 ± 0,02*	4,2 ± 0,16*
	ГСТ	3,829±0,3	4,872 ± 0,5	2,132 ± 0,17*	7,44 ± 0,74*
	КА	0,689±0,05	0,579 ± 0,04	0,993 ± 0,02*	0,611 ± 0,02*
СКК	СТ	1,858 ± 0,17	1,005±0,06	1,611 ± 0,14	1,376 ± 0,05
	ГСТ	1,42 ± 0,2	2,127 ± 0,2	1,345 ± 0,2	4,677 ± 0,7*
	КА	0,371 ± 0,01	0,245 ± 0,01	1,121 ± 0,01*	0,3 ± 0,01
ТКВ	СТ	1,596 ± 0,17	0,991 ± 0,06	0,721 ± 0,004	1,01 ± 0,03
	ГСТ	1,493 ± 0,09	1,798 ± 0,11	1,431 ± 0,12	2,595 ± 0,4*
	КА	0,485 ± 0,028	0,37 ± 0,04	0,189 ± 0,03	0,188 ± 0,005
ТМВ	СТ	0,857 ± 0,07	0,611 ± 0,04	0,747 ± 0,01	0,636 ± 0,849
	ГСТ	1,375 ± 0,14	2,984 ± 0,4	0,937 ± 0,23	0,849 ± 0,04*
	КА	0,261 ± 0,07	0,243 ± 0,06	0,538 ± 0,04	0,173 ± 0,005*
ТК	СТ	2,234 ± 0,01	2,183 ± 0,01	1,257 ± 0,14	1,671 ± 0,13
	ГСТ	1,481± 0,17	1,596 ± 0,01	1,18 ± 0,45	1,746 ± 0,13
	КА	0,45 ± 0,01	0,41 ± 0,003	0,377 ± 0,04	0,225 ± 0,003*
М/О ТК	СТ	1,347 ± 0,06	1,159 ± 0,03	1,217 ± 0,12	1,114 ± 0,1
	ГСТ	1,189 ± 0,12	1,293 ± 0,02	0,884 ± 0,05	1,04 ± 0,04
	КА	0,304 ± 0,03	0,222 ± 0,01	0,267 ± 0,015	0,216 ± 0,01

Достоверные отличия определялись от данных интактных крыс при * - $p \leq 0,05$ (two-way ANOVA).

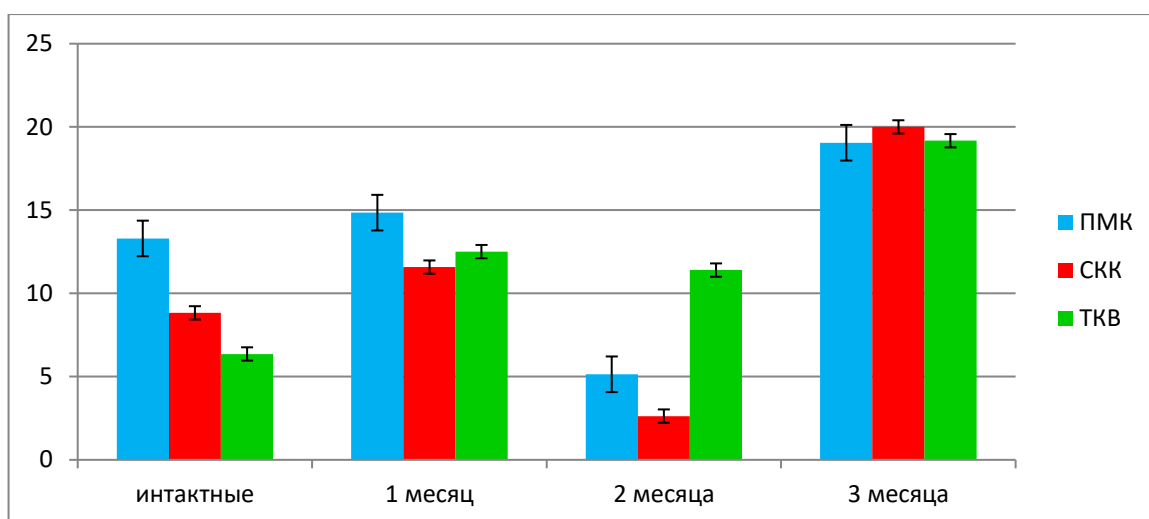


Рисунок 27 - Изменение соотношения (СТ+ГСТ)/КА в премедуллярных, субкапсулярных клетках и Т - лимфоцитах коркового вещества интактных крыс и после введения канцерогена через 1, 2 и 3 месяца.

На срезах, окрашенных по методу Унна, общее количество тучных клеток снижается по сравнению с предыдущим сроком и приближается к количеству этих клеток в группе контроля. Они располагаются единично в междольковых септах. В процентном соотношении преобладают дегранулированные клетки Т-2 – 33% и полностью опустошенные Т-3 – 25% (Рис. 28).

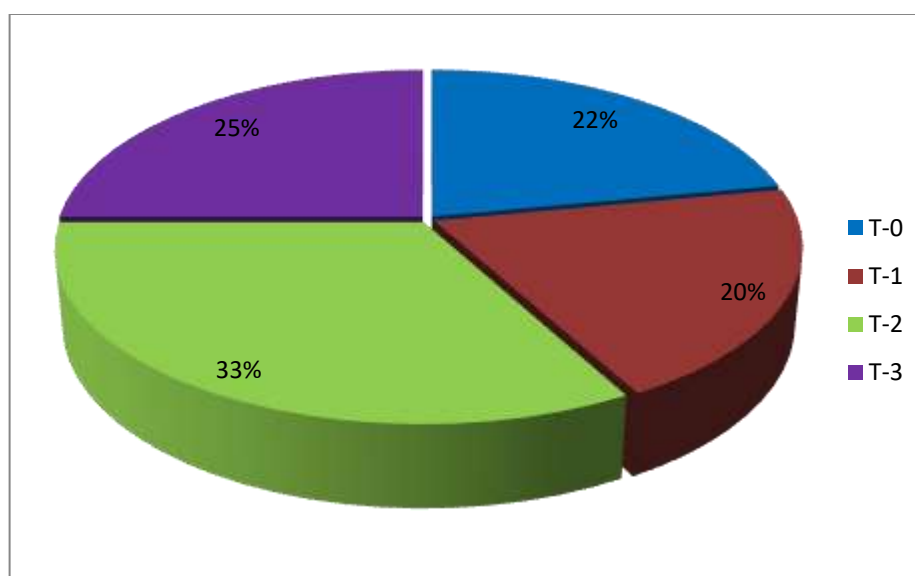


Рисунок 28 - Процентное содержание разных форм тучных клеток через 3 месяца после введения канцерогена.

Индекс дегрануляции составил 1,58, что по – прежнему превышает показатель интактных крыс в 1,7 раза.

Таким образом, через 3 месяца масса тимуса в динамике возрастает, но не достигает показателей интактных крыс. Достоверно уменьшается площадь мозгового вещества в 1,6 раз, а толщина коркового вещества приближается к данным предыдущей группы.

Иммуногистохимическое исследование показало, что число $CD3^+$ и $S-100^+$ клеток в динамике возрастает по всему веществу дольки тимуса, в динамике в 2 раза увеличивается число макрофагов в кортико-медуллярной зоне. Достоверное снижение в 2 раза $Vcl-2^+$ клеток в мозговом веществе и кортико-медуллярной зоне дольки может говорить о наступившем преобладании клеточной гибели.

В клетках премедуллярной и субкапсулярной зоны обнаруживается снижение уровня серотонина и катехоламинов. Уровень гистамина возрастает в премедуллярных, субкапсулярных клетках и лимфоцитах коркового вещества. Соотношение $(СТ+ГСТ)/КА$ в изучаемых структурах свидетельствует об уменьшении функциональной активности клеточных элементов. В популяции тучных клеток вновь преобладают дегранулированные и полностью опустошенные формы.

3.3 Морфофункциональное состояние тимуса после воздействия водно-иммобилизационного стресса

3.3.1 Морфофункциональное состояние тимуса через 1 месяц после воздействия водно-иммобилизационного стресса

В этой экспериментальной группе через 1 месяц гистологическая картина срезов тимуса, окрашенных гематоксилином и эозином, почти не отличается от таковой в группе интактных животных. Отличительной чертой является выявление в расширенных междольковых промежутках включений жировой ткани (Рис. 29).



Рисунок 29 - Тимус. 1 месяц после воздействия водно-иммобилизационного стресса. Мозговое вещество округлой формы.

В междольковых промежутках жировая ткань.

Окраска гематоксилином и эозином. Микромед 3 Люм. Ув. X400.

Масса тимуса составляет $131,25 \pm 5,15$ мг, что в 1,8 раза меньше, чем у интактной группы.

При проведении морфометрии площадь мозгового вещества увеличилась в 1,6 раза и составила $0,57 \pm 0,02$ мм², толщина коркового вещества – в 2 раза ($0,75 \pm 0,01$ мм).

Процент S-100⁺ клеток в корковом веществе после стрессового воздействия снижается в 6 раз, а в мозговом - в 8 раз по сравнению с интактными животными (Рис. 30). Содержание CD3⁺ клеток в мозговом веществе в 1,5 раза превышает данные группы интактных животных и в процентном отношении составило 54,2% в мозговом веществе и 59,9% в корковом веществе долики (Рис. 31).

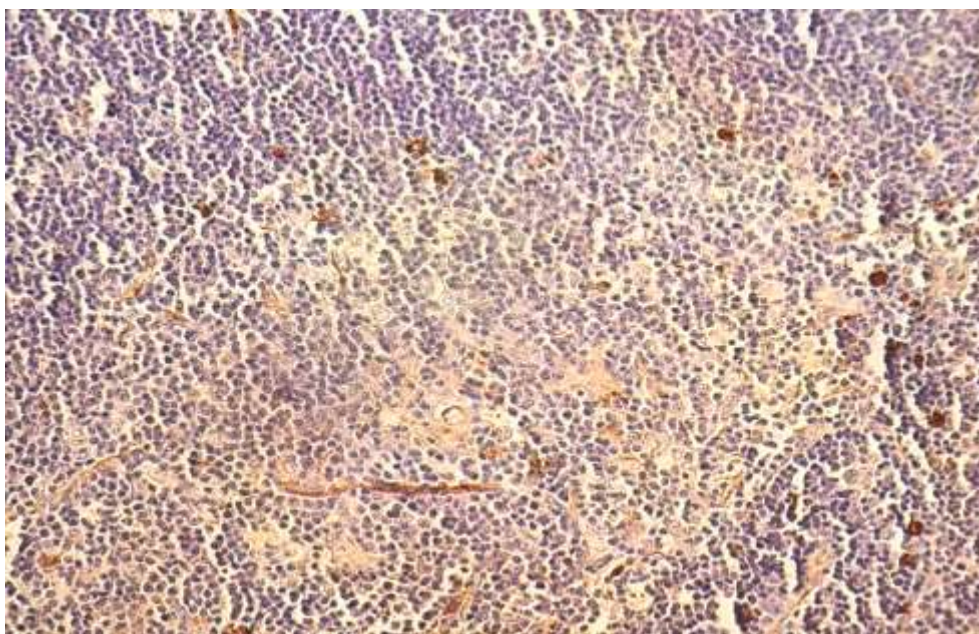


Рисунок 30 - Тимус. 1 месяц после окончания воздействия водно-иммобилизационного стресса. Снижение числа S-100⁺ клеток в корковом веществе. Иммуногистохимическая реакция на белок S-100. Микромед 3Люм.Ув. X400.

Обнаруживаются положительные реакции к белку Bcl-2, маркерам CD68 клеток, процентное содержание этих клеток в мозговом веществе близко к их содержанию у интактных животных. Однако в кортикальной зоне достоверно снижается количество Bcl-2⁺ клеток в 2,2 раза. CD68⁺ клетки этой зоны возрастают в 2,5 раза.

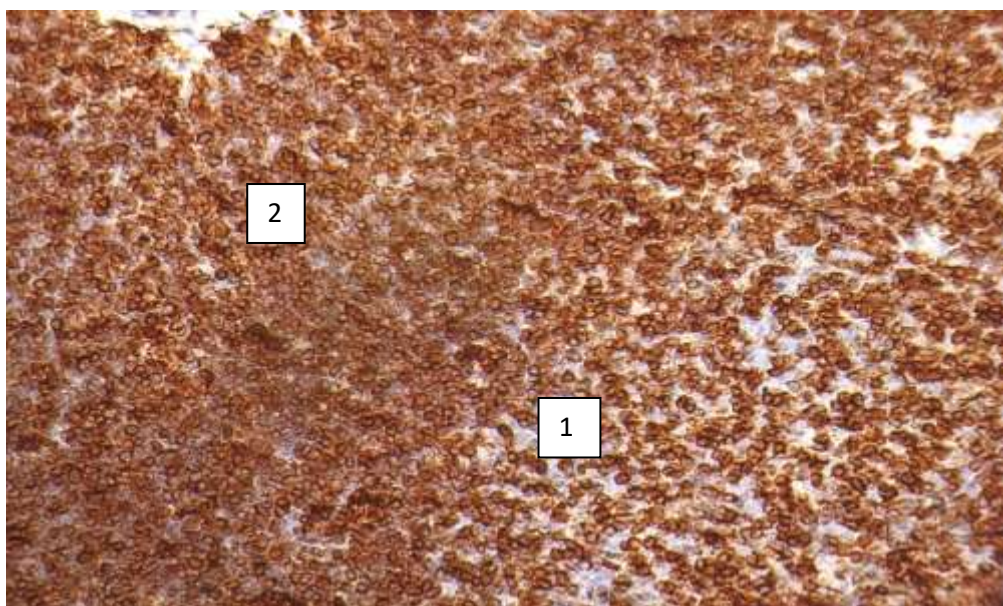


Рисунок 31 - Тимус. 1 месяц после окончания воздействия водно-иммобилизационного стресса. Увеличение количества CD3⁺ - лимфоцитов в мозговом (1) и корковом веществе (2) долики. Иммуногистохимическая реакция на CD3. Микромед 3 Люм. Ув. Х400.

После обработки срезов по методу Фалька – Хилларпа и методу Кросса-Эвена-Роста визуализируются долики тимуса, которые по структуре сходны с тимусом интактных животных. При исследовании биогенных аминов в структурах тимуса через 1 месяц после воздействия водно-иммобилизационного стресса отмечается достоверное снижение уровня серотонина, гистамина и катехоламинов.

Так, в премедуллярных клетках уровень серотонина и гистамина достоверно снижается в 2 раза, катехоламинов - в 1,5 раза по сравнению с интактными животными (Рис. 32). В субкапсулярных клетках серотонин достоверно снижается в 1,5 раза, гистамин – в 1,7 раза, катехоламины - в 1,4 раза. В лимфоцитах коркового вещества достоверно снижается уровень серотонина и катехоламинов в 1,5 и 2 раза соответственно. В Т-клетках мозгового вещества уровень серотонина, гистамина и катехоламинов снижается практически в 1,5 раза. В тучных клетках также происходит

достоверное снижение всех биогенных аминов: серотонина - в 1,9 раза, гистамина - в 1,3 раз, катехоламинов - в 1,8 раза.

Соотношение (СТ+ГСТ)/КА в премедуллярных клетках снижается по сравнению с показателем интактных животных и составляет 9,95 (у интактных крыс – 13,3), в Т - лимфоцитах коркового вещества этот показатель возрастает в 1,5 раза и составляет 9,3 (у интактных – 6,36). В остальных структурах тимуса это соотношение остается практически равным с интактными животными.

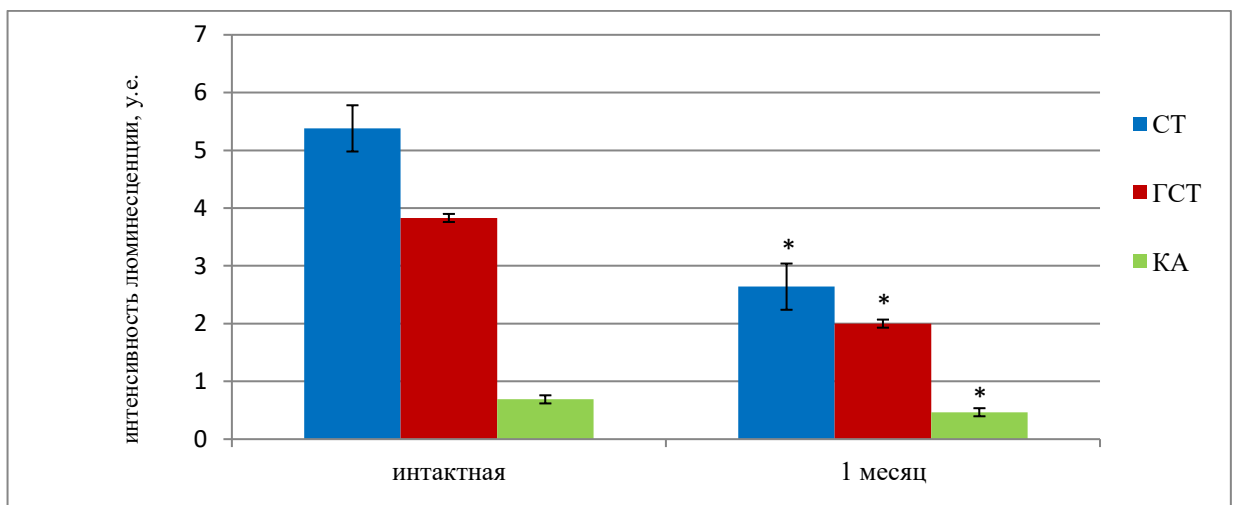


Рисунок 32 - Тимус. Уровень биогенных аминов в премедуллярных клетках тимуса у интактных крыс и через 1 месяц после водно-иммобилизационного стресса (two-way ANOVA), ($p \leq 0,05$).

После окраски микроскопических срезов полихромным толуидиновым синим на тучные клетки обнаруживается снижение их общего количества в 2 раза по сравнению с контролем. При этом преобладают частично дегранулированные Т-1 и дегранулированные Т-2 клетки, их процентное содержание составляет 39,5% и 29% соответственно (Рис. 33). Индекс дегрануляции – 1,4.

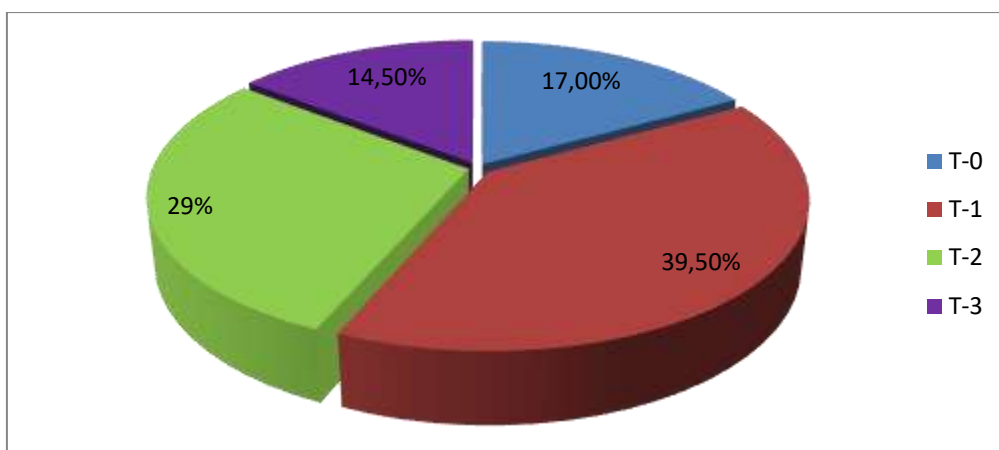


Рисунок 33 - Процентное содержание тучных клеток тимуса по степени их дегрануляции через 1 месяц после водно-иммобилизационного стресса.

3.3.2 Морфофункциональное состояние тимуса через 2 месяца после воздействия водно-иммобилизационного стресса

Масса тимуса по-прежнему меньше его массы у интактной крысы, однако, на 19 % больше массы предыдущего срока исследования. /При морфометрии установлено, что площадь мозгового вещества, которая составляет $1,44 \pm 0,04 \text{ мм}^2$, увеличивается в 2,5 раза по сравнению с предыдущим сроком воздействия и в 4 раза по сравнению с нормой. Толщина коркового вещества составляет $0,69 \pm 0,04 \text{ мм}$, что незначительно меньше показателя предыдущего срока наблюдения, но превышает данные интактной в 1,8 раза. В тимусе нет долек правильной формы, преобладают дольки вытянутой формы с крупным мозговым веществом, в соединительнотканых септах увеличивается прослойка из жировых клеток (Рис. 34).

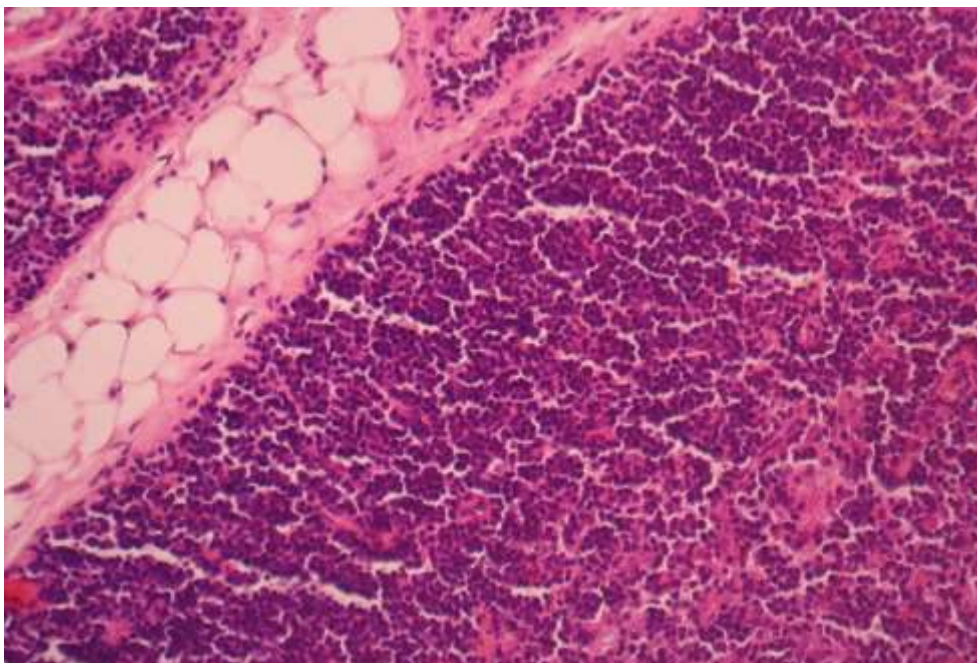


Рисунок 34 - Тимус. 2 месяца после окончания воздействия водно-иммобилизационного стресса. Нарастание жировой ткани в соединительнотканых септах. Окраска гематоксилином и эозином. Микромед 3 Люм. Ув. X400.

Число дендритных клеток в мозговом веществе в динамике достоверно возрастает почти в 4 раза, однако по – прежнему в 2,2 раза ниже, чем у крыс контрольной группы (Рис. 35).

Количество $CD3^{+}$ клеток в мозговом веществе немного снижается, оставаясь увеличенным по сравнению с контролем на 10,3% (Рис. 36).

Количество Pan-cytokeratin⁺ клеток в мозговом веществе снижается по сравнению с предыдущей группой почти в 2 раза и составляет 3,23%. Число $CD68^{+}$ клеток практически не изменяется.

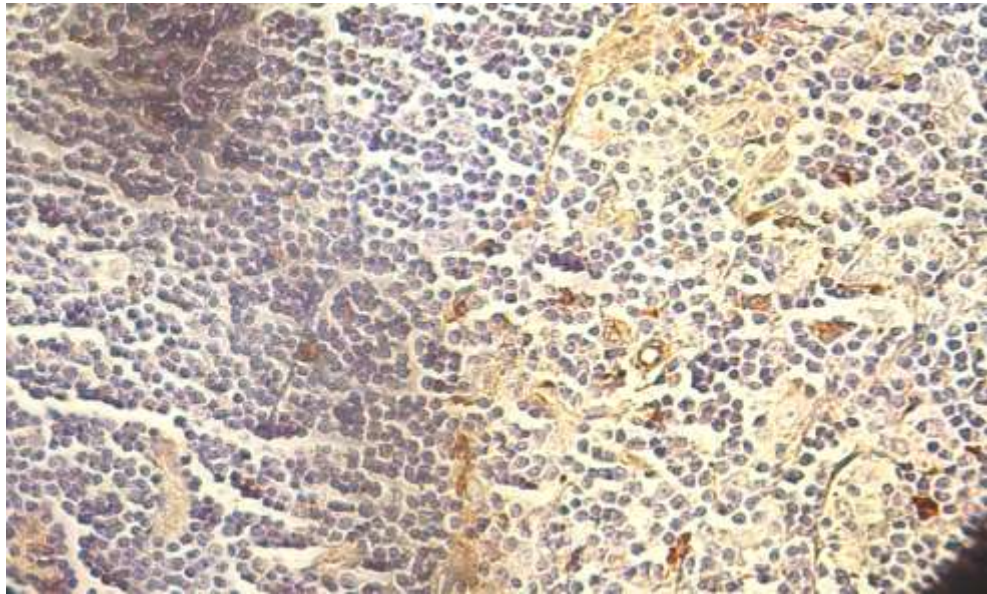


Рисунок 35 - Тимус. 2 месяца после окончания воздействия водно-иммобилизационного стресса. S-100⁺ клетки в мозговом веществе тимуса. Иммуногистохимическая реакция на белок S-100.

Микромед 3 Люм. Ув. X400.

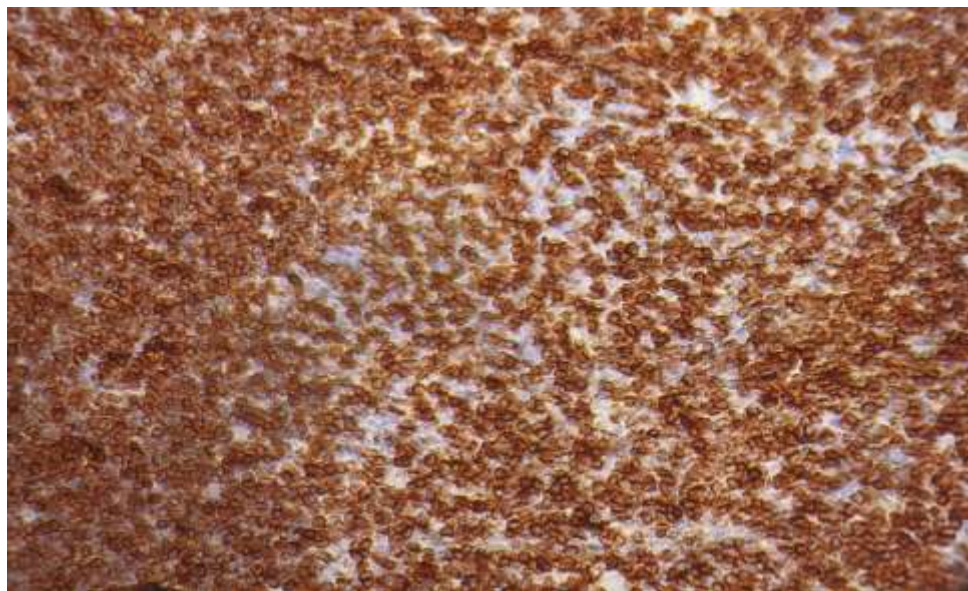


Рисунок 36 - Тимус. 2 месяца после окончания воздействия водно-иммобилизационного стресса. Нарастание CD3⁺ лимфоцитов в паренхиме дольки. Иммуногистохимическая реакция на CD3. Микромед 3 Люм. Ув. X400.

Наблюдается достоверное увеличение количества Bcl-2⁺ клеток в корковом веществе долек в 5 раз по сравнению с интактными животными и с предыдущей группой исследования (в 12 раз) (Рис. 37).

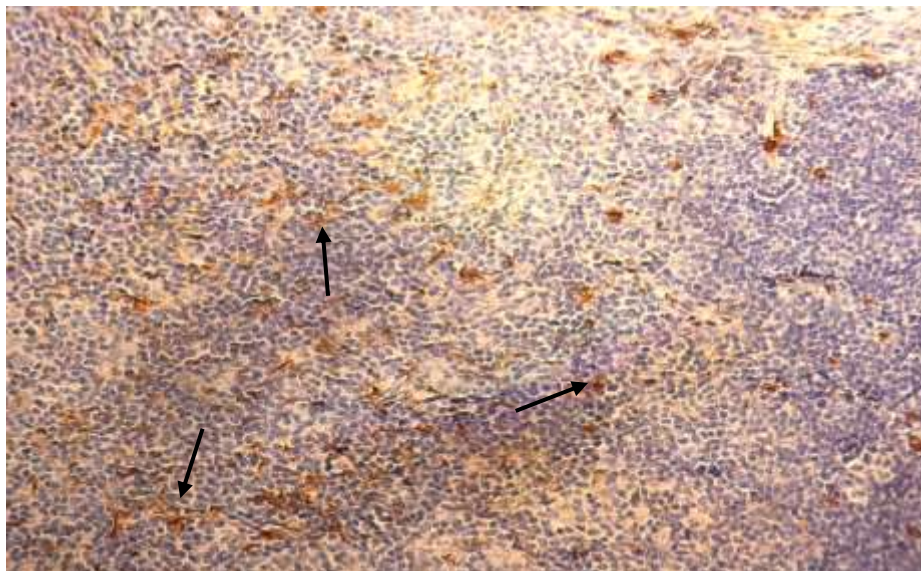


Рисунок 37 - Тимус. 2 месяца после воздействия водно-иммобилизационного стресса. Увеличение числа Bcl-2⁺ клеток в корковом веществе. Иммуногистохимическая реакция на белок Bcl-2. Микромед 3 Люм. Ув. X400.

При люминесцентной микроскопии дольки хорошо визуализируются, четко видна граница между корковым и мозговым веществом, представленная яркими люминесцирующими клетками – премедуллярными и субкапсулярными (Рис. 38).

Наблюдается достоверное снижение уровня биогенных аминов по сравнению с интактными животными. В премедуллярных клетках снижение уровня серотонина и гистамина в 2 раза, в субкапсулярных клетках – в 1,7 раза серотонина и в 1,4 раза - катехоламинов.

В корковом веществе снижается уровень серотонина и катехоламинов в Т-лимфоцитах (в 1,2 и в 1,5 раза), в тучных клетках - в 2,4 и 2 раза соответственно. В микроокружении тучных клеток уровень серотонина меньше, чем у интактных крыс в 2 раза, катехоламинов - в 1,4 раза.

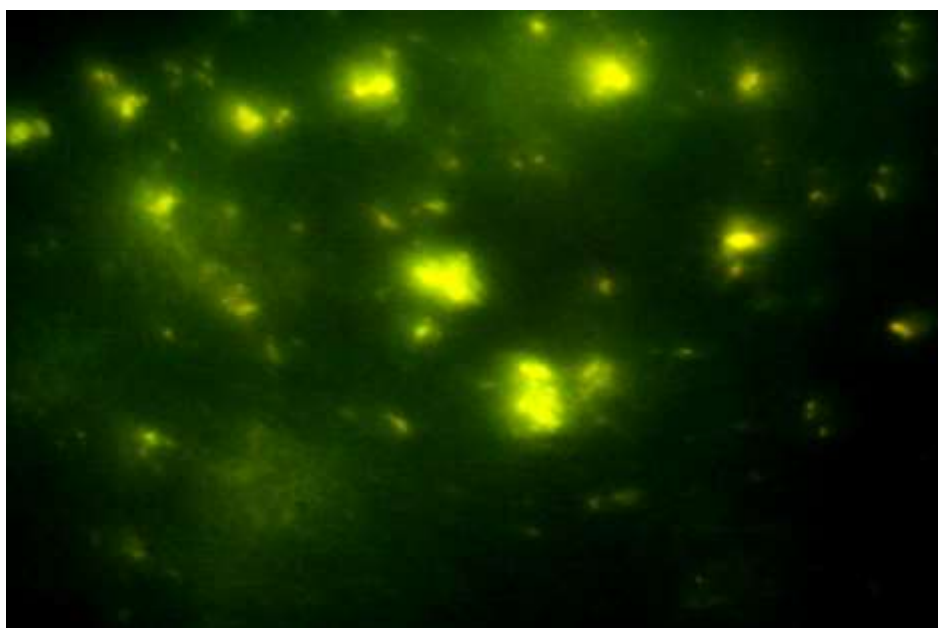


Рисунок 38 - Тимус. 2 месяца после окончания воздействия водно-иммобилизационного стресса. Возрастание количества люминесцирующих клеток премедуллярной зоны. Метод Кросса. Микромед 3 Люм. Ув. X400.

В субкапсулярных клетках уровень гистамина увеличивается в 1,7 раза. В лимфоцитах коркового вещества уровень гистамина нарастает в 1,3 раза, серотонина и катехоламинов - в 1,2 раза (Рис. 39, 40).

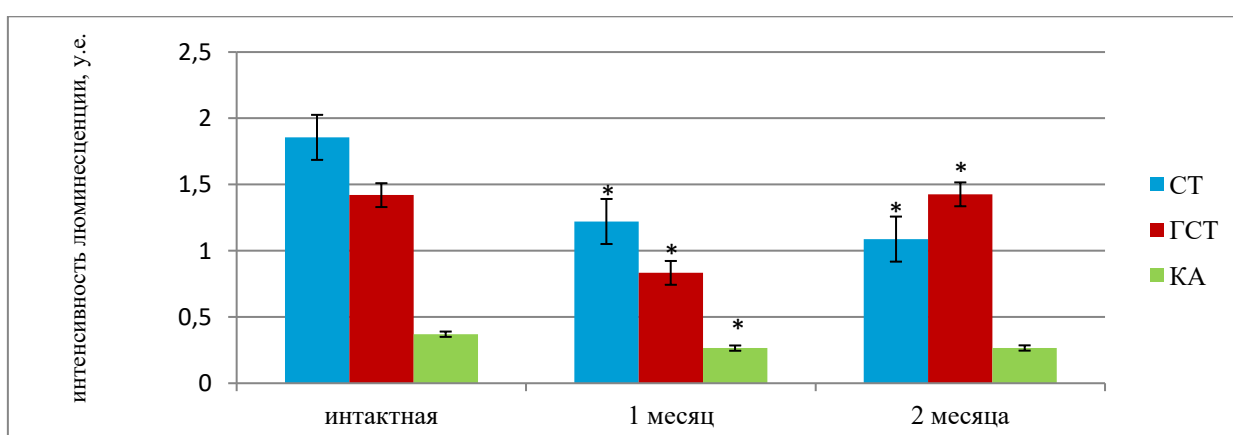


Рисунок 39 - Уровень биогенных аминов в субкапсулярных клетках у интактных крыс, через 1 и 2 месяца после воздействия водно-иммобилизационного стресса (two-way ANOVA), ($p \leq 0,05$).

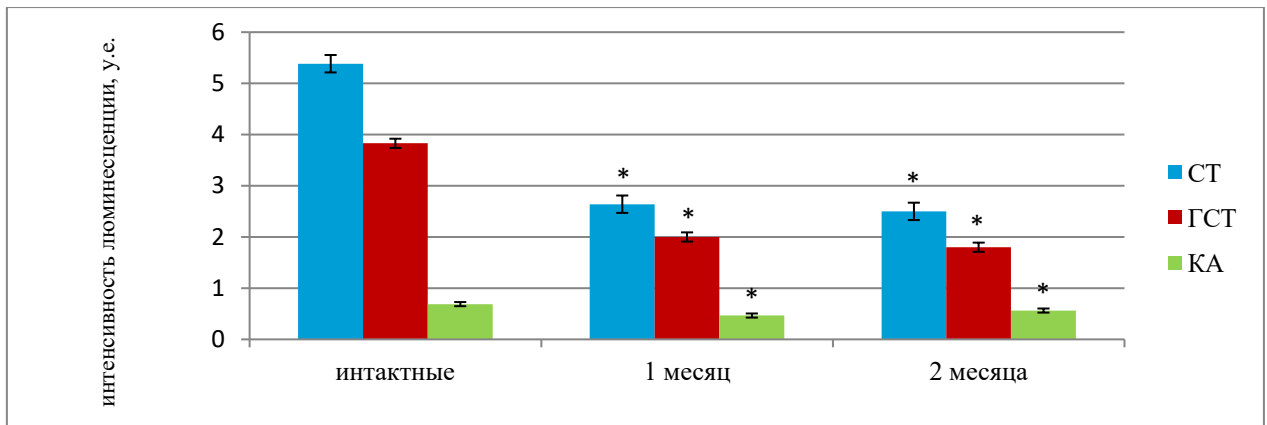


Рисунок 40 - Уровень биогенных аминов в клетках премедуллярной зоны у интактных крыс, через 1 и 2 месяца после воздействия водно-иммобилизационного стресса (two-way ANOVA), ($p \leq 0,05$).

Через 2 месяца соотношение (СТ+ГСТ)/КА в исследуемых клетках мозгового вещества снижается по сравнению с предыдущим сроком и с интактными животными в 1,5 раза и составляет 5,5. В тучных клетках это соотношение увеличивается в 1,5 раза и составляет 12,7 (у интактных - 8,25, через 1 месяц после стресса – 9,33) (Рис. 41).

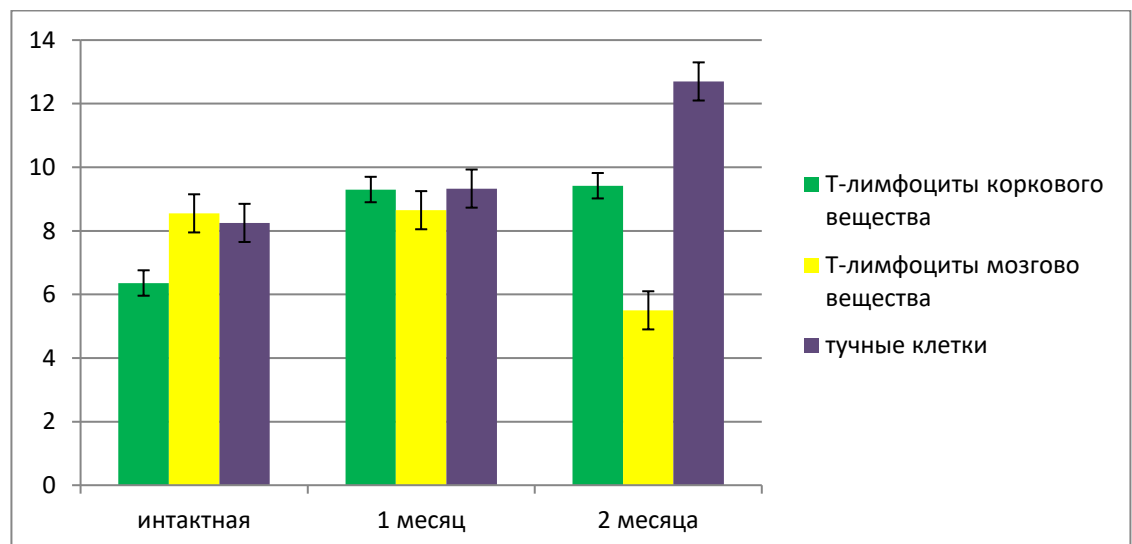


Рисунок 41 - Соотношения (СТ+ГСТ)/КА в Т-лимфоцитах коркового и мозгового вещества, тучных клетках у интактных крыс, через 1 и 2 месяца после воздействия водно-иммобилизационного стресса.

Наблюдается снижение общего количества тучных клеток в междольковых промежутках, при этом среди них преобладают дегранулированные клетки Т-2 – 29% и полностью опустошенные Т-3 клетки – 32% (рисунок 42, 43).

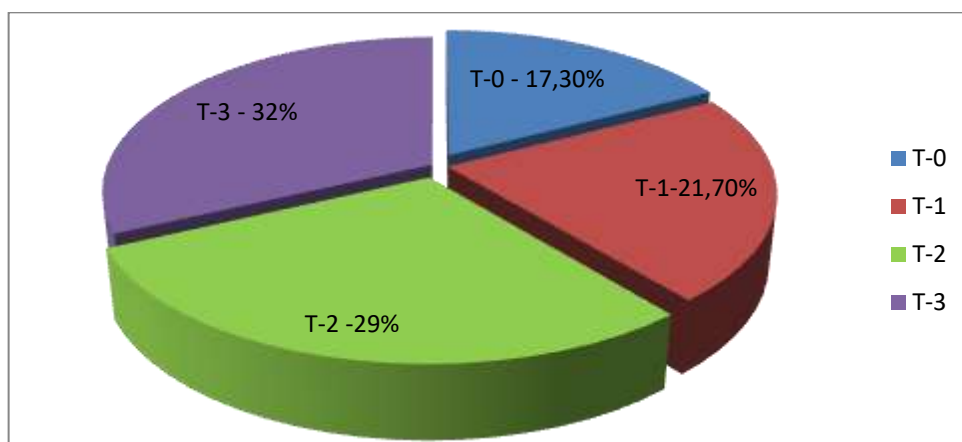


Рисунок 42 - Процентное соотношение тучных клеток в тимусе по степени их дегрануляции через 2 месяца после воздействия водно-иммобилизационного стресса. Преобладание дегранулированных форм тучных клеток.

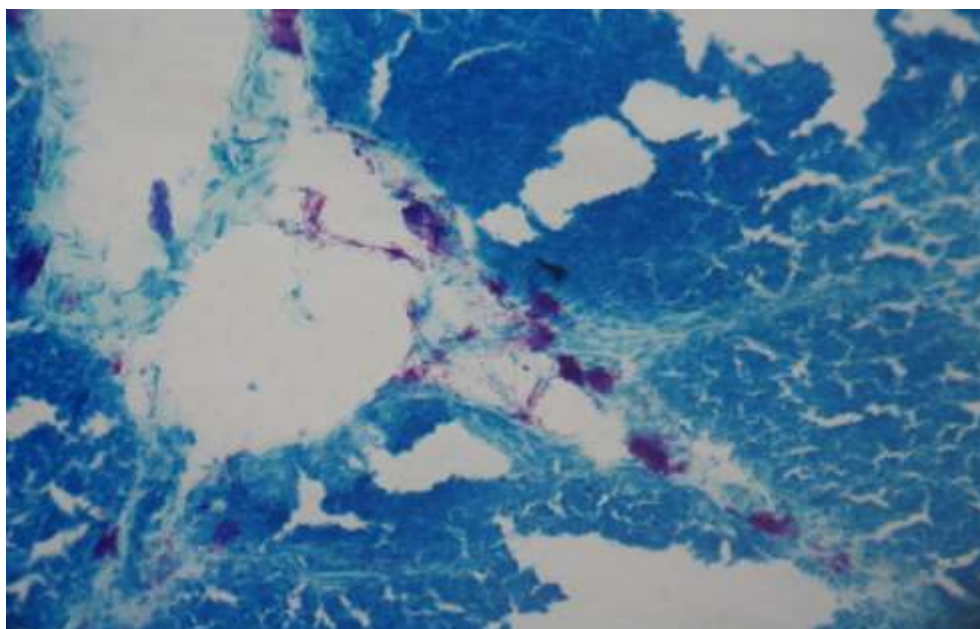


Рисунок 43 - Тимус. 2 месяца после воздействия водно-иммобилизационного стресса. Преобладание дегранулированных форм тучных клеток. Окраска полихромным толуидиновым синим по Унна. Микромед 3 Люм. Ув. X400.

3.3.3 Морфофункциональное состояние тимуса через 3 месяца после воздействия водно-иммобилизационного стресса

При окраске гематоксилином и эозином на срезах тимуса визуализируется значительное разрастание жировой и соединительной ткани вокруг тимусных долек (Рис. 44).

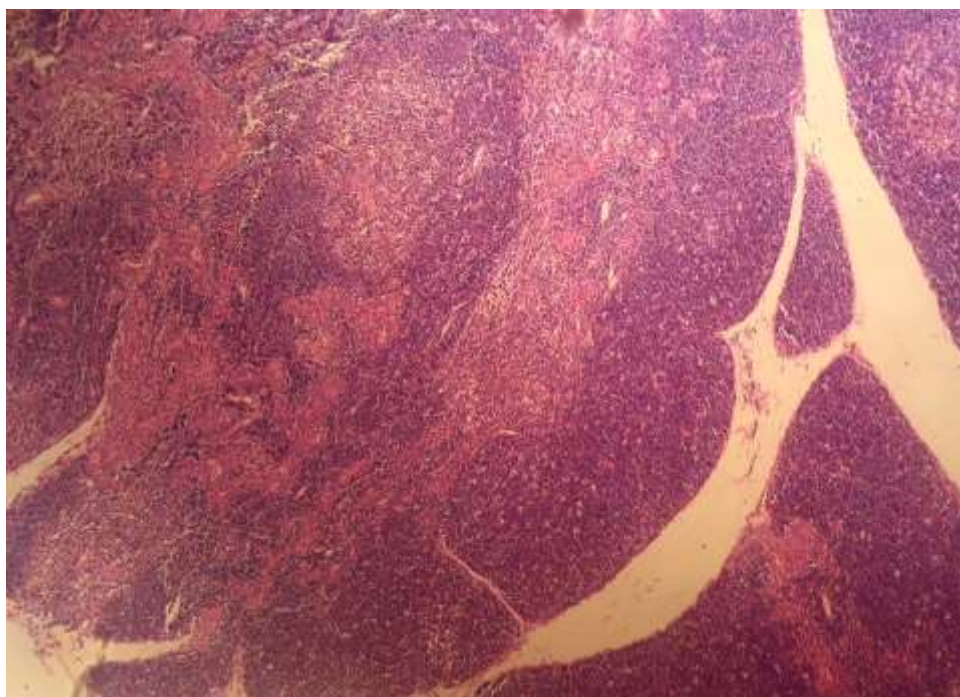


Рисунок 44 - Тимус. 3 месяца после окончания воздействия водно-иммобилизационного стресса. Нарастание жировой и соединительной ткани вокруг тимусных долек. Окраска гематоксилином и эозином. Микромед 3 Люм. Ув. X100.

В динамике наблюдений через 3 месяца масса тимуса по сравнению с интактными животными остается сниженной, составляя $168,2 \pm 22,6$ мг (Рис. 45).

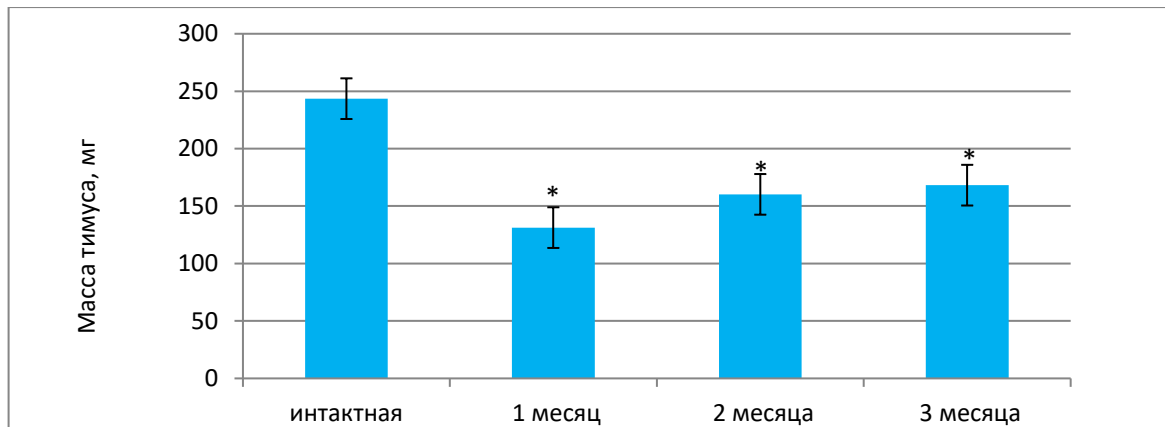


Рисунок 45 - Динамика изменения массы тимуса у интактных животных и через 1, 2 и 3 месяца после окончания воздействия водно-иммобилизационного стресса. Уменьшение массы тимуса в экспериментальной группе (two-way ANOVA), ($p \leq 0,05$).

При проведении морфометрии площадь мозгового вещества в динамике уменьшается в 4 раза ($0,36 \pm 0,01 \text{ мм}^2$) и вдвое снижается толщина коркового вещества ($0,37 \pm 0,05 \text{ мм}$) (Рис. 46 а, б) по сравнению с предыдущим сроком исследования.

Иммуногистохимическое исследование показало, что относительно предыдущего срока исследования, уровень S-100⁺ клеток возрастает в 2,5 раза по всему веществу долики, оставаясь при этом сниженным по сравнению с интактными животными.

CD3⁺ клетки в мозговом веществе в динамике снижаются в 1,6 раза (Рис. 47).

Уровень CD68⁺ клеток в корковом веществе составляет 10,3%, в мозговом - 8,8%, что превышает показатели предыдущего срока исследования (в 4 раза в мозговом веществе, в 2 раза – в корковом веществе) и показатели у интактных животных. Количество Pan-cytokeratin⁺ клеток также увеличивается по всему веществу долики по сравнению с контрольной и предыдущей группой исследования.

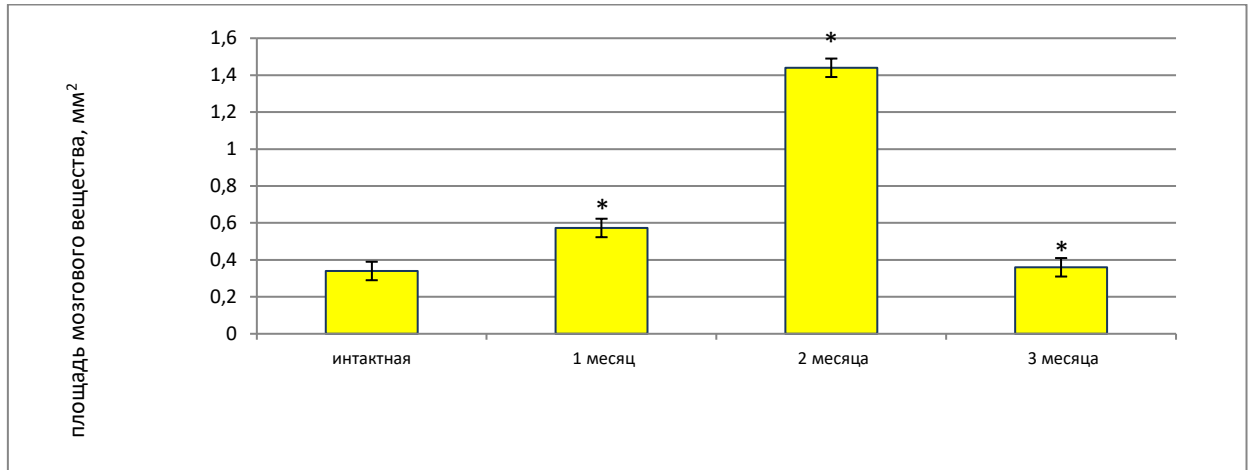
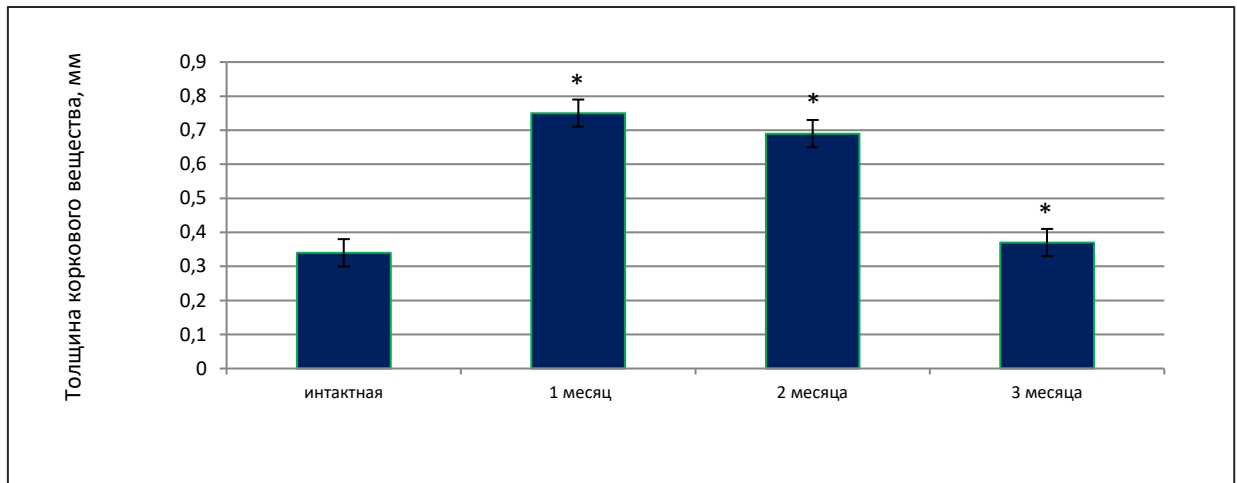
а.**б.**

Рисунок 46 - Изменение площади мозгового вещества (а) и толщины коркового вещества (б) тимуса у интактных животных и через 1, 2 и 3 месяца после воздействия водно-иммобилизационного стресса (two-way ANOVA), ($p \leq 0,05$).

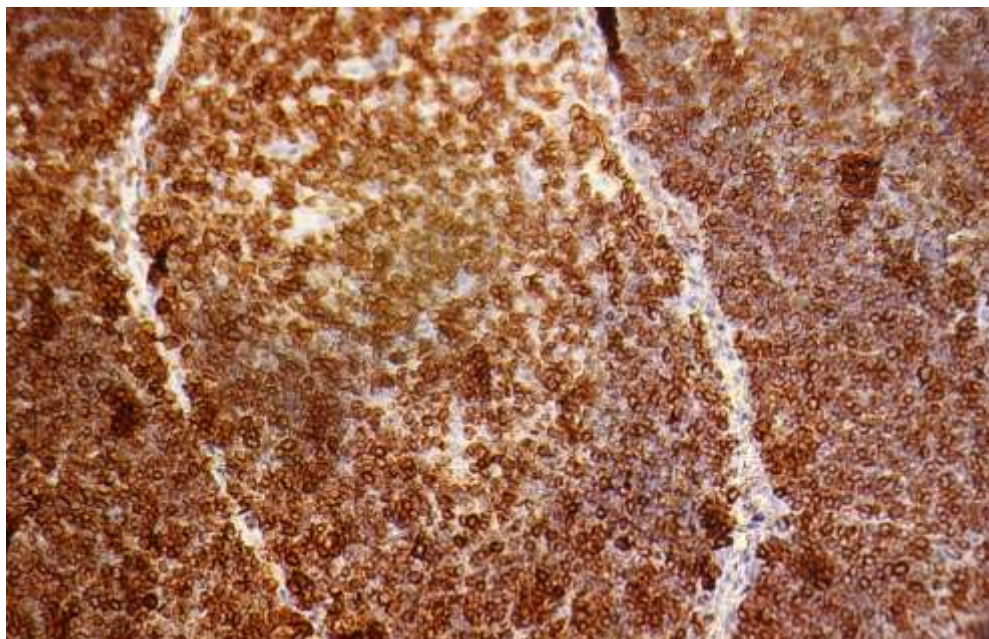


Рисунок 47 - Тимус. 3 месяца после окончания воздействия водно-иммобилизационного стресса. Снижение числа $CD3^+$ - лимфоцитов в мозговом веществе дольки. Иммуногистохимическая реакция на CD3.

Микромед 3 Люм. Ув. X400.

После обработки срезов тимуса методами Фалька и Кросса обнаруживается рост интенсивности свечения биогенных аминов (Рис. 48). Уровень серотонина возрастает в Т-лимфоцитах кортикальной зоны в 2,4 раза, в клетках мозгового вещества - в 2 раза, в микроокружении тучных клеток в 1,3 раза. Уровень гистамина возрастает в 1,9 раза в субкапсулярных клетках, в 1,6 раза - в клетках коркового вещества, и почти в 2 раза - в тучных клетках и их микроокружении. При этом уровень гистамина в премедуллярных клетках и Т-лимфоцитах мозгового вещества, напротив, снижается в 1,6 раза по сравнению с интактными животными. А в субкапсулярных клетках и лимфоцитах коркового вещества его уровень, напротив, возрастает в 2 и в 1,6 раза соответственно. Уровень катехоламинов достоверно снижается в премедуллярных клетках в 1,7 раза, в Т - лимфоцитах коркового вещества и тучных клетках - в 1,3 раза.

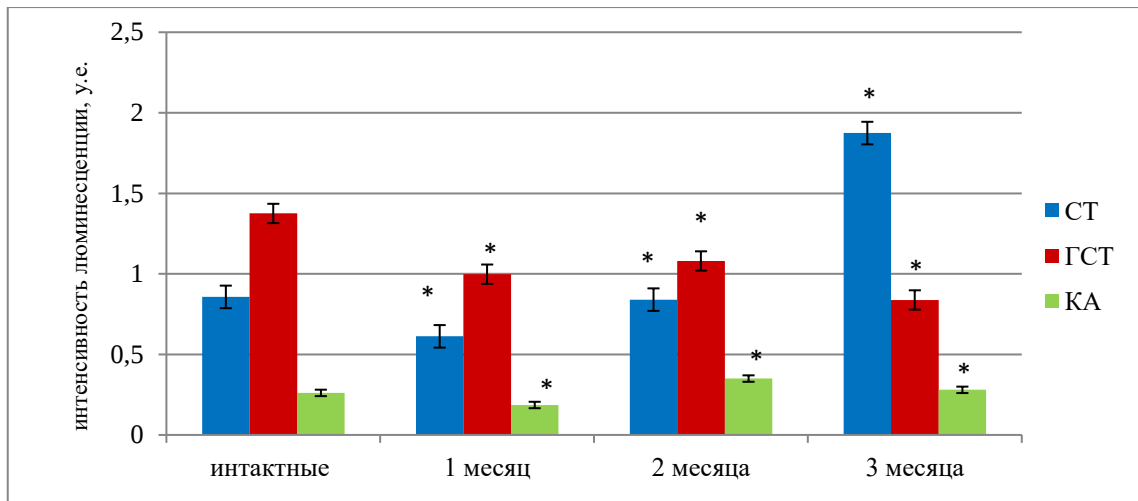


Рисунок 48 - Уровень биогенных аминов в Т-лимфоцитах мозгового вещества тимуса у интактных крыс, через 1, 2 и 3 месяца после окончания воздействия водно-иммобилизационного стресса (two-way ANOVA), ($p \leq 0,05$).

По сравнению с предыдущим сроком также отмечается достоверный рост уровня биогенных аминов. В субкапсулярных клетках и в Т-лимфоцитах коркового вещества уровень серотонина увеличивается (в 1,9 и в 2,4 раза), уровень гистамина в этих же клетках – в 2,2 и в 1,6 раза (Рис. 49). В лимфоцитах мозгового вещества серотонин увеличивается в 2,2 раза, а уровень гистамина, наоборот, снижается в 1,2 раза по сравнению с предыдущим сроком. Нарастает уровень серотонина и в тучных клетках и их микроокружении в 3 и 2,6 раза соответственно, гистамина – в 1,5 и 1,8 раза.

Уровень катехоламинов достоверно увеличивается в субкапсулярных клетках в 2,2 раза, в тучных клетках и их микроокружении - в 1,5 и 1,6 раз соответственно (Рис. 50). В премедуллярных клетках, напротив, уровень катехоламинов снижается в 1,5 раза.

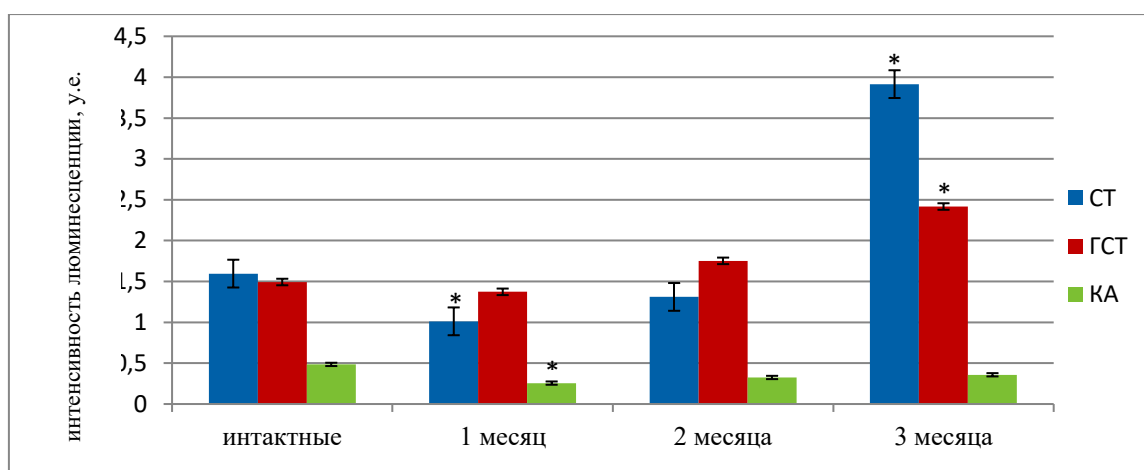


Рисунок 49 - Уровень биогенных аминов в Т-лимфоцитах коркового вещества тимуса у интактных крыс, через 1, 2 и 3 месяца после окончания воздействия водно-иммобилизационного стресса (two-way ANOVA), ($p \leq 0,05$).

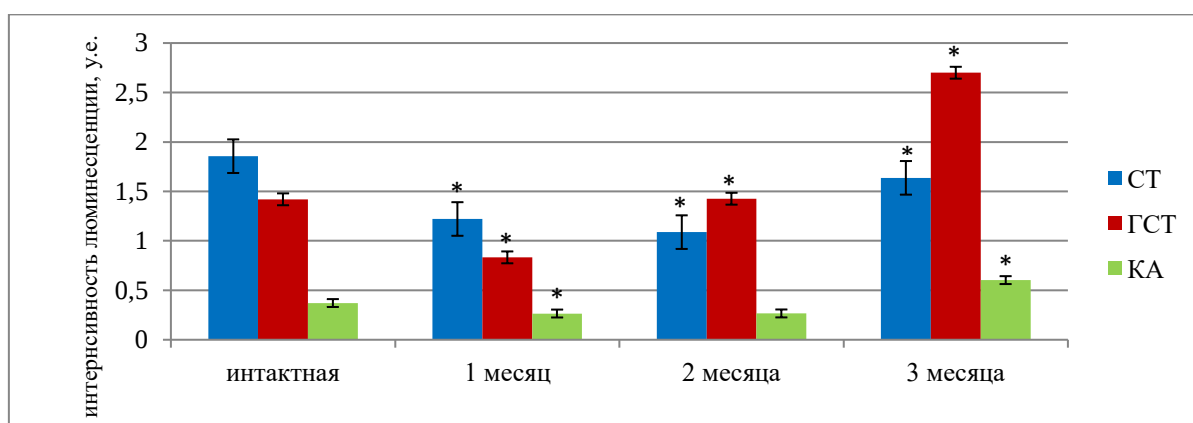


Рисунок 50 - Уровень биогенных аминов в субкапсулярных клетках у интактных животных, через 1, 2 и 3 месяца после окончания воздействия водно-иммобилизационного стресса (two-way ANOVA), ($p \leq 0,05$).

Соотношение (СТ+ГСТ)/КА через 3 месяца после окончания воздействия водно-иммобилизационного стресса увеличивается по сравнению с интактными животными и предыдущим сроком в Т-лимфоцитах коркового вещества и тучных клетках в 2,7 и в 2 раза и составляет 17,6 и 15,9 соответственно, что говорит о подавлении функциональной активности клеточных структур (Табл. 6).

Таблица 6. Соотношение (СТ+ГСТ)/КА в биоаминсодержащих структурах тимуса у интактных животных, через 1, 2 и 3 месяца после окончания воздействия водно-иммобилизационного стресса.

Клетки	интактные животные	После воздействия водно-иммобилизационного стресса		
		1 месяц	2 месяца	3 месяца
ПМК	13,3±0,03	9,95±0,7	7,63±0,9	7,8±0,6
СКК	8,83±0,24	7,75±0,9*	9,45±0,75*	7,19±0,64
ТКВ	6,36±1,07	9,3±0,6	9,42±1,2	17,6±0,5*
ТМВ	8,55±0,8	8,65±1,06	5,5±0,65*	9,6±0,7*
ТК	8,25±0,67	9,33±0,5	12,7±0,4*	15,9±1,4*
М/О ТК	8,34±0,4	9,96±0,6	9,2±0,6	12,0±0,3*

Достоверные отличия определялись от данных интактных крыс при * - $p \leq 0,05$ (two-way ANOVA).

Общее количество тучных клеток по сравнению с предыдущими сроками после окончания воздействия стресса снижено. При этом преобладают Т-1 и Т-2 клетки, их процентное соотношение составляет 34 % и 45 % соответственно от общего количества тучных клеток (Рис. 51). Индекс дегрануляции приближается к значениям предыдущей группы и составляет 1,77.

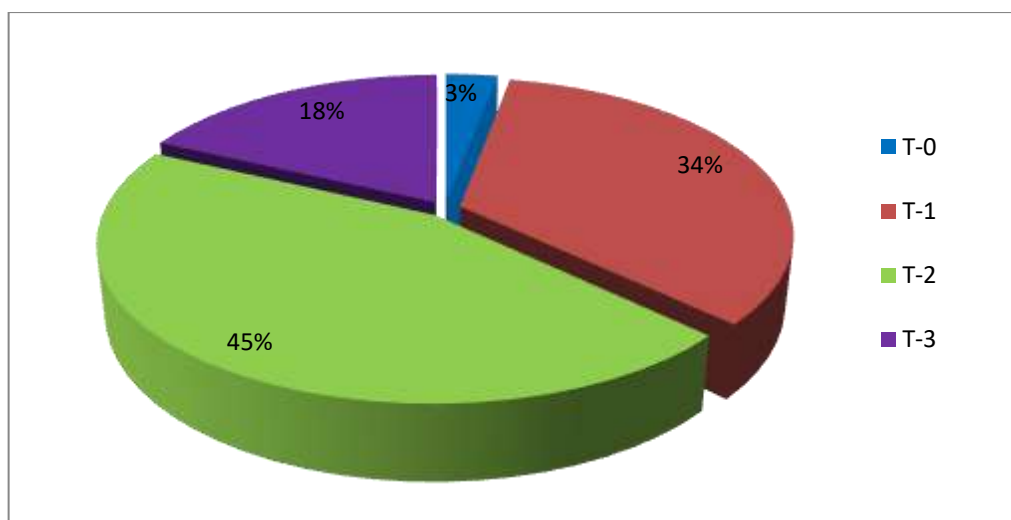


Рисунок 51 - Процентное соотношение тучных клеток тимуса через 3 месяца после воздействия водно-иммобилизационного стресса. Преобладание дегранулированных (Т-2) и полностью опустошенных форм (Т-3) тучных клеток.

Полученные данные свидетельствуют, что воздействие водно-иммобилизационного стресса в целом приводит к тем же неспецифическим изменениям в тимусе, что и в предыдущей экспериментальной группе, но есть и некоторые особенности. Уже через 1 месяц в единичных долях местами визуализируются расширенные междольковые промежутки с включениями жировой ткани, количество которой нарастает с увеличением срока исследований. Во всех люминесцирующих структурах в 1,5 и более раз достоверно снижается уровень всех биогенных аминов. Уменьшается общее количество тучных клеток.

Отличие реакции тимуса состоит и в том, что через 1 месяц в корковом веществе достоверно снижается количество $Bcl-2^+$ клеток в 2,2 раза, а через 2 месяца – увеличивается в 5 раз по сравнению с интактной группой и в 12 раз по сравнению с предыдущим сроком исследования. Процентное содержание $Pan-cytokeratin^+$ клеток в динамике возрастает.

3.4 Морфофункциональное состояние тимуса крыс после сочетанного воздействия канцерогена N-метил-N-нитрозомочевины и водно-иммобилизационного стресса

3.4.1 Морфофункциональное состояние тимуса крыс через 1 месяц после сочетанного воздействия

На гистологических срезах тимуса, окрашенных гематоксилином и эозином, визуализируются долики вытянутой формы. Мозговое вещество имеет неправильную форму. Междольковые промежутки расширены, в них встречаются участки жировой и соединительной ткани (Рис. 52).

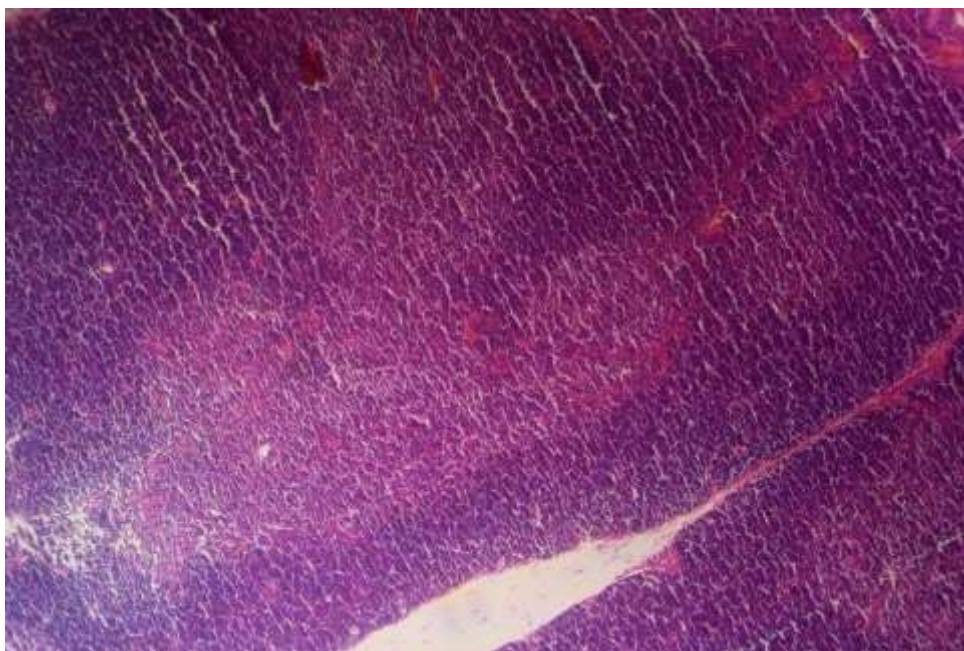


Рисунок 52 - Тимус. 1 месяц после окончания сочетанного воздействия.

Мозговое вещество вытянутой формы, расширение междольковых промежутков. Окраска гематоксилином и эозином.

Микромед 3 Люм. Ув. X100.

Масса тимуса равна $183,25 \pm 22$ мг, что в 1,3 раза меньше, чем у интактной группы. При морфометрии установлено, что площадь мозгового вещества по сравнению с интактными животными возрастает

в 2,8 раза и равна $0,97 \pm 0,024 \text{ мм}^2$, толщина коркового вещества - в 2,3 раза ($0,88 \pm 0,02 \text{ мм}$).

При сравнении морфологии тимуса при сочетанном воздействии двух факторов одно из отличий состоит в том, что уже через 1 месяц визуализируются участки междольковых промежутков, заполненные жировой тканью. При изолированном введении канцерогена тимус повторяет строение интактного.

В мозговом веществе увеличивается количество CD3^+ клеток (в 1,5 раза). Здесь же возрастает и число S-100^+ клеток, в 1,3 раза превышая показатели у интактных крыс. В корковом веществе, напротив, их число снижается в 2,5 раза (Рис. 53).

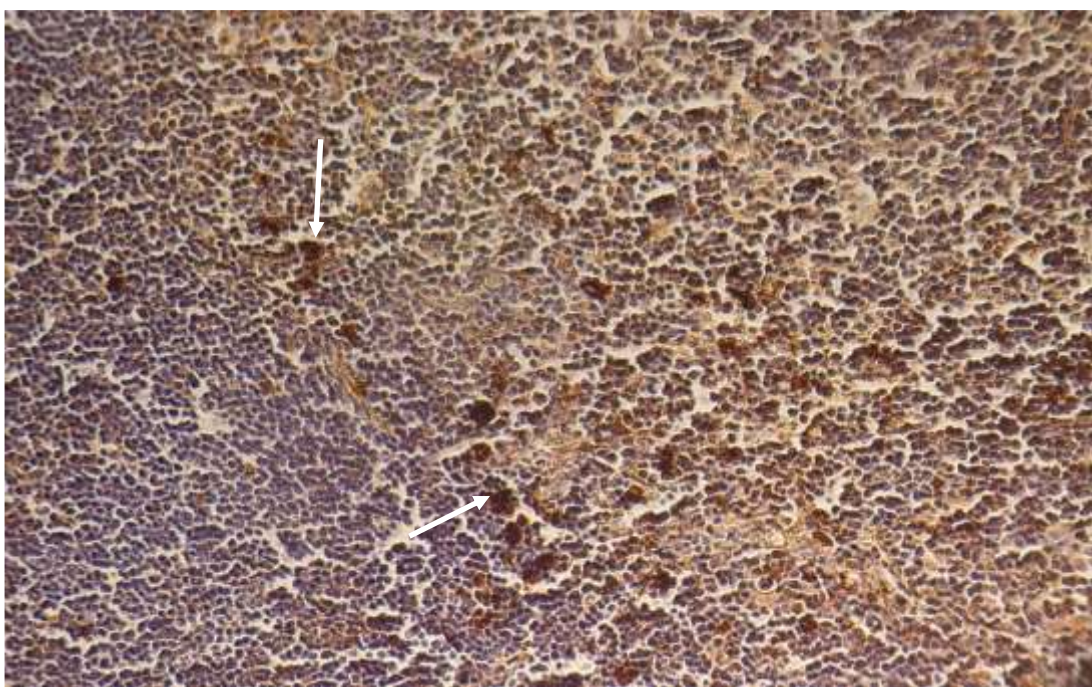


Рисунок 53. Тимус. 1 месяц после сочетанного воздействия факторов.

Возрастание S-100^+ клетки в мозговом веществе тимуса.

Иммуногистохимическая реакция на белок S-100.

Микромед 3 Люм. Ув. X400.

Число Vcl-2^+ клеток в корковом веществе в 6 раз превышает данные интактных крыс (Рис. 54). Количество Pan-cytokeratin^+ клеток в мозговом

веществе долек в 6 раз превышает их количество по сравнению с группой контроля.

Количество CD68⁺ клеток снижается по сравнению с интактными крысами в мозговом веществе долики в 2 раза.

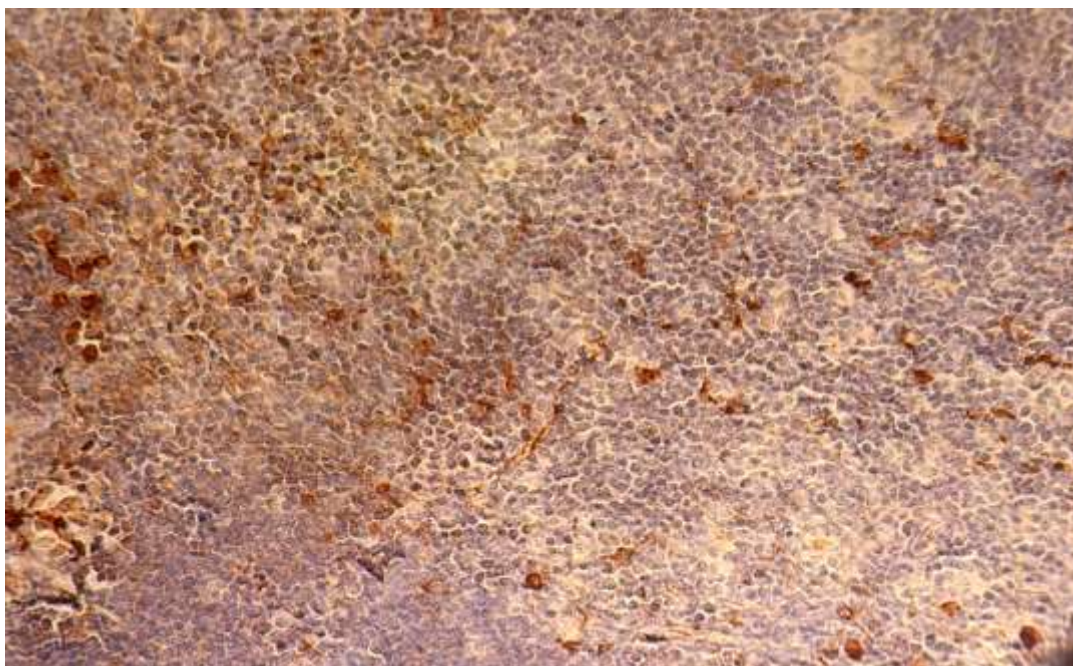


Рисунок 54 - Тимус. 1 месяц после окончания сочетанного воздействия факторов. Увеличение количества Bcl-2⁺ клеток в корковом веществе.

Иммуногистохимическая реакция на белок Bcl-2.

Микромед 3 Люм. Ув. X400.

Картина тимуса при люминесцентной микроскопии не отличается от таковой у интактных крыс.

Сочетанное воздействие двух факторов приводит к изменениям уровня моноаминов в клетках премедуллярной и субкапсулярной зон, лимфоцитах коркового и мозгового вещества, тучных клетках и их микроокружении. В премедуллярных и субкапсулярных клетках уровень серотонина снижается в 1,7 и в 2 раза, катехоламинов - в 1,2 и 1,5 раз соответственно (Рис. 55).

В Т-лимфоцитах коркового вещества происходит достоверное снижение уровня серотонина и катехоламинов в 1,5 и 1,6 раза по сравнению

с интактными, в тучных клетках и их микроокружении уровень моноаминов падает в 1,5 раза.

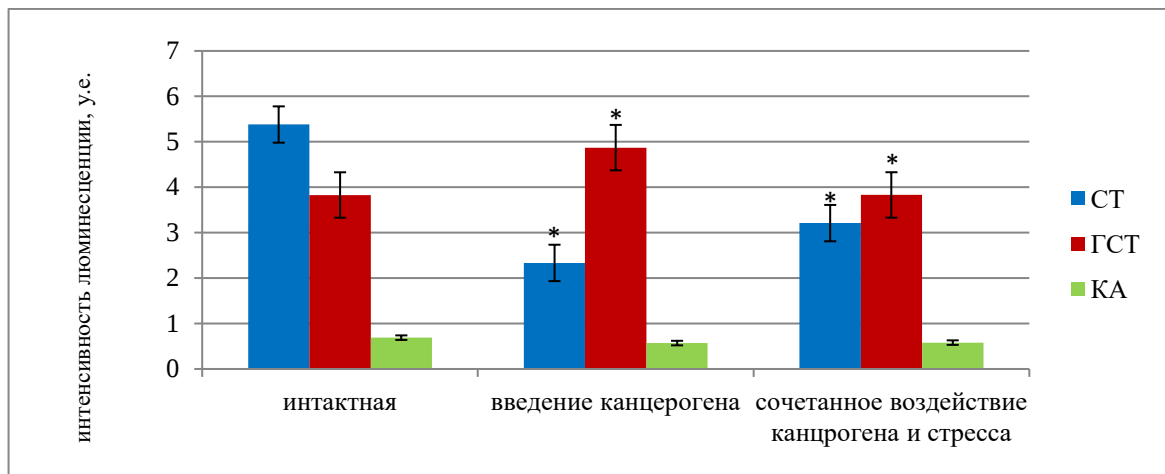


Рисунок 55 - Уровень биогенных аминов в клетках премедуллярной зоны тимуса у интактных крыс, через 1 месяц после окончания введения канцерогена и сочетанного воздействия двух факторов (two-way ANOVA), ($p \leq 0,05$).

В субкапсулярных клетках гистамин снижается в 1,2 раза (Рис. 56).

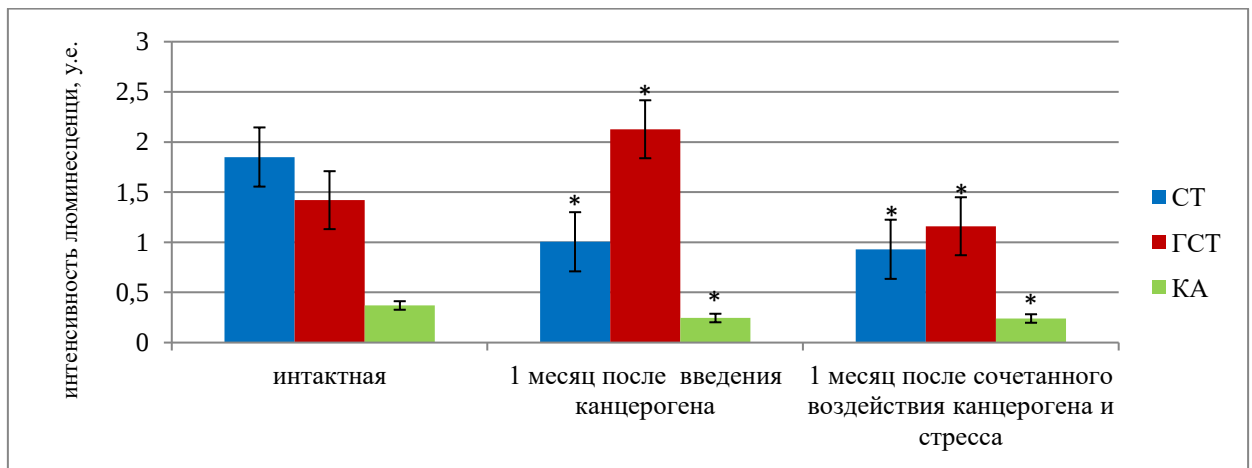


Рисунок 56 -Уровень биогенных аминов в клетках субкапсулярной зоны у интактных крыс, через 1 месяц после окончания введения канцерогена и сочетанного воздействия канцерогена и стресса (two-way ANOVA), ($p \leq 0,05$).

Достоверное увеличение гистамина в 1,8 и 1,4 раза наблюдается только в тучных клетках и в их микроокружении по сравнению с интактными крысами (Рис. 57). В остальных структурах уровень гистамина приближается к показателям интактных животных.

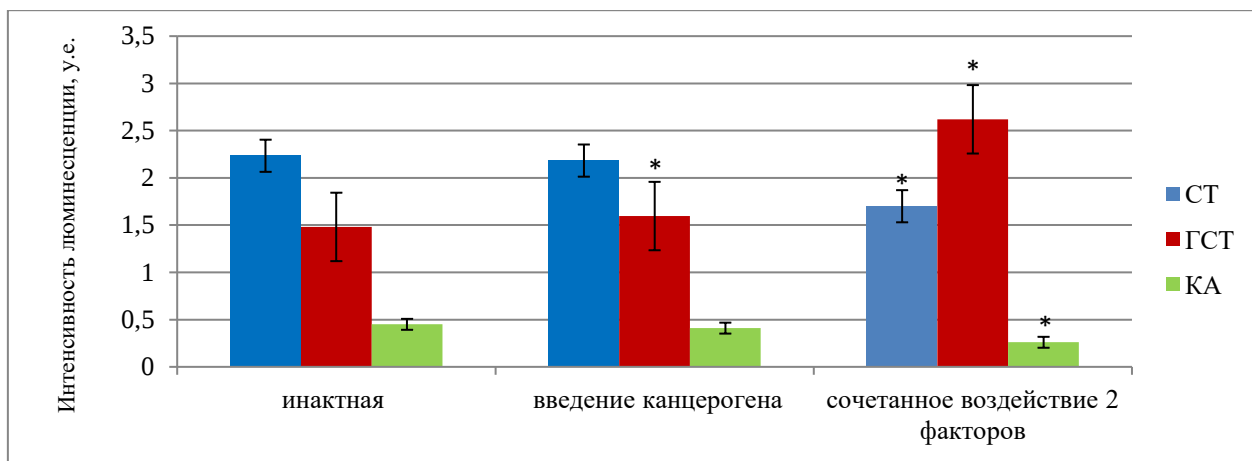


Рисунок 57 - Уровень биогенных аминов в тучных клетках у интактных крыс, через 1 месяц после окончания введения канцерогена и сочетанного воздействия двух факторов (two-way ANOVA), ($p \leq 0,05$).

Соотношение $(СТ+ГСТ)/КА$ во всех изучаемых структурах увеличивается почти в 1,5 раза, что может свидетельствовать об угнетении их функциональной активности. Исключение составляют премедуллярные и субкапсулярные клетки, в которых оно остается на одном уровне с интактными животными (Рис. 58).

В междольковых промежутках тимуса и в соединительной ткани визуализируются тучные клетки, их количество в 1,2 раза превышает количество тучных клеток у интактных крыс (Рис. 59).

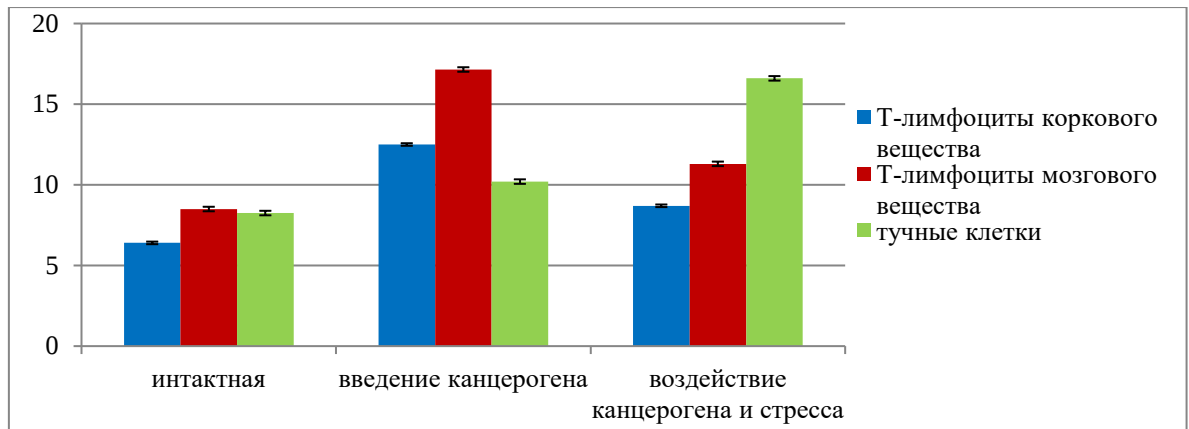


Рисунок 58 - Изменение соотношения (СТ+ГСТ)/КА в Т-клетках коркового и мозгового вещества и в тучных клетках тимуса у интактных животных, через 1 месяц после введения канцерогена и после окончания сочетанного воздействия факторов.

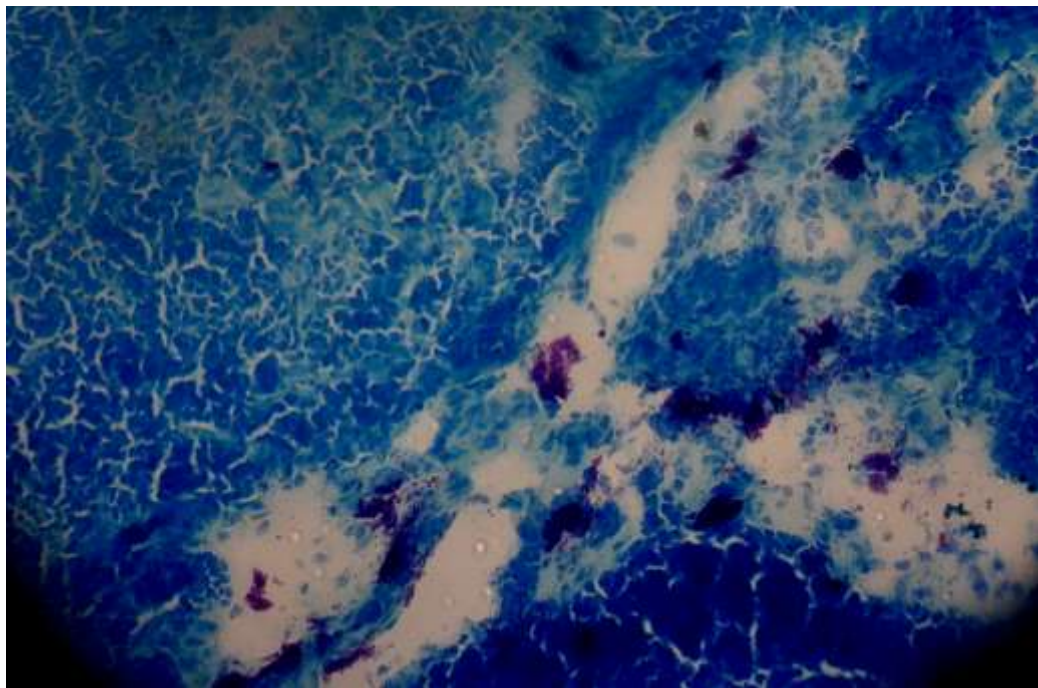


Рисунок 59 - Тимус. 1 месяц после сочетанного воздействия факторов. Визуализируются тучные клетки, различные по степени дегрануляции. Окраска полихромным толуидиновым синим по Унна. Микромед 3 Люм. Ув. X400.

Важно отметить, что в тучноклеточной популяции нарастает количество дегранулированных T-2 и T-3 форм (Рис. 60). Индекс дегрануляции через 1 месяц в этой группе составил 1,78.

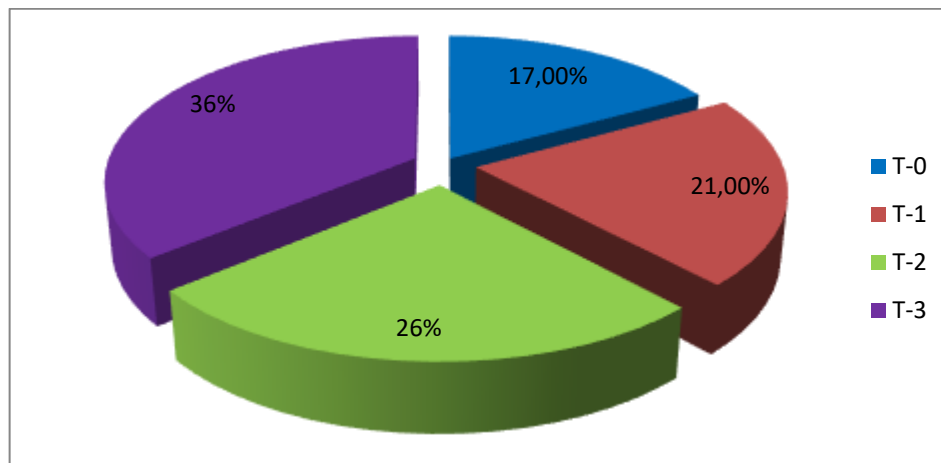


Рисунок 60 - Соотношение разных форм тучных клеток по степени дегрануляции в тимусе крыс через 1 месяц после окончания сочетанного воздействия факторов.

При иммуногистохимическом исследовании основные отличия отмечены в увеличении количества S-100⁺ клеток, которое в мозговом веществе в 2,8 раза превышает их число при изолированном введении канцерогена.

Число Vcl-2⁺ клеток коркового вещества в 4,2 раза больше, чем при изолированном введении канцерогена. Количество CD68⁺ клеток по сравнению с изолированным введением канцерогена в мозговом и в корковом веществе долек превышает показатели в 2 и в 4 раза соответственно.

Стоит отметить, что изменения уровня биогенных аминов, которые мы наблюдаем в тимусе через 1 месяц после сочетанного воздействия факторов, имеет однонаправленный характер с группой изолированного введения канцерогена. Отличительной чертой является достоверное увеличение в 1,6 и 1,2 раза уровня гистамина в тучных клетках и в их

микроокружении по сравнению с изолированным введением канцерогена. А также достоверное снижение уровня серотонина и катехоламинов в премедуллярных и субкапсулярных клетках и тимоцитах коркового вещества.

Показатели соотношения биогенных аминов в люминесцирующих структурах несколько снижены по сравнению с группой изолированного введения канцерогена в субкапсулярных клетках, лимфоцитах коркового и мозгового вещества в среднем в 1,4 раза, в результате чего можно предположить их более высокую функциональную активность по сравнению с изолированным введением канцерогена. В тучных клетках наблюдается противоположный процесс – соотношение (СТ+ГСТ)/КА при сочетанном воздействии двух факторов превышает таковое у животных с изолированным введением канцерогена в 1,5 раза.

3.4.2 Морфофункциональное состояние тимуса крыс через 2 месяца после сочетанного воздействия введения канцерогена и водно-иммобилизационного стресса

Через 2 месяца после сочетанного воздействия этих факторов на срезах, окрашенных гематоксилином и эозином, отмечаются веретенообразно вытянутой формы дольки тимуса, которые разделены заполненными жировой и соединительной тканью междольковыми промежутками. Мозговое вещество не имеет четких границ (Рис. 61).

Масса тимуса в 1,5 раза меньше, чем у интактных крыс. В динамике масса снижается на 15% по сравнению с предыдущим сроком исследования. С помощью морфометрии выявлено, что площадь мозгового вещества возросла в 1,5 раза по сравнению с интактными крысами, но в 1,8 раза снижена по сравнению с предыдущим сроком. Толщина коркового вещества по сравнению с предыдущим сроком исследования уменьшилась вдвое и приближается к показателю интактных животных.

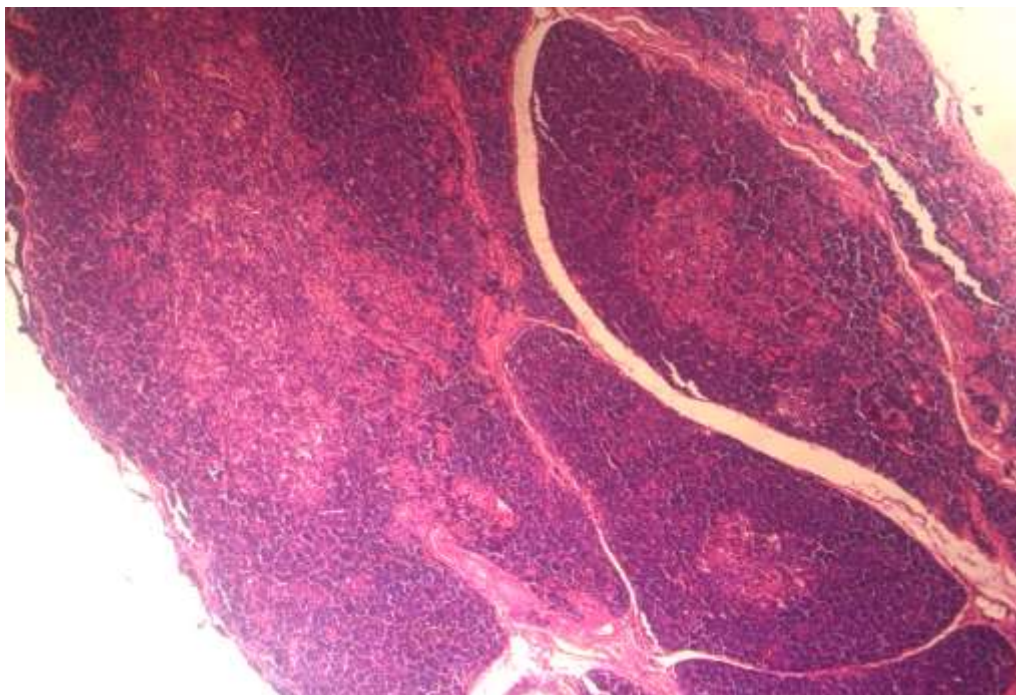


Рисунок 61 - Тимус. 2 месяца после окончания сочетанного воздействия факторов. Дольки веретенообразной формы, расширенные междольковые промежуки. Окраска гематоксилином и эозином. Микромед 3 Люм. Ув. X100.

В мозговом веществе тимуса число $CD3^+$ клеток возрастает в 2 раза по сравнению с интактными животными, однако их количество лишь незначительно превышает показатели предыдущего срока.

Число $V\alpha 1-2^+$ клеток в мозговом веществе в 2 раза возрастает по сравнению с интактными животными и в 6 раз превышает значения предыдущей группы. В корковом веществе их содержание в динамике почти не изменяется (Рис. 62).

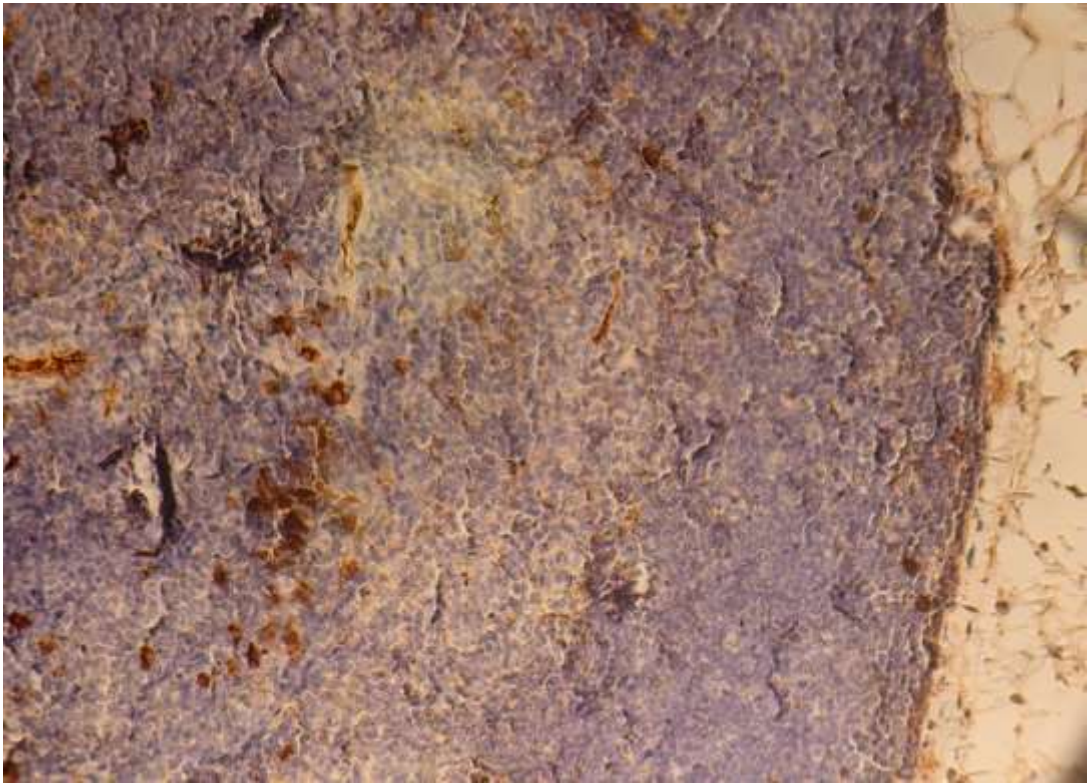


Рисунок 62 -Тимус. 2 месяца после окончания сочетанного воздействия факторов. Увеличение количества Bcl-2⁺ клеток в корковом веществе. Иммуногистохимическая реакция на белок Bcl-2. Микромед 3 Люм. Ув. X400.

Количество S-100⁺ клеток в мозговом веществе в динамике продолжает расти, их число увеличивается в 1,5 раза. В кортико-медуллярной зоне долики число S-100⁺ клеток возрастает в 2 раза по сравнению с предыдущим сроком исследования, но не достигает показателей интактной группы.

Количество Pan-cytokeratin⁺ клеток в мозговом веществе в динамике продолжает возрастать, увеличиваясь в 2 раза (Рис. 63).

Их число также превышает в 1,7 раза показатели при изолированном введении канцерогена.

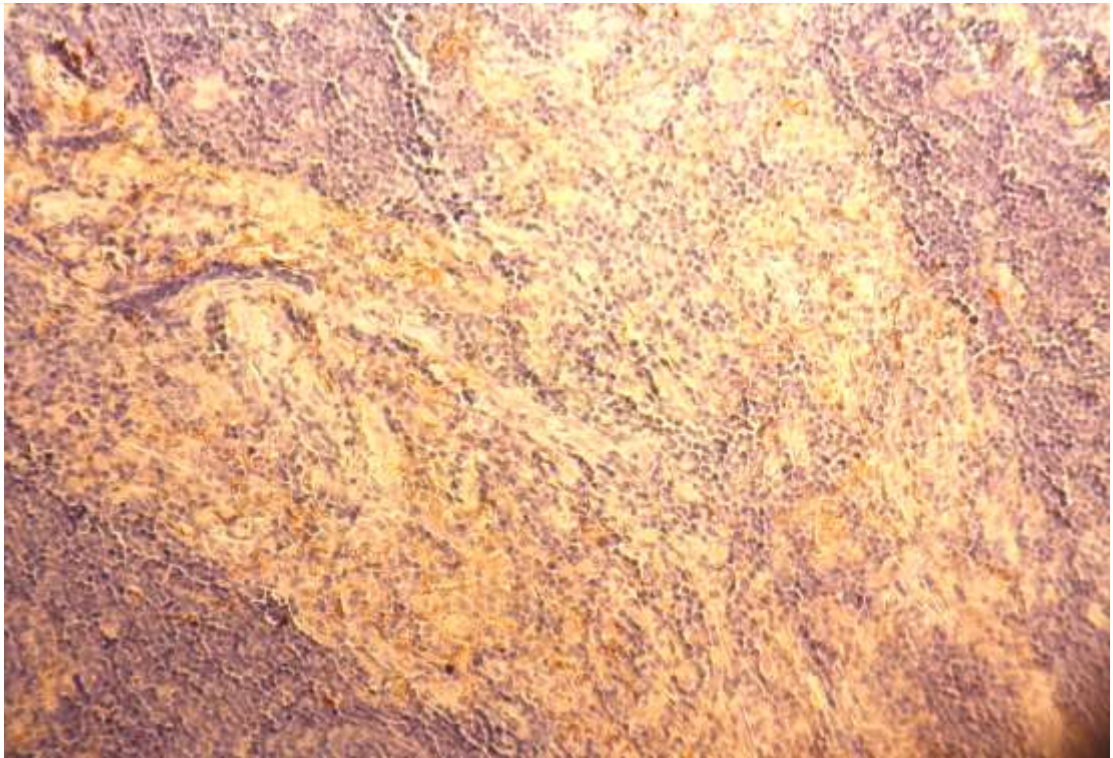


Рисунок 63 - Тимус. 2 месяца после окончания сочетанного воздействия факторов. Увеличение количества Pan-cytokeratin⁺ в мозговом и корковом веществе дольки.

Иммуногистохимическая реакция на Pan-cytokeratin.

Микромед 3 Люм. Ув. X400.

Число CD68⁺ клеток с увеличением срока исследования достоверно снижается по всему веществу дольки (в 4,5 раза - в мозговом веществе и в 2,4 раза - в корковом), также резкое снижение числа этих клеток прослеживается в мозговом веществе (в 8 раз) по сравнению с группой контроля (Рис. 64).

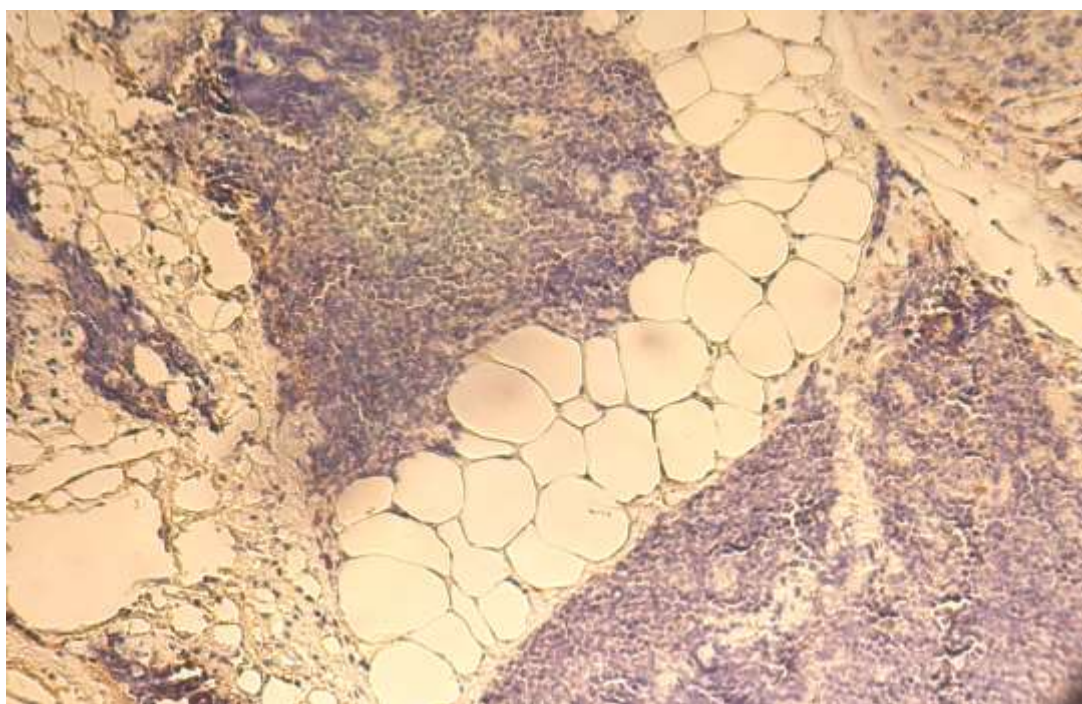


Рисунок 64 - Тимус. 2 месяца после окончания сочетанного воздействия факторов. Снижение количества CD68⁺ - лимфоцитов.

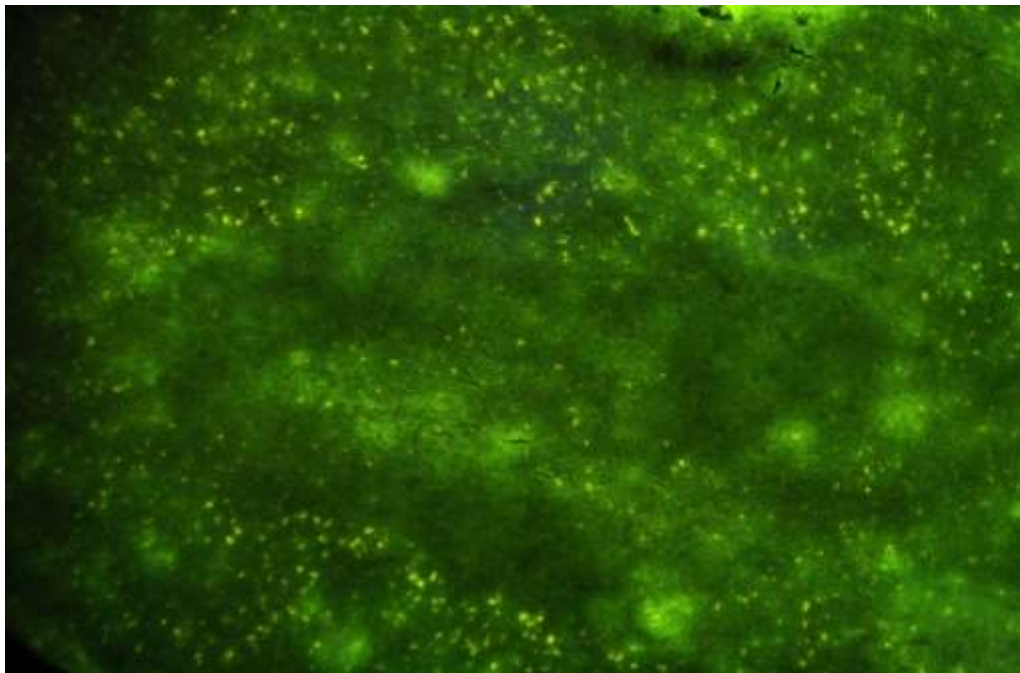
Расширение междольковых промежутков, заполненных жировой тканью. Иммуногистохимическая реакция на CD68.

Микромед 3 Люм. Ув. X400.

При люминесцентной микроскопии визуализируется вытянутой подковообразной формы мозговое вещество, биоаминсодержащие клетки разбросаны. Отсутствует четкая граница между корковым и мозговым веществом (Рис. 65).

Через 2 месяца после окончания сочетанного воздействия в субкапсулярных клетках, тимocyтах коркового вещества и в тучных клетках прослеживается увеличение уровня гистамина в 1,2 раза по сравнению с интактными животными.

Наблюдается снижение уровня серотонина: в премедуллярных клетках его содержание уменьшается в 1,8 раза, в Т-лимфоцитах коркового вещества – в 1,5 раза, в тучных клетках и их микроокружении - в 1,6 и 1,4 раза по сравнению с интактными. Уровень катехоламинов нарастает в тучных клетках в 1,4 раза.



**Рисунок 65 - Тимус. 2 месяца после сочетанного воздействия факторов.
Клетки премедуллярной зоны окружают мозговое вещество
неправильной формы. Метод Кросса. Микромед 3 Люм. Ув. X100.**

На этом сроке исследования по сравнению с группой контроля соотношение (СТ+ГСТ)/КА снижается в премедуллярных и в тучных клетках в 1,6 раза, что говорит об увеличении функциональной активности клеточных структур. В субкапсулярных клетках и тимоцитах мозгового вещества это соотношение, напротив, возрастает в 1,3 раза, в тимоцитах коркового вещества – в 1,8 раза.

Выявляется снижение общего количества тучных клеток по сравнению с предыдущим сроком почти в 4 раза. Продолжают преобладать дегранулированные клетки Т-2 - 30% и полностью опустошенные формы клеток Т-3 - 35% (Рис. 66). Показатель индекса дегрануляции сохраняется на прежнем уровне и равен 1,78.

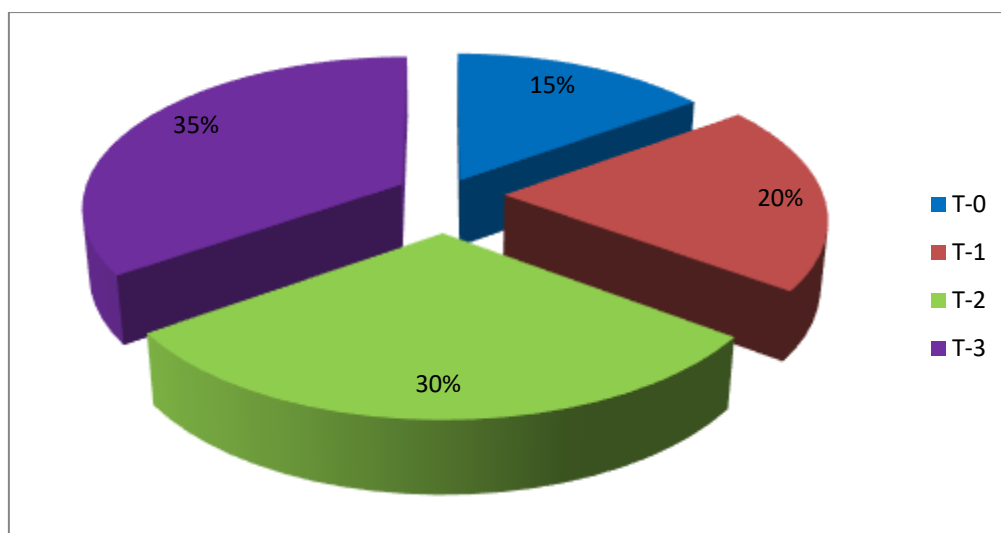


Рисунок 66 - Соотношение различных форм тучных клеток по степени дегрануляции в тимусе крыс через 2 месяца после сочетанного воздействия.

При сочетанном воздействии двух факторов наблюдаются выраженные морфологические изменения тимуса: увеличение междольковых промежутков, разрастание жировой ткани и замещение ею функциональной ткани тимуса, чего нет при изолированном введении канцерогена на этом сроке исследования.

И сочетанное воздействие факторов, и изолированное введение канцерогена через 2 месяца приводит к схожим изменениям со стороны моноаминов, однако есть и особенности. Так, уровень гистамина в данной группе возрастает по сравнению с группой контроля (Табл. 7).

Функциональная активность клеточных структур угнетается по сравнению с изолированным введением канцерогена. На это указывает возрастание соотношения (СТ+ГСТ)/КАв субкапсулярных клетках (в 1,6 раза), в Т- клетках коркового и мозгового вещества (в 2,4 и 1,7 раза). Функциональная активность тучных клеток, напротив, увеличивается.

**Таблица 7. Уровень биогенных аминов (у.е.) в структурах тимуса
у интактных крыс и через 1 и 2 месяца у крыс
с изолированным введением канцерогена и после окончания
сочетанного воздействия факторов.**

Структуры		интактные крысы	1 месяц после изолированного введения канцерогена	2 месяца после изолированного введения канцерогена	1 месяц после сочетанного воздействия двух факторов	2 месяца после сочетанного воздействия двух факторов
ПМК	СТ	5,384±0,4	2,334 ± 0,2	2, 977 ± 0,02	3,21 ± 0,14	3,02 ± 0,17
	ГСТ	3,829±0,3	4,872 ± 0,5	2,132 ± 0,17*	3,83 ± 0,48	3,33 ± 0,11*
	КА	0,689±0,05	0,579 ± 0,04	0,993 ± 0,02*	0,58 ± 0,01	0,78 ± 0,04*
СКК	СТ	1,858 ± 0,17	1,005±0,06	1,611 ± 0,14	0,93 ± 0,04**	1,65 ± 0,07*
	ГСТ	1,42 ± 0,2	2,127 ± 0,2	1,345 ± 0,2	1,16 ± 0,1	1,68 ± 0,06*
	КА	0,371 ± 0,01	0,245 ± 0,01	1,121 ± 0,01*	0,24 ± 0,01*	0,29 ± 0,01*
ТКВ	СТ	1,596 ± 0,17	0,991 ± 0,06	0,721 ± 0,004	1,1 ± 0,06*	1,09 ± 0,05*
	ГСТ	1,493 ± 0,09	1,798 ± 0,11	1,431 ± 0,12	1,52 ± 0,06	1,75 ± 0,06
	КА	0,485 ± 0,028	0,37 ± 0,04	0,189 ± 0,03	0,3 ± 0,01	0,24 ± 0,01*
ТМВ	СТ	0,857 ± 0,07	0,611 ± 0,04	0,747 ± 0,01	1,1 ± 0,06	0,86 ± 0,01
	ГСТ	1,375 ± 0,14	2,984 ± 0,4	0,937 ± 0,23*	1,51 ± 0,05*	1,32 ± 0,04*
	КА	0,261 ± 0,07	0,243 ± 0,06	0,538 ± 0,04	0,23 ± 0,01*	0,2 ± 0,01*
ТК	СТ	2,234 ± 0,01	2,183 ± 0,01	1,257 ± 0,14	1,7 ± 0,14	1,39 ± 0,05
	ГСТ	1,481± 0,17	1,596 ± 0,01	1,18 ± 0,45	2,62 ± 0,13*	1,84 ± 0,04*
	КА	0,45 ± 0,01	0,41 ± 0,003	0,377 ± 0,04	0,26 ± 0,002*	0,65 ± 0,06*
М/О ТК	СТ	1,347 ± 0,06	1,159 ± 0,03	1,217 ± 0,12	0,89 ± 0,006	0,95 ± 0,04*
	ГСТ	1,189 ± 0,12	1,293 ± 0,02	0,884 ± 0,05	1,62 ± 0,03*	1,32 ± 0,04*
	КА	0,304 ± 0,03	0,222 ± 0,01	0,267 ± 0,015	0,215±0,001	0,14 ± 0,004*

Достоверные отличия определялись от данных интактных крыс при * - $p \leq 0,05$ (two-way ANOVA).

Иммуногистохимическое исследование структур тимуса показало, что основные отличия по сравнению с изолированным введением канцерогена в изменении числа $CD3^+$ клеток (больше в 1,5 раза) и в корковом, и в мозговом веществе тимуса, и в снижении количества $CD68^+$ клеток в мозговом веществе (уменьшается почти в 10 раз).

3.4.3 Морфофункциональное состояние тимуса крыс через 3 месяца после сочетанного воздействия введения канцерогена и водно-иммобилизационного стресса

Структура тимуса на этом сроке исследования значительно изменяется. Большая часть паренхимы тимуса заменяется жировой и соединительной тканью. Уменьшается площадь мозгового вещества, оно принимает формы округлых включений (Рис. 67).

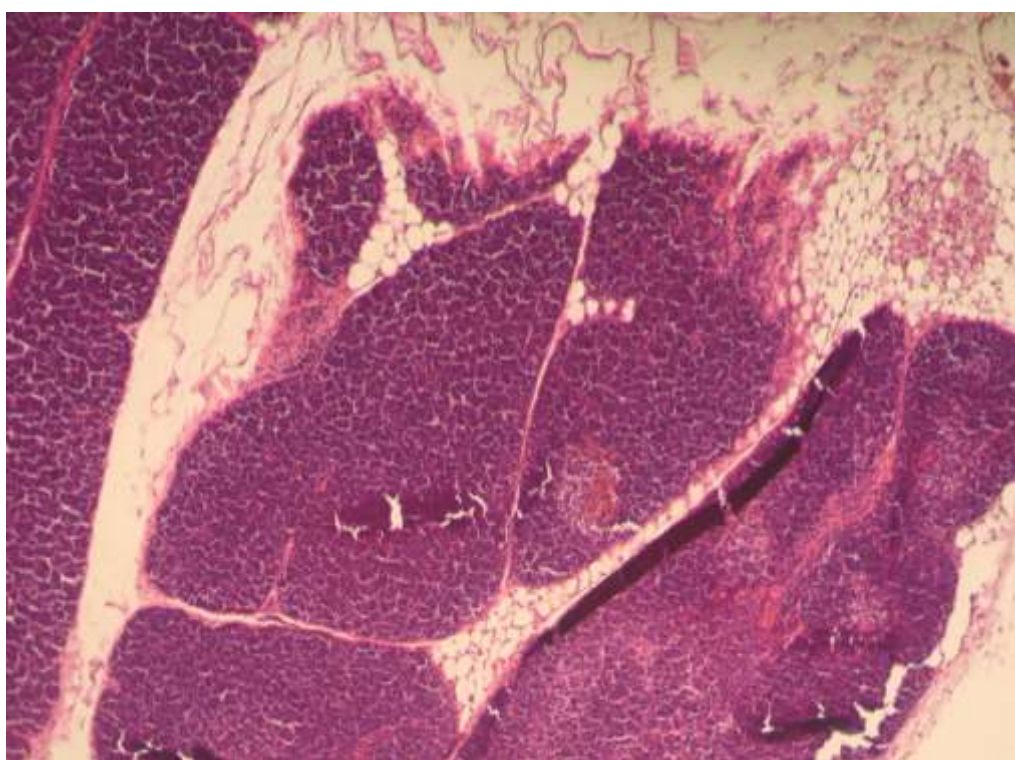


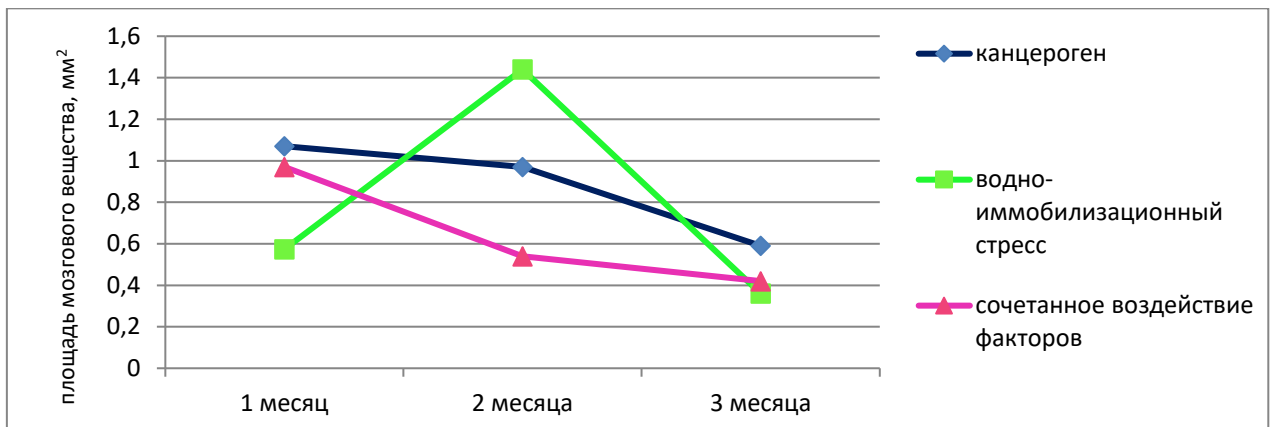
Рисунок 67 - Тимус. 3 месяца после окончания сочетанного воздействия факторов. Мозговое вещество в виде небольших включений округлой формы, замещение паренхимы жировой и соединительной тканью.

Окраска гематоксилином и эозином. Микромед 3 Люм. Ув.X100.

Масса тимуса в динамике незначительно возрастает, приближаясь к его массе через 1 месяц после сочетанного воздействия факторов. Данные морфометрии свидетельствуют об уменьшении в динамике площади

мозгового вещества на 24% ($0,4 \pm 0,01 \text{ мм}^2$). Толщина коркового вещества приближается к данным предыдущего срока ($0,49 \pm 0,04 \text{ мм}$) (Рис. 68 а, б).

а.



б.

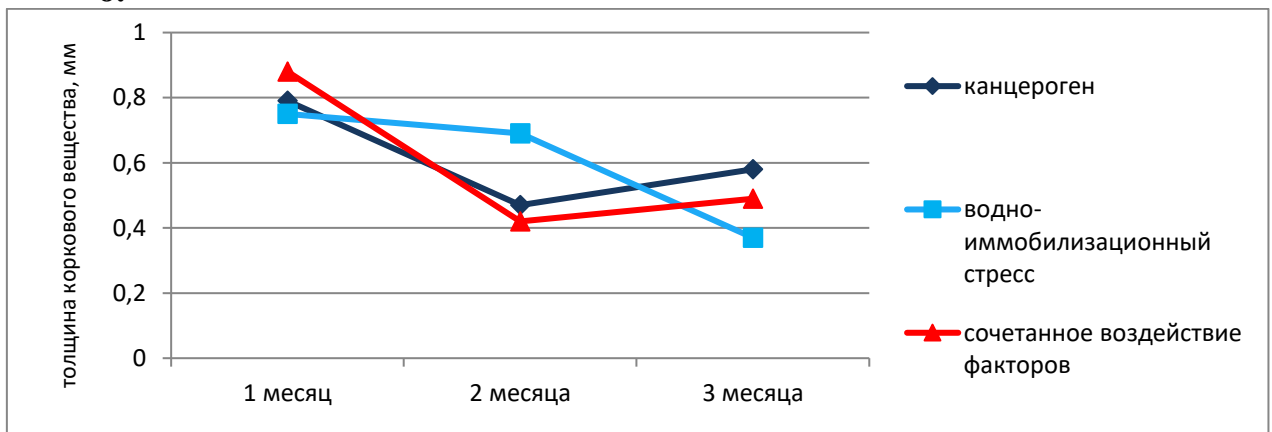


Рисунок 68 - Изменение площади мозгового вещества (а) и толщины коркового вещества (б) тимуса у животных всех экспериментальных групп.

Иммуногистохимическое исследование структур тимуса показало, что процент $CD3^+$ клеток по сравнению с интактными крысами изменяется недостоверно (Рис. 69). Однако по отношению к предыдущему сроку их количество в мозговом веществе вдвое уменьшается.

$Bcl-2^+$ клетки возрастают в 12 раз в мозговом и в 3,4 раза - в корковом веществе по сравнению с группой контроля. Число $Bcl-2^+$ клеток в мозговом веществе значительно возрастает, увеличиваясь в 6 раз по сравнению

с предыдущим сроком исследования (Рис. 70). В корковом веществе их количество с увеличением срока наблюдения снижается.

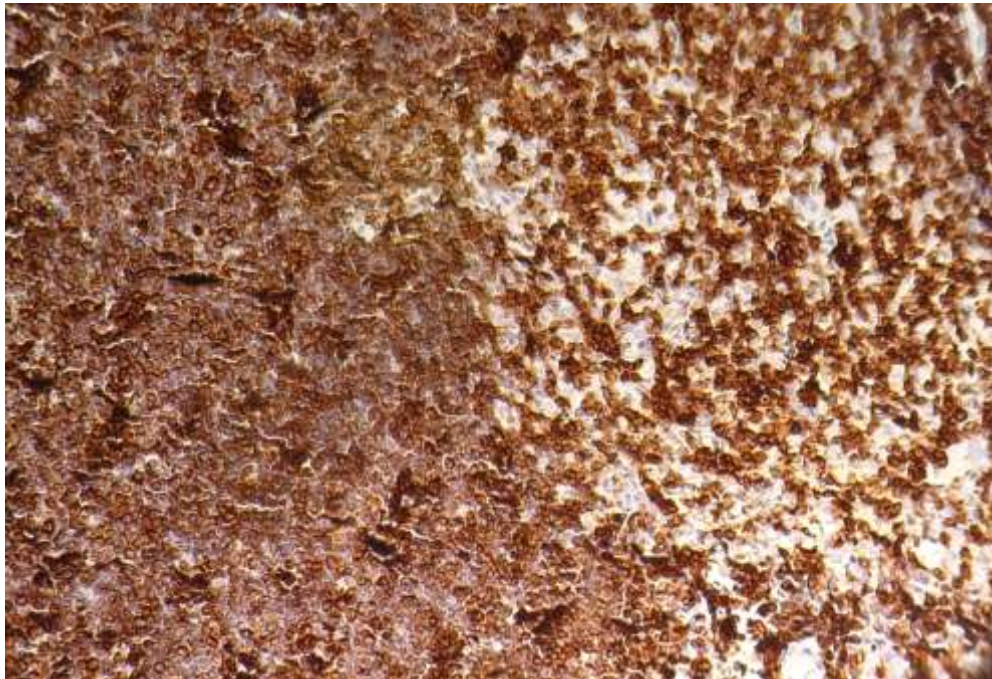


Рисунок 69 - Тимус. 3 месяца после окончания сочетанного воздействия факторов. CD3⁺ - лимфоциты в мозговом веществе долики. Иммуногистохимическая реакция на CD3. Микромед 3 Люм. Ув. X400.

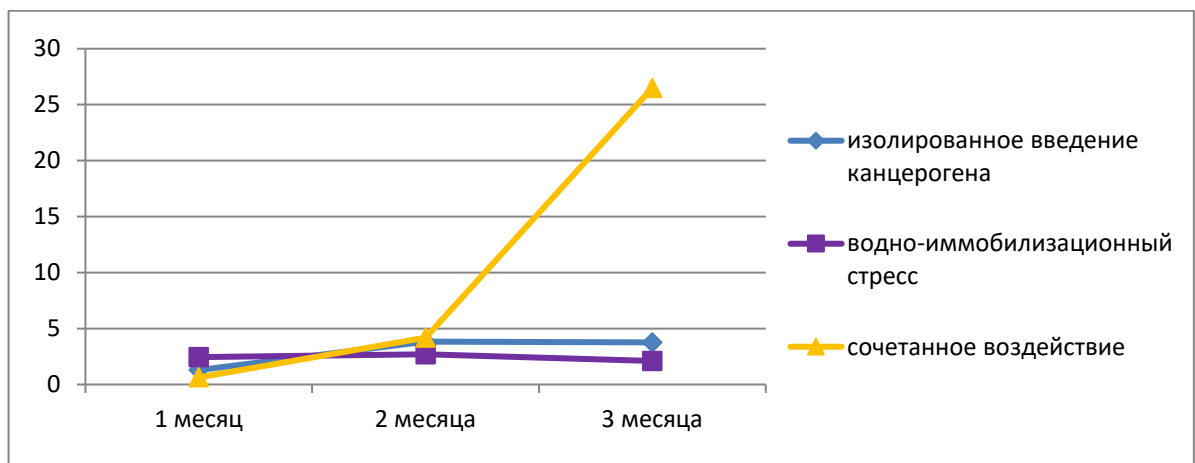


Рисунок 70 - Экспрессия Bcl-2 в клетках мозгового вещества у крыс после изолированного введения канцерогена, водно-иммобилизационного стресса и сочетанного воздействия факторов.

В мозговом веществе возрастает количество CD68⁺ клеток в 1,3 раза по сравнению с интактными, и в 12 раз относительно предыдущего срока исследования, в корковом веществе – практически не изменяется (Рис. 71).

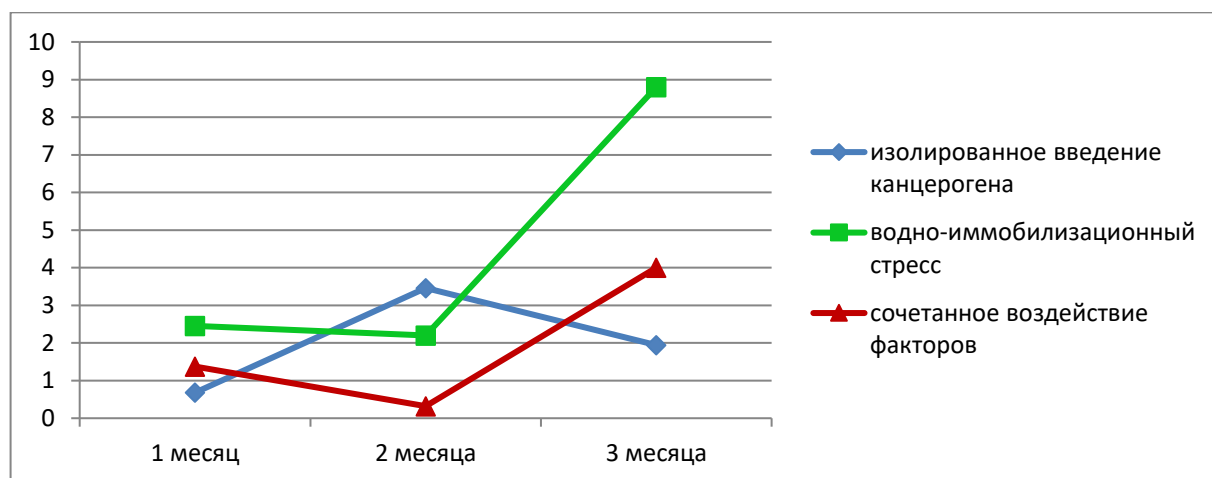


Рисунок 71 - Экспрессия CD68 в клетках мозгового вещества у крыс после изолированного введения канцерогена, водно-иммобилизационного стресса и сочетанного воздействия факторов.

Количество Pan-cytokeratin⁺ клеток по сравнению с предыдущим сроком снижается по всей длине, наиболее значительное снижение их числа (в 4 раза) - в корковом веществе.

Отмечается достоверное снижение S-100⁺ клеток в кортико-медуллярной зоне в 3 раза, в мозговом веществе - в 1,3 раза по сравнению с интактными животными и со значениями предыдущей группы исследования [175]. Их процент составляет в мозговом веществе – 7,35% (у интактных - 9,84%, в предыдущей группе – 19,15%), в корковом веществе – 4,38% (у интактных - 13,6%, в предыдущей группе – 10,2%).

Сочетанное воздействие факторов через 3 месяца наблюдений приводит к еще более выраженным изменениям в цитоархитектонике и функциональной активности биоаминсодержащих структур тимуса. Граница между корковым и мозговым веществом едва различима (Рис. 72).

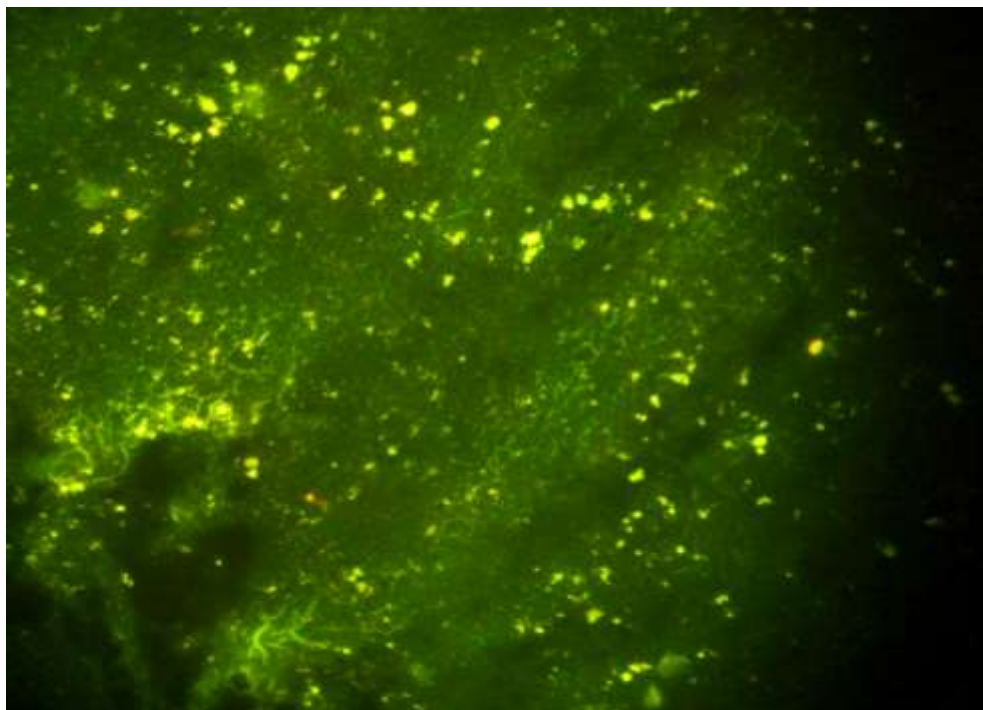


Рисунок 72 - Тимус. 3 месяца после окончания сочетанного воздействия факторов. Люминесцирующие гранулярные клетки. Метод Кросса. Микромед 3 Люм. Ув. X100.

Определение уровня биологически активных аминов позволило выявить достоверное снижение уровня гистамина по сравнению с группой контроля в тимоцитах мозгового вещества в 1,5 раза (Рис. 73). В тучных клетках его уровень возрастает в 1,2 раза. В остальных структурах достигает показателей интактных крыс. Уровни серотонина и катехоламинов в Т-клетках мозгового вещества возрастают в 1,6 и в 1,5 раза соответственно. В премедуллярных, субкапсулярных клетках, Т - лимфоцитах коркового вещества и в тучных клетках и серотонин, и катехоламины достоверно снижаются. Так, уровень серотонина в премедуллярных и субкапсулярных клетках достоверно снижается в 1,7 в 1,4 раза (Рис. 74). Наиболее выраженное уменьшение уровня катехоламинов отмечается в Т-лимфоцитах коркового вещества в 1,7 раза и в тучных клетках – в 1,5 раза.

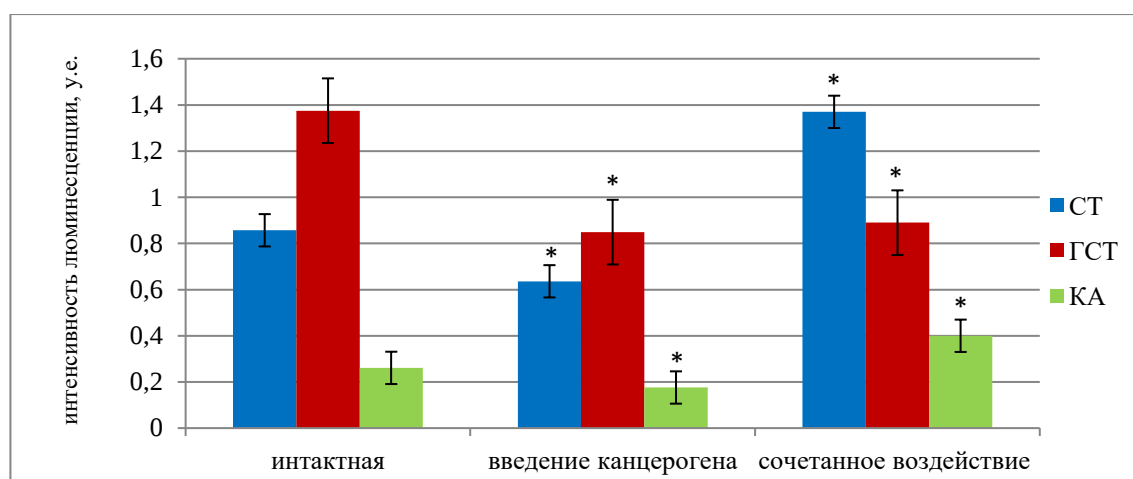


Рисунок 73 - Уровень биогенных аминов в Т-лимфоцитах мозгового вещества тимуса у интактных крыс и через 3 месяца после изолированного введения N-метил-N-нитрозо мочевины и сочетанного воздействия двух факторов (two-way ANOVA), ($p \leq 0,05$).

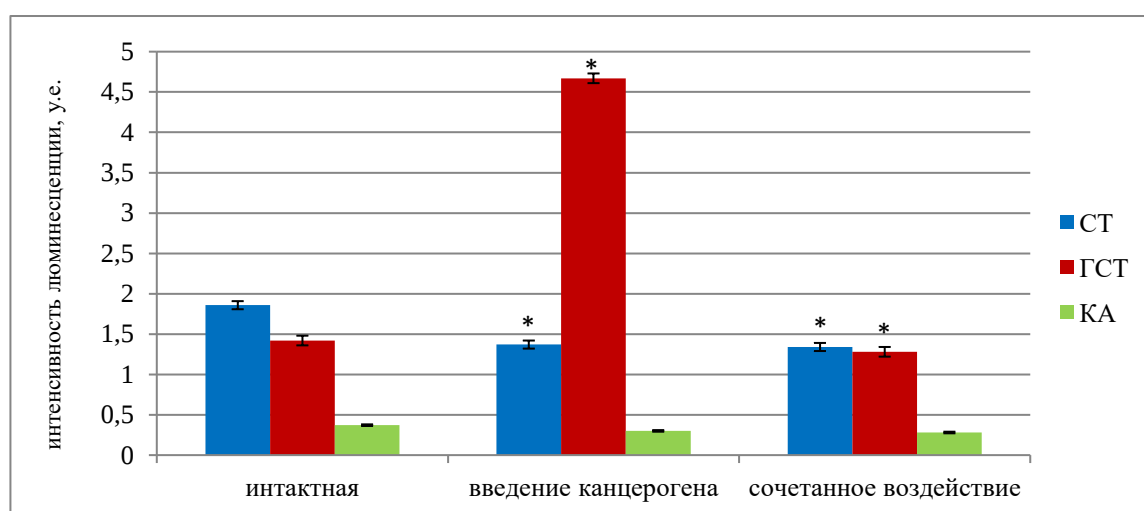


Рисунок 74 - Уровень биогенных аминов в субкапсулярных клетках тимуса у интактных крыс, через 3 месяца после изолированного введения канцерогена и сочетанного воздействия факторов (two-way ANOVA), ($p \leq 0,05$).

По сравнению с предыдущим сроком основные изменения происходят в Т-лимфоцитах мозгового вещества и тучных клетках. Уровень серотонина в этих клетках достоверно увеличивается в 1,6 и 1,3 раза соответственно. Уровень катехоламинов в клетках мозгового вещества возрастает в 2 раза,

а в тучных клетках уменьшается также в 2 раза. Остальные показатели приближаются к данным предыдущего срока наблюдения (Табл. 8).

Таблица 8. Уровень биогенных аминов (у.е.) в структурах тимуса у intactных крыс, через 1, 2 и 3 месяца после окончания сочетанного воздействия введения N-метил-N-нитрозомочевина и водно-иммобилизационного стресса.

Структуры тимуса		Intactные животные	1 месяц	2 месяца	3 месяца
ПМК	СТ	5,384±0,4	3,21 ± 0,14*	3,02 ± 0,17*	3,095 ± 0,12*
	ГСТ	3,829±0,3	3,83 ± 0,48	3,33 ± 0,11*	3,26 ± 0,32*
	КА	0,689±0,05	0,58 ± 0,01	0,78 ± 0,04*	0,61 ± 0,02*
СКК	СТ	1,858 ± 0,17	0,93 ± 0,04*	1,65 ± 0,07*	1,34 ± 0,06
	ГСТ	1,42 ± 0,2	1,16 ± 0,1	1,68 ± 0,06*	1,28 ± 0,07*
	КА	0,371 ± 0,01	0,24 ± 0,01*	0,29 ± 0,01*	0,28 ± 0,02*
ТКВ	СТ	1,596 ± 0,17	1,1 ± 0,06	1,09 ± 0,05	1,2 ± 0,08
	ГСТ	1,493 ± 0,09	1,52 ± 0,06	1,75 ± 0,06	1,4 ± 0,16
	КА	0,485 ± 0,028	0,3 ± 0,01	0,24 ± 0,01*	0,28 ± 0,005
ТМВ	СТ	0,857 ± 0,07	1,1 ± 0,06	0,86 ± 0,01	1,37 ± 0,08*
	ГСТ	1,375 ± 0,14	1,51 ± 0,05	1,32 ± 0,04	0,89 ± 0,04*
	КА	0,261 ± 0,07	0,23 ± 0,01	0,2 ± 0,01*	0,4 ± 0,02*
ТК	СТ	2,234 ± 0,01	1,7 ± 0,14	1,39 ± 0,05	1,84 ± 0,4
	ГСТ	1,481± 0,17	2,62 ± 0,13*	1,84 ± 0,04*	1,73 ± 0,1
	КА	0,45 ± 0,01	0,26 ± 0,002*	0,65 ± 0,06*	0,29 ± 0,02*
М/О ТК	СТ	1,347 ± 0,06	0,89 ± 0,006	0,95 ± 0,04*	0,87 ± 0,05*
	ГСТ	1,189 ± 0,12	1,62 ± 0,03*	1,32 ± 0,04*	0,69 ± 0,02*
	КА	0,304 ± 0,03	0,215± 0,001	0,14 ± 0,004*	0,14 ± 0,03*

Достоверные отличия определялись от данных intactных крыс при * - $p \leq 0,05$ (two-way ANOVA).

Соотношение (СТ+ГСТ)/КА по сравнению с intactной группой снижается в премедуллярных клетках и Т-лимфоцитах мозгового вещества в среднем в 1,5 раза, в лимфоцитах коркового вещества и в тучных клетках, напротив, в 1,5 раза возрастает (Рис. 75).

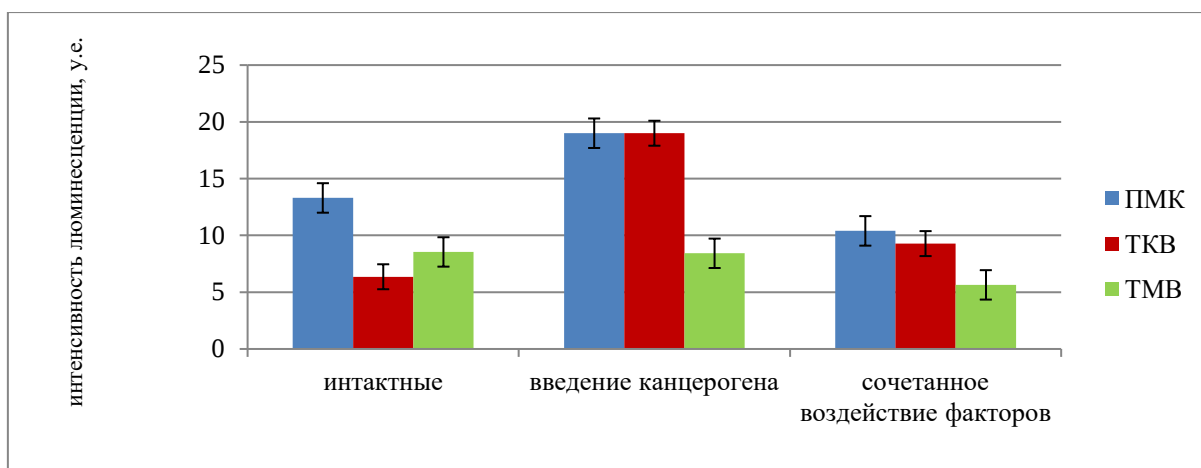


Рисунок 75 - Соотношение (СТ+ГСТ)/КА в премедуллярных, Т-лимфоцитах коркового и мозгового вещества у интактных крыс, через 3 месяца после окончания введения канцерогена и сочетанного воздействия двух факторов (two-way ANOVA).

Во всех клеточных структурах соотношения (СТ+ГСТ)/КА, кроме тучных клеток, в 2 раза меньше по сравнению с показателями группы с изолированным введением канцерогена.

Среди тучных клеток обнаруживаются практически в одинаковом количестве все типы тучных клеток разной степени дегрануляции (Рис. 76).

Количество недегранулированных Т-0 и частично дегранулированных Т-1 форм составляет 25,7% и 26,6%, дегранулированных и полностью опустошенных форм – 23% и 24,7% соответственно [175]. При этом индекс дегрануляции снижается и составляет 1,46.

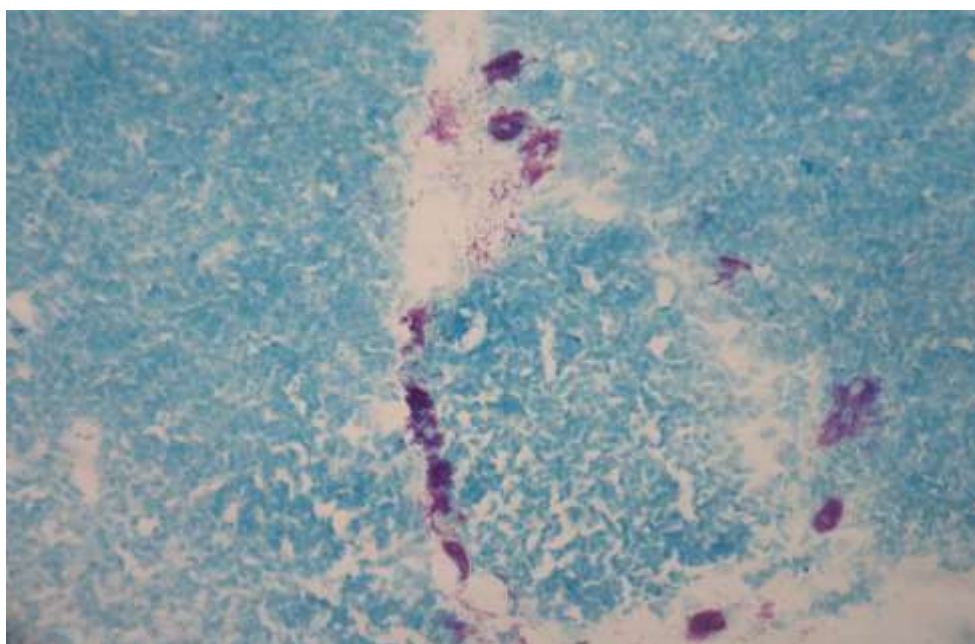


Рисунок 76 - Тимус. 3 месяца после окончания сочетанного воздействия факторов. Тучные клетки разной степени дегрануляции. Окраска толуидиновым синим по Унна. Микромед 3 Люм. Ув. X100.

Таким образом, через 3 месяца после сочетанного воздействия двух факторов отмечаются выраженные изменения в морфологии тимуса по сравнению с изолированным введением канцерогена [175].

Зафиксировано достоверное снижение $S-100^+$ клеток не только по сравнению с интактными крысами, но и с группой изолированного введения канцерогена. Так, количество $S-100^+$ клеток уменьшается в мозговом веществе в 1,3 раза, в кортико-медуллярной зоне – в 3 раза соответственно.

При сравнении содержания гистамина выявлены разнонаправленные их изменения в группах с изолированным введением канцерогена и сочетанного влияния двух факторов.

Вычисленные показатели соотношения $(СТ+ГСТ)/КА$ во всех клеточных структурах, кроме тучных клеток, в 2 раза меньше по сравнению с показателями группы с изолированным введением канцерогена.

ГЛАВА 4. ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ И ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Проблема резкого роста онкологических заболеваний в стране и в мире, а зачастую и безуспешность лечения онкопатологии, стимулирует все более глубокое изучение процессов канцерогенеза. По прогнозам Всемирной организации здравоохранения к 2050 году ежегодная онкологическая заболеваемость в мире возрастет почти в два раза [177, 289]. Данные литературы приводят неутешительную статистику заболеваемости женского населения по всему миру раком молочной железы – около 20% всех злокачественных опухолей [178, 179, 180].

На сегодняшний день известно, что иницирующими факторами малигнизации клеток различной морфофункциональной организации является разнообразный ряд причин: генетических, гормональных сдвигов, агрессивных вирусных агентов, развитие острых и хронических стресс – реакций, экологических факторов, старение населения и нарушения в иммунной системе, а также канцерогены химической, физической, биологической природы. В современном мире известны такие химические канцерогены как полициклические ароматические углеводороды и амины, нитрозамины, алкилирующие агенты, природные и неорганические вещества [181].

Установлено, что одной из важнейших задач иммунной системы является не только защита от инфекций и внешних агрессивных агентов, но, в большей степени, контроль за спонтанными мутациями [182].

За последние годы сформировались и активно развиваются новые научные направления – нейроиммуноэндокринология и онкоиммунология. Многочисленные исследования иммунного статуса больных с онкопатологией показали, что опухолевый рост, как правило, сопровождается изменениями со стороны иммунной и эндокринной систем [179, 183, 184, 185]. Известно, что развитию канцерогенеза предшествует и способствует его прогрессированию Т и В – зависимые иммунодефицитные

состояния, характеризующиеся подавлением активности и неспособностью организма к эффективной реакции защиты на уровне клеточного и гуморального звена иммунитета [185]. При некоторых локализациях рака, например, молочной железы, щитовидной железы, ободочной кишки процессы канцерогенеза закономерно сочетаются с недостаточностью клеточных механизмов элиминации раковых клеток, что подтверждается моноцитопенией, падением уровня в крови CD-3, CD-4 Т-лимфоцитов и NK-клеток. При этом происходит увеличение суммарно отрицательного заряда мембран лимфоцитов, что приводит к нарушению их контактного взаимодействия [185].

Большой интерес для исследователей представляют процессы взаимодействия нервной, эндокринной и иммунной систем при стрессе. По данным литературы известно, что воздействие стресса может привести к глубоким изменениям в иммунном статусе, при этом ответ иммунной системы зачастую зависит от характера стрессового фактора [117]. До сих пор наименее изученными остаются постстрессовые иммуномодуляционные изменения в организме, начиная с детского возраста. Отмечается, что стресс, перенесенный в детстве, способен изменять постстрессовые механизмы и реакции в организме взрослого человека [117].

Известны данные о двух группах факторов, способных вызывать подавление иммунитета на фоне стресса. С одной стороны, это непосредственная активация нейроэндокринной оси вследствие воздействия на организм токсических веществ и эмоционального стресса, в результате чего происходит увеличение продукции гипоталамусом кортикотропин-высвобождающего гормона. С другой стороны – опосредованная активация нейроэндокринной оси, которая может возникнуть при инфекционных заболеваниях или при дисбалансе в питании [121].

Хорошо известны процессы возрастной инволюции тимуса, возникающей в результате старения организма, и акцидентальной инволюции, которая может быть спровоцирована различными факторами.

В обоих случаях эти процессы ведут к угнетению иммунной реактивности организма, что нередко приводит к появлению злокачественных новообразований [161]. Одной из причин развития акцидентальной инволюции является стресс. При сопоставлении стадий адаптационного синдрома при стрессе и стадий акцидентальной инволюции известно, что стадия тревоги соответствует первой (покоящийся тимус с признаками увеличения массы органа) и второй (начальные инволютивные процессы с миграцией макрофагов в корковую зону тимуса) фазам инволюции, стадия резистентности - третьей фазе (нарастание признаков инволюции). Стадия истощения – 4-й и 5-й стадиям инволюции, которые завершаются развитием атрофии, жировой дистрофии, склероза и формированием микрокальцинатов [56, 121].

Тимус способен взаимодействовать с эндокринной системой как благодаря тимическим гормонам, так и Т-лимфоцитам, которые продуцируют лимфокины, воздействующие на гипоталамус и оказывающие регуляторное действие на продукцию аутоантител к гормонам и их рецепторам [20]. Увеличение в Т-тимфоцитах уровня таких биогенных аминов, как гистамин и серотонин способствует запуску необратимой запрограммированной гибели клеток [186].

В последнее десятилетие активно обсуждается факт, что возможным скрытым, системным и негативным действием на организм обладает психогенный стресс. Существует ряд данных о негативном влиянии стресса на иммунный статус у здоровых людей [274], студентов во время сессий, результаты анализа о негативном влиянии разводов на функционирование иммунной системы [290], изучение взаимосвязи посттравматического стресса и состояния иммунитета на прогноз у онкологических больных [12]. На сегодняшний день есть данные о взаимосвязи заболеваемости населения злокачественными новообразованиями и пусковыми стрессовыми психоэмоциональными факторами. Так, для 80% на первом месте стоит стресс, испытываемый на службе, в остальную группу входят прочие факторы

(проблемы в семье, утрата близкого человека и прочее) [177]. А также существуют экспериментальные работы, подтверждающие изменения иммунного статуса на фоне стресса различного генеза [11, 187, 291].

Однако, до сих пор официально стрессовый фактор в экспериментальной и клинической онкологии не рассматривается как пусковой механизм развития канцерогенеза. В нашей работе мы решили объединить известные модели экспериментального канцерогенеза при введении N-метил- N-нитрозомочевины с развитием рака молочной железы [133] и воздействия водно-иммобилизационного стресса [164], чтобы оценить, каким образом стресс и введение канцерогена влияют на морфологию тимуса и процесс канцерогенеза.

Через 1 месяц после окончания введения канцерогена структура молочной железы соответствует таковой у интактных крыс. При этом в тимусе уже увеличивается площадь мозгового и толщина коркового вещества (в 3 и 2 раза соответственно). Нарастает количество люминесцирующих гранулярных клеток (в 1,5 раза). Начинает изменяться уровень биогенных аминов: уровень серотонина в клетках премедуллярной зоны достоверно снижается в 2,3 раза, в субкапсулярных клетках - в 1,8 раза. Содержание гистамина в этих же структурах, напротив, увеличивается в среднем в 1,5 раза, в тимоцитах мозгового вещества - в 2,2 раза.

Из данных литературы известно, что моноамины – серотонин и катехоламины, а также гистамин оказывают значительное влияние на физиологические процессы в органах и тканях [80, 188]. Серотонин усиливает активность и взаимодействие клеток иммунной системы, их миграцию, а также активирует фагоцитоз и продукцию интерлейкинов. Катехоламины способны активировать Т-хелперы, запускать процесс образования антител, повышать функциональную активность тучных клеток и клеток моноцитарно-макрофагальной системы, индуцировать гуморальный и клеточный иммунитет, влиять на продукцию противовоспалительных

цитокинов [80, 188, 292]. В свою очередь гистамин, напротив, оказывает угнетающее действие на фагоцитоз, снижает активность клеток гуморального иммунитета, усиливает цитотоксичность Т-клеток и натуральных киллеров [80]. По данным других авторов известно, что агрессивность опухолевого процесса приводит к волнообразным изменениям уровня гистамина. Есть данные, подтверждающие, что снижение его содержания происходит на фоне развития более агрессивной опухоли с метастазированием [160].

Соотношение (СТ+ГСТ)/КА в клетках субкапсулярной зоны, в лимфоцитах коркового и мозгового вещества возрастает. Таким образом, уже через 1 месяц отмечаются изменения, свидетельствующие об угнетении функциональной активности клеточных элементов тимуса.

Отмечается незначительное увеличение количества тучных клеток, они располагаются группами. При этом преобладают дегранулированные и полностью опустошенные клетки, индекс дегрануляции увеличивается и составляет 1,58.

Клетки мозгового вещества и премедуллярной зоны дают позитивную реакцию на белок S-100, его количество снижается в мозговом веществе в 2 раза, в кортико-медуллярной зоне – в 3 раза по сравнению с интактной группой. Количество CD68⁺ клеток снижается в зоне коркового и мозгового вещества в 4,5 и в 3,6 раза соответственно. Возрастает процент CD3⁺ клеток.

Через 2 месяца морфология молочной железы по-прежнему соответствует строению железы интактных крыс. Масса тимуса по сравнению с предыдущим сроком несколько возрастает (на 11%). Площадь мозгового вещества практически не изменяется, толщина коркового вещества начинает уменьшаться (в 1,6 раза). Визуализируются единичные участки, заполненные жировой и соединительной тканью.

Снижение уровня гистамина отмечается в премедуллярных клетках в 1,8 раза, в Т-лимфоцитах мозгового вещества и в тучных клетках - в 1,5 и более раз. Содержание серотонина остается сниженным по сравнению с контрольной группой во всех клеточных структурах,

что наиболее выражено (в 2 раза) в премедуллярных клетках, Т-лимфоцитах коркового вещества и в тучных клетках. Уровень катехоламинов в этих же структурах, напротив, достоверно возрастает. Соотношение (СТ+ГСТ)/КА в разных структурах тимуса изменяется неоднозначно. В Т-лимфоцитах коркового вещества соотношение увеличивается в 1,8 раза, что свидетельствует о продолжающемся подавлении функциональной активности этих клеток, а в премедуллярных, субкапсулярных клетках и Т-клетках мозгового вещества – достоверно снижается, что говорит о противоположном процессе [80, 189].

В тучноклеточной популяции продолжают преобладать дегранулированные и полностью опустошенные формы.

Наиболее достоверное увеличение численного показателя происходит среди Bcl-2⁺ клеток, их количество в кортико-медуллярной зоне возрастает и по сравнению с интактной группой, и с предыдущим сроком исследования. Этот белок является главным белком, который участвует в подавлении апоптоза. Bcl-2 выявляется, главным образом, на мембране митохондрий и, отчасти, на ядерных и клеточных мембранах [23]. Наиболее выраженная выработка Bcl-2 обнаруживается в незрелых Т - и В - клетках, зрелых иммунных клетках памяти, а также клетках головного мозга. Возрастание количества Bcl-2⁺ клеток встречается при высокой активности деления клеток [23, 190]. Увеличение экспрессии антиапоптотического белка может говорить о преобладании процессов пролиферации над гибелью клеток [190].

Число макрофагальных клеток возрастает и по сравнению с интактной группой, и с предыдущим сроком. Количество S-100⁺ клеток по всему веществу дольки увеличивается, наиболее достоверно в мозговом веществе – в 1,7 раза, однако не достигает показателей интактных крыс. Снижается число CD3⁺ клеток, что может быть связано с их миграцией на периферию. Возрастает процентное содержание Pan-cytokeratin⁺ клеток по всему веществу тимической дольки, что может быть связано с выходом из тимуса лимфоцитов.

Через три месяца после окончания введения канцерогена в молочной железе визуализируются многочисленные солитарные, в некоторых препаратах - мультифокальные очаги пролиферации долек и протоков. В отдельных случаях степень клеточной атипии характерна для неинвазивного рака *in situ*.

Масса тимуса через 3 месяца в динамике увеличивается на 7% по сравнению с предыдущим сроком, но не достигает контрольных цифр. В динамике достоверно уменьшается площадь мозгового вещества в 1,6 раз, а толщина коркового вещества приближается к данным предыдущей группы. При исследовании содержания биогенных аминов в клетках премедуллярной зоны и субкапсулярных клетках выявляется повышение уровня гистамина (в 2 и 3,2 раза соответственно), в тимоцитах коркового вещества его количество возрастает в 1,7 раза. Соотношение (СТ+ГСТ)/КА в изучаемых структурах, кроме Т-лимфоцитов мозгового вещества, возрастает, что говорит об угнетении функциональной активности клеточных элементов.

По общему количеству тучных клеток на этом сроке исследования достоверных отличий от интактных крыс нет. При этом вновь преобладают дегранулированные и полностью опустошенные формы тучных клеток.

Иммуногистохимическое исследование показало, что доля CD3⁺ клеток в динамике начинает возрастать по всему веществу долики тимуса, что может быть связано с их недостаточной миграцией. Число S-100⁺ клеток по мере увеличения срока исследования продолжает возрастать, их число увеличивается вдвое по всему веществу долики тимуса. Количество Pan-cytokeratin⁺ клеток в мозговом веществе незначительно увеличивается по сравнению с предыдущим сроком. Достоверное снижение в 2 раза Bcl-2⁺ клеток в мозговом веществе и кортико-медуллярной зоне долики может говорить о наступившем преобладании клеточной гибели.

Таким образом, введение канцерогена N-метил-N-нитрозомочевины стимулирует волнообразные изменения уровня гистамина. Увеличение выброса гистамина происходит уже на раннем сроке исследования,

что запускает механизм подавления функций иммунных клеток, через 2 месяца отмечается его незначительный спад, а через 3 месяца – вновь его достоверное увеличение в среднем в 2 раза. На фоне развития изменений цитоархитектоники тимуса с признаками акцидентальной трансформации, мы наблюдаем в динамике волнообразные изменения количества $CD3^+$ клеток: увеличение их количества через 1 и 3 месяца и снижение через 2 месяца после введения канцерогена. Известно, что зрелые Т-лимфоциты, вышедшие из тимуса на периферию, участвуют в формировании противоопухолевой защиты. Недостаточная миграция Т-клеток, которую мы наблюдаем в своем эксперименте, возможно, ведет к стимуляции опухолевого роста [23, 293], что подтверждено гистологическим исследованием развившейся опухоли.

Основываясь на данных ранее проводимых исследований и собственных результатах, можно предположить, что процесс дегрануляции тучных клеток, сопровождающийся выбросом биогенных аминов, принимает непосредственное участие в процессах акцидентальной инволюции органа, наряду с другими клеточными структурами тимуса. Эти процессы опосредованы влиянием гипоталамо-гипофизарно-надпочечниковой системы, активированной введением канцерогена [80].

Дендритные клетки способны секретировать иммунорегулирующие факторы и биогенные амины и являются посредниками во взаимодействии между иммунной и эндокринной системами. Согласно данным литературы, именно эти клетки являются наиболее активными антигенпрезентирующими клетками [191, 294]. В тимусе они участвуют в процессах позитивной и негативной селекции. Зрелые дендритные клетки располагаются в региональных лимфатических узлах или, наряду с Т-лимфоцитами, распределяются по периферии опухолевого образования. Существуют данные, что эти клетки имеют прогностическое значение. Наблюдаемое нами на раннем сроке достоверное снижение числа дендритных клеток в тимусе может быть связано с перераспределением клеточного состава тимуса,

а на более поздних сроках - следствием их миграции в место локализации патологического процесса. Их высокое содержание в злокачественном новообразовании взаимосвязано с сокращением выживаемости при онкопатологии [191, 294]. Нами также отмечено постепенное возрастание в динамике числа дендритных клеток. По данным литературы известно, что увеличение количества дендритных клеток может быть связано с активацией антигенной стимуляции, вызванной ростом опухоли [190].

В нашем эксперименте прослеживается стабильное увеличение числа макрофагов. CD68 участвуют в процессах созревания Т-лимфоцитов, а также в межклеточных взаимосвязях и взаимодействии клеток с патогенными компонентами, а также в фагоцитарной активности тканевых макрофагов. Также по данным литературы известно, что основной функцией макрофагов тимуса является удаление погибших в результате дифференцировки Т-лимфоцитов [43, 190].

Стоит отметить, что через 2 месяца после окончания введения N-метил-N-нитрозомочевины изменения в тимусе нарастают. Хотя гистологическая структура молочной железы соответствует интактной. Поэтому можно предположить, что изменения в тимусе являются результатом действия самого канцерогена. Из данных литературы известно, что нитрозосоединения – нитрозоэтилмочевина, нитрозометилмочевина, нитрозодиметиламины относятся к прямым канцерогенам, которые оказывают действие на организм без предварительного метаболического превращения [124].

Метаболизм нитрозометилмочевины осуществляется в печени, период полувыведения составляет 24-72 часа, основной путь выведения - через почки в течение суток. Вещества этой группы распадаются с образованием активных производных частиц, содержащих электрофильную группу. Взаимодействие электрофильных с нуклеофильными группами молекулы ДНК приводит образованию стабильных ковалентных связей. Во время репликации нуклеотид, связанный с остатком канцерогена, может быть неверно считан ДНК полимеразой, следствием чего являются мутации.

N-нитрозамины - высокоактивные канцерогены, обладающие эмбриотоксическим и органоспецифическим действием [130].

Вещество N-метил-N-нитрозомочевину относят к супермутагенам [131]. Доказано, что N-метил-N-нитрозомочевина оказывает выраженный токсический эффект на гемопоэз (лейкопения, тромбоцитопения), лимфоидную ткань и ткани, характеризующиеся быстрой клеточной регенерацией [132]. Известно, что при введении канцерогена N-метил-N-нитрозомочевины у большинства крыс развивается гормонозависимая аденокарцинома молочной железы [133] и злокачественные эпителиальные опухоли прямой кишки [135], опухоли почек, нервной системы и крови [136].

Воздействие стресса на животных вызывает появление характерной для него морфологической перестройки тимуса. Это проявляется снижением массы железы, изменением уровня биогенных аминов, соотношения (СТ+ГСТ)/катехоламины, а также количества люминесцирующих гранулярных клеток. Скорее всего, эти изменения зависят от фазы стресс-реакции. Известны три фазы развития стресса: тревоги, устойчивости и истощения [192].

При воздействии стресса в тимусе, в целом, развиваются те же неспецифические изменения, что и в предыдущей группе, но есть и некоторые особенности. Уже через 1 месяц в единичных долях местами визуализируются расширенные междольковые промежутки с включениями жировой ткани, количество которой нарастает с увеличением срока исследований.

Через 1 месяц после окончания воздействия водно-иммобилизационного стресса уровень всех изученных биогенных аминов, в том числе и гистамина, в клеточных элементах тимуса достоверно снижается. В премедуллярных и субкапсулярных клетках уровень гистамина снижается в 2 раза, в Т-клетках мозгового вещества – в 1,5 раза, уровень серотонина - в 2 и в 1,5 раза, уровень катехоламинов - в 1,5 и более раз. Наряду с этим, соотношение (СТ+ГСТ)/КА в премедуллярных клетках снижается,

а в Т-клетках коркового вещества возрастает по сравнению с контрольной группой исследования. В остальных клеточных структурах тимуса данное соотношение приближается к показателям контрольной группы.

Процент S-100⁺ клеток в кортико-медуллярной зоне и в мозговом веществе после стрессового воздействия снижается в 6 и в 8 раз соответственно по сравнению с интактными животными. Количество CD3⁺ клеток в мозговом веществе в 1,5 раза превышает данные группы контроля. В кортико-медуллярной зоне достоверно снижается количество Vcl-2⁺ клеток в 2,2. CD68⁺ клетки коркового вещества возрастают в 2,5 раза.

Через 2 месяца масса тимуса по-прежнему меньше его массы у интактной крысы, однако на 19 % больше массы предыдущего срока исследования. Площадь мозгового вещества в динамике увеличивается в 2,5 раза. В тимусе нет долек правильной формы, в соединительнотканых септах увеличивается прослойка из жировых клеток. Содержание биологически активных аминов продолжает оставаться сниженным. Так, уровень биогенных аминов в клетках премедуллярной и субкапсулярной зоны, тучных клетках и их микроокружении остается сниженным: уровень серотонина и катехоламинов более чем в 1,5 раза меньше по сравнению с интактными животными. В премедуллярных клетках достоверно снижается уровень гистамина (в 2 раза). Соотношение биоаминов в премедуллярных клетках и Т-лимфоцитах мозгового вещества продолжает снижаться.

Общее количество тучных клеток уменьшается, преобладают дегранулированные и полностью опустошенные формы, индекс дегрануляции возрастает и составляет 1,75. Уменьшение общего количества тучных клеток, наблюдаемое при воздействии стресса, не было отмечено в группе с изолированным введением канцерогена. Известно, что воздействие стрессовых факторов приводит к миграции тучных клеток из тимуса и костного мозга в периферические органы и ткани. А процесс дегрануляции и выход тучных клеток на периферию является одним из важных компонентов адаптационного синдрома при стресс – реакции [82].

Число дендритных клеток в мозговом веществе в динамике достоверно возрастает почти в 4 раза, но при этом оставаясь в 2,2 раза ниже, чем у крыс контрольной группы. Незначительно снижается количество CD3⁺ клеток в мозговом веществе по сравнению с предыдущим сроком, но их доля превышает показатели интактных животных. Число Bcl-2⁺ клеток в кортико-медуллярной зоне увеличивается в 5 раз. Увеличение активности антиапоптотического белка может говорить о наличии антигенной стимуляции [193], спровоцированной в нашем эксперименте стрессовым воздействием, и созданием антиапоптотической защиты клеток органа. Количество Pan-cytokeratin⁺ клеток в мозговом веществе снижается и по сравнению с интактными крысами, и с предыдущим сроком исследования почти в 2 раза.

Подобные изменения в тимусе соответствуют признакам развития третьей фазы акцидентальной инволюции, что сопоставимо со стадией резистентности адаптационного синдрома при стрессе.

Через 3 месяца масса тимуса по сравнению с предыдущим сроком не изменяется. При морфометрии обнаруживается резкое уменьшение площади мозгового вещества (в 4 раза) и практически вдвое уменьшается толщина коркового вещества. Наблюдается достоверный рост уровня серотонина

в Т-клетках коркового вещества в 2,4 раза и лимфоцитах мозгового вещества – в 2 раза, а также в тучных клетках и их микроокружении. Структура органа заметно изменена, в динамике происходит уменьшение функциональной площади, все больше начинает преобладать жировая ткань. Выявлено увеличение содержания гистамина в субкапсулярных клетках, в Т-лимфоцитах коркового вещества в 2 и 1,6 раза, в тучных клетках и их микроокружении – в 1,8 и в 2 раза соответственно. Известно, что изменение уровня биогенных аминов - увеличение серотонина и гистамина наблюдается при воздействии на организм стресса. Эти изменения провоцируют развитие целого ряда патофизиологических процессов, приводящих к симпатической

гиперреактивности, сосудистому спазму и нарушению микроциркуляции в тканях и органах, что влечет за собой развитие стойких патологических реакций [194].

Соотношение (СТ+ГСТ)/КА возрастает в клетках коркового вещества, тучных клетках и их микроокружении, что говорит о подавлении их функциональной активности. Среди тучных клеток продолжают преобладать дегранулированные формы, индекс дегрануляции остается высоким— 1,77.

Процент числа S-100⁺ в мозговом веществе продолжает расти, в 2,5 раза превышая показатели предыдущего срока, но остается ниже, чем у интактных крыс. Число Vcl-2⁺ клеток в корковом веществе начинает сокращаться. Количество CD3⁺ клеток в мозговом веществе достоверно снижается в 1,6 раза. Число макрофагов на этом сроке исследования и по сравнению с интактной группой, и с предыдущим сроком достоверно возрастает. Можно предположить, что это связано с процессом активации апоптоза и необходимостью увеличения фагоцитарной активности клеток. Количество Pan-cytokeratin⁺ клеток в мозговом веществе в динамике возрастает.

Изменения, которые претерпевает тимус через 3 месяца, характерны для развития конечных фаз акцидентальной трансформации тимуса (4 и 5), которые соответствуют стадии истощения адаптационного синдрома [121].

Безусловно, развитие стресс - реакции угнетает клетки иммунной системы, и, как следствие, ослабляется устойчивость организма к развитию различных заболеваний, в частности - злокачественных новообразований. При воздействии стрессового фактора активизируется нервная система, эндокринными железами начинают активно секретироваться гормоны. Повышение содержания глюкокортикоидов оказывает угнетающее воздействие на иммунную систему [187].

Нами отмечено, что сочетанное воздействие канцерогена N-метил-N-нитрозомочевины и водно-иммобилизационного стресса приводит

к изменениям в морфологии молочной железы уже через 2 месяца после окончания воздействия факторов и более выраженным изменениям в цитоархитектонике и функциональной способности биоаминсодержащих структур тимуса уже на ранних сроках исследования.

Через 1 месяц после сочетанного воздействия факторов молочная железа повторяет строение интактной. Масса тимуса снижена. Структура тимуса на этом сроке исследования отличается даже визуально. Дольки приобретают веретенообразно вытянутый вид, незначительно увеличены междольковые промежутки с включениями из жировых клеток. Площадь мозгового и толщина коркового вещества увеличены. Уровень серотонина и катехоламинов практически во всех люминесцирующих клетках достоверно снижается. Соотношение (СТ+ГСТ)/КА в Т-лимфоцитах коркового мозгового вещества, в тучных клетках и их микроокружении свидетельствует о снижении функциональной активности этих клеток.

Отмечено увеличение общего количества тучных клеток, среди них - большое количество дегранулированных и полностью опустошенных форм. Известно, что тучные клетки тимуса, выделяя медиаторы, принимают участие в замещении паренхимы органа соединительной тканью. Это связано с функцией их медиаторов – они активизируют пролиферацию фибробластов, которые синтезируют коллаген [22, 195]. Иммуногистохимическое исследование показало достоверное увеличение числа $CD3^+$ и $S-100^+$ клеток в мозговом веществе. Возможно, активатором роста числа лимфоцитов в тимусе стал запустившийся механизм канцерогенеза, послуживший стимулом к выходу из костного мозга клеток предшественников. Число $Bcl-2^+$ клеток также возрастает, причем их число в кортико-медуллярной зоне в 4,6 раза больше, чем при изолированном введении канцерогена.

Через 2 месяца у крыс с сочетанным воздействием факторов в ткани молочной железы отмечаются мультифокальные пролифераты протоков, перидуктальный фиброз и очаговая атипия клеток. При этом масса тимуса снижается по сравнению с предыдущей группой на 15%, это приводит

в динамике к уменьшению вдвое и площади мозгового, и толщины коркового вещества. Между тимическими дольками нарастает количество жировой ткани. По сравнению с изолированным введением канцерогена уровень гистамина достоверно возрастает во всех клеточных структурах железы. Именно биогенные амины играют важную регуляторную функцию в тимусе, влияя на межклеточные взаимодействия, развитие Т-лимфоцитов и их миграцию. Наблюдаемый через 2 месяца рост уровня гистамина и снижение содержания серотонина и катехоламинов способствует угнетению фагоцитарной активности, снижает активность клеток, подавляя клеточный и гуморальный иммунитет [80, 188]. Об этом свидетельствует и соотношение (СТ+ГСТ)/КА, которое возрастает в субкапсулярных клетках, в тимоцитах коркового и мозгового вещества - в 1,8 и 1,3 раза соответственно.

Среди тучных клеток преобладают дегранулированные и полностью опустошенные формы. Число $CD3^+$ клеток продолжает увеличиваться по всему веществу дольки. Количество $S-100^+$ клеток в кортико-медуллярной зоне и в мозговом веществе продолжает возрастать. Располагающиеся в мозговом веществе интердигитирующие дендритные клетки участвуют в дифференцировке и негативной селекции Т-лимфоцитов [42], представляют на своей поверхности антигены, продуцируют цитокины, запуская иммунный ответ [196]. Следовательно, наблюдаемый в динамике рост Т-лимфоцитов и дендритных клеток может свидетельствовать о стимуляции иммунитета в ответ на воздействующие факторы. Уровень $CD68^+$ клеток достоверно снижается по всему веществу дольки (в 4,5 раза - в мозговом веществе и в 2,4 раза - в корковом), их количество резко снижено (в 10 раз) по сравнению с изолированным введением канцерогена.

Продолжает расти процент Pan-cytokeratin⁺ и Bcl-2⁺ клеток в мозговом веществе (в 2 раза и 6 раз соответственно). Известно, что эпителиальные клетки обеспечивают необходимые условия для созревания Т-лимфоцитов. Эпителиоциты выстраивают трехмерный каркас, участвуют в формировании гемато-тимического барьера, выделяют ряд биологически активных веществ,

а также участвуют в синтезе и презентации тканеспецифических антигенов [197].

При сочетанном воздействии факторов через 3 месяца в молочной железе выявляются фокусы неинвазивного и инвазивного дуктального рака, схожего по морфологии с неспецифическим протоковым раком low grade у человека.

В структуре тимуса на этом сроке исследования наблюдаются значительные изменения. Кортико-медуллярная граница становится нечеткой, уменьшается площадь мозгового вещества, большая часть паренхимы заменяется жировой и соединительной тканью. В тимусе происходит перераспределение уровня биогенных аминов. Уровень гистамина снижается и по сравнению с интактной группой, и с изолированным введением канцерогена. Уровень серотонина и катехоламинов уменьшается во всех структурах, кроме т-лимфоцитов мозгового вещества, где он в 1,5 раза превышает данные контрольной группы. Соотношение биогенных аминов в люминесцирующих клетках изменяется неоднозначно. Так, в лимфоцитах коркового вещества, в тучных клетках и их микроокружении оно свидетельствует о снижении функциональной активности клеток, в лимфоцитах мозгового вещества – об ее увеличении. Это происходит благодаря увеличению уровня серотонина в этих клетках, который помимо стимуляции активности клеток, увеличивает их миграцию, активирует фагоцитоз и секрецию интерлейкинов и катехоламинов, способных активировать Т-хелперы, процесс образования антител и повышение функциональной активности тучных клеток [80, 188, 292].

Популяция тучных клеток представлена всеми формами, практически в равных соотношениях. Это можно связать с процессом активации тучных клеток под действием биогенных аминов, что ведет к появлению недегранулированных и частично дегранулированных форм. Именно процесс внутритимического созревания тучных клеток играет одну из ведущих ролей в восстановлении тимуса после воздействия стресс-индуцирующих факторов.

Это подтверждается и данными экспериментальной работы В.В. Гусельниковой (2013). Созревание тучных клеток в тимусе взрослых животных объясняется гипотезой их тимического происхождения из Т-лимфоцитов. После внешних повреждающих факторов различного происхождения, к которым можно отнести воздействие канцерогена и водно - иммобилизационного стресса, в тимусе с акцидентальной инволюцией мобилизуются внутритимусные источники экстренного восстановления органа, которыми выступают $\gamma\delta$ – лимфоциты [78, 93, 238].

Число $CD3^+$ клеток в мозговом веществе снижается в 2 раза. Происходит снижение числа дендритных клеток как в кортико-медуллярной зоне в 3 раза, так и в мозговом веществе, что может свидетельствовать об их миграции в место патологического очага. Доля $V\alpha 1-2^+$ клеток в мозговом веществе в динамике достоверно возрастает, увеличиваясь в 6 раз по сравнению с предыдущим сроком исследования. Резко возрастает количество $CD68^+$ клеток в мозговом веществе (в 12 раз), которые участвуют в элиминации Т-лимфоцитов, погибших вследствие дифференцировки [43].

Таким образом, воздействие двух факторов ускоряет и усиливает канцерогенез в молочной железе и приводит к более ранним изменениям в цитоархитектонике тимуса и функционального статуса его клеточных элементов. Отмечено уменьшение площади долек, снижение уровня серотонина и катехоламинов. Соотношение биогенных аминов в клетках коркового вещества, в тучных клетках и их микроокружении говорит о снижении функциональной активности клеток, в Т-лимфоцитах мозгового вещества – об увеличении. Наблюдается возрастание числа макрофагов и $V\alpha 1-2^+$ клеток в мозговом веществе и снижение количества дендритных клеток.

Изменения, которые мы наблюдаем при сочетанном воздействии факторов, свидетельствуют о развитии акцидентальной инволюции тимуса, наступающей в ранние сроки. Скорее всего, это связано с воздействием на организм стресса, который повлиял и на более раннее (через 2 месяца)

развитие опухоли в молочной железе (продукты метаболизма которой оказывают токсическое влияние на иммунитет).

При сравнении морфофункциональной картины тимуса в представленных экспериментальных моделях выявлено, что наиболее выраженные изменения, проявляющиеся дисбалансом уровня биологически активных аминов, перестройкой паренхимы железы с признаками ее атрофии, отмечаются у группы крыс с сочетанным воздействием введения канцерогена и водно-иммобилизационного стресса.

Выявленные изменения у животных всех экспериментальных групп свидетельствуют о признаках развития акцидентальной инволюции тимуса, которые, в зависимости от воздействующего фактора, проявляются в разные сроки исследования. При этом сочетанное воздействие факторов вызывает более раннюю и выраженную дезорганизацию структуры тимуса. Известно, что развитие инволюции тимуса происходит поэтапно [92]. Вероятно, при изолированном введении канцерогена через 3 месяца формируется 2-3 фаза инволюции тимуса, о чем свидетельствует уменьшение площади мозгового вещества, увеличение междольковых промежутков, увеличение уровня гистамина и снижение функциональной активности органа. При сочетанном воздействии факторов начальные проявления признаков акцидентальной инволюции появляются уже через 2 месяца после окончания воздействия факторов, а через 3 месяца изменения, которые претерпевает тимус, можно отнести к 4 фазе инволюции, которая сопровождается уменьшением в динамике площади мозгового и толщины коркового вещества, более выраженным уменьшением функциональной активности клеток (в 2 раза) по сравнению с изолированным введением канцерогена, уменьшением $CD3^+$, $S-100^+$ и $Pan-cytokeratin^+$ клеток, с характерным развитием атрофии и склероза органа.

Развитие акцидентальной инволюции может быть спровоцировано любыми факторами. Действие патологических раздражителей приводит к напряжению функциональной активности тимуса [198]. При этом может

изменяться количество лимфоцитов в железе и интенсивность их миграции, а также может возрастать секреторная активность клеток эпителиальных скоплений, синтезирующих гормональные вещества. Секретируемые гормоны, с одной стороны, влияют на поступление Т-предшественников в тимус, с другой – способствуют становлению иммунологической зрелости этих клеток [198]. Доказано, что запуск и регуляция эффективности иммунного ответа определяется антигенами Т-лимфоцитов [199]. К фенотипическим маркерам лимфоцитов относится маркер CD3. Экспрессия CD3⁺ рецепторов на мембране Т-клеток отражает их функцию и позволяет определять общее количество Т-лимфоцитов [199].

Важную роль в защите организма занимают дендритные клетки, которые при активации вырабатывают интерлейкины и гормоноподобные биологически активные вещества, а также биоамины. В нашем исследовании количество этих клеток при изолированном введении канцерогена в динамике возрастает, а при сочетанном воздействии его рост через 1 и 2 месяца сменяется сокращением их количества. Установлено, что после того, как дендритные клетки захватывают злокачественные антигены, опухолевые и стромальные стимулы вызывают их созревание и миграцию в лимфатические узлы для представления опухолевых антигенов специфическим Т-клеткам [200]. Также и некоторые факторы, выделяемые опухолью, могут привлекать дендритные клетки в очаг неоплазии, нарушать их созревание, дифференцировку и функциональную активность [200].

Известно, что различные воздействия на организм провоцируют ответную реакцию со стороны тучных клеток, а именно их количественные изменения и распад за счет выброса медиаторов из гранул. Также эти клетки способствуют активации ангиогенеза в активно растущих злокачественных новообразованиях [243]. На фоне развивающейся инволюции популяция дегранулированных и полностью опустошенных тучных клеток увеличивается, а локализуются они по всей строме тимуса. Возможно, процесс дегрануляции тучных клеток свидетельствует об их непосредственном

участии в иммунном ответе при развитии опухоли. С другой стороны, тучные клетки и выделяемые ими биогенные амины способны регулировать скорость и степень развития акцидентальной инволюции.

Наше исследование помогает раскрыть новые, неизвестные ранее аспекты воздействия стресса на функционирование иммунной системы при экспериментальном развитии канцерогенеза. Это проявляется процессами нарушения функционирования центрального органа иммуногенеза при канцерогенезе, воздействии хронического стресса, и наиболее активным подавлением его функциональных возможностей при сочетанном воздействии двух факторов. Однако, нами была изучена лишь небольшая часть возможных морфологических изменений. Мы надеемся, что полученные результаты дадут возможность понять сложные механизмы, протекающие в иммунной системе на фоне канцерогенеза с сочетанным воздействием хронического стресса.

ВЫВОДЫ

1. Изолированное введение канцерогена N-метил-N-нитрозомочевины и воздействие стресса через 1 месяц приводят к увеличению толщины коркового и площади мозгового вещества долек тимуса в разной степени выраженности. При дальнейшем наблюдении отмечается достоверное снижение этих показателей и замещение паренхимы органа соединительной и жировой тканями.
2. При сочетанном воздействии этих двух факторов особенности изменений выявляются в раннем появлении жировой ткани в соединительнотканых прослойках и значительном замещении ею паренхимы тимуса. Уже через 1 месяц дольки приобретают веретенообразную форму, граница между корковым и мозговым веществом становится нечеткой. С увеличением срока исследования уменьшается площадь мозгового и толщина коркового вещества.
3. Введение канцерогена приводит к количественному изменению клеточных элементов в тимусной дольке: через 1 месяц наблюдения отмечается снижение $S-100^+$ дендритных клеток и $CD68^+$ макрофагов на фоне достоверного увеличения $CD3^+$ - лимфоцитов коркового и мозгового веществ. Через 3 месяца - значительный рост дендритных клеток, макрофагов и эпителиоцитов. При сочетанном воздействии двух факторов выраженный клеточный дисбаланс регистрируется уже через 2 месяца: увеличение $S-100^+$ клеток (в 1,9 раза), эпителиальных клеток (в 8,8 раз), а через 3 месяца – еще и увеличение $Bcl-2^+$ клеток (более, чем в 11 раз).
4. Изолированное введение канцерогена N-метил-N-нитрозомочевины и воздействие стресса вызывают волнообразные изменения уровня биогенных аминов в люминесцирующих структурах тимуса. При введении канцерогена максимальное содержание гистамина и серотонина регистрируется через 3 месяца наблюдения, при воздействии водно-иммобилизационного стресса - через 3 месяца достоверно возрастает только уровень гистамина.

При сочетанном воздействии уровень всех биогенных аминов снижается через 1 и 3 месяца наблюдений. Максимальный уровень гистамина отмечен через 2 месяца. Соотношение (СТ+ГСТ)/КА во всех экспериментальных группах изменяется также волнообразно.

5. Популяция тучных клеток тимуса на изолированное введение канцерогена и сочетанное воздействие двух факторов отвечает увеличением числа тучных клеток в соединительнотканых септах (в 1,5 раза) с преобладанием дегранулированных и полностью опустошенных форм. Индекс дегрануляции увеличивается в 2 раза. При стрессовом воздействии общее количество тучных клеток снижается (в 2 и более раз), преобладают дегранулированные формы.
6. Сравнительный анализ данных показал, что цитоморфологические изменения долек тимуса отмечены во всех трех группах эксперимента, но при сочетанном воздействии канцерогена и стресса эти изменения более выражены и наступают уже через 1 месяц наблюдения. Это проявляется снижением массы тимуса, увеличением количества CD3⁺, S-100⁺ и Pan-cytokeratin⁺ клеток через 1 и 2 месяца. Через 3 месяца отмечено уменьшение количества CD3⁺ лимфоцитов в корковом веществе, снижение S-100⁺ клеток, Vcl-2⁺, эпителиальных клеток, значительное повышение уровня гистамина в лимфоцитах коркового и мозгового веществ, опустошение коркового слоя на фоне замещения паренхимы жировой тканью через 3 месяца. Все это свидетельствует о развитии признаков акцидентальной инволюции тимуса.

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

1. При изучении цитоархитектоники тимуса на фоне введения канцерогена N-метил-N-нитрозомочевины необходимо учитывать гистологически обоснованные признаки неинвазивного и инвазивного дуктального рака молочной железы. Это позволит стандартизировать и обосновать последующие результаты исследований для формирования исчерпывающей базы знаний о канцерогенезе и морфологических изменениях в иммунных органах.
2. Данные об изменении фенотипа антигенпрезентирующих клеток тимуса еще на этапе развития предопухолевых признаков можно трактовать как способность иммунной системы к ответной реакции на начальном этапе канцерогенеза. Эти сведения могут послужить основой при разработке схем противоопухолевой иммунотерапии и иммунопрофилактики.
3. Полученные данные о том, что стресс усугубляет течение канцерогенеза, вызывая при этом более ранние и выраженные изменения в тимусе, необходимо учитывать в практической онкологии.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

ГСТ	гистамин
КА	катехоловые амины
КМЗ	кортико-медуллярная зона
ЛГК	люминесцирующие гранулярные клетки
МКАТ	моноклональные антитела
М/О ТК	микроокружение тучных клеток
МНМ	N-метил-N-нитрозомочевина
ПКАТ	поликлональные антитела
СКЗ	субкапсулярная зона
СТ	серотонин
ТК	тучные клетки
ТКВ	Т-лимфоциты коркового вещества
ТМВ	Т-лимфоциты мозгового вещества
CD	cluster of differentiation (кластер дифференцировки)

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Состояние онкологической помощи населению России в 2017 году /А.Д. Каприн, В.В. Старинский, Г.В. Петрова//– М.: МНИОИ им. П.А. Герцена – филиал ФГБУ «НМИЦ радиологии» Минздрава России, 2017 – илл. - 236 с.
2. Тюляндин, С.А., Жуков Н.В. Правда о российской онкологии: проблемы и возможные решения, под редакцией: М. Общероссийская общественная организация «Российское общество клинической онкологии». – 2018. -28 с.
3. Выбор импланта молочной железы после проведенной радикальной операций при раке молочной железы / Назлиев Д.К., Судаков Д.В., Белов Е.В., Шевцов А.Н., Тишинов Е.Н.// Центральный научный вестник. - 2018. - Т. 3, №22 (63). - С.7-9.
4. Зикиряходжаев, А.Д. Рецидивы после радикальных подкожных/кожесохраненных мастэктомий с одномоментной реконструкцией при раке молочной железы / А.Д. Зикиряходжаев, Е.А. Рассказова, А.Ю. Тукмаков, И.М. Широких // Исследования и практика в медицине. – 2019. – Т.6, №1. – С.33-40.
5. Рак молочной железы: современные подходы диагностики и лечения/ Исмаилова Г.Н., Ермекбаева Б.А., Жусупова Б.Т., Исакова А.М., Есмагамбетов Ж.А., Шаймарданова Г.М., Кумисбекова Р.К.// Клиническая медицина Казахстана. - 2014. - С.10-11.
6. Характеристика гематогенного метастазирования при двухстороннем раке молочных желез / Фесик Е.А., Крахмаль Н.В., Завьялова М.В., Слонимская Е.М., Вторушин С.В., Перельмутер. В.М. // Сибирский онкологический журнал. - 2014. - № 6. - С. 40-44.
7. Факторы риска рака молочной железы / О.Ю. Муранова// Сибирский онкологический журнал. Приложение №2. – 2007. - С 76-77.

8. Распространенность и факторы риска рака молочной железы / Федоров В.Э., Чебукаева М.Ю.// Фундаментальные исследования. -2015. - №1. - С.414-419.
9. Широкова, И. Рак молочной железы: взгляд экспертов / И. Широкова, Ю. Прожерина // Ремедиум. Журнал о российском рынке лекарств и медицинской техники. – 2016. - №.10. – С. 53-58.
10. Захарова, И.Н. Стресс и стресс-индуцированные расстройства у детей /И.Н. Захарова, Т.М. Творогова, И.И. Пшеничникова, В.И. Свиницкая, Л.Л. Степурина // Медицинский совет. - 2018. - № 11.- С. 110-116.
11. Картушина, И.А. Влияние стресса на иммунную систему человека // Материалы IX Международной студенческой научной конференции «Студенческий научный форум». - 2017.
12. Взаимосвязь психологических характеристик посттравматического стресса и иммуногистохимических параметров у больных раком молочной железы / Тарабрина Н.В., Генс Г.П., Падун М.А., Коробкова Л.И., Шаталова Н.Е.// Ж.: Социальная и клиническая психиатрия. - 2008. - Т.18, №4 - С.22-28.
13. Бухтояров, О.В. Доминантный подход к патогенезу, профилактике и терапии рака / О.В. Бухтояров, А.Е. Архангельский // Вопросы онкологии. – 2007. – Т.53, №3. – С. 253-261.
14. Бухтояров, О.В. О роли психогенного фактора в развитии злокачественных опухолей у сотрудников уголовно-исполнительной системы / О.В. Бухтояров, С.Б. Пономарев // Ведомости уголовно-исполнительной системы. – 2017. - №9. – С. 2-5.
15. Психогенный канцерогенез / О.В. Бухтояров, Самарин Д.М. // Здоровье и образование в XXI веке. – Т.12, № 1. – 2010.
16. Самотруева, М.А. Нейроиммуноэндокринология: современные представления о молекулярных механизмах /М.А. Самотруева,

А.Л. Ясенявская, А.А. Цибизова, О.А. Башкина, Х.М. Галимзянов, И.Н. Тюренков// Иммунология. – 2017. - № 38(1). – С.49-59.

17. Кострова, О.Ю. Бигенные амины надпочечников у крыс при развитии рака молочной железы. /Кострова О.Ю., Драндрова Е.Г., Котёлкина А.А., Тимофеева Н.Ю.// В сборнике: Молодежь и медицинская наука в XXI веке Сборник трудов XVII-ой Всероссийской научной конференции студентов и молодых ученых с международным участием. Под редакцией И.В. Шешунова, Н.К.Мазиной, Ю.В. Кислицина. – 2016. – С.65-66.

18. Самотруева, М.А. Пути реализации нейро-иммуно-эндокринных взаимодействий / Самотруева М.А., Теплый Д.Л., Тюренков И.Н.// Естественные науки. - 2009. - № 4. - С. 112-130.

19. Изменение клеточного звена иммунитета у больных с раком молочной железы с метастазами в легкие / И.И. Андреяшкина, В.Н. Плохов // Медицинская Иммунология. - 2011. - Т.13, № 4-5. –С. 446.

20. Тимус и стресс в клинике и эксперименте / Л.Г. Кузьменко, Н.М. Киселева// Вестник РУДН - 2011 –№3. - С.89-93.

21. Пальцев, М.А., Кветной, И.М. Руководство по нейроиммуноэндокринологии. М.: Медицина, 2006, 384 с.

22. Кострова, О.Ю. Акцидентальная инволюция тимуса крыс на фоне развития аденокарциномы толстой кишки, вызванной введением канцерогена в различной дозировке / Фундаментальные исследования. -2013. - № 3-2. - С. 321-324.

23. Москвичев, Е.В. Морфологическая и иммуногистохимическая характеристика вилочковой железы при экспериментальном канцерогенезе в условиях вторичной иммунной недостаточности: автореф. дис. ... докт. мед. наук. – Оренбург, 2013. - 30 с.

24. Драндрова, Е.Г. Морфологическая и иммуногистохимическая характеристика тимуса при экспериментальном канцерогенезе потомства самок с вторичным иммунодефицитом: дис. ... канд. мед. наук. – Москва, 2015. - 157 с.

25. Особенности структурных изменений в тимусе при повреждающих воздействиях / Д.В. Васендин // Ученые записки Петрозаводского государственного университета - №2 – С.59-64.
26. Современные представления о морфологии тимуса / Бреусенко Д.В., Димов И.Д., Клименко Е.С., Карелина Н.Р. // Педиатр. - Т.8, Вып.5. -2017. - С.91-93.
27. Кузьменко, Л.Г., Тюрин Н.А., Петрук Н.И. и др. Структурные изменения тимуса и иммунный статус в динамике осложненного течения острых респираторных заболеваний у детей раннего возраста // Детские инфекции. — 2005. — Т.4, № 1. - С. 25 - 29.
28. Тихомирова, В.Д. Детская оперативная хирургия: / Практ. рук-во. — СПб - Лик, 2001. — С. 154-156.
29. Забродин, В.А. Морфология тимуса взрослого человека: дис. ... д-ра мед. наук. — М., 2004. — 252 с.
30. Кулагина, Н.Н. Вилочковая железа у детей раннего возраста в норме и при патологических состояниях по данным ультразвукового исследования. // Вестник РНЦРР МЗ РФ. — 2007. - №7. — С.
31. Нормальная анатомия человека: учебник / И.В. Гайворонский - СПб.: СпецЛит.- 2001. —Т.1-2.
32. Иваненко, А.И. Клинико-рентгенологическое исследование вилочковой железы при некоторых патологических состояниях организма: автореф. дис. ... канд. мед. наук. — СПб, 1994. - С. 16.
33. Сапин, М.Р. Анатомия человека: учебник: в 2 т. / М.Р. Сапин, Г.Л.Билич. — М.,2012. — Т.2. — С.496.
34. Визуализация тимуса у плодов / Е.А. Казакова, И.В. Жуков, Г.Р. Вагапова // Практическая медицина - 2013. - № 4. — С.87-89.
35. Кузьменко, Л.Г. К вопросу о тимусе, связанной с ним терминологии и состоянии здоровья детей с большим тимусом / Л.Г. Кузьменко, З.В. Смылова, Н.М. Киселева, О.В. Быстрова, Р.К. Агарвал // Здоровье и образование в XXI веке. — 2015. — Т.17, № 4. — С.97-105.

36. Анисимова В.П. Роль морфофункциональных перестроек тимуса в обменно-эндокринных нарушениях организма // Рос. вестник перинатологии и педиатрии. 1994. - Т.29. - №1. – С.35.
37. Современные представления о морфогенезе первичного лимфоидного органа / Е.Ю. Бибик, А.Ю.Берест // Украинский морфологический альманах. - Т.9.-№3.- 2011.- С.43-46.
38. Быков, В.Л. Секреторные механизмы и секреторные продукты тучных клеток / В.Л. Быков // морфология. -1999. –Т.115, № 2. – С. 64-72.
39. Гистология, цитология, эмбриология: учебник / Ю.И. Афанасьев, Н.А. Юрина, Е.Ф. Котовский и др.; под ред. Ю.И. Афанасьева, Н.А. Юриной. – М., 2012. - 800с.
40. Быков, В.Л. Гистология, цитология и эмбриология: атлас / В.Л. Быков, С.И. Юшканцева. –М., - 2013. - 296 с.
41. Кузнецов, С.Л. Гистология, цитология и эмбриология: учебник для медицинских вузов / С.Л. Кузнецов, Н.Н. Мушкамбаров. – М., 2007. – 600 с.
42. Иммунологическая характеристика акцидентальной инволюции тимуса после спленэктомии / Москвичев Е.В., Меркулова Л.М., Стручко Г.Ю., Михайлова М.Н.// Вестник национального медико-хирургического Центра им. И.И. Петрова. – 2012. - Т.7, №2. - С. 40-43.
43. Кащенко, С.А. современные представления о строении тимуса / С.А. Кащенко, А.А. Захаров // Перспективы медицини та біології. – 2010. – Т.ІІ, № 1. – С. 22-32.
44. Кащенко, С.А. Гистология, цитология и эмбриология: в 2 ч. / С.А. Кащенко, И.В. Бобрышева. – Луганск, 2013. – Ч.2. – С.228.
45. Парамзин, Ф.Н. Морфологическая характеристика телец Гассалья в случаях уменьшения массы тимуса // Новые задачи современной медицины: материалы III Междунар. науч. конф. - 2014. — С. 54-55. — URL <https://moluch.ru/conf/med/archive/153/6644/> (дата обращения: 28.02.2019).
46. Беловешкин, А.Г. К вопросу о классификации телец Гассалья / А.Г. Беловешкин // Молодой ученый. – 2013. - №4(51). – С. 631-634.

47. Юрчинский, В.Я., Количественная характеристика тимусных телец у неполовозрелых позвоночных животных и человека / В.Я. Юрчинский, Л.М. Ерофеева // Журнал анатомии и гистопатологии. – 2016. - Т. 5, №. 1. - С. 76-82. <https://doi.org/10.18499/2225-7357-2016-5-1-76-82>.
48. Беловешкин, А.Г. Роль телец Гассалья тимуса человека в позитивной и негативной селекции тимоцитов / А.Г. Беловешкин // Молодой ученый. — 2012.—№7. - С.334-338.
49. Кузьменко, Л.Г. Старение и тимус / Л.Г. Кузьменко, Н.М. Киселева, А.В. Симонова // Здоровье и образование в XXI веке. – 2013. – Т.15, № 1- 4. – С.170-175.
50. Карта заселения органов иммунной системы эмбриона и плода человека Т и В-лимфоцитами и начало эндокринной функции тимуса/ З.С. Хлыстова, С.П. Шмелева, И.И. Калинина// Иммунология. - №2. - 2002. - С.80 - 82.
51. Бекмухамбетов, Е.Ж. Закономерности эмбриофетального морфогенеза тимуса / Е.Ж. Бекмухамбетов, Т.Ж. Умбетов, Ж.Е. Комекбай // Морфология. – 2011. – Т. 140, № 5. – С. 35.
52. Кулида, Л.В. Критические периоды развития тимуса на этапах эмбриогенеза и раннего фетогенеза / Л.В. Кулида // Вестник Ивановской медицинской академии. -Т.16, №2. - 2011. - С. 63-68.
53. Ивановская, Т.Е., Зайратьянц О.В., Леонова Л.В., Волощук И.Н. Патология тимуса у детей. – СПб. - 1996.- 271 с.
54. Харченко, В. П., Саркисов Д. С., Ветшев П. С., Зайратьянц О. В. Болезни вилочковой железы. - М. «Триада-Х». - 1998. - 232 с.
55. Григорьев, В.Н. Структурнофункциональные взаимосвязи иммунной и эндокринной систем у детей раннего возраста / В.Н. Григорьев // Математ. морфология. – 2007. – Т. 6, № 1. – С. 4050.
56. Анатомио - морфологические особенности и способы оценки поперечного размера и объема вилочковой железы у детей/ И.В. Силантьева,

Ю.И. Ровда, О.С. Барына, И.Г.Хасанова// Мать и дитя в Кузбассе. - №2145. - 2011. - С.11-16.

57. Будчанов, Ю.И. Клеточный иммунитет. Типы клеточной цитотоксичности. Рецепторы и маркеры, субпопуляции лимфоцитов // Учебно-методическое пособие по общей иммунологии. Тверь, - 2008. - 11 с.

58. Т-клетки недавние эмигранты из тимуса / А.А. Ярилин, А.Д. Донецкова // Иммунология. - 2012. - №6. – С. 326-334.

59. Лопухин, Ю.М., Арион В.Я. Тимус, иммунодефициты, иммунокоррекция / Ю.М. Лопухин, В.Я. Арион // Современные проблемы аллергологии, клинической иммунологии и иммунофармакологии: материалы 1-й Национальной конф. Российской ассоциации аллергологов и клинических иммунологов. М., 1997. - С. 113-120.

60. Фрейдлин, И.С. Регуляторные Т-клетки: происхождение и функции / И.С. Фрейдлин // Медицинская иммунология. – 2005. – Т.7. -№ 4. –С. 347-354. <https://doi.org/10.15789/1563-0625-2005-4-347-354>

61. Регуляторные Т-лимфоциты CD4⁺CD25⁺FOXP3⁺. Перспективы применения в иммунотерапии / Г.А. Жуглай, Е.А. Олейник // Труды Карельского научного центра РАН– 2012. - № 2. - С. 3–17.

62. Морфологические изменения в легочной ткани лабораторных крыс при подкожном развитии солидной формы экспериментальной опухоли / Джардранов Е.С., Ергазина М.Ж., Джангильдина З.Н., Красноштанов А.В., Красноштанов В.К.// Вестник Казахского национального медицинского университета - 2016. - №1. - С. 483-485.

63. Торбек, В.Э. Ультраструктура эпителиоцитов тимуса потомства при изменении гормонального фона в функциональной системе мать-плод / В.Э. Торбек, Н.А. Юрина // Вестник РУДН. Сер. «Медицина». – 2000. - №2. – С. 45-49.

64. Жукова, Е.М. Роль капсамуцин-чувствительных нейронов в регуляции гормон-синтезирующей активности эпителиоцитов тимуса крыс / Е.М. Жукова // Бюллетень со РАМН. - 2007. - №3. - С.138-141.

65. Изменения ультраструктуры тимуса белых крыс после введения циклофосфида / Бобрышева И.В.// Вестник ВГМУ. - 2013. - Т.12. - №4. - С. 63-68.
66. Беловешкин, А.Г. Топография S-100⁺ дендритных клеток, ассоциированных с тельцами Гассала в тимусе человека / А.Г. Беловешкин, Т.М. Студеникина // БГМУ: 90 лет в авангарде медицинской науки и практики: сборник научных трудов. – Минск: РНМБ. -2012. – Т.1. – С. 89-90.
67. Жукова, Е.М. Роль капсаицинчувствительных нейронов в контроле структурной организации тимуса / Е.М. Жукова // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. – 2005. – Т. 140, № 8. – С. 222-226.
68. Состояние стромального компонента тимуса и телец Гассала при аутопениях у детей / Волкова Л.В., Бондарев В.П., Омельчук Н.И.// Международный журнал прикладных и фундаментальных исследований. - 2014. - №8. - С.133-144.
69. Полякова, В.О. Кветной И.М. Структурно-функциональное единство пинеальной железы и тимуса: роль и значение в нейроиммуноэндокринной регуляции гомеостаза // Нейроиммунология. - 2009. – Т.7, №1. – С. 85-86.
70. Лопатина, А.Е. Характеристика основных свойств дендритных клеток /А.Е. Лопаткина, Н.Л. Макарова// Международный журнал прикладных и фундаментальных исследований. - №1. – 2012 - С.73-74.
71. Бобрышев, Ю.В. Дендритные клетки и их потенциальная значимость для иммунотерапии атеросклероза / Ю.В. Бобрышев, А.Н. Орехов // Атеросклероз и дислипидемии. – 2013. - № 4. –С. 4-15.
72. Морфологическое и иммуногистохимическое исследование тимуса в норме и после применения полиоксидония (обзор) / Стручко Г.Ю., Меркулова Л.М., Кострова О.Ю., Михайлова М.Н., Москвичев Е.В.// Вестник Чувашского госуниверситета. - 2012. - № 3. - С.525-530.
73. Цатуров, М.Э. Толерогенные дендритные клетки – созревание и функции в экспериментах in vitro / М.Э. Цатуров, В.Ю. Талаев,

А.В. Матвейчев, М.В. Талаева, О.Н. Бабайкина, И.Е. Заиченко, М.А. Ломунова // Медицинский Альманах. – 2010. - №2 (11). – С. 263-266.

74. Козлова, А.И. Роль дендритных клеток в формировании противоопухолевого иммунитета (обзор литературы) / А.И. Козлова, Е.В. Воропаев, А.И. Конопля // Проблемы здоровья и экологии. – 2014. – С. 19-24.

75. Антигенпрезентирующие клетки лимфоидных органов / В.С. Гордова, И.М. Дьячкова // Вестник Чувашского университета. – 2014. - №2. – С.217-223.

76. Изучение локализации CD 68-положительных макрофагов в тимусе в норме / П.А. Луговцова, Н.А. Луговцова, А.Н. Платонов // Время смотреть в будущее: тезис конференции 51-й итоговой студенческой научной конференции с международным участием. - Северо-Осетинская государственная медицинская академия, - Владикавказ, - 2012. - С. 71-72.

77. Черкасов, Е.В Ультраструктура дендритных клітин тимуса при експериментальній опіковій хворобі у изурів та за умовії лікування комбінованими гіперсмолярними розчинами / Е.В. Черкасов // Вісник морфології - 2012. -Т.-18, №1. -С.6-10.

78. Гусельникова, В.В., Полевщиков А.В. Тучные клетки тимуса мыши в норме и при акцидентальной трансформации // Российский Аллергологический Журнал. – 2013 – №4. – С. 24-33.

79. Арташян, О.С. Морфологические аспекты участия тучных клеток в формировании общего адаптационного синдрома // Таврический медикобиологический вестник. 2012. Т. 15, №3. - С. 22–25.

80. Общегистологическое и люминесцентно-гистохимическое исследование тимуса крыс при экспериментальном канцерогенезе в условиях врожденного /Стручко Г.Ю. Драндрова Е.Г. Меркулова Л.М. Стоменская И.С. Кострова О.Ю. // Современные проблемы науки и образования. – 2018. – № 2

81. Происхождение тучных клеток: современное состояние проблемы / Гусельникова В. В., Пронина А.П., Назаров П.Г., Полевщиков А.В.// Вопросы морфологии XXI века. — 2010. — Вып. 2.— С. 108–115.

82. Арташян, О.С. Влияние острой гипоксии на систему тучных клеток крыс. [Текст] / О.С. Арташян // Материалы XI Всероссийской научно-практической конференции «Молодые ученые в медицине». – Казань. - 2006.- С. 207-208

83. Яглова, Н.В. Биология секреции тучных клеток / Н.В. Яглова, В.В. Яглов // Клиническая и экспериментальная морфология. – 2012. - № 4.- С.4–9.

84. Беглай, Е.О. Тучные клетки - ключевые участники патогенеза / Е.О. Беглай, А.И. Дубиков // Научно-практическая ревматология. 2015. –Т.53, № 2. – С.182–189.

85. Гордон, Д.С. Тучные клетки в эксперименте / Д.С. Гордон // Чебоксары. - 1982. - 234 с.

86. Изменения тучноклеточной популяции тимуса потомства крыс с иммунодефицитом на фоне канцерогенеза /Е.Г. Драндрова, Г.Ю. Стручко, М.Н. Михайлова и др. // Сборник тезисов V Международного молодежного медицинского конгресса «Санкт-Петербургские научные чтения – 2013». – СП-б.- 2013. – С.145-146.

87. Омеляненко Н.П., Ковалев А.В., Сморгков М.М., Мишина Е.С. Структура собственного вещества роговицы глаза человека // Морфология. 2017. Т. 151, №3. С.93.

88. Изменения дифференцировки, пролиферации и апоптоза тимоцитов под влиянием синтетических пептидов /Ярилин А.А., Хавинсон В.Х., Полякова В.О., Линькова Н.С., Кветной И.М. // Морфология. 2011. Т. 140, №4. С. 23–26.

89. Котёлкина, А.А. Морфология акцидентальной инволюции тимуса в экспериментальном канцерогенезе /А.А. Котёлкина, Л.М. Меркулова,

О.Ю. Кострова, Г.Ю. Стручко // Морфологические ведомости. - 2019. – Т.27. – Выпуск 1. – С. 30-34.

90. Тучная клетка как полифункциональный элемент иммунной системы / В.Н. Цибулькина, Н.А., Цибулькин// Ж. Аллергология и иммунология в педиатрии. - 2017. - №2. - С. 4-11.

91. Лазарев А.Ф. Тучные клетки и опухолевый рост. А.Ф. Лазарев, И.П. Бобров, Т.М. Черданцева, В.В. Климачев и др. // Сибирский онкологический журнал. – 2011. - № 4 (46). – С.59-63.

92. Особенности акцидентальной инволюции вилочковой железы при пероральном применении ацетата свинца в эксперименте Е.Б. Родзаевская, И.А. Уварова, Т.П. Романова, Г.Ф. Журавлева, А.В. Медведева / Естественные науки. - 2017. - №4. - С. 166-171.

93. Кветной И.М., Ярилин А.А., Полякова В.О., Князькин И.В. Нейроиммуноэндокринология тимуса. — СПб-б.: ДЕАН, 2005. — 160 с.

94. Структурно - функциональная организация клеток диффузной эндокринной системы в дыхательных путях в норме и при патологии / Суходуло И.В., Геренг Е.А.// Бюллетень сибирской медицины – 2008. - №1.- С.71-74.

95. Любовцева, Л.А. Свойства гранулярных люминесцирующих клеток / Л.А. Любовцева и др. // International Journal on Immunorehabilitation (Международный журнал по иммунореабилитации). – 2009. – Т.11, №1. – С.25 – 26.

96. Диффузная эндокринная система (APUD - система) / Вылегжанина Т.А. // Учебно-методическое пособие. Минск БГМУ. - 2008. - 35с.

97. Новые концепции биологической дифференцировки эндокринной системы: итоги и перспективы ее изучения / Яглов В.В., Яглова Н.В. // Вестник РАМН «Актуальные вопросы эндокринологии». - 2012. - №4. - С.74-80.

98. Показатели эндокринного статуса у больных остропрогрессирующим туберкулезом легких / Баласанянц Г.С.,

Греймер М.С., Шпанская Я.С.// Проблемы туберкулеза. – 2000. - №6. - С. 41-44.

99. Значение морфофункционального состояния апудоцитов для прогноза кровотечения при язвенной болезни двенадцатиперстной кишки / Сеидов В.Д., Алекберзаде А.В.// Хирургия. - 2000. - №9. - С. 16-19.

100. Люминесцирующие гранулярные клетки тимуса при развитии экспериментальной опухоли толстой кишки / Драндрова Е.Г., Стручко Г.Ю., Кострова О.Ю., Михайлова М.Н., Бессонова К.В.// Здоровье и образование в XXI веке. - 2011. - Т.13, №1. - С. 14-16.

101. Дендритные клетки: основные представления / Е.А. Грищенко// Аллергология и иммунология в педиатрии. - 2015 - №2. – С. 9-17.

102. Москвичев, Е.В. Морфология и иммуногистохимический фенотип тимуса при вторичной иммунной недостаточности после спленэктомии / Е.В. Москвичев, Л.М. Меркулова, Г.Ю. Стручко // Современные проблемы науки и образования. – 2012. - №3. – С. 54-61.

103. Пасюк, А.А. Сравнительный анализ развития тимуса человека и белой крысы в постнатальном онтогенезе // Сборник статей научно-практической конференции, посвященной памяти доцента Д.Д. Смирнова. 2017. - Гродно. – С. 81.

104. Фрейдлин, И.С. Загадки тимуса. Возраст и иммунитет / И.С. Фрейдлин // Соровский образов. журнал. – 1997. – № 5. – С. 26-29.

105. Функциональная морфология старения / А.В. Трофимов// Успехи геронтологии. - Т.22, №3 - 2009.

106. Шиловский, Г.А. Инволюция тимуса в онтогенезе: роль запрограммированного старения / Г.А. Шиловский, Б.А. Фенюк, В.П. Скулачев // Биохимия. - 2015. – Т. 80. – Вып.12. – С. 1898-1901.

107. Роль сигнальных молекул в старении эпифиза и тимуса человека/ Н.С. Линькова, В.О. Полякова, Т.В. Кветная, А.С. Катанугина, А.В. Костылев, Р.И. Абдулрагимов, И.Н. Севостьянова // Молекулярная медицина. - №5. - 2012. - С. 41-44.

108. Наглядная иммунология / Г.-Р. Бурместер, А. Пецутто; пер.с англ. — 4-е изд. — М.: Лаборатория знаний, 2018. — 320 с.: ил. — (Наглядная медицина).
109. Куликов, А.В. Возрастная инволюция тимуса: способы замедления/А.В. Куликов, Е.Г. Новоселова, Ю.Н. Корыстов, О.В. Глушкова, Д.А. Черенков, Г.Н. Смирнова, Л.В. Архипова, Д.А. Куликов // Усп. геронтологии. - 2005. - №17. - С. 82–86.
110. Старение иммунной системы / А.П. Парахонский // Международный журнал прикладных и фундаментальных исследований - №6. - 2011. - С. 73-74.
111. Федорова, Е.С. Возрастная динамика факторов микроокружения в тимусе человека: автореф. на дис. канд. биол. наук. - 2009. – 23 с.
112. Хавинсон, В.Х. Пептидная регуляция старения / В.Х. Хавинсон // С.-Пб – Наука. - 2009. – 57 с.
113. Полякова, В.О. Возрастные изменения экспрессии вазоактивных гормонов и факторов апоптоза в тимусе человека/ В.О. Полякова, Е.В. Чернышова, А.Ю. Чеснокова, П.Н. Зезюлин, Е.С. Федорова// Медицинская иммунология. - 2006 - Т. 8, № 2-3. - С. 380-381.
114. Функция эпифиза при раке и старении / В.И. Анисимов, Р. Рейтер // Вопросы онкологии. - Т.36, №3. - 1990. - С. 259-268.
115. От нейроэндокринологии к нейроиммуноэндокринологии / И.Г. Акмаев, В.В. Гриневич // Бюллетень экспериментальной биологии - Т.131, №1. - С. 22-32.
116. Молекулярные и физиологические механизмы старения / В.Н. Анисимов // СП-б.: Наука. - 2003.
117. Акцидентальная инволюция тимуса в и различных видов стрессоров / М.Ю. Капитонова, С.Л. Кузнецов, С.В. Клаучек, З.И. Мохд Исмаил, М. Улла и О.В. Федорова // Морфология. – 2006. - Т.130, №6 – С.56-60.

118. Акцидентальная инволюция тимуса при конфликтной стрессовой ситуации как модели социального взаимодействия / А.В. Куликов, П.И. Катунян, Ю.А. Сухонос, А.В. Новицкий, Д.А. Куликов // Военно-медицинский журнал - №1. – 2012. - С. 71-72

119. Частный анализ хронического патологического процесса: аутоиммунные болезни / В.А. Карпин // Успехи современного естествознания – 2005. - С. 21-24.

120. Зайратьянц, О.В., Бершанская А.М. Акцидентальная инволюция вилочковой железы. В кн.: Болезни вилочковой железы. Харченко В.П., Саркисова С.Д., Ветшева П.С. и др. М.: Изд-во Триада Х. - 1998 – С. 46–58.

121. Стресс и лимфоциты / Н.М. Киселева, Л.Г. Кузьменко, М.М. Нкане Нкоза // Педиатрия. -2012. – Т. 91, № 1. – С. 137-142.

122. Турицына, Е.Г. Морфологические и этиологические аспекты акцидентальной инволюции тимуса птиц // Аграрный вестник Урала. – 2009 – № 12(66). – С. 74–76.

123. Стручко, Г.Ю. Морфологическая картина и иммуногистохимический фенотип тимуса после введения полиоксидония / Г.Ю. Стручко, Е.В. Москвичев, Л.М. Меркулова, О.Ю. Кострова, М.Н. Михайлова // Иммунология. – 2014. - №5. – С. 260-263.

124. Хисматуллина, З.Н. Особенности этапов химического, физического и вирусного канцерогенеза // Вестник Казанского технологического университета. – 2013. - № 7. - URL: <https://cyberleninka.ru/article/n/osobennosti-etapov-himicheskogo-fizicheskogo-i-virusnogo-kantserogeneza>.

125. Турусов, В.С. Механизмы действия химических канцерогенов / В.С. Турусов, Г.А. Белицкий / Канцерогенез// Под ред. Д.Г. Заридзе. – М.: Научный мир. - 2000. – С.106-121.

126. Канцерогенез: учебное пособие /РАН, Рос.онкол.науч.центр им. Н.Н. Блохина, НИИ канцерогенеза; Под ред. Д.Г. Заридзе. – Москва: Научный мир. - 2000. - 418 с.

127. Худолей, В.В. Гены и ферменты метаболической активации ксенобиотиков в химическом канцерогенезе / В.В. Худолей // Экологическая генетика. - 2003. – Т.1, № 0. – С. 30-35.

128. Нитраты и нитриты в продукции растениеводства / Койка С.А., Скориков В.Т. // Вестник РУДН. - 2008. - №3. - С. 58-63.

129. Нитраты, нитриты, нитрозамин / Эвенштейн З. // Общественное питание. - 1989. - №3.

130. Осипенко, Б.Г. Нитрозодиметиламин (НДМА) – гепатотропный яд и канцероген: токсиколого-гигиенические аспекты его биологического действия (сообщение 1) / Б.Г. Осипенко, Л.О. Полякова // Сибирский медицинский журнал. – 2005. - №4. – С. 5-9.

131. Высокоолеиновый сорт рапса ярового амулет/ Горлов С.Л., Бочкарева Э.Б., Горлова Л.А., Сердюк В.В. // Научно-техническая бюллетень Всероссийского научно-исследовательского института маслиничных культур. - 2015. - №2.

132. Александров, В.А., Беспалов В.Г. Химиопрофилактика рака у пожилых // Клиническая геронтология. - 2003. - Т.9, № 8. - С. 38–50.

133. Иммуномодулирующий эффект лемонена в отношении развития опухоли молочной железы, индуцированный N-метил-N-нитрозомочевинной у крыс / Чочиева А.Р. // Современные наукоемкие технологии. - 2006. - № 6.

134. Лыков, А.П. Сравнительный анализ содержания в лимфе гормонов, вовлеченных в патогенез рака молочной железы у крыс линии Wistar / А.П. Лыков, Н.А. Бондаренко, О.В. Повещенко, А.В. Кабаков, Т.В. Райтер, О.В. Казаков, Д.Н. Стрункин, А.Ф. Повещенко, В.И. Коненков // Сибирский онкологический журнал. - 2015. - №1. - URL: <https://cyberleninka.ru/article/n/sravnitelnyy-analiz-soderzhaniya-v-limfe-gormonov-vovlechnnyh-v-patogenez-raka-molochnoy-zhelezy-u-krys-linii-wistar>

135. Рак прямой кишки у крыс wistar, индуцированный нитрозометилмочевинной/ Исакова Н.Б., Старкова Е.В. // Вестник НГУ. - 2014. - Т.12. - выпуск 1. - С. 66-70.

136. Беспалов, В.Г. Влияние рыбьего жира на развитие опухолей молочной железы и толстой кишки, вызываемых метилнитрозмочевинной в органах мишенях у крыс / В.Г. Беспалов, В.А. Александров // Сибирский онкологический журнал. - 2015. - № 2. – С. 53-57.

137. Стресс без дистресса: [перевод с английского] / Г. Селье; общ. ред. Е. М. Крепса. - Москва: Прогресс, - 1982. – С. 124. - : ил.; 20 см.

138. Стресс и его роль в развитии патологических процессов / Л.К. Хныченко, Н.С. Сапронов // Обзоры по клинической фармакологии и лекарственной терапии. – Т.2, №3. – 2003.- С.2-5.

139. Стресс и стратегии поведения /В.В. Немец, Е.П. Виноградова// Национальный психологический журнал. - 2017. - №2. - С. 59-69.

140. Морфологические аспекты атрофии тимуса при стрессе / И.С. Старская, А.В. Полевщиков // Иммунология. - № 5. – 2013.- С.271-276.

141. Психологический и социальный стрессы и канцерогенез: к постановке проблемы / К.О. Власкина, Д.А. Гора, В.И. Николаев, О.С. Булгакова // Вестник психофизиологии. - № 4. – 2014. – С.82-84.

142. Биохимический ответ организма на стресс / В.В. Жигулина // Верхневолжский медицинский журнал. – 2014. - Т.12, №4 – С.25-29.

143. Прохоренко И.О., Германова В.Н., Сергеев О.С. Стресс и состояние иммунной системы в норме и патологии. Краткий обзор литературы // Вестник медицинского института «РЕАВИЗ»: реабилитация, врач и здоровье. 2017. - Т. 25. - № 1. - С. 82–90.

144. Акцидентальная инволюция тимуса при действии нейрогенных и психогенных стрессоров / М.Ю. Капитонова, А.И. Краюшкин, О.В. Федорова, Н.А. Мураева, В.Л. Загребин, Т.А. Худа-Салех // Фундаментальные исследования - №6. - 2005. - С. 46-47. URL: <http://fundamental-research.ru/ru/article/view?id=6187>

145. Влияние хронического стресса на острую стресс - реакцию у крыс / Е.А. Вычужанова // Медицинские науки. – 2015. – С. 9-11.

146. Морфофункциональные изменения тимуса крыс при иммобилизационном стрессе и их коррекция фитосредством «Тантон» / И.К. Иванова, К.С. Лоншакова, Л.Н. Шантанова // Бюллетень ВСНЦ со РАМН.-2009. - № 2 (66). – С. 260-261.

147. Реакция соединительной ткани различных локализаций на действие иммобилизационного стресса / М.Ю. Быкова, Е.А. Мухлынина // Вестник Уральской Медицинской Академической науки. - №4. – 2010. – С. 56-58.

148. Федоров, В.Э. Проблемы в лечении рака молочной железы: взгляд со стороны, мнение и опыт онколога – хирурга / В.Э. Федоров, Ю.С. Гергенретер, К.С. Титов, М.Ю. Чебуркаева // Ремедиум Приволжье. – 2017. -№6 (156). – С. 15-18.

149. Назлиев, Д.К. Современные подходы к диагностике рака молочной железы / Д.К. Назлиев, Д.В. Судаков, Е.В. Белов, А.Н. Шевцов, Е.Н. Тишинов// Центральный научный вестник. - 2018. -Т.3, №.12. - С. 10-13.

150. Изменения заболеваемости злокачественными новообразованиями и их структуры в Астраханской области с 1970 по 2010 год /О.А. Иванов, В.В. Старинский, А.Е. Сухарев, Р.Т. Жгалиев, С.П. Иванова // Материалы VIII Всероссийского съезда онкологов России. - 2013. - С. 163-164.

151. Иммунофизиологические механизмы возникновения и поддержания опухолевого роста у человека / Лебедев К.А., Понякина И.Д.// Физиология человека. - 2010. - Т. 36, № 4. - С. 5-14.

152. Особенности Т-клеточного иммунитета при раке молочной железы /Скотаренко Л.В., Воротников И.К., Кадагидзе З.Г., Шамилов Ф.А.// Опухоли женской репродуктивной системы. - 2011. - № 4. - С. 24-28.

153. Особенности общего и локального иммунитета при одиночном и синхронном первично-множественном раке толстой кишки / Кит О.И., Златник Е.Ю., Никипелова Е.А., Геворкян Ю.А., Аверкин М.А.,

Новикова И.А., Дашков А.В. // Современные проблемы науки и образования. - 2012. - № 5. - С. 38.

154. Патологические изменения дендритных клеток при раке /Кескинов А.А., Щурин М.Р., Бухман В.М., Шпрах З.С.// Российский биотерапевтический журнал. - 2016. - Т. 15, № 4. - С. 25-33.

155. Парахонский, А.П. Механизмы повышения эффективности противоопухолевого иммунитета / В сборнике: В мире научных открытий материалы XVI Международной научно-практической конференции: сборник научных трудов. Центр научной мысли; научный редактор И.А. Рудакова. - 2015. - С. 21-26.

156. Особенности клеточного статуса иммунитета у больных раком шейки матки / Тилляшайхов М.Н., Камышов С.В.// European Science. - 2018. - № 5 (37). - С. 75-80.

157. Падун, М.А., Тарабрина Н.В. Когнитивно-личностные аспекты переживания травматического стресса // Психологический журнал. – 2004. – № 5.

158. Нейроиммунология в онкологии: воздействие стресса на болезнь /Солопова А., Идрисова Л., Чуканова Е., Алипов В. // Врач. - 2017. - № 9. - С. 14-16.

159. Кострова О.Ю. Изменения в надпочечниках крыс-самок при сочетанном воздействии канцерогена и стресса / О.Ю Кострова, И.С. Стоменская, Л.М. Меркулова, Г.Ю. Стручко, М.Н. Михайлова, М.В. Лукьянов, Ф.Н. Филиппов //Сборник научных работ, посвященный 85-летию со дня рождения профессора А.С. Леонтьюка. Строение организма человека и животных в норме, патологии и эксперименте. Минск. - 2017. - С. 295-299.

160. Взаимосвязь некоторых факторов роста и гормонов в крови крыс в динамике метастатического поражения печени / Е.М. Франциянц, И.В. Каплиева, Л.К. Трепитаки, Н.Д. Черярина // Современные проблемы науки и образования. – 2015. - №3. – С.205.

161. Возрастная инволюция и острая атрофия тимуса при экспериментальном канцерогенезе /Е.В. Москвичев, Л.М. Меркулова, Г.Ю. Стручко, М.Н. Михайлова, О.Ю. Кострова// Вестник ВолгГМУ - №3, 2014. - С. 127-130.
162. Каркищенко, Н.Н. Руководство по лабораторным животным и альтернативным моделям в биомедицинских технологиях / под ред. Н.Н. Каркищенко, С.В. Грачева. – М. - 2010. – 358 с.
163. Гершов, С.О. Анестезия грызунов / ВА «Кобра». - 2004.
164. Шаляпина В.Г., Изменение приспособительного поведения активных и пассивных крыс Виста в водно-иммерсионной модели депрессии / В.Г.Шаляпина, Е.А.Вершинина, В.В. Ракицкая, Л.Ю. Рыжова, М.Г. Семенова, О.Г. Семенова// Журнал высшей нервной деятельности. - 2006. – Т. 56, № 4. - С. 543-547.
165. Крохина Е.М., Александров П.Н. Симпатический (адренергический) компонент эффекторной иннервации сердечной мышцы. Кардиология. - 1969. - №3. - С. 97–102.
166. Юденфренд, С. Флуоресцентный анализ в биологии и медицине. М.: Мир. - 1965. - 484 с.
167. Карнаухов, В.Н. Люминесцентный спектральный анализ клетки. – М.: Наука. – 1978. – 208 с.
168. Калмыков, В.Л. Современные методы количественного определения катехоламинов и серотонина. // Ла.дело. – 1982. - №7. – С.31-36.
169. Тучноклеточная популяция тимуса при канцерогенезе патомства самок со вторичным иммунодефицитом / Г.Ю.Стручко, Л.М. Меркулова, Е.Г. Драндрова, О.Ю. Кострова, А.А. Котёлкина// Вестник новых медицинских технологий – 2018. - Т.25, №4. - С. 199-206.
170. Пирс, Э. Гистохимия теоретическая и прикладная. - М.: Изд-во иностр. лит. - 1962. - 962 с.

171. Линднер, Д. П. Морфометрический анализ популяций тучных клеток / Д. П. Линднер, И. А. Поберий, М. Я. Розкин // Арх. патологии. - 1980. - № 6. - С. 60–64
172. Стручко, Г.Ю. Люминисцентно-гистхимическое исследование тучных клеток тимуса у крыс после введения растворимого антигена. // Тез. докл. студ. науч. общества, посвященного юбилею Кубанской государственной академии. – Краснодар. – 1995. - С. 339-340.
173. Михайлова, М.Н., Меркулова Л.М., Стручко Г.Ю. Влияние имунофана на морфометрические показатели тимуса в условиях экспериментальной иммунодепрессии циклофосфаном. / Мат. Конфе. «Фундаментальные и прикладные проблемы гистологии. Гистогенез и регенерация тканей». – СПб. - 2004. – С. 123-124.
174. Бирюкова, Т.И. Влияние патологии печени матери различного генеза на морфофункциональное становление клеточного иммунитета потомства: автореф. дис. ... канд. биол. наук: 03.00.13 / Бирюкова Татьяна Игоревна. – Челябинск. - 2009. – 21 с.
175. Котёлкина, А.А. Клеточный состав тимуса крыс при сочетанном воздействии канцерогена и стресса / А.А. Котёлкина, О.Ю. Кострова, Л.М. Меркулова, Г.Ю. Стручко, М.Н. Михайлова // Журнал анатомии и гистопатологии. - 2019. – Т.8, №2. – С.47-53.
176. Сергеева, В.Е., Гордон Д.С. Люминесцентно-гистохимическая характеристика ранней реакции моноаминосодержащих структур тимуса на антигенные воздействия / Чебоксары. – Изд-во Чуваш. Ун-та. – 1992. – 352 с.
177. Голивец, Т.П. Анализ мировыз и Российских тенденций онкологической заболеваемости в XXI веке / Т.П. Голивец, Б.С. Коваленко // Научный результат. – 2015. – Т.1, №4(6). – С. 79-86.
178. Куликов, Е.П. Рак молочной железы / Е.П. Куликов// Учебное пособие. – 2002. - С. 10 – 15.

179. Чеснокова, Н.П. Рак молочной железы: проблемы патогенеза / Н.П. Чеснокова, В.Ю. Барсуков, О.А. Злобина // Фундаментальные исследования. – 2012. - №4. – С. 146-151.

180. Состояние онкологической помощи населению России в 2017 году /А.Д. Каприн, В.В. Старинский, Г.В. Петрова//– М.: МНИОИ им. П.А. Герцена– филиал ФГБУ «НМИЦ радиологии» Минздрава России. – 2018. – илл. - 236 с.

181. Биохимические аспекты развития рака молочной железы / Ильтинбаева Х.И., Курманова С.А.// Международный студенческий научный вестник. –2018. – №4-3.; URL: <http://eduherald.ru/ru/article/view?id=18877> (дата обращения: 06.01.2019).

182. Место иммуномодуляторов в терапии рака молочной железы/ Е.В. Артамонова// Ж. Опухоли женской репродуктивной системы. №1-2. - 2007. - С.23-26.

183. Георгиев, Г.П. Как нормальная клетка превращается в раковые? // Соросовский образовательный журнал. – 1999. - №4. – С. 17-22.

184. Канцерогенез, цитокины иммунитет: патогенетическая взаимосвязь в динамике развития неоплазий / под общей редакцией В.М. Попкова, Н.П. Чесноковой, В.Ю. Барсукова. – Саратов: Изд-во: СГМУ. - 2014. – 328 с.

185. Современные концепции канцерогенеза: значение недостаточности механизмов элиминации малигнезированных клеток в прогрессирующем развитии неоплазий различных локализаций (обзор) / Н.П. Чеснокова, В.В. Моррисон, В.Ю. Барсуков, Е.В. Панукалина // Саратовский научно-медицинский журнал. - 2016. -Т. 12, №.1. - С. 32-35.

186. Участие дендритных и нейроэндокринных клеток тимуса в развитии его инволюции при формировании экспериментальной опухоли толстой кишки/ М.Н. Михайлова, Г.Ю. Стручко, Л.М. Меркулова, О.Ю. Кострова, Е.В. Москвичев, Е.Г. Драндрова, И.С. Стоменская// Вестник Чувашского университета. - 2011. - № 3. - С. 377-383.

187. Булгакова, О.С. Иммуитет и различные стадии стрессового воздействия / О.С. Булгакова // Успехи современного естествознания. – 2011. - № 4. – С. 31-35.
188. Симбирцев А.С. Цитокины в лабораторной диагностике / А.С. Симбирцев, А.А. Тотолян // Клиническая лабораторная диагностика: национальное руководство / под ред. В.В. Долгова, В.В. Меньшикова. – М.: ГОЭТАР –Медиа. - 2012. – Т. 2. – С. 193-229.
189. Кострова О.Ю. Морфофункциональные изменения тимуса при экспериментальном канцерогенезе, вызванном введением 1,2-диметилгидразина в различной дозировке: дис. ...к-та мед. наук/ О.Ю. Кострова. - Санкт-Петербург. - 2013. - 153 с.
190. Драндрова, Е.Г. Морфология тимуса при экспериментальном канцерогенезе потомства самок с вторичным иммунодефицитом / Е.Г. Драндрова, Г.Ю. Стручко, Л.М. Меркулова, Е.В. Москвичев. Чебоксары: Изд-во Чуваш. ун-та, - 2018. - 140с.
191. Никипелова, Е.А. Колоканцерогенез: онкоиммунология локальных изменений / Е.А. Никипелова, А.И. Кит, А.В. Шапошников, Е.Ю. Златник, И.А. Новикова / Злокачественные опухоли – 2016. - №4. – С.81-86.
192. Ганиева А.Ф. Основные виды и стадии развития стресса // Молодежь и системная модернизация страны: сб. науч. ст. 3-й Междунар. науч. конф. студентов и молодых ученых: в 4 т. / отв. редактор А.А. Горохов. Курск: Университетская книга, - 2018. - С. 25–28
193. Черепанова, М.А. Особенности экспрессии антиапоптотического белка Bcl-2 в печени в модели ожирения и сахарного диабета 2-го типа и при коррекции линаглиптином / М.А. Черепанова // Acta Biomedica scientific. – 2018. - Т-3, № 1. - С.- 116-119.
194. Влияние острого стресса на обмен биогенных аминов у крыс в эксперименте /И.А. Тюзиков, А.П. Иванов, И.В. Чернышев//Journal of Siberian Medical Sciences/ - №2. -2012.

195. Рева, И.В., Апоптоз и его роль в репаративной регенерации эпителиальных клеток / И.В. Рева, О.А. Сингур, П.А. Зеленков, С.В. Игнатъев // Морфология. - 2006. - № 4.
196. Пащенко, М.В., Пиненин Б.В. Физиология клеток врожденной иммунной системы: дендритные клетки // Иммунология. 2006. - № 6. - С. 368-378.
197. Логинова, Н.П. Иммуноцитохимические дифференцировки эпителиальных клеток тимуса у детей первого года жизни при эмбриональных нарушениях развития сердца /Н.П. Логинова, В.А.Четвертных, В.В. Семченко, Н.В. Чемурзиева, Г.А. Хромцова // Фундаментальные исследования. – 2013 - №12. – С. 49-53.
198. Маткина, О.В. Патогистологические изменения в тимусе и селезенке неинбредных белых крыс при остром стрессе /О.В. Маткина// Пермский медицинский журнал. - 2014. - Т. 31, №1 - С. 121-128
199. Тилляшайхов, М.Н. Особенности клеточного статуса иммунитета у больных раком шейки матки/ М.Н. Тилляшайхов, С.В. Камышов// European Science. - 2018. - Т.5, №37. - С. 75–80.
200. Влияние секретируемых опухолью веществ на дендритные клетки при раке / А.А. Кескинов, М.Р. Щурин, В.М. Бухман, З.С. Шпрах// Российский биотерапевтический журнал. - 2017. – Т.16, №1. - С.12-23.
201. Lange, CA, Hyy D. Progesterone and breast cancer / Womens Health (Lond). – 2008. - 4(2). P. 151-162. doi: 10.2217/17455057.4.2.151; PubMed Central PMCID: PMC4038907.
202. Polymorphisms in steroid hormone biosynthesis genes and risk of breast cancer and fibrocystic breast conditions in Chinese women /Sakoda LC, Blackston C, Doherty JA, Ray RM, Lin MG, Stalsberg H et al. // Cancer Epidemiol Biomarkers Prev. – 2008. - 17(5). P.1066-1073. doi: 10.1158/1055-109965.EPI-77-2680; PubMed Central PMCID: PMC2791045.

203. Lio, CW, Hsieh CS. Becoming self-aware: the thymic education of regulatory T cells / C.W. Lio, C.S. Hsieh // *Curr Opin Immunol.* – 2011. – Vol. 23, №2. – P. 213-219. doi: 10.1016/j.coi.2010.11.010.
204. Kendall M.S., Stebbings R.J. The endocrine thymus. *Endocrinology journal.* – 1994. – V.2. – P. 333-339.
205. Anderson, MS, Su MA. Aire and T cell development / MS Anderson, Su MA // *Curr Opin Immunol.* – 2011. – Vol. 23, №2. - P. - 198-206. doi: 10.1016/j.coi.2010.11.007.
206. Bellamy D, Mohamed K. A comparative study of age involution of the bursa of Fabriciusan thymus in birds. *Thymus.* – 1982. - T.4, №2. – P. 107-114.
207. Gordon, J. Mechanisms of thymus organogenesis and morphogenesis / J. Gordon, N.R. Manley // *Development.* – 2011. – Vol. 209. – P. 58-75.
208. L'Hypertrofie thymique chez l'enfant au-dela de 2 ans / Hoeffel J.C., Mainard L., Worms A.M., Marcon F., Galloy M.A. // *Radiology J. Cepur.* – 1994. – № 14/1. – P. 9 - 15.
209. T-cell lineage determination / Yang Q, Jeremiah Bell J, Bhandoola A. // *Immunol Rev.* 2010. - 238(1):12-22. doi: 10.1111/j.1600-065X.2010.00956.x
210. High CD30 ligand expression by epithelial cells and Hassal's corpuscles in the medulla of human thymus / P Romagnani; F Annunziato; R Manetti; C Mavilia; L Lasagni; C Manuelli; G B Vannelli; V Vanini; E Maggi; C Pupilli; S Romagnan // *Blood.* - 1998. - Vol. 91, № 9. – P.3323-3332. - ISSN 0006-4971.
211. Th1/Th2 cells, their associated molecules and role in pathophysiology. / P. Romagnani, F. Annunziato, M.P. Piccinni, E. Maggi, S. Romagnani // *European cytokine network.* – 2000. - Vol.11, № 3. - P. 510-511.
212. He, W. Induction of TCR-gamma delta expression on triple-negative (CD3-4-8) human thymocytes. Comparative analysis of the effects of IL-4 and IL-7 / He W, Zhang Y, Deng Y, Kabelitz D.// *J Immunol.* - 1995. – Vol. 154, № 8. - P. 3726 - 3731.

213. Grapin-Botton, A. Evolution of the mechanisms and molecular control of endoderm formation / A. Grapin-Botton, D. Constam // *Mech. Dev.* – 2007. – Vol. 124. – P. 253-278.
214. Zorn, A.M. Vertebrate endoderm development and organ formation / A.M. Zorn, J.M. Wells // *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* – 2009. – Vol. 25. – P. 221-251.
215. Barthlott, T. A short primer on early molecular and cellular events in thymus organogenesis and replacement / T. Barthlott, M.P. Keller, W. Krenger // *Swiss Med Wkly.* - 2006. - Vol. 136, № 23-24. - P. 365-369.
216. Love PE, Bhandoola A. Signal integration and crosstalk during thymocytemigration and emigration. *Nat Rev Immunol.* – 2011. - V.11, №7. - P. 469-477. doi: 10.1038/nri2989.
217. Mandal, A., Viswanathan C. Natural killer cells: In health and disease / A. Mandal, C. Viswanathan // *Hematol Oncol Stem Cell Ther.* – 2015. Vol. 8, №2. – P. 47-55.
218. Levings, M., BacchettaR, Schulz U., Roncarolo M. The role of IL10 and TGF β in the differentiation and effector function of regulatory cells / M. Levings, R. Bacchetta, U. Schulz, M. Roncarolo // *Int. Arch. Allergy Immunol.* – 2002. - Vol.129. – P. 263 - 276.
219. Curiel, T. J., Specific recruitment of regulatory T cells in ovarian carcinoma fosters immune privilege and predicts reduced survival / T.J. Curiel, G. Coukos, L. Zou et al. // *Nat. Med.* – 2004. - Vol. 10. - P. 942–949.
220. Menetrier-Caux, C. Differences in tumor regulatory T-cell localization and activation status impact patient outcome / C. Menetrier-Caux, M. Gobert, C. Caux // *Cancer Res.* – 2009. - Vol. 69. - P. 7895–7898.
221. Yang, Z.Z. The role of Treg cells in the cancer immunological response / Z.Z. Yang, S.M. Ansell // *Am. J. Immunol.* – 2009. - Vol. 5, №. 1. - P. 17–28.
222. Anderson, M., Projection of an immunological self shadow within the thymus by the Aire protein/ M. Anderson, E. Venanzi, I. Klein, Z. Chen, S. Berzins et al.//*Science.* – 2002. – V.298. – P.1395-1401.

223. Jorgensen, A., Ropke C., Nielsen M., Madsen H., Svejgaard A. / Tissue Antigens// Munksgaard volume 47-issue 4. - New York. - 1996.
224. Ileana, P. Regeneration of the adult thymus is preceded by the expansion of K5+K8+ epithelial cell progenitors and by increased expression of Trp63, cMyc and Tcf3 trascription factors in the thymic stoma / Ileana P., Zubkova I., Medvedovic M. // International Immunology. -2008.- Vol. 19. – P. 1249 – 1260.
225. Hendrix, TM, et al. Thymic nurse cells exhibit epithelial progenitor phenotype and create unique extra-cytoplasmic membrane space for thymocyte selection. Cell Immunol. – 2010. - 261(2). - P.81-92. doi: 10.1016/j.cellimm.2009.11.004
226. Gallucci, S., Positive selection of T cells / S. Gallucci, M. Lolkema, P. Matzinger // Nat. Med. - 1999. - Vol. 5. - P. 1249-1255.
227. Brocker, T. Targeted expression of major histocompatibility complex (MHC) class II molecules demonstrates that dendritic cells can induce negative but not potive celection of thymocytes in vivo / T. Brocker, M.Riedinger, K. Karjalainen // Jornal of Experimental Medicine. – 1997. – Vol.185, №3. – P.541-550.
228. Moore, A.J. Dendritic cell development: a choose-your-own-adventure story / A.J. Moore, M.K. Anderson // Advanced in hematology. - 2013. – Vol. 2013. – 16 p.
229. Generation of dendritic cells with regulatory properties / G. Ureta, F. Osorio, J.Morales, M. Roseblatt, M.R. Bono, J.A. Fierro// Transplant Proc. - №39. - 2007. - P.633-637.
230. Dendritic cells in the thymus contribute to T regulatory cell induction / A. Proietto, S. van Dommelen, P. Zhou et al. // Proc Natl Acad Sci. – 2008. – Vol. 105. – P. 19869-19874.
231. Gupta, S. Role of dendritic cells in autoimmunity in aged humans / S. Gupta // Immunome Research. – 2013. – Vol. 9, №1. – 5 p.
232. Gallegos, M.A. Central tolerance: good but imperfect / M.A. Gallegos, M.J. Bevan // Immunological Reviews. – 2006. – Vol. 209. – P.290-296.

233. Hubert, F.X. AIRE regulates the transfer of antigens from mTECs to dendritic cells for induction of thymic intolerance / F.X. Hubert // *Blood*. – 2011. – Vol. 118. – P. 2462-2472.

234. Aire – dependent production of XCL1 mediates medullary accumulation of thymic dendritic cells and contributes to regulatory T cell development / Y. Lei et al. // *J. Exp. Med.* - 2011. – Vol. 208. – P. 383-394.

235. Kyewski, B.A. Seeding of thymic microenvironment defined by distinct thymocyte-stromal cell interactions is developmentally controlled / B.A. Kyewski // *J. Exp. Med.* – 1987. – Vol. 156. – P. 520.

236. Wood, G.W. Macrophages in the thymus / G.W. Wood // *Surv. Immunol. Res.* – 1985. – Vol. 4, №3. – P. 179 -191.

237. Ultrastructural study of macrophages in the rat thymus, with special reference to the cortico-medullary zone / N.M. Milicevic, Z. Milicevic, M. Colic, S. Mujovic // *J. Anat.* – 1987. – Vol. 150. – P. 89 – 98.

238. Ginsburg H. The in vitro differentiation and culture of normal mast cells from the mouse thymus // *Ann. N. Y. Acad. Sci.* — 1963. — Vol. 103, № 1. — P. 20–39.

239. Galli, S.G. New insights into «the riddle of the mast cells»: microenvironmental regulation of mast cell development and phenotypic heterogeneity / S.J. Galli // *Lab. Invest.* – 1990. – Vol. 62. – P. 5-33.

240. Crivellato, E. Nico B., Ribatti D. Mast cell contribution to tumor angiogenesis: a clinical approach // *Eur. Cytokine Netw.* - 2009. – Vol. 20, №4. – P. 197-206.

241. The role of mast cell in tissue morphogenesis. Thymus, duodenum, and mammary gland as examples / D. Ribatti , E. Crivellato // *Experimental Cell Research*. - 2016. -Vol. 341. - P. 105-109. DOI: 10.1016/j.yexcr.2015.11.022

242. Development, migration and survival of mast cells / Y. Okayama, T. Kawakami // *Immunol Res.* - 2006. - P.97-115.

243. Mast Cells in Mammary Carcinogenesis: Host or Tumor Supporters? / A. Faustino-Rocha, A. Gama, M. Neuparth et al. // *Anticancer Res.* – 2017. - Vol. 37, № 3. - P.1013–1021.
244. Coordinated regulation of NK receptor expression in the maturing human immune system / D. Strauss-Albee, A. Horowitz, P. Parham et al. // *J. Immunol.* - 2014. - Vol. 193, № 10. - P. 4871– 4879.
245. Rao, KN Brown MA Mast cells: multifaceted immune cells with diverse roles in health and disease/ Rao KN, Brown MA// 2008. – V.1143. - P.83-104. doi:10.1196/annals.1443.023.
246. Tatsuta, M., Yamamura H., Ichii M. // *Am. Rev. Respir. Dis.* – 2005. - P. 677-680.
247. Effects of altered glucocorticoid sensitivity in the T cell lineage on thymocyte and T cell homeostasis /A. Pazirandeh, Y. Xue, T. Prestegard et all.// *FASEB J.* - 2002. - №7. - P. 727-729.
248. Hale, L. P. Histologic and molecular assessment of human thymus // *Ann Diagn Pathol.* – 2004. – № 2. 1. – P. 50-60.
249. Raut, R.S. Morphohistological study of thymus of an adult cadaver / R.S. Raut, A. Gaikwad, B.H. Bahetee // *Int. J. of Recent Trends in Science and Technology.* – 2013. – Vol. 9, №1. – P. 146-148.
250. Involution of the mammalian thymus, one of the leading regulators of ageing / B. Bodey, B.Jr. Bodey, S.E. Siegel, H.E. Kaiser // *In Vivo.* – 1997. – Vol. 11, №5. – P. 421-440.
251. Hedden, J.W. Thymic endocrinology / J.W. Hedden // *Ann. NY Acad. Sci.* – 1998. – Vol. 840. – P. 352-358.
252. Begum, M. Age related changes in weight of the thymus gland of Bangladeshi people / M. Begum, K.P. Uttam, J. Alam // *Bangladesh Journal of Anatomy.* – 2010. – Vol. 8, №1. – P. 10-12.
253. A study on histomorphological features of persistent adult human cadaveric thymus / R.Sugavasi, D.B. Indira, M. Sujatha et al. // *Int J Cur Res Rev.* – 2012. – Vol. 4, № 24. – P. 74-76.

254. Palmer, D.B. The effect of age on thymic function / D.B. Palmer // *Frontiers in Immunology*. – 2013. – Vol. 4. – 6 p.

255. Consolini, R., Legitimo A., Calleri A., Milani M. Distribution of age-related thymulin in normal subjects through the course of life / A. Legitimo, A. Calleri, M. Milani // *Clin. Exp. Immunol.* - 2000. – Vol. 121, № 3. – P.444–447.

256. Thymus and aging: morphological, radiological, and functional overview / R. Rezzani, L. Nardo, G. Favero, M. Peroni, L.F. Rodella // *AGE*, 2013. DOI: 10.1007/s11357-013-9564-5.

257. Glavina-Durdov, M. The grade of acute thymus involution in neonates correlates with the duration of acute illness and with the percentage of lymphocytes in peripheral blood smear. Pathological study / M. Glavina-Durdov, O. Springer, V. Capkun, Z. Saratlija-Novakovic, D. Rozic, M. Barle // *Biol Neonate*. - 2003. – Vol. – 83, № 4. – P. 229-34.

258. Strauss, G. Induction of apoptosis and modulation of activation and effector function in T cells by immunosuppressive drugs / G. Strauss, W. Osen, K. Debatin // *Clin. Exp. Immunol.* – 2002 – № 2 – P. 255–266.

259. Gress, R.E. Reduced thymus activity and infection prematurely age the immune system / R.E. Gress, S.G. Deeks // *J. Clin. Invest.* - 2009. - Vol. 119, № 10. – P. 2884–2887.

260. Penn, I., Starzl T.E. Immunosuppression and cancer / I. Penn, T.E. Starzl // *Transplant Proc.* – 1973. – Vol.5, №1. – P. 943-947.

261. Michaud, D.S. Understanding the Role of the Immune System in the Development of Cancer: New Opportunities for Population-Based Research / D.S. Michaud, E.A. Houseman, C.J. Marsit, H.H. Nelson, J.K. Wiencke, K.T. Kelsey // *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* – 2015. – Vol. 24, №12. – P. 1811-1819.

262. Dolcetti, R., A lymphomagenic role for HIV beyond immune suppression? / R. Dolcetti, A. Gloghini, A. Caruso, A. Carbone // *Blood*. - 2016. – Vol.127, № 11. - P. - 1403-1409.

263. Pardoll, D. Cancer and the Immune System: Basic Concepts and Targets for Intervention / D. Pardoll // *Semin Oncol.* – 2015. – Vol. 42, №4. – P. 523-538.
264. Candeias, S.M., Gaip U.S. The Immune System in Cancer Prevention / S.M. Candeias, U.S. Gaip // *Development and Therapy. Anticancer Agents Med Chem.* – 2016. – Vol.16, №1. - P. 101-107.
265. Wahlang, B., Role of Cytochrome P450 Monooxygenase in Carcinogen and Chemotherapeutic Drug Metabolism / B. Wahlang, K.C. Falkner, M.C. Cave, R.A. Prough // *Adv Pharmacol.* – 2015. - №74. - P. 1-33.
266. Janeway, C.A. Jr., Travers P., Walport M., et al. Immunobiology: The Immune System in Health and Disease. 5 th edition. New York: Garland Science. - 2001.
267. Conolly, R.B., Population variability in biological adaptive responses to DNA damage and the shapes of carcinogen dose-response curves/ Conolly R.B., Gaylor D.W., Lutz W.K. // *Toxicol Appl Pharmacol.* – 2005. – Vol. 207(2 Suppl). - P. 570-575.
268. Schiller, J.T., Lowy D.R. Virus infection and human cancer: an overview / J.T. Schiller, D.R. Lowy // *Recent Results Cancer Res.* – 2014. - №193. - P. 1-10.
269. Glovatchcka, V. Chronic stress-induced changes in pro-inflammatory cytokines and spinal glia markers in the rat: a time course study/ V. Glovatchcka, H. Ennes, E.A. Mayer, S. Bradesi // *Neuroimmunomod.* – 2012. – Vol. 19, №6. – P. 367–376.
270. Felten, D.L., Noradrenergic sympatheticneural interactions with the immune system: structure and function / D.L. Felten, S.Y. Felten , D.L. Bellinger, S.L. Carlson, K.D. Ackerman, K.S. Madden, A.J.A. Olschowka, S. Ivnat // *Immunol Rev.* – 1987. - №100. – P. 225–60. doi: 10.1111/j.1600-065X.1987.tb00534.x
271. Cohen S., Janicki-Deverts D., Doyle W.J. et al. Chronic stress, glucocorticoid receptor resistance, inflammation, and disease risk // *Proc Nat Acad Sci USA.* – 2012. – Vol. 109, № 16. – P. 5995–5999.

272. Dhabhar, F.S. Stress-induced redistribution of immune cells – from barracks to boulevards to battlefields: a tale of three hormones – Curt Richter Award Winner / Dhabhar F.S., Malarkey W.B., Neri E., McEwen B.S. // *Psychoneuroendocr.* – 2012. – Vol. 37, №9. – P. 1345–1368.

273. Driscoll, P., A genetically -based model for divergent stress responses: behavioral, neurochemical and hormonal aspects. In: Pliska, V., & Stranzinger, G. (Eds) / P. Driscoll, J. Demek, M. D'Angio, Y. Claustre, & B. Scatton // *Farm animals in biomedical research*. Hamburg: Verlag Paul Parey. – 1990. – P. 97–107.

274. Herbert, T.B., Kohen S. Stress and immunity in humans: A metanalytic review // *Psychosom. Med.* - 1993. - Vol.55. - P. 364-379

275. Vivier E., Raulet D.H., Moretta A., et al. Innate or adaptive immunity? The example of natural killer cells. *Science*. – 2011. – Vol. 331. - № 6013. - P. 44-49.

276. Gruver, A. L. Cytokines, leptin, and stress-induced thymic atrophy / A.L. Gruver, G. D. Sempowski // *Journal of Leukocyte Biology*. – 2008. – Vol. 84, № 4. – P.915–923.

277. Van der Pomp G., Antoni M.H., Mulder C.L. et al. Psychoneuroimmunology and the course of breast cancer // *Psycho-oncology*. – 1994. – Vol. 3. – P. 271–288.

278. McPherson, K. et al. ABC of breast diseases. Breast cancer epidemiology, risk factors, and genetics // *Brit. Med. J.* – 2000. – Vol. 321. – P. 628 – 634.

279. Csaba, G. The immunoendocrine thymus as a pacemaker of lifespan / G. Csaba// *Acta Microbiologica et Immunologica*. – 2016 – Vol. 63, № 2 – P. 139 – 158.

280. Pathway-based discovery of genetic interactions in breast cancer / Wang W, Xu ZZ, Costanzo M, Boone C, Lange CA, Myers CL.// *PLoS Genet.* - 2017. –V.13, №9. doi: 10.1371

281. European convention for the protection of vertebrate animals used for experimental and other scientific purpose: Council of Europe 18.03.1986. Strasbourg. – 1986. – 52 p.
282. Dabbs, D.J. Diagnostics immunohistochemistry //Edinburg: Chrchill Livingstone. - 2002. – 637 p.
283. Fluorescencence of catechol-amines and related compounds condensed with formaldehyde / Falk B., Hillarp N.A. Thieme G., Torp A. // J. Histochem. Cytochem. – 1962. – V.10. – P.348 - 354.
284. Bjorklund, A., Nobin A., Stevi H. Regeneration of central serotonin neu-rons after axonal degeneration induced by 5, 6-dihydrooxytryptamine// Brain Res. – 1973. - V.50, №1. – P. 214 - 220.
285. Cross, S.A.M., Ewen S.W.B., Rost E.W.D. A study of the methods oavailable for the cytochemical Fnflammatory of histamine by fluorescence induced with o-phthalaldehyde or acetaldehyde. J. Histochem. - 1971. - № 6. – P. 471–476.
286. Sokal and Rolf. Biometry. The principles and Practice of Statistics in Biological Research.W.H. Freeman and Company. – New York. - 1981. – 859 p.
287. Siegel, S. and Castellan r.,N.J. Nonparametric Statistics for the Behavioral Sciences. 2nd Edition, McGrawHill. – New York. – 1988.
288. Metformin and melatonin improve histopathological outcome of NMU-induced mammary tumors in rats / Bojková B., Kajo K., Kubatka P., Solár P., Péc M., Adamkov M.// Pathol Res Pract. - 2019. – V. 215, №4. – P. 722 - 729 <https://doi:10.1016/j.prp.2019.01.007>.
289. Boyle, P. Cancer incidence and mortality in Europe / Boyle P., Ferlay J. // Annals of Oncology. - 2005. - Vol. 16. - P. 481 – 488.
290. Kennedy, S. Kiecolt-Glaser. K., Glaser R/ Immunological consequences of acute acute and chronic stressors: Mediating role of interpersonal relationships // Br. Med. Psychol. – 1988. – V. 61. – P. 77 – 85.
291. Bukhtoyarov, O.V. Psychoimmunological rehabilitation of advanced cancer patients with psychogenic medical history/ O.V. Bukhtoyarov,

D. M. Samarin // International Journal of Medicine and Medical Sciences. - 2013. - Vol. 5, №11. – P. 498–502.

292. Elenkov, I.J. Stress System Organization, Physiology and Immunoregulation / I.J. Elenkov, G.P. Chrousos // Neuroimmunomodulation. -2006. - Vol. 13. - P. 257 - 267.

293. Clarke S.L., Betts G.J., Plant A., et al CD4⁺CD25⁺FOXP3⁺ regulatory T cells suppress anti-tumor immune responses in patients with colorectal cancer // PLoS One. - 2006. – Dec. – Vol.27, №1. - P.129.

294. Pages, F. Immune infiltration in human tumors: a prognostic factor that should not be ignored / F. Pages, J. Galon, M. C. DieuNosjean, E. Tartour, C. Sauts-Fridman, W. H. Fridman // Oncogene. – 2010. - №29. – P.1093–1102. PMID: 19946335 DOI: 10.1038/ onc.2009.416.