

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

*На правах рукописи*



**САМАКИНА Екатерина Станиславовна**

**МОРФОЛОГИЧЕСКАЯ И ИММУНОГИСТОХИМИЧЕСКАЯ  
ХАРАКТЕРИСТИКА ЛИМФОИДНЫХ СТРУКТУР  
СЕЛЕЗЕНКИ КРЫС ПРИ ВВЕДЕНИИ ЭТИЛКАРБАМАТА  
НА ФОНЕ ПРИЕМА СЕЛЕНА**

1.5.22 – Клеточная биология

Диссертация

на соискание ученой степени

кандидата медицинских наук

Научный руководитель:

доктор медицинских наук, профессор

Меркулова Лариса Михайловна

## ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ .....	4
ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ.....	16
1.1. Современные представления о морфофункциональной гистеоструктуре селезенки .....	16
1.2. Этилкарбамат – элемент современных технологий и его биологическое действие на организм .....	31
1.3. Роль селена в поддержании гомеостаза организма.....	38
1.3.1. Общие сведения о микроэлементе селене и его уникальная роль во множестве функций.....	38
1.3.2. Роль ферментов, содержащих селен, в функционировании клеток .....	45
ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ.....	51
2.1. Материал исследования .....	51
2.2. Методы исследования .....	54
ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ СОБСТВЕННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ.....	60
3.1. Влияние селена на морфологическую и иммуногистохимическую структуру селезенки .....	60
3.1.1. Морфологическое и иммуногистохимическое исследование селезенки через месяц с момента завершения приема селена .....	60
3.1.2. Морфологическое и иммуногистохимическое исследование селезенки через 2 месяца с момента завершения приема селена .....	71
3.1.3. Морфологическое и иммуногистохимическое исследование селезенки через 6 месяцев с момента завершения приема селена .....	80
3.2. Морфологическая картина селезенки после инъекции этилкарбамата	93

3.2.1. Морфологическое и иммуногистохимическое исследование селезенки через месяц после инъекции этилкарбамата.....	93
3.2.2. Морфологическое и иммуногистохимическое исследование селезенки через 2 месяца после инъекции этилкарбамата .....	98
3.2.3. Морфологическое и иммуногистохимическое исследование селезенки через 6 месяцев после инъекции этилкарбамата .....	104
3.3. Морфологическая картина селезенки после последовательного приема селена и инъекции этилкарбамата .....	112
3.3.1. Морфологическое и иммуногистохимическое исследование селезенки через месяц после последовательного приема селена и инъекции этилкарбамата.....	112
3.3.2. Морфологическое и иммуногистохимическое исследование селезенки через 2 месяца после последовательного приема селена и инъекции этилкарбамата.....	120
3.3.3. Морфологическое и иммуногистохимическое исследование селезенки через 6 месяцев после последовательного приема селена и инъекции этилкарбамата.....	128
ГЛАВА 4. ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ И ЗАКЛЮЧЕНИЕ.....	139
ВЫВОДЫ .....	150
ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ .....	152
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ.....	153
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....	156

## ВВЕДЕНИЕ

### **Актуальность темы исследования**

Иммунная система выполняет широкий спектр важнейших физиологических функций, включая модуляцию воспалительных реакций и подавление опухолевых процессов [32, 38, 41, 123, 130, 134, 138]. Современные исследования морфологических изменений иммунных органов свидетельствуют о том, что адаптивные возможности организма и уровень иммунореактивности напрямую зависят от их активности, которые обеспечивают генерацию как специфических, так и неспецифических ответов на разнообразные внешние и внутренние стимулы [162, 163, 175, 195, 268].

Иммунная система функционирует благодаря наличию большого количества органов, которые подразделяются на центральные и периферические, один из них – селезенка. Она является паренхиматозным органом периферической иммунной системы, играющим ключевую роль в иммунном ответе организма [3, 6, 7, 57], включая противоопухолевый и противовоспалительный [24, 31, 41, 123, 134, 138, 325]. Это реализуется благодаря ее специфическому строению, так как в этом органе происходит дифференцировка и активация Т- и В-клеток [79, 83, 119, 128, 186, 242, 285]. Исследования подтверждают, что лимфоциты ответственны за гуморальный и клеточный иммунные ответы [3, 5, 7, 66, 82, 105]. Показано, что после спленэктомии развивается вторичный иммунный дефицит, приводящий к увеличению риска развития неопластических процессов в организме [3, 5, 7, 74].

Хроническое воспаление любого органа ассоциировано с повышением онкогенного риска [125, 154, 199, 211, 228, 254, 321]. Особую уязвимость демонстрируют легкие как орган, постоянно контактирующий с множеством химических и биологических агентов: повреждение эпителиальных, иммунных и стромальных клеток сопровождается высвобождением

провоспалительных цитокинов и формированием микросреды, благоприятной для канцерогенеза [202, 288]. В последние года зафиксирован рост воспалительных заболеваний дыхательной системы [2, 28, 85], особенно в связи с пандемией SARS-COVID 19 [28, 85, 272]. Согласно данным G. T. Stathopoulos, C. Narayan, A. Kumar и других авторов, эффекторные клетки воспаления способны секретировать цитокины, непосредственно активирующие онкогенные сигнальные каскады в клетках, включая ядерный фактор Каппа- $\beta$  (NF)- $\kappa$ B, что поддерживает их выживание и пролиферацию [171, 230, 288, 290].

Злокачественные опухоли остаются одной из главных медико-социальных проблем. В 2022 году зарегистрировано 20 млн новых случаев рака и 10 млн смертей, а к 2050 году прогнозируется рост до 35 млн случаев [108, 284]. В Российской Федерации наиболее распространены опухоли кожи (13,6%), молочной железы (12,3%), легких (8,7%) и кишечника (7,1%) [27, с. 34-39]. За последние 10 лет рак увеличился на 26%. Среди мужчин чаще диагностируют рак предстательной железы (19,1%) и легких (14,5%), среди женщин – молочной железы (22,5%) и кожи (15,6%) [27, с. 4-12]. По мнению А. О. Шахзадовой, В. В. Старинского [87], наиболее запущенные случаи выявляются в поджелудочной железе, печени и дыхательных путях.

Таким образом, воспалительные процессы являются значимым звеном причинно-следственной цепи, ведущей к опухолевой трансформации. Существенным экзогенным триггером воспалительных и неопластических процессов в легких выступает этилкарбамат [122, 157, 200, 216, 230, 231, 232, 255, 288, 290], присутствующий, в частности, в пищевых продуктах [199], используемый как промежуточный продукт в фармацевтическом производстве, в качестве сшивающего агента в текстильной промышленности и при проведении биохимических экспериментов [288], а также в стоматологии в составе композитов [214]. Помимо процессов развития воспаления и запуска онкологических заболеваний, этилкарбамат обладает

генотоксическим действием и вызывает мутацию в гене Kras [200, 216, 231, 232].

Участие микроэлементов в регуляции иммунного ответа является предметом пристального внимания в медицине. Научные исследования за последние 5 лет указывают, что нутриенты играют важную роль в регуляции как воспалительных процессов [160, 167, 258, 309], так и способствуют противоопухолевому ответу [170, 179, 269, 270, 287]. Особая заинтересованность имеется в изменении структур селезенки на фоне приема селена, поскольку он относится к эссенциальным микроэлементам с доказанным иммуностимулирующим и противоопухолевым действием [102, 137, 141, 160, 188, 236, 258]. Селен входит в состав ферментов из семейства селенопротеинов, глутатионпероксидазы, тиреодоксинредуктазы [93, 94, 271, 292, 303, 304, 330]. Они опосредованно участвуют в регуляции экспрессии воспалительных факторов за счет накопления активных форм кислорода и циркулирующего уровня провоспалительных цитокинов [271, 292, 303, 304, 330]. Кроме того, они участвуют в пролиферации опухолевых клеток за счет сверх экспрессии, а также участвуют в деградации неправильно свернувшихся белков, обеспечивая защиту клеток от окислительного повреждения [182, 271]. Кроме того, селен способен усиливать пролиферацию Т-лимфоцитов в Т-зависимых зонах в ответ на воздействие мутагенов [46, 115, 137, 258, 304].

Наше исследование направлено на выявление морфологических перестроек селезенки крыс при последовательном приеме селена и инъекции этилкарбамата. В литературе отсутствуют систематические данные об их последовательном влиянии на клеточную архитектуру селезенки, включая, лимфоциты, макрофаги, клетки мезенхимального происхождения, что делает наше исследование значимым.

### **Степень разработанности темы**

Множество ученых изучали участие органов иммунной системы, в том числе и селезенки, в развитии воспалительного и онкологического процессов [3, 38, 53, 123, 162, 325]. Известно, что при длительном воспалении

развивалась гиперплазия структур белой пульпы селезенки преимущественно В-зоны. Так при длительной циркуляции SARS-CoV-2 в организме детей возникала атрофия белой пульпы селезенки [53], а при введении 1,2-диметилгидразина у потомства экспериментальных животных ученые выявляли гиперплазию компартментов белой пульпы органа [3, 4, 5]. При введении этилкарбамата, на фоне развития изменений в легких, в селезенке выявляли очень раннее увеличение как эффекторных клеток, продуцирующих IFN- $\gamma$ , так и супрессорных клеток CD11b<sup>+</sup>Gr-1<sup>+</sup>/CD4<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup>, что указывает на раннее подавление иммунитета [264]. Но до сих пор остается неизученным иммуногистохимическая и ультрамикроскопическая характеристика клеток селезенки на фоне хронического воспаления с последующим развитием неопластического процесса в легких.

Существуют работы, в которых изучался иммуностимулирующий эффект селена по окончании срока его поступления [33, 46, 50, 52, 58, 71, 77], но не известно, какие изменения происходят в селезенке после его полного выведения из организма. Известны работы, в которых подтверждается, что селен снижает частоту развития злокачественных новообразований в легких [126, 164, 197, 258], однако в этих работах отсутствуют оценка клеточного состава и структурно-функциональных перестроек селезенки как важного периферического органа иммунной системы. Кроме этого, в доступных источниках отсутствуют данные об изменениях селезенки при предварительном поступлении селена перед инъекцией этилкарбамата, что не позволяет судить о возможном протективном или, напротив, модифицирующем влиянии селена на гистоархитектонику органа.

### **Цель исследования**

Цель исследования – выявить особенности морфофункционального состояния селезенки крыс при пероральном поступлении селена, при внутрибрюшинной инъекции этилкарбамата и при последовательном их воздействии.

**Задачи исследования:**

1. Определить морфологические изменения селезенки крыс-самцов через 1, 2 и 6 месяцев с момента завершения поступления селена, после однократной внутрибрюшинной инъекции этилкарбамата, а также после последовательного поступления селена и инъекции этилкарбамата.

2. Изучить особенности Т-клеточного звена (*CD2*, *CD3* и *Vimentin*) в селезенке крыс-самцов через 1, 2 и 6 месяцев с момента завершения поступления селена, после однократной внутрибрюшинной инъекции этилкарбамата, а также после последовательного поступления селена и инъекции этилкарбамата.

3. Оценить количественное распределение макрофагов (*CD68*) и В-лимфоцитов (*CD21*) в селезенке крыс-самцов через 1, 2 и 6 месяцев с момента завершения поступления селена, после однократной внутрибрюшинной инъекции этилкарбамата, а также после последовательного поступления селена и инъекции этилкарбамата.

4. Провести анализ ультрамикроскопических особенностей селезенки крыс-самцов через 1, 2 и 6 месяцев с момента завершения поступления селена, после однократной внутрибрюшинной инъекции этилкарбамата, а также после последовательного поступления селена и инъекции этилкарбамата.

5. Оценить пролиферацию клеток (*Ki67*) и содержание белка p53 в селезенке крыс-самцов через 1, 2 и 6 месяцев с момента завершения поступления селена, после однократной внутрибрюшинной инъекции этилкарбамата, а также после последовательного поступления селена и инъекции этилкарбамата.

**Научная новизна**

Описаны морфологические, иммуногистохимические и ультраструктурные изменения селезенки крыс-самцов на разных сроках после однократной инъекции этилкарбамата, с момента завершения поступления селена и при последовательном поступлении селена и этилкарбамата.

Установлено, что однократная инъекция этилкарбамата в дозировке 1 г/кг массы тела экспериментальным животным через 1 и 2 месяца привела к гиперплазии белой пульпы селезенки с увеличением площади лимфоидных узелков и толщины периартериолярной муфты. Через 2 месяца после инъекции этилкарбамата возникают изменения иммунного ответа: снижаются маркеры CD2, CD3 и CD21 и лимфоидный коэффициент, а также пролиферация клеток. Через 6 месяцев после инъекции возникла атрофия белой пульпы с отсутствием лимфоидных узелков и уменьшением параметров периартериолярной муфты. Доказано, что возникает периартериолярный отек с уменьшением просвета центральной артериолы селезенки и снижением пропускной способности в ней. Также через 6 месяцев наблюдается выраженное снижение всех исследуемых клеток в белой и в красной пульпе селезенки, а также отсутствие лимфоидных узелков.

Впервые на ультраструктурном уровне после однократной инъекции этилкарбамата установлены признаки увеличения синтетической активности эндоплазматического ретикулума и комплекса Гольджи в плазматических клетках белой и красной пульпы. В лимфоцитах выявлено увеличение числа набухших митохондрий и перераспределение гетерохроматина в ядре. Через 6 месяцев в селезенке преобладали эритроциты и отмечены макрофаги на различных стадиях фагоцитоза, а также лимфоциты с увеличенным количеством митохондрий и липидными включениями.

Установлено, что поступление селена в дозировке 20 мкг/кг массы тела крыс с питьевой водой с последующей инъекцией этилкарбамата приводит к сохранению массы селезенки, приводит к уменьшению индекса Керногана и увеличению количества Т-клеток. Впервые выявлено, что через 2 месяца при предварительном поступлении селена перед инъекцией этилкарбамата повышен индекс Керногана, толщина периартериолярной муфты и площадь лимфоидных узелков, а также повышено количество Т- и В-клеток, а также макрофагов и клеток мезенхимального происхождения.

Через 6 месяцев после последовательного поступления веществ сохранены лимфоидные узелки как с герминативным центром, так и без него. В работе выявлено, что при последовательном приеме селена и инъекции этилкарбамата индекс Керногана не отличался от контрольной группы животных, что указывает на сохранение пропускной способности центральной артериолы селезенки. Впервые обнаружено, что через 6 месяцев после последовательного поступления селена и этилкарбамата увеличивалось количество маркеров CD3, CD68 и Ki67 в белой пульпе селезенки. На ультраструктурном уровне определяли лишь единичные набухшие митохондрии в лимфоцитах селезенки.

### **Теоретическая и практическая значимость работы**

Результаты работы дополняют сведения о клеточном составе селезенки на фоне приема селена в течение месяца, инъекции этилкарбамата и последовательного поступления в организм данных веществ.

Результаты проведенного исследования значительно обогатят имеющуюся научную базу о морфологических изменениях в селезенке после приема селена и инъекции этилкарбамата. Данные выводы представляют ценность не только для фундаментальных наук, но и для аспирантов и магистрантов, специализирующихся в области клеточной биологии. Полученные данные могут стать полезным материалом для разработки лекционных курсов и проведения лабораторных практикумов в медицинских вузах, а также использоваться в программах профессиональной переподготовки специалистов в области биомедицины. Кроме того, они могут быть интегрированы в учебные издания, способствуя повышению качества подготовки будущих специалистов.

Полученные данные обладают высокой прикладной ценностью для специалистов в различных областях (морфология, иммунология, онкология и профпатология), занимающихся изучением структурно-функциональных преобразований лимфоидных органов под влиянием поступающих ксенобиотиков.

## **Методология и методы исследования**

В эксперименте участвовали крысы линии Wistar в количестве 106 шт., которые были разделены на 4 группы: 1 – интактная; 2 – опытная, где крысы получали по требованию питьевую воду, фортифицированную селеном 20 мкг на кг массы тела крысы, в течении 1 месяца; 3 – опытная, где крысам проводили однократную внутрибрюшинную инъекцию этилкарбамата в дозе 1 г на кг массы тела крысы, предварительно разведенного в 1 мл 0,9% - ого физиологического раствора; 4 – опытная, где крысы получали по требованию питьевую воду, фортифицированную селеном 20 мкг на кг массы тела в течении 1 месяца, и после однократно внутрибрюшинно вводили этилкарбамат в дозе 1 г на кг массы тела крысы, предварительно разведенный в 1 мл 0,9% - ого физиологического раствора.

Во всех группах извлекали селезенку и исследовали ее с помощью следующих методов: общегистологический (окрашивание гематоксилином и эозином), иммуногистохимический (использовали МКАТ И ПКАТ), просвечивающая электронная микроскопия, компьютерная морфометрия с помощью программы «Микроанализ», вычисление морфологических индексов. Все полученные данные обрабатывались с помощью программ Microsoft Excel 2010 и STATISTICA 10.

## **Положения, выносимые на защиту**

1. Однократная внутрибрюшинная инъекция этилкарбамата приводит к изменениям в морфологии селезенки с наиболее выраженной трансформацией через 6 месяцев: отсутствие лимфоидных узелков, уменьшение толщины периаартериолярной муфты, увеличение липидных включений в лимфоцитах, уменьшение количества Т-клеток (*CD2*, *CD3*), В-клеток (*CD21*), макрофагов (*CD68*) и клеток мезенхимального происхождения (*Vimentin*) в органе.

2. Введение этилкарбамата на фоне предварительного поступления селена не вызывает столь значимых изменений в селезенке: сохраняется

структура лимфоидных узелков, количество Т-клеток (*CD2*, *CD3*), что подтверждает защитные и адаптивные свойства селена.

### **Степень достоверности и апробация результатов научных исследований**

Достоверность результатов эксперимента обоснована формулированием задач и применением комплекса актуальных методов исследования, способствующих достижению цели исследования, формированием необходимого количества интактной и опытных групп животных, использованием комплекса статистических методов, дающих возможность оценить значимость выявленных изменений, сравнительным анализом полученных данных.

Результаты диссертационной работы представлены на Международной научно-практической конференции, посвященной 55-летию Чувашского государственного университета имени И.Н. Ульянова «Медицинская наука и практика: междисциплинарный диалог» (Чебоксары, 2022); на XXIV Международной научно-практической конференции «Фундаментальная и прикладная наука: состояние и тенденции развития» (Петрозаводск, 2022); на Всероссийской научно-практической конференции с международным участием «Морфологические школы сегодня» (Воронеж, 2022); на XXIX международной научно-практической конференции (Бангалор, 2022); на Всероссийской научно-практической конференции с международным участием, посвященная 100-летию со дня рождения доктора медицинских наук, профессора Д.С. Гордон (Чебоксары, 2022), на Всероссийском морфологическом форуме с международным участием «Сталинградская сирень» (Волгоград, 2023), на международном медицинском форуме «Медицинская наука без границ» (Ставрополь, 2024), на IX Международной научной конференции «Донецкие чтения 2024: образование, наука, инновации, культура и вызовы современности» (Донецк, 2024), на IX международной морфологической научно-практической конкурс-конференции студентов и молодых ученых «Морфологические науки —

фундаментальная основа медицины» (Новосибирск, 2024), на 78-й межвузовской (XIII Всероссийской) итоговой научно-практической конференции студентов и молодых ученых с международным участием (Челябинск, 2024), на Международной научно-практической конференции, приуроченной 95-летию профессора П.И. Лобко «Достижения современной морфологии» (Минск, 2024), на Всероссийской научной конференции «Достижение отечественной морфологии» (Сибирский морфологический форум-2025), посвященный 50-летию кафедры морфологии и общей патологии ФГБОУ ВО СибГМУ Минздрава России (Томск, 2025), на Всероссийском научном форуме с международным участием «Медицина будущего – 2025». (Тюмень, 2025), на IX Всероссийском съезде анатомов, гистологов и эмбриологов России с международным участием фундаментальная и прикладная морфология в XXI веке (Оренбург, 2025), на Международной научно-практической конференции «Клиническая фармакология: интеграция науки и практики» (Чебоксары, 2025).

#### **Соответствие диссертации паспорту научной специальности**

Диссертационная работа на тему «Морфологическая и иммуногистохимическая характеристика лимфоидных структур селезенки крыс при введении этилкарбамата на фоне приема селена» на соискание ученой степени кандидата медицинских наук соответствует шифру специальности 1.5.2. Клеточная биология (медицинские науки). Область исследования диссертационной работы соответствует: пункту 2. Клеточные компартменты и органеллы, их пространственная и структурно-функциональная организация. Цитоплазма, ядро, митохондрии, эндоплазматический ретикулум, комплекс Гольджи, эндосомы, лизосомы и лизосомоподобные органеллы, пероксисомы, хлоропласты и другие пластиды, плазматическая мембрана, клеточная оболочка. Рибосомы. Протеасомы. Немембранные органеллы и структуры, формируемые внутренне неупорядоченными белками и РНК; пункту 13. Изучение молекулярных, иммунологических, цитохимических и физиологических аспектов

жизненного цикла клеток при экспериментальных (в том числе повреждающих) воздействиях. Изучение пролиферации клеток, старения и клеточной гибели; пункту 14. Исследование адаптации клеток и тканей к действию различных факторов внешней среды.

### **Личный вклад**

Автор принимал непосредственное участие на всех этапах диссертационного исследования – от формулировки цели и постановки задач до разработки дизайна эксперимента и научных положений. Диссертантом самостоятельно обоснованы положения, выносимые на защиту, научная новизна, определены направления теоретического и практического применения, сформулированы заключение и выводы.

Диссертант самостоятельно распределил экспериментальных животных по группам, проводил и контролировал введение исследуемых веществ (этилкарбамат, селен), выполнял забор и фиксацию материала, изготавливал гистологические препараты, постановку иммуногистохимических реакций к маркерам CD2, CD3, CD21, CD68, Ki-67, p53, Vimentin, морфометрический анализ и статистическую обработку и интерпретацию полученных результатов. Текст диссертации и иллюстративный материал подготовлены автором самостоятельно. Диссертант совместно с соавторами подготовил и представил к публикации научные статьи, отражающие основные результаты выполненного исследования.

### **Публикации по теме диссертации**

По результатам исследования опубликована 21 работа (17 статей, 4 тезиса), из них 5 соответствуют научной специальности 1.5.22 Клеточная биология (медицинские науки), индексируемые в Перечень ВАК при Минобрнауки России, в которых должны быть опубликованы основные научные результаты диссертаций на соискание ученой степени кандидата наук.

### **Структура и объем диссертации**

Структура диссертационного исследования соответствует целям и задачам работы, определяется его этапами и состоит из введения, обзора литературы, материалов и методов исследования, результатов собственных исследований, заключения, выводов, списка сокращений и условных обозначений и списка литературы. Библиографический список содержит 334 источника, из них 90 – отечественных и 224 – зарубежных авторов. Общий объем диссертации составляет 190 страниц, включает 15 таблиц, 38 рисунков.

### **Внедрение результатов исследования**

Практическая значимость выполненного диссертационного исследования подтверждается его внедрением в учебный процесс при преподавании дисциплины «Гистология, цитология, эмбриология» в ФГБОУ ВО «Марийский государственный университет» студентам по направлению специальности 31.05.01 Лечебное дело и 31.05.02 Педиатрия. Полученные результаты используются и внедрены в клиническую практику патологоанатомического отделения БУ «Республиканский онкологический диспансер» МЗ ЧР.

## ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

### 1.1. Современные представления о морфофункциональной гистоструктуре селезенки

В настоящее время хорошо известно, что органы иммунной системы играют важную роль в обеспечении адаптивного иммунитета, поддерживая как клеточный, так и гуморальный гомеостаз организма. Изучение структурно-функциональных характеристик селезенки является особенно важной задачей, так как иммунная система этого органа, согласно Т. П. Макалиш, А. Auerbach и др. ученых, обладает более сложной и исключительной организацией по сравнению с другими органами этой системы [38, 39, 54, 99, 106, 198]. Характерной чертой данного органа является его многофункциональность и высокая специализированность каждой области, поскольку в них происходит уникальная координация лимфоидных клеток со стромальными элементами. Эти механизмы формируют специфическую микросреду каждой зоны, способствуя развитию эффективного и полноценного иммунного ответа [26, 189, 297, 298]. Изучение гистопатологии селезенки имеет особую значимость, поскольку позволяет понять реакцию органа на различные химические вещества [9, 14, 41, 43, 48, 51, 78, 133, 135, 301], бактериологические агенты, стресс и другие факторы [30, 36, 175, 195, 201, 243, 278, 327]. Наиболее часто исследуются функции селезенки в процессе перестройки иммунных клеток [82, 86], ее связь с центральной нервной системой [112, 319, 332], а также роль в противоопухолевом иммунном ответе [41, 291] и других воздействиях [162].

Согласно определению, данному В. S. Steiniger и другими учеными, селезенка (spleen, lien) представляет собой крупный орган вторичной иммунной системы, расположенный в брюшной полости [61, 162, 180, 293] и,

в первую очередь, занята иммунным «наблюдением» за кровью, также является важным органом для рециркуляции лимфоцитов и эритроцитов [198]. Селезенка присутствует у большинства позвоночных, но наиболее тщательно исследована у мышей, крыс и человека [244, 286].

Т. L. Papenfuss, M. F. Cesta [246] в своей работе показывают, что на момент рождения гистогенез селезенки животных неполноценен и несовершенен. Выявляются в незначительном количестве лимфоидные узелки без центра размножения, а лимфоидные узелки с центром размножения вовсе не определяются [296]. В исследовании G. F. Makhmudova [208] отмечается неравномерное распределение лимфоидных узелков в разных частях органа. Они более многочисленны в периферической части селезенки и менее представлены в центральной части, где в изобилии имеются периартериоллярные лимфоидные муфты. Также упоминается, что центры размножения у лимфоидных узелков селезенки человека начинают формироваться ближе к завершению первого года после рождения. Затем их количество увеличивается и достигает своего максимума в возрасте 10 лет [208].

Известно, что селезенка у позвоночных полностью покрыта капсулой, толщина которой варьирует по всей поверхности органа. Например, в области ворот она утолщена [43, 266, 296]. Капсула включает в себя три разновидности волокон: коллагеновые, эластические и ретикулярные, причем последние преимущественно локализуются ближе к внутренней части структуры. Между волокон присутствует немногочисленные гладкомышечные клетки. От капсулы вглубь селезенки отходят трабекулы, которые анастомозируют между собой. В трабекулах по сравнению с капсулой отмечается более высокая насыщенность эластическими волокнами при относительно меньшем содержании гладкомышечных клеток [6, 43].

Согласно литературным данным, представленными Т. М. Досаевым с др. соавторами [18, 19], а также Birte S. S. [106], у мышей, крыс и человека

селезенка обладает уникальной организацией микроциркуляторного русла – открытая и закрытая циркуляция. Особенности представлены в таблице 1.

Таблица 1. Особенности микроциркуляторной организации селезенки человека, крыс и мышей

Структурный параметр	Особенности в селезенке	Отличие от других паренхиматозных органов
Топография артерий и вен среднего калибра	Селезеночные артерии и вены среднего калибра располагаются отдельно, не образуя типичного параллельного хода; артериальная и венозная системы топографически разведены.	В большинстве паренхиматозных органов (печень, почка и др.) артерии и вены среднего калибра, как правило, следуют параллельно в составе сосудисто-соединительнотканых пучков.
Тип микроциркуляции красной пульпы	Капилляры КП формируют преимущественно открытый тип микроциркуляции: часть капилляров заканчиваются открытыми концами в строме селезеночных тяжей.	Для других органов характерен закрытый тип микроциркуляции («артериола → капилляр → венула») без выхода крови за пределы сосудистого русла при норме.
Связь капилляров красной пульпы с венозными синусами	Прослеживается отсутствием прямых переходов «капилляр → венозный синус»; капилляры не впадают непосредственно в синусы, а оканчиваются в стромальных пространствах селезеночных тяжей.	В классической закрытой микроциркуляции капилляры непосредственно переходят в посткапиллярные венулы и вены.
Венозные синусы	Имеют щелевидные межклеточные пространства, обеспечивающие реабсорбцию крови и клеток.	В других органах венозное звено представлено обычными венулами и венами без щелевидных фильтрационных промежутков.

Путь движения клеток крови	Кровь выходит из открытых капилляров в селезеночные тяжи, контактирует с макрофагами и стромой, затем через щели эндотелия синусов вновь попадает в венозное русло. Клетки не преодолевают сплошной эндотелиальный барьер.	В большинстве органов клетки крови циркулируют только внутри просвета сосудов и контактируют с эндотелием через непрерывный клеточный слой.
----------------------------	--	---

Селезеночная артерия входит в ворота селезенки и ее ветви проникают в различные компартменты органа: в трабекулах они становятся трабекулярными артериями; в пульпе – пульпарными артериями [117].

В пульпе адвентиция артерии замещена оболочкой, состоящей из лимфоидной ткани, в результате чего формируется центральная артерия. Эта центральная артерия окружена муфтой, состоящей из лимфоидной ткани. От сосуда под прямым углом отходят мелкие разветвления, направляющиеся в окружающее лимфоидное образование. В результате такого строения циркулирующие лимфоциты, проходящие через селезенку, попадают в белую пульпу по пути открытого кровоснабжения, при этом они преимущественно накапливаются вблизи наружной поверхности артерии среднего и мелкого калибра, формируя характерные лимфоидные скопления вокруг центральной артериолы [198].

Далее, по мере прохождения в пульпе, ветви центральной артериолы переходят в кисточковые артериолы, которые, в свою очередь, переходят в кисточковые капилляры, открывающиеся в венозный синус или гемокапилляр венозного типа. От синусов отходят пульпарные венулы и трабекулярные вены, формирующие селезеночную вену. Селезеночная вена выходит из ворот селезенки, попадая в воротную вену [198, 295].

Синусы селезенки также имеют уникальную гистологическую организацию. В зависимости от кровенаполнения они могут увеличиваться в размерах. Внутри синусов содержатся не только форменные элементы, но и плазма, что отражает их роль в гомеостазе кровеносной системы селезенки [6,

295]. В области, где синусы переходят в венозные сосуды, расположены гладкомышечные сфинктеры. В расслабленном состоянии сосудистых сфинктеров кровотоков между артериальной и венозной системами осуществляется беспрепятственно: кровь из синусоидальных пространств напрямую переходит в венозные сосуды. Напротив, при сокращении сфинктеров происходит их замыкание, что вызывает задержку кровотока внутри синусов. В результате кровь накапливается, формируя депо, служащее источником для последующего поступления крови в венозное русло при изменении гемодинамических условий. Расслабление и открытие сфинктера способствует опорожнению синусов и продвижению крови в венозные сосуды, что важно для поддержания нормального венозного оттока и контроля за объемом циркулирующей крови. Эта морфофункциональная особенность синусов селезенки играет важную роль в перемещении плазмы и форменных элементов крови между белой и красной пульпой, что способствует эффективной фильтрации крови [6, 295].

Эндотелиальные клетки синуса селезенки имеют отличительные ультраструктурные характеристики, включая форму и расположение. Они имеют вытянутую палочковидную форму, располагаются продольными рядами и с аблюминальной стороны охвачены кольцевидными петлями базальной мембраны («кольцевыми волокнами»), тогда как в их базальной части формируются продольно ориентированные актиновые стресс-фибриллы [306]. В исследовании К. Uehara 2021 г. [305] показано, что в синусоидных эндотелиоцитах имеется PAR1-PAR4 и родственные рецепторы, а на плазмолемме выявляется большое количество клатрин-покрытых выпячиваний и везикул. При этом у основания клеток хорошо выражены актиновые фибриллы, тогда как в зоне межклеточных контактов их относительно немного. Совокупность данных позволяет рассматривать PAR-опосредованные сигнальные пути и описанную архитектуру цитоскелета как ключевые механизмы поддержания барьерной функции и прочной фиксации эндотелия к кольцевым волокнам при сохранении стенки синуса [305]. Также

основным промежуточным филаментным белком синусоидных эндотелиоцитов является виментин, который образует в их базальной части плотную сеть, интегрированную через плектин с актиновыми структурами и фокальными адгезиями и рассматривается как центральный структурный модуль, участвующий в регуляции размеров и стабильности фокальных контактов и клеточно-матричной адгезии [306].

Паренхима селезенки представляет комплексную тканевую организацию, включающую две основные структуры: красную и белую пульпу. Между этими двумя областями находится маргинальная зона (MrЗ), у человека имеется дополнительная перифолликулярная зона [64, 198, 251, 256]. MrЗ, кроме лимфоцитов, содержит специфическую популяцию макрофагов. Архитектура селезенки у разных видов животных одинакова, однако MrЗ крысы более заметна [296].

Белая пульпа (БП) функционирует как основная иммунологическая область селезенки. Тем не менее, БП составляет менее четверти всей паренхимы селезенки [246]. В то время как КП занимает большую ее часть и выполняет иммунную функцию, отличную от БП. В отличие от лимфатических узлов, селезенка не имеет афферентных лимфатических сосудов, что подразумевает, что все клетки и антигены попадают в селезенку через кровь [14, 246].

КП представлена разветвленной системой сосудистых структур, включающей артериальные капилляры, синусоиды и пульпарные вены, погруженные в ретикулярную строму, которая формирует так называемые тяжи Бильрота [298]. В тяжах имеется различное количество белков сложного строения – фибронектин, ламинин, коллаген III и IV типов [298]. В таблице 2 представлены обобщенные морфологические и функциональные характеристики ретикулярных клеток и ретикулярных волокон селезенки [101, 117, 132].

Фибробласты селезенки человека отличаются от фибробластов в не лимфатических органах тем, что проявляют активированный фенотип и

экспрессируют, среди других внутриклеточных или мембранных антигенов, SMA (smooth muscle  $\alpha$ -actin), CD271 и цитокератин 8/18 [295, 297]. Таким образом, стромальные клетки селезенки представляют собой не пассивный каркас, а функционально активную сеть клеток с миофибробластоподобными свойствами.

Таблица 2. Ультраструктурные характеристики и функциональная роль ретикулярных волокон селезенки [101, 117, 132]

Структурой компонент	Ультраструктурные характеристики	Функциональные особенности
Ретикулярные клетки стромы селезенки	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Формируют трехмерную сеть, тесно связанную с ретикулярными волокнами;</li> <li>• Окружены многочисленными отростками, которые образуют влагалище-подобные структуры вокруг ретикулярных волокон;</li> <li>• Обладают морфологическими признаками миофибробластов;</li> <li>• Включают элементы базальной мембраны, контактируют с нервными волокнами.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Обеспечивают структурную поддержку КП;</li> <li>• Участвуют в механической регуляции объема селезенки за счет миофибробластного фенотипа;</li> <li>• Поддерживают архитектуру сосудистоклеточных пространств;</li> <li>• Служат опорой для миграции иммунных клеток;</li> </ul>
Ретикулярные волокна	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Состоят из коллагеновых и эластических фибрилл;</li> <li>• В их состав входят миофибриллы, элементы базальных пластинок ретикулярных клеток;</li> <li>• Ассоциированы с немиелинизированными адренергическими нервными волокнами;</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Формируют опорно-механический каркас КП;</li> <li>• Обеспечивают устойчивость сосудистых и клеточных пространств;</li> <li>• Участвуют в нейрогуморальной регуляции кровотока и тонуса органа через адренергические влияния;</li> </ul>

	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Полностью окружены отростками ретикулярных клеток.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Создают структурную основу фильтрационной функции.</li> </ul>
Межтканевые пространства КП	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Расположены между тяжами ретикулярных волокон</li> <li>• Содержат клетки крови: эритроциты, гранулоциты, циркулирующие мононуклеары;</li> <li>• Присутствуют макрофаги, включая гемосидерофаги;</li> <li>• Связаны с открытой циркуляцией.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Выполняют ключевую роль в фильтрации крови, удалении старых поврежденных клеток;</li> <li>• Обеспечивают фагоцитарную активность макрофагов и иммунный надзор;</li> <li>• Являются центральным звеном гемоциркуляции в КП.</li> </ul>

Скопление ретикулярных клеток совместно со стромальными клетками образуют так называемые каналы для миграции Т- и В- клеток. Согласно современным представлениям, клетки и инертные частицы из артериол селезенки первоначально выводятся из кровотока в КП и МрЗ преимущественно пассивно, под действием гемодинамических сил. Чтобы функционально охарактеризовать последующее миграционное поведение Т-лимфоцитов А. Chauveau et al. [119] в 2020 году блокировали интегринопосредованную адгезию, используя моноклональные антитела к LFA-1 и VLA-4. Авторы показали, что Т-клетки не хаотически рассеиваются в КП, а преимущественно входят в Т-зону по специализированным периваскулярным стромально-васкулярным путям. После выхода из артериол в КП Т-клетки, экспрессирующие CCR7, захватываются периваскулярной стромой вокруг терминальных артериол и перемещаются к Т-зоне [119, 186]. Кроме этого, стромальные клетки экспрессируют CCL19 (C-C motif chemokine ligand 19) и CCL21 (C-C motif chemokine ligand 21), которые хемотаксически направляют миграцию Т-клеток в Т-зону. По данным С. Н. Kim и Q. Liu (2020), эффекторные Т-клетки после активации снижают экспрессию CCR7 и повышают экспрессию CXCR3 (C-X-C motif chemokine receptor 3), что

способствует их накоплению в МрЗ и, предположительно, дренированию через венозные синусоиды КП в селезеночную вену [186]. Кроме этого, считается, что градиенты CXCL12 (chemokine C-X-C motif ligand 12) участвуют в перераспределении плазматических клеток из БП в КП, где они локализуются и секретируют антитела в системный кровоток [186]. CD8<sup>+</sup> Т-клетки мигрируют в КП для очистки от бактерий [181].

Венозные синусы расположены по всей площади КП, непосредственно прилегают к краевой (маргинальной) зоне. Они выстилаются сетью эндотелиальных клеток, которые находятся на базальной мембране между ретикулярными волокнами КП [117]. Фенотип эндотелия венозного синуса является специфическим. На стенке экспрессируют CD8 $\alpha$  [148, 297], рецептор макрофагов маннозы CD206 [215], CD141 [293], TIE-2 (CD202b), VEGFR-3 (vascular endothelial growth factor receptor 3) и LYVE-1 (lymphatic vessel endothelial hyaluronan receptor 1) [215].

Стенка капилляров КП состоит из трех частично перекрывающихся слоев клеток, окружающих эндотелиальные клетки с перицитами [294]. Во внутренний слой входят специализированные стромальные клетки, экспрессирующие рецептор CD271 с высокой интенсивностью. Эти элементы окружаются макрофагами, демонстрирующий иммунный профиль CD68-положительных при отсутствии экспрессии CD163, что морфологически и фенотипически сходно с популяцией макрофагов, ассоциированных с В-клеточными фолликулами [5, 294]. Наружный слой содержит разное по количеству скопления В-лимфоцитов. По данным иммуногистологического исследования эти В-лимфоциты, по-видимому, не отличаются по фенотипу от мигрирующих В-клеток в мантийной и МрЗ [26].

Согласно анализу данных литературы, КП селезенки извлекает из кровотока старые, мертвые или опсонизированные клетки, одновременно исследуя их на наличие патогенов и повреждений [246]. Кровь доставляется в МрЗ по терминальным артериолам, которые высвобождают свое содержимое в «открытую» систему крови без традиционного эндотелиального барьера. КП

отфильтровывает состарившиеся эритроциты (Red blood cells – RBCs), которые должны пройти извилистые венозные синусоиды, чтобы снова попасть в кровоток. Выдержанные, инфицированные или дисфункциональные RBCs, которые не могут адекватно деформироваться, потеряли сигнал «не ешьте меня», CD47 или опсонизированные антителами, или комплементом, удаляются из кровообращения макрофагами КП, а железо, содержащееся в RBCs, рекультивируется для системного использования для дальнейшего воспроизведения новых эритроцитов. После просачивания крови через тяжи КП она повторно собирается в пазухах, чтобы сформировать венозную синусоидальную систему, и, в конечном итоге, попадает в эфферентную вену для возвращения в систему кровообращения [148, 177, 198].

Хотя адаптивные иммунные реакции на системные антигены инициируются в БП, иммунная эффекторная функция часто происходит в КП. Многие лейкоциты с врожденными функциями находятся в КП, включая нейтрофилы, моноциты, дендритные клетки (ДК), гамма-дельта ( $\gamma\delta$ ) Т-клетки и макрофаги [131, 237]. Эти миелоидные популяции могут динамически меняться как по местоположению, так и по числу во время воспалительного ответа, чтобы быстро реагировать на формирование адаптивного иммунного ответа [198, 215, 218].

Экстрамедуллярный гематопоз и хранение клеточных резервов (моноциты, тромбоциты, RBCs и т. д.) являются другими важными функциями КП селезенки [198, 266].

Терминология областей БП селезенки была впервые введена для крыс ученым Snook [286], хотя сами области были описаны гораздо раньше [106]. Именно эта часть паренхимы выполняет функции вторичного лимфоидного органа. Из данных литературы известно, что БП — это скопление высокоорганизованных Т- и В – лимфоцитов вокруг артериол, которые образуют периартериолярную муфту (ПМ) [4, 14, 16, 22], лимфоидный узелок (ЛУ) с МрЗ и мантийной зоной (МнЗ) [23, 24, 29, 35, 64, 68], и герминативный центр (ГЦ) [76, 117, 119, 186, 297]. Кроме лимфоцитов в БП имеются

макрофаги, дендритные клетки, плазматические клетки, артериолы и капилляры в ретикулярной строме, аналогичной той, которая находится в КП [18, 21, 36, 54, 117, 130, 133, 134, 135].

Согласно современным представлениям, ретикулярная соединительная ткань формирует каркас БП, образуя как стромальные элементы, так и сеть ретикулярных волокон, наиболее плотную в области МрЗ и ПМ. Стромальные клетки этих зон синтезируют ключевые компоненты внеклеточного матрикса – фибронектин, ламинин и коллаген III типа, которые, в сочетании с хемокинами CCL21 и CXCL13, обеспечивают направленную миграцию и организацию лимфоцитов в ходе реализации иммунного ответа [101, 103, 135, 218, 238, 311, 320].

Селезеночная артерия, после вхождения в ворота селезенки, распадается на множество ветвей, вокруг которых скапливается большое количество Т-лимфоцитов, образуя ПМ. В ней различают внутренний и внешний слои [5, 67]. Во внутреннем слое, кроме Т-лимфоцитов, присутствуют интердигитирующие дендритные клетки, функция которых заключается в презентации антигена Т-лимфоцитам, и небольшое количество мигрирующих В-лимфоцитов [132]. Внешний слой состоит из малых и средних Т- и В- лимфоцитов, макрофагов и мигрирующих после антигенной стимуляции плазмоцитов [5, 71]. При оценке микроскопической картины этой зоны выделяют темные и светлые лимфоциты, содержащие крупное ядро с выраженным гетерохроматином и эухроматином. Кроме лимфоцитов, в ПМ имеются единичные эритроциты и ретикулярные клетки [9].

При дальнейшем прохождении селезеночной артериолы скапливаются В-лимфоциты, которые образуют ЛУ. Структура и функция ЛУ находятся в прямой зависимости от стадий развития центров размножения, то есть при их появлении происходит нарастание числа делящихся В-лимфоцитов, и они начинают активно функционировать [5, 311]. Первичные узелки характеризуются относительно однородной структурой, они образованы

скоплениями малых рециркулирующих В-лимфоцитов среди сети фолликулярных дендритных клеток (Follicular dendritic cells – FDC) [311].

На мембране FDC локализуются иммунные комплексы, взаимодействующие с проходящими через фолликулы В-лимфоцитами. В результате этого контакта инициируется антиген-зависимая активация, приводящая к запуску пролиферации В-клеток. Далее активированные клетки проходят этапы созревания, дифференцировки и отбора. [5, 82]. В пределах первичного ЛУ формируется ГЦ, что свидетельствует о трансформации его во вторичный ЛУ. Последний характеризуется морфологической неоднородностью: он включает светлый центральный ГЦ и окружающие его более темной зоны – мантийную и периартериолярную области. В ГЦ после встречи с антигеном формируются плазматические и В-клетки памяти [5, 82].

Субпопуляция Т-лимфоцитов смещается к периферии первичного узелка, образуя с рециркулирующей субпопуляцией антигеннеиндуцированных зрелых В-клеток зону мантии или МнЗ [244]. Центральные артериолы во вторичных ЛУ расположены эксцентрично, и, по сути, являются не артериями, а артериолами [6].

Таким образом, согласно литературным данным [4, 6, 7, 68] БП образована вокруг центральной артериолы, которая сопровождается непрерывной ПМ, состоящей из клеток фибробластического ретикулула (FRCs), дендритных клеток (ДК), макрофагов и большого количества более или менее мигрирующих Т – лимфоцитов (преимущественно Т-хелперы (CD4<sup>+</sup>) и в небольшом количестве Т-киллерами (CD8<sup>+</sup>)) [82, 124, 132, 244, 311]. У крыс полусферические ЛУ прикрепляются к внешней части ПМ через регулярные, но относительно большие интервалы [67, 69, 80, 82, 106]. Он поддерживается FDC и также поддерживает ГЦ, окруженной МнЗ, состоящей из небольших рециркулирующих В-клеток. Из исследований известно, что CCR7 и его лиганды CCL19 и CCL21 имеют важную роль в количестве и местоположении Т-клеток, при потере CCR7 возникает рассеивание Т-клеток по всей паренхиме селезенки. ПМ и ЛУ встроены в широкую МрЗ, в основном

населенную В-лимфоцитами с относительно бледными ядрами и обильной цитоплазмой, которые морфологически отличаются от В-лимфоцитов небольшой МнЗ [117].

Внешняя граница МрЗ по направлению к КП несколько нечеткая, в то время как внутренняя граница МрЗ по направлению к ПМ и фолликулу образует точную линию, которая состоит из заполненной кровью расщелины краевого синуса [296].

В структуре селезенки выделяют две специализированные популяции макрофагов, тесно ассоциированные с МрЗ. К первой группе относят маргинальные металлофильные макрофаги (МММs), локализующиеся в области между маргинальными синусами и ПМ, либо фолликулярными структурами. Вторая популяция представлена макрофагами маргинальной зоны (МЗМs), которые характеризуются более равномерным распределением по всей МрЗ [130, 151, 191, 198, 250, 296].

Вероятно, что МММ каким-то образом ограничивают доступ высокомолекулярных веществ к ПМ и фолликулам [238]. МММs и МЗМs способны эффективно стимулировать поздний иммунный ответ В-лимфоцитов, которые нацелены через специальные рецепторы. Выдающимся антигеном МММs и некоторых МЗМs является CD169 [151]. Присутствие CD169 важно для нормального уровня IgM [240] крови и для поглощения микроорганизмов, несущих остатки сиаловой кислоты на их поверхности. CD169 – это макрофагспецифический маркер воспаления и иммунорегуляции [151, 240].

МрЗ частично входит в открытый селезеночный цикл, поскольку он всегда содержит определенное количество случайно распределенных свободных эритроцитов и поэтому может рассматриваться как часть КП [106]. Однако это также зона В-клеток, которая относится к БП [106]. В-лимфоциты МрЗ могут быть смесью функционально различных клеток. У крыс большинство В-клеток МрЗ не имеют гипермутантных иммуноглобулиновых генов [127, 128, 129] и поэтому могут принадлежать к врожденному типу В-

лимфоцитов, предрасположенных к дифференцировке в IgM-секретирующие плазматические клетки. В-клетки Mr3 для крыс были определены как CD21<sup>+</sup>-, CD23<sup>+</sup>-, IgM<sup>+</sup>- и IgD<sup>+</sup>- большие лимфоциты [80, 81, 106, 153]. Например, CD21 способствует интернализации иммунных комплексов В-клетками для усиления презентации антигена. CD21 в сочетании с CD19/CD81 также служит дополнительным активационным комплексом с рецептором антигена В-клеток, позволяя использовать более низкую концентрацию антигена для достижения максимальной активации В-клеток [253]. Кроме этого, улавливает иммунные комплексы на поверхности фолликулярных дендритных клеток и отображает их активированным В-клеткам в зародышевых центрах. Таким образом, CD21 В-лимфоциты участвуют в непосредственном переходе в плазматические клетки и выработке антител [72, 253].

Основной функцией В-клеток Mr3 при отсутствии патогенов в крови является продукция натуральных антител [6, 7, 16, 35, 80, 81]. Преимущественно эти антитела имеют изотип IgM, которые синтезируются независимо от внешних стимулов, у которых специфичность низкая. Наличие таких антител препятствует формированию аутоиммунных процессов. А при встрече с антигеном В-клетки Mr3 активируются и запускают Т-независимую продукцию антител. В результате формируются плазматические клетки, которые секретируют антитела и локализуются в КП селезенки. Данная дифференцировка опосредована повышенным уровнем экспрессии транскрипционного фактора *Blimp-1* в В-клетках Mr3 [242]. Кроме перехода в плазматические клетки и образование антител, данные клетки выделяют большое количество противовоспалительных цитокинов, активирующие врожденный иммунитет. Если липополисахарид активирует В-клетки Mr3, то данный процесс опосредуется преимущественной сигнализацией через Toll-подобные рецепторы (TLR-4). Из этого следует, что активация и дифференцировка В-лимфоцитов Mr3 в плазматические клетки обеспечивает сдерживание антигенов до формирования специфического иммунного ответа и активации врожденного иммунного ответа. Также В-клетки Mr3 при

распознавании белкового антигена с помощью В-клеточного рецептора, мигрируют в Т-зависимую клеточную зону презентовать антиген фолликулярным Т-клеткам через главный комплекс гистосовместимости (МНС) [72, 242].

Функция селезенки заключается в очистке твердых частиц и других антигенов, и микроорганизмов, также от старых и поврежденных эритроцитов. Кроме этого, она участвует в заключительных этапах В - клеточного созревания у мышей, в то время как у человека она является важным резервуаром памяти В-клеток [210], тромбоцитов [163, 190] и моноцитов [310]. Таким образом, у селезенки можно выделить основные функции: фильтрационную или очистительную и иммунную.

Селезенку можно считать периферической тканью сосудистой системы, встроенной с несколькими структурами аналогичным лимфатическим узлам [218], но с двумя важными отличиями от лимфатических узлов. Во-первых, БП у селезенки по сравнению с лимфатическими узлами мыши, крысы и человека не содержит капсулы, отделяющей ее от паренхимы органа, т.е. от КП. Вместо этого имеется клеточная граница, состоящая, в основном, из врожденных иммунных клеток, разграничивающая БП. Несмотря на отсутствие капсулы, антиген размером более 60 кДа не поступает свободно в БП, а переносится по ячейкам из МрЗ [238]. Во-вторых, афферентные лимфатические узлы не участвуют в переносе антигенов и клеток в кровь [13, 238]. Несмотря на большое количество исследований имеется представление о том, что селезенка является дренирующим вторичным лимфоидным органом для брюшины, поэтому антиген, вводимый внутрибрюшинно, фактически попадает в медиастинальные лимфатические узлы [238], хотя, в конечном итоге, часть антигена достигает селезенки. Вместо этого БП селезенки функционирует как вторичный лимфоидный орган системы кровообращения, аналогично тому, как лимфатические узлы выводят и контролируют антигены из тканей. В БП наивные Т-клетки и Т-клетки памяти селезенки активируются в ответ на

реакцию родственного антигена и В-клеточного ГЦ, приводящие к выработке антител [198, 249].

## **1.2. Этилкарбамат – элемент современных технологий и его биологическое действие на организм**

Химически-индуцированный канцерогенез находится в центре внимания токсикологических исследований на протяжении многих десятилетий. Однако механизмы, приводящие к образованию опухолей, понятны только применительно к определенным веществам. Чаще всего потенциальные канцерогены поступают в организм через верхние дыхательные пути. Химически индуцированные опухоли легких являются последним проявлением многоэтапного пути, приводящего к дисбалансу между пролиферацией клеток и их гибелью в результате апоптоза [326].

Длительное воспаление способствует высвобождению цитокинов, которые стимулируют онкогенную сигнализацию в раковых клетках. Это включает активацию ядерного фактора Каппа- $\beta$  (NF)- $\kappa$ B, который способствует выживанию и обеспечивает опухолевый рост [171, 228, 229, 230]. (NF)- $\kappa$ B является основной причиной транскрипции, которая идентифицирована как критическое механическое звено между хроническим воспалением и неопластическим процессом. Более того, он регулирует экспрессию большинства генов, таких как Bsl-2, что способствует выживанию клеток и является одним из важных звеньев в процессе фиброза и онкогенеза в легочной ткани [121].

Помимо влияния на клеточную пролиферацию, воспалительные клетки способны производить реактивные образования кислорода и реактивные промежуточные продукты азота, которые увеличивают скорость мутации клеток, вызывают повреждение ДНК и увеличивают геномную нестабильность; эти молекулы также инактивируют функции восстановления

несоответствия, тем самым поддерживая развитие опухоли. Таким образом, имеется тесная взаимосвязь между воспалением и развитием опухоли [230].

Особое место в развитии воспаления и рака занимают интерлейкины. Одним из ключевых универсальных медиаторов среди них является IL-6, который играет центральную роль в регуляции как воспалительных, так и иммунных реакций. Он участвует в инициации острой фазы воспаления, оказывает влияние на процессы активации и функциональной дифференцировки В- и Т-лимфоцитов, а также способствует поддержанию клеточной пролиферации и выживаемости иммунокомпетентных клеток [121, 227, 326]. Другие члены семьи IL, связанные с раком легких, включают IL-2, IL-4 и IL-10 [121, 229, 230, 326]. IL-2-активированные NK-клетки способны индуцировать регрессию установленных опухолей легких [121, 326].

IL-4 действует как противовоспалительный цитокин, который уменьшает выработку провоспалительных цитокинов моноцитами и оказывает прямое антипролиферативное действие в некоторых опухолях [121, 326]. Однако он также активизирует катепсины в опухолево-ассоциированных макрофагах, что способствует росту и инвазии рака, регулируя эти процессы через сложные сигнальные пути, включая Janus-киназы и фосфоинозитид 3-киназу [121, 326]. Интерлейкин – 10 (IL-10), обладая иммуносупрессивными свойствами, участвует в канцерогенезе [121, 326], он подавляет противоопухолевый иммунный ответ. В то же время, существуют данные, что IL-10 обладает противометастатической и противоопухолевой активностью [255].

Хроническое воспаление является характерным фенотипом опухоли, вызванное этилкарбаматом, которые описали С. Narayan и А. Kumar [230]. Они сообщили, что индуцированные этилкарбаматом опухоли легких у мышей BALB/c могут быть вызваны хроническим воспалением органа.

Этилкарбамат (ЭК) (уретан) представляет собой этиловый эфир карбаминовой кислоты ( $\text{CH}(\text{NH}_2)(\text{OC}_2\text{P}_5)$ ) – кристаллическое вещество с четко выраженной столбчатой морфологией, обладающее слабым

парафиновым запахом и незначительно выраженным селитряным вкусом. Вещество характеризуется высокой термостабильностью в диапазоне температур плавления 50-51<sup>0</sup>С и кипения 180-184<sup>0</sup>С. ЭК демонстрирует выраженную растворимость в воде, спиртах, эфирах, хлороформе и глицерине, а также способен к растворению в биологических средах [257].

ЭК, согласно классификации Международного агентства по изучению рака, отнесен к канцерогенам группы 2А, что указывает на его высокую способность вызывать злокачественные новообразования у человека [114, 116, 168]. Кроме этого, данное соединение признано токсическим загрязнителем атмосферного воздуха. При работе с ЭК необходимо соблюдать меры предосторожности [239, 257].

ЭК является продуктом ферментации, образованным в результате реакции этанола и карбамилфосфата [91]. Он обнаруживается в составе разнообразных алкогольсодержащих напитков, а также в ряде ферментированных пищевых продуктов, таких как сыр, хлеб, йогурт и соевый соус [91, 152, 168, 199, 269]. ЭК рассматривался как один из наиболее вероятных канцерогенных веществ, потенциальное воздействие которого может способствовать увеличению риска развития онкологических заболеваний у отдельных групп лиц, систематически употребляющих алкоголь [194].

Средняя концентрация ЭК в спиртных напитках находится в диапазоне от 4 до 122 мкг/кг (или от 0,1 до 1400 мкг/л), а в продуктах питания наблюдается более низкая его концентрация от 0,2 до 16 мкг/кг [91, 136, 152]. После термической обработки содержание ЭК увеличивается [231, 232]. Он также используется в химической промышленности в качестве растворителя для различных органических материалов; в качестве промежуточного продукта в производстве органических химических веществ; при подготовке аминокислотных смол; в качестве растворителя при производстве пестицидов и фумигантов; в качестве промежуточного продукта в производстве фармацевтических препаратов, сшивающих агентов в текстиле и в качестве

реагента в лабораториях биохимических исследований [257, 263, 288]; также в качестве химического промежуточного продукта в текстильной промышленности для придания тканям прочных свойств при стирке и износе; в качестве совместного растворителя с лекарственными препаратами [231], стоматологических материалов, например, входящих в состав полимерного композита [214].

ЭК может попадать в окружающую среду с различными потоками отходов, но исключительно в виде паров. Разлагается в паровой фазе в атмосфере в результате фотохимической реакции с образующимися гидроксильными радикалами с расчетным периодом полураспада 2-3 дня [288].

После проникновения в организм грызунов метаболизм ЭК осуществляется таким образом, что приблизительно 90% соединения подвергается гидролизу с образованием этанола, аммиака и углекислого газа, проходя дальнейшее превращение под действием микросомальных ферментов печени – карбоксилэстераз. Около 5% вещества выводится через мочевыделительную систему в неизменном состоянии [231, 232, 288].

ЭК преобразуется ферментом семейства цитохрома P450 и CYP2E1 в эпоксид винилкарбамат, который обладает канцерогенным действием. Образовавшееся соединение ковалентно взаимодействует с молекулами ДНК, нарушая корректное выстраивание оснований в процессе репликации, что приводит к возникновению точечных мутаций [143, 153]. Данный метаболит, образующийся в результате окисления ЭК, выводится из организма путем конъюгации с глутатионом, реакции, которая может происходить спонтанно или катализироваться с помощью глутатион-S-трансфераз [152].

ЭК напрямую вызывает митохондриальную дисфункцию, тем самым приводя к интерстициальной инфильтрации воспалительных клеток, вызванной избыточной продукцией активных форм кислорода, которая играет важную роль в развитии рака легких. Также снижается экспрессия

коннексинов 32 и 43, которые нарушают тканевой гомеостаз и инициируют канцерогенез легких [122, 152].

В клинической практике ранее ЭК использовался как ингаляционное анестезирующее средство при оперативных вмешательствах. При введении в малых дозах он способен тормозить проведение нервных импульсов в центральной нервной системе, вызывая снижение сенсорного восприятия и ослабления волевой активности, при этом практически не сопровождалось выраженными побочными эффектами. При более высоких концентрациях наблюдается угнетение произвольной моторики, потеря чувствительности и развитие состояния утраты сознания. Важно отметить, что даже при глубокой анестезии с использованием ЭК функции дыхательного центра сохраняются: дыхание не подавляется, сердечная деятельность остается стабильной, артериальное давление удерживается на физиологическом уровне, однако может фиксироваться учащение пульса [42, 75, 245]. Однако стабильность сердечно-сосудистой системы частично обусловлена устойчивой активностью симпатической нервной системы, связанной с высокими уровнями циркулирующего адреналина и норадреналина (норэпинефрина) [116, 142]. На основании вышеуказанных свойств ЭК рассматривался в качестве предпочтительного средства для индукции сна по сравнению с хлоралгидратом, благодаря его минимальному влиянию на сердечно-сосудистую и дыхательные системы. Механизм его действия обусловлен выборочным подавлением активности корковых структур головного мозга при сохранении функциональной активности подкорковых и стволовых отделов. Это обеспечивает седативный эффект без угнетения жизненно важных центров, таких как дыхательный и сосудодвигательный. Он в значительной мере подавляет глутаматергическую передачу в процессе возбудимости головного мозга [281].

Также в 1947 году N. Alwall [97] описал исчезновение протеинурии и уменьшение числа плазматических клеток в костном мозге с 33% до нормы у больного множественной миеломой, получавшего ЭК [97]. Но

рандомизированные исследования выявили, что лечение ЭК не привело к достоверному увеличению продолжительности жизни больных, а даже, наоборот, ухудшало прогноз. Было продемонстрировано, что у ЭК отсутствует противоопухолевая активность [56, 97]. Поэтому в дальнейшем его не применяли в качестве основной терапии множественной миеломы.

Было выявлено, что он обладает иммуносупрессивным действием. Это доказывается множеством исследований. В них говорится, что ЭК подавляет количество НК-клеток, которые участвуют в противоопухолевом иммунном ответе и в распространении метастазов в другие органы [114, 318]. Возникает агранулоцитоз, апластическая анемия [140], нарушается восприимчивость к поражению опухолевыми клетками гуморального и клеточного иммунитета, а также угнетаются функции макрофагов [173]. Примечательно, что ЭК в присутствии гормонов эстрогена и рентгеновских лучей способен вызывать лейкемию [49]. В работе И. М. Тарасовой [70], опубликованной в 1985 году указано, что исследованы физико-химические показатели лимфоцитов при попадании ЭК в организм животных. Показано, что лимфоциты изменяют физико-химические свойства именно с развитием опухолевого процесса в дыхательной системе, а не за счет непосредственного действия ЭК на них. Но в работе F. C. P. Rosin et al. [264] указано, что после инъекции ЭК возникает гиперплазия ткани легкого с развитием узелков. На фоне изменений в паренхиме легкого происходит очень раннее увеличение как эффекторных (клеток, продуцирующих IFN- $\gamma$ ), так и супрессорных/регуляторных (клеток CD11b<sup>+</sup>Gr-1<sup>+</sup>/CD4<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup>) фенотипов в селезенке, что говорит о раннем подавлении иммунитета [264].

Одним из первых, кто исследовал онкогенное действие ЭК в экспериментальной модели был Л. М. Шабат [11]. По данным его исследования ЭК с очень высокой достоверностью на различных сроках воздействия вызывал опухолевидное образование в легком. Так, через 3 месяца после воздействия микроскопическая картина легкого характеризовалась прогрессированием патоморфологических изменений в

ткани. А именно, новообразования состояли из однородных, тесно прилегающих друг к другу клеток со светлой протоплазмой, округлым ядром и ячеистым строением. Клетки имели цилиндрическую форму и образовывали железистые ходы. Такая картина характерна для аденомы [11, 255].

Также на ранних этапах воздействия возникает перестройка нормальной легочной ткани, появляется диффузная пролиферация эпителия, а далее очаговое разрастание клеток, доказанное в работах Г. М. Веснушкина, N. Guo et al. [11, 156, 216].

Однако, при длительной экспозиции возможна малигнизация образовавшихся аденом, которые трансформируются в злокачественную опухоль, т.е. аденома является истинным предраковым состоянием.

Индукция опухоли легочной ткани у мышей с использованием ЭК рассматривалась как значимая экспериментальная модель для изучения патогенеза рака легкого, ассоциированного с активацией онкогена Kras [157, 199, 200, 209, 288]. У грызунов может развиваться аденокарцинома легкого с гистологическими и генетическими характеристиками, которые повторяют аденокарциному человека [288]. Аденокарцинома, индуцированная ЭК, стала общепринятой моделью для изучения ее у человека [230]. Тем не менее, инбредные штаммы грызунов демонстрируют переменную восприимчивость к новообразованию опухолей легких. Данную модель описывают и применяют в различных научных исследованиях [114, 120, 122, 143, 157, 169, 171, 222, 230, 290].

Особо выражено его действие в легких, но данные литературы указывают, что ЭК вызывает перестройку ткани в сторону неоплазии в таких органах как печень, молочная железа, сердце, яичник, передняя часть живота [176].

У беременных мышей, подвергшихся воздействию ЭК, наблюдалась пониженная регуляция различных генов, ответственных за клеточный цикл, таких как TGF $\beta$ 3, GM-CSF и факторов роста, таких как IGF-I, IGF-II и IL-2, кодирующих гены. Это указывает на то, что воздействие ЭК во время

беременности может привести к врожденным дефектам [277]. Кроме этого, введение ЭК на поздних сроках беременности приводит к определенным изменениям, влияющим на развитие плода. Результаты этого исследования свидетельствуют о том, что у плода в легких отмечаются «зародышевые» гиперпластические узелки, которые могут привести к развитию опухолевого процесса [56, с. 149].

Таким образом, ЭК обладает множественными механизмами действий и влияний на организм. Применяется он как в промышленности, так и в медицине. У данного канцерогена имеются различные механизмы развития неопластического процесса в легких. Нами была выбрана именно эта модель канцерогенеза, поскольку имеются высокодостоверные исследования и полученные данные о формировании опухолевого процесса при использовании ЭК.

### **1.3. Роль селена в поддержании гомеостаза организма**

#### **1.3.1. Общие сведения о микроэлементе селене и его уникальная роль во множестве функций**

Изменение концентрации микроэлементов в сыворотке крови (значительное снижение уровня Zn, Cr, Ti, V, а также Se и повышение уровня Pb и Sn) способствует развитию паранеопластических процессов и хронических воспалительных состояний. Существует предположение, что хроническое воспаление является предраковым состоянием. Изменения в микроэлементном балансе могут рассматриваться как универсальный фактор канцерогенеза. Сами опухолевые трансформации тканей представляют собой адаптивную реакцию клеток на хронический дефицит микроэлементов. В комбинации с локальными постоянными нарушениями структуры ткани и гипоксией, характерными для хронического воспаления, длительный дефицит нутриентов в питательных веществах создает благоприятные условия для выживания и роста клеток с упрощенным ферментативным и энергетическим

обменом, ориентированным на более примитивные типы, то есть клетки, склонные к опухолевому перерождению [40, 179, 307, 309, 329].

Очень важно, что в условиях хронического дефицита микроэлементов (Se, Zn, V, Cr, Ni и т.д.) нормальные высокодифференцированные клетки (и в частности, клетки иммунной системы) будут весьма ослаблены и не смогут выполнять свою функцию. Указывается, что восстановление микроэлементного баланса, даже на 4 стадии опухолевой болезни, во многих случаях позволит получить подлинную клиническую картину регрессии опухолевого процесса вплоть до ремиссии [40, 50, 170, 184]. Одним из таких микроэлементов является селен и его различные формы.

Селен, известный как Se и занимающий 34-е место в периодической таблице, был впервые обнаружен Й. Я. Берцелиусом [226]. В природе данный минерал присутствует в различных формах, включая элементарное состояние ( $\text{Se}^0$ ), селенид ( $\text{Se}^{2-}$ ), селенат ( $\text{SeO}_4^{2-}$ ) и селенит ( $\text{SeO}_3^{2-}$ ) [165, 182]. Он обладает высокой реакционной способностью и может изменять свою степень окисления. Различные факторы, такие как pH, концентрация свободного кислорода, окислительно-восстановительные реакции и влажность, влияют на данные процессы. Исследователи утверждают, что в анаэробных условиях и кислой среде образуются соединения селена с более низкими степенями окисления, но также в аэробной среде и при щелочном pH преобладают соединения селена с более высокими степенями окисления [182, 183]. Интересно отметить, что селен имеет физико-химические свойства, которые схожи с серой (S), так как оба элемента принадлежат к одной и той же группе 16 в периодической системе (халькогенам). Это делает их схожими по прочностным характеристикам, ионизирующим и окислительно-восстановительным потенциалам [302]. Кроме того, селен может взаимодействовать с разными элементами, такими как водород, бром, хлор, фтор, фосфор, образуя продукты, которые по физическим и химическим свойствам схожи с соответствующими соединениями серы [226].

Эпидемиологический и клинический интерес растет к определению влияния металлоида Se на здоровье. Будучи важным для клеточной физиологии, Se, в основном, помогает предотвратить окислительный стресс, выступая в качестве компонента селенопротеинов – семейства ферментов, участвующих в многочисленных окислительно-восстановительных процессах в организме [302, 303].

Хотя селен считается важным элементом для здоровья человека, он также является одним из наиболее токсичных в природе элементов, что подтверждено недавними оценками риска для человека [314, 316]. Соединения селена появились в качестве пищевых добавок с наиболее устойчивым противоопухолевым действием среди ряда микронутриентов, подтвержденных в экспериментах на животных и дальнейших клинических испытаниях на людях [50, 258, 260, 283]. В литературе указано, что при избыточном и не контролируемом потреблении селена возникают метаболические и сердечно-сосудистые заболевания, такие как гипертония, гиперлипидемия, гипергликемия и диабет [109, 166, 172, 186, 224, 313, 315, 316].

Селен является широко распространенным элементом в природе, встречающимся в атмосфере, литосфере, биосфере и гидросфере Земли [95, 161, 261]. Этот элемент, присутствующий в окружающей среде, запускает процесс выветривания горных пород [182, 183, 233, 276]. Селен попадает в атмосферу через вулканические выбросы. Биохимическое разложение микроорганизмами органического вещества, обогащенного селеном, и прочие подобные процессы в значительной степени способствуют непрерывному насыщению атмосферы селеном [161, 261]. Небольшой уровень селена обнаруживается в подземных водах, обычно в виде селенатов и селенитов, однако, его концентрация выше в морской воде [226, 276]. Безопасный уровень селена в питьевой воде, согласно рекомендациям ВОЗ, составляет менее 10 мкг/литр [226, 322].

Селен поступает в организм человека в наибольшей степени при употреблении продуктов и различных БАДов. Продукты растительного и животного происхождения являются основными источниками этого элемента. Растения накапливают селен в виде неорганических соединений, селенатов IV или VI степени, которые затем преобразуются в органические формы, в частности селенометионин и селеноцистеин. До 90% селена в растениях присутствует в виде селенометионина [113]. Селеноцистеин доминирует в продуктах животного происхождения. Данная форма селена, которую потребляет человек, преобразуется, связываясь с аминокислотами и белками [233]. Количество селена в продуктах зависит от места, в котором выращивались растения и животные [182, 219, 233]. Оно определяется количеством селена в почве в данной области, типом почвы, агроклиматическими условиями и типом урожая [182] в зависимости от географического региона [182, 233]. Наибольшее количество селена встречается в таких продуктах как злаки, хлеб, мясо, почки, печень и сердце крупного рогатого скота, также в морской рыбе, поскольку в морской воде содержится большое его количество. В этих продуктах его содержание колеблется от 0,01 до 30 мг/кг [182, 205]. По сравнению с белковыми источниками, фрукты и овощи содержат относительно низкий уровень селена [182].

ВОЗ рекомендует каждому взрослому принимать 30-40 мкг селена в сутки [185]. Максимальная доза не должна превышать 400 мкг/сут [107]. Мужчины должны потреблять селен в количестве 40-70 мкг в день, в то время как женщинам рекомендуется 45-55 мкг, с повышением дозы до 60-70 мкг во время беременности или при кормлении грудью [183]. Из данных Роспотребнадзора в России установлены следующие нормы потребления селена: 55 мкг/сут для женщин, 75 мкг/сут для мужчин и 10–50 мкг/сут для детей [223, 265]. При этом из исследований известно, что оптимальные эффекты селена проявляются при его суточном потреблении в диапазоне 150

– 200 мкг: тогда он осуществляет свои основные функции – антиоксидантную, иммуностимулирующую и противоопухолевую [223].

Всасывание Se-содержащих соединений осуществляется в основном в тонком кишечнике и, в отличие от всасывания прочих микроэлементов, потенциально не находится в зависимости от способа потребления селена [158, 223]. Всасывание селена усиливается витаминами группы С, А и Е [279]. Неорганические (селенит, селенат) и органические (содержащие аминокислоты) соединения селена поглощаются с сопоставимой эффективностью (70-95%) [223]. Поглощенный селен быстро всасывается и возвращается в плазму в метаболитированной форме [102, 234]. Эритроциты осуществляют специфическую функцию в метаболизме селенита, восстанавливая его до формы, которая после экстрезии способна связываться с белками плазмы [100, 234].

Метаболизм селена можно описать следующим образом: селенит, селенат и селеноаминокислоты (селеноцистин, селеноцистеин и селенометионин) восстанавливаются с помощью ферментативных и не ферментативных стадий с участием глутатиона. Ионы селената и селенометионина попадают в кровообращение в основном без изменений, в то время как селенит активно метаболизируется в клетках [139, 223]. Селеноцистеин и селеноцистин проникают в циркуляцию в небольших количествах. Большинство этих молекул связываются с глутатионом с образованием смешанных дисульфидов, метаболизирующихся в печени [223].

Биологический период полувыведения селена из организма в среднем составляет около 11 суток, при этом для отдельных органов данный показатель варьирует: из почек он выводится примерно за 11 суток, из печени – 24, а из селезенки – 18 суток. Накопление микроэлемента в мягких тканях характеризуется более продолжительным сроком, достигающим 87 дней, тогда как период его биологического полувыведения из этих тканей составляет 50-60 суток [8, 45, 62].

В течении суток с мочой выделяется приблизительно 4,5 мкг селена, содержащегося в крови [8, 62]. При пероральном поступлении его неорганических соединений в количестве 150 мкг, с мочой выводится 50 мкг, с калом – около 20 мкг, с потом – 80 мкг, с другими жидкостями – следы. Установлено, что такие токсикологические значимые элементы, как ртуть и мышьяк, а также анионы сульфатов и фосфатов, способны модифицировать распределение селена в организме и изменять интенсивность его экскреции с желчью (с фекалиями) [8, 62]. Предполагают, что растворимый неорганический селен выводится с калом приблизительно 15% [45].

Также селен удаляется из организма при выдыхаемом воздухе в виде летучего диметилселенида, образованного метилированием [223]. В условиях высокого или токсичного воздействия селена выведение его с потом и дыханием становится более важным. Несколько исследований показали, что часть поглощенного селена быстро выводится с мочой (через 2-5 часов после приема внутрь) и не полностью уравнивается в селеновом компартменте организма в течение этого периода времени. Действительно, уровни селена в моче быстро повышаются до значений, превышающих наблюдаемые в плазме, что указывает на преимущественное выведение поглощенной дозы до того, как она попадет в плазменный пул [223].

Не выявлено регулируемого резервного пула селена, аналогичному железу, у которого имеется пул ферритина. Каждый из уровней распределения селена создает иерархию – один из селенопротеидов внутри клетки, а другой – в тканях организма. Эти уровни распределения действуют в тандеме, создавая иерархию селенопротеинов во всем организме [113].

При поступлении селена в организм в дозировке менее 40 мкг в сутки развивается его дефицит [282]. Дефицит селена может быть обусловлен не только низким его содержанием в пищевых продуктах, но и курением, муковисцидозом, хроническим алкоголизмом и вследствие развития опухолевого образования. Недостаток этого микроэлемента влияет на функционирование щитовидной железы, сердечно-сосудистой и иммунной

систем и может вызвать бесплодие [93, 94, 204, 223, 272, 273, 282]. Глубокий дефицит Se в пищевой цепи приводит к развитию конкретных эндемий, таких как болезнь Кешана (кардиомиопатия) и болезнь Кашина-Бека (остеохондропатия), а также к миопатии и общей мышечной дистрофии [120, 166, 187, 224, 313, 314]. В результате эпидемиологических исследований был сделан вывод о том, что умеренный дефицит селена в рационе влияет на развитие заболеваний, вызванных снижением иммунитета [182, 184]. Также его дефицит может негативно повлиять на функционирование нервной системы [292]. Описаны случаи развития депрессии или усиления тревоги, также возникает болезнь Альцгеймера [185]. Считается, что снижение элемента приводит к повышению вирулентности ВИЧ и увеличению перехода в СПИД [155, 323]. Дефицит селена у беременных женщин негативно влияет на развитие эмбриона [241, 272, 276]. При длительной недостаточности селена в организме человека и при заражении вирусом COVID-19 заболевание коронавирусной инфекцией протекает тяжелее [52, 272, 304]. На фоне дефицитного состояния селена с большей скоростью накапливаются такие элементы как мышьяк, ртуть, медь, кадмий, никель, свинец, талий и серебро [62]. Значит избыточное поступление ртути, меди, мышьяка и сульфата в человеческий организм может привести к возникновению дефицита селена [62].

Если в организм селен поступает в дозировке более 400 мкг в сутки, возникает его передозировка – селеноз, и микроэлемент начинает проявлять токсические свойства [259]. При отравлении селеном выпадают волосы и поражаются кожа и ногти [95]. Характерным симптомом отравления селеном является запах чеснока в выдыхаемом воздухе из-за наличия летучего метаболита – этилселенида. Ранние симптомы острого отравления включают возникновение гипотонии и тахикардии. Появляются неврологические симптомы: тремор и сокращения мышц [95]. Другими симптомами отравления селеном являются анемия, сухой кашель, лихорадка и гипосаливация.

Отравление приводит к повышенной проницаемости капилляров и развитию нефроза [95].

### **1.3.2. Роль ферментов, содержащих селен, в функционировании клеток**

Селен и селеноцистеин (Sec) – важные составляющие 25 селенопротеинов, участвующих в различных физиологических процессах, а также входящих в состав более 30 белков крови и тканей [52, 109, 137]. Sec является аналогом цистеина, в котором атом S заменен на Se и признан 21-й аминокислотой [141]. Геном человека содержит 25 генов, кодирующих белки из селеноцистеина (селенопротеины) [149], содержащиеся в эукариотах, эубактериях и прокариотах. Они кодируют стоп-кодон UGA (урацил-гуанин-аденин) и запускают механизм для прекращения синтеза белка. Sec является единственной аминокислотой у эукариот, биосинтез которой происходит на ее тРНК [271, 274]. Sec синтезируется путем серинмисацилирования транспортного РНК селеноцистеина (тРНКSec), за которым следует фосфорилирование фосфосерил-тРНКSec-киназой (PSTK) и дефосфорилирование селеноцистеинсинтетазой [147]. Затем предшественник проходит уникальный процесс, называемый трансляционным перекодированием. Здесь стоп-кодон UGA в последовательности мРНК декодируется в 3' нетранслируемой области, чтобы разрешить вставку Sec [324].

Различают множество селенопротеинов, они отвечают за функцию и регуляцию гормонов щитовидной железы, за регуляторы роста, за развитие и дифференциацию, за ингибиторы неспецифического иммунного ответа, нейтрализаторы воспалительных, хемотактических и фагоцитарных реакций, участвуют в развитии клеток мужской и женской половой системы и т. д. [52, 160, 330]. Из всех известных селенопротеинов только некоторые выполняют важные функции в клетках организма человека: антиоксидантную,

противовоспалительную, антисклеротическую, противовирусную, антибактериальную, противогрибковую и антиатерогенную [197, 280].

Селенопротеин Р (SelP, SEP1) является единственным селенопротеином, который содержит 10 остатков селеноцистеина, в основном производится в печени, а затем транспортируется в плазму. SelP высвобождается в кровоток и отвечает за распределение селена по другим органам и тканям, т.е. транспортирует селен по всему организму. Также SelP отвечает за поддержание гомеостаза по всему организму человека во время нормального и нарушенного метаболизма (например, в процессе заживления ран) [160].

Селенопротеин S (SelS) представляет собой недавно открытый селенопротеин, расположенный на мембране эндоплазматического ретикулума (ЭПР). Он поддерживает гомеостаз ЭПР, участвует в окислительном стрессе, путях деградации, связанной с ЭПР, регулирует экспрессию воспалительных факторов за счет накопления активных форм кислорода и циркулирующие уровни провоспалительных цитокинов, включая интерлейкин-2, интерлейкин-6, интерлейкин-1 $\beta$  и TNF- $\alpha$  и пролиферацию опухолевых клеток за счет сверх экспрессии и участвует в деградации развернутых белков и белков, которые неправильно свернулись в различных процессах [192, 212, 220].

Селенопротеин К (SelK) участвует в процессах иммунных клеток, активирует клеточный и гуморальный иммунный ответ (дефицит SelK приводит к дефициту потока  $Ca^{2+}$  во время активации иммунных клеток и возникает нарушение иммунного ответа), поддерживает гомеостаз кальция клеток за счет регулирования потока, а также участвует в механизмах, связанных со стрессом ЭПР, в ретротранслокации только части неправильно свернутых белков из ЭПР [174, 192, 212, 220].

Селенопротеин Т (SelT) преимущественно локализован в ЭПР и аппарате Гольджи и повсеместно экспрессирует как во время эмбрионального развития, так и в сформировавшихся тканях [192]. Особенно распространен в

эндокринных органах, таких как гипофиз, поджелудочная железа, щитовидная железа и яички, что указывает на важную роль этого селенопротеина в продукции гормонов [98], обладает кардиопротективным действием при сердечно-сосудистых заболеваниях [221].

Селенопротеин I (SelI) представляет собой этаноламинфосфолипидтрансферазу, участвующую в клеточном метаболизме и синтезе гликозилфосфатидилинозитола. Было показано, что блокировка SelI в T-клетках нарушает метаболическое перепрограммирование во время активации этих клеток, влияя на их пролиферацию и дифференцировку [206, 207].

Селенопротеин H (SelH) уникально расположен в ядрышке, ядерном компартменте для биогенеза рибосом, где происходят транскрипция и сборка рРНК [126, 274]. Рибосомы влияют на различные клеточные процессы, включая синтез белка, контроль клеточного цикла, стабильность генома и апоптоза. Ядрышко действует как «сенсор стресса» из-за различных клеточных давлений, включая внутриклеточные активные формы кислорода, которые запускают каскад реакций, приводящие к подавлению синтеза рРНК и индуцируется остановка клеточного цикла [126, 275].

Помимо селенопротеинов имеются и другие ферменты, содержащие в себе селен. Наиболее подробно на сегодняшнее время изучены глутатионпероксидаза (GPX), тиреодоксинредуктаза (TXNRD1 – TXNRD3), метионинсульфоксидредуктаза (MSRB1), йодтирониндеодиназа (DIO) [110, 219, 225, 226, 236].

Глутатионпероксидазы (GPX) представляют собой семейство антиоксидантных ферментов. Выделяют восемь форм GPX, которые характеризуются сходными функциями. У них разные способы и места действия и разные химические формы, но у всех основная функция заключается в нейтрализации перекиси водорода и органических гидроперекисей во внутриклеточных и внеклеточных компартментах. Их ферментативная активность прямо пропорциональна потреблению селена, особенно для форм с 1 по 4 [219, 226, 236].

Глутатионпероксидаза 1 (GPx1, GPX1) считается одним из основных антиоксидантных ферментов, и вместе с каталазами и пероксиредоксинами она участвует в защите клеток от окислительного повреждения путем деградации токсичного  $H_2O_2$  [219, 226, 236].

Глутатионпероксидаза 2 (GPx2, GPX2) локализуется преимущественно в тканях желудочно-кишечного тракта и печени человека. Защищает их от окислительного повреждения [219, 226, 236].

Глутатионпероксидаза 3 (GPx3, GPX3) локализована во внеклеточной жидкости и плазме. Обнаружена в печени, почках, сердце, легких, щитовидной железе, желудочно-кишечном тракте, в плаценте и мужской репродуктивной системе [219, 226, 236].

Глутатионпероксидаза 4 (GPx5, GPX5) широко распространена в организме. Большая активность наблюдается в семенниках и соответственно важна для мужской фертильности и созревания, функции и подвижности сперматозоидов. Она расположена в цитозоле, митохондриях и ядре. Помимо антиоксидантной активности также защищает мембрану клетки от пероксидативной деградации, защищает от повреждения ДНК путем окисления [219, 226, 236].

Йодотирониндейодиназа (DIO) – селенопротеин, который участвует в регуляции активности тиреоидных гормонов путем восстановительного дейодинирования. Различают 3 вида DI1, DI2 и DI3 [213].

DIO способствует преобразованию тироксина ( $T_4$ ) в активный гормон щитовидной железы – трийодтиронин ( $T_3$ ), путем дейодирования внешнего кольца в реакции, катализируемой DI1 и DI2 [104, 262]. От уровня потребления селена будет зависеть синтез гормонов щитовидной железы [262].

Тиоредоксинредуктаза (TR, TrxR) представляет собой оксидоредуктазы, которые вместе с тиоредоксином (Trx) составляют основную систему восстановления дисульфидов в клетке [146, 262].

Тиоредоксинредуктаза 1 (TR1) участвует в репарации ДНК, поддержании окислительно-восстановительного гомеостаза и регуляции клеточной передачи сигналов, активирует супрессор опухоли p53. Недавнее исследование показало, что TR1 защищает от образования опухолей при химически индуцированном раке печени [146].

Кроме селенопротеинов и ферментов оказывают непосредственное действие в клеточном цикле органические и неорганические формы селена. Так, селенит натрия играет роль в противоопухолевом ответе за счет продукта метаболизма селенида водорода. Он реагирует с глутатионом или сульфгидрильными группами, в результате реакции образуются  $O_2^-$  и  $H_2O_2$ , которые способствуют разрыву нитей ДНК, а также остановке клеточного цикла в фазе S или G2, что приводит к апоптозу клетки. В различных экспериментах указывается, что селенит индуцирует апоптоз, активируя p53 – транскрипционного фактора, который регулирует клеточный цикл и является геном супрессором опухолевого роста. p53 непосредственно в митохондриях через высвобождение цитохрома C активирует каспазу 9, являющуюся проапоптотическим белком [92, 165].

Селен является важным природным микроэлементом, входящий в состав веществ, которые необходимы для всех форм жизни, от микробов до человека. Выполняет важные функции, такие как антисклерозную, антиоксидантную, иммуностимулирующую, противовирусную, гормональную, репродуктивную, то есть участвует в гомеостазе [17, 50, 52, 58, 62, 77, 164, 167, 188]. Биологические эффекты Se в основном проявляются за счет его включения в селенопротеины, а селенопротеины участвуют в активации, пролиферации и дифференцировке клеток, которые управляют врожденными и адаптивными иммунными реакциями. На клеточном уровне пищевой Se может влиять на различные эффекторные функции лейкоцитов, включая адгезию, миграцию, фагоцитоз и секрецию цитокинов. Несколько членов семейства селенопротеинов регулируют или регулируются клеточным окислительно-восстановительным тонусом, который является важным

модулятором передачи сигналов и функции иммунных клеток. Существуют также важные связи между селенопротеинами и потоком кальция ( $\text{Ca}^{2+}$ ), который регулирует окислительный процесс, необходимый для оптимальной активации иммунных клеток. Были получены новые данные о роли отдельных селенопротеинов в модулировании иммунно-опосредованных рецепторов сигнальных путей, связанных с потоком  $\text{Ca}^{2+}$  и окислительный процесс, который индуцирует продукцию, миграцию и другие клеточные процессы цитокинов [167].

Таким образом, анализ литературных данных не выявил информации о морфологических и иммуногистохимических изменениях в селезенке при последовательном поступлении селена с последующей парентеральной инъекцией этилкарбамата. В рамках настоящего исследования проведено комплексное изучение структурно-функциональных трансформаций селезенки, включая гистоархитектонику в условиях комбинированного воздействия селена и этилкарбамата. Полученные результаты способствуют углублению понимания механизмов иммуномодуляции и возможных адаптационно-компенсаторных реакциях иммунной системы, что может быть значимо для разработки новых стратегий профилактики и коррекции патологических состояний, связанных с воздействием ксенобиотиков в том числе.

## ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

### 2.1. Материал исследования

#### **1 этап – формирование опытных групп и условия их содержания.**

Характеристика объекта исследования. В исследовании использовали крыс-самцов линии Wistar в количестве 106 штук, исходный средний возраст которых составил  $60 \pm 1,5$  дней и вес  $122 \pm 8,9$  гр.

Этическая экспертиза. В течении всего эксперимента животные получали сбалансированное питание. Животные имели свободный доступ к питьевой воде и находились в стандартных условиях вивария. В течение всего эксперимента животные содержались в соответствии ГОСТу 33215-2014 «Руководство по содержанию и уходу за лабораторными животными. Правила оборудования помещений и организации процедур», ГОСТу 33216-2014 «Руководство по содержанию и уходу за лабораторными животными. Правила содержания и ухода за лабораторными грызунами и кроликами», Руководство по содержанию и использованию животных для экспериментов и в научных целях (FELASA, 2007 г.), СанПин 2.2.1.3218-14 «Санитарно-эпидемиологические требования к устройству, оборудованию и содержанию экспериментально биологических клиник (вивариев)», СанПиН 2.1.3684-21 «Санитарно-эпидемиологические требования к содержанию территорий городских и сельских поселений, к водным объектам, питьевой воде и питьевому водоснабжению, атмосферному воздуху, почвам, жилым помещениям, эксплуатации производственных, общественных помещений, организации и проведению санитарно-противоэпидемических (профилактических) мероприятий», «Европейская конвенция о защите животных, используемых в экспериментах или в иных научных целях» (Страсбург, 18 марта 1986), Решение совета Евразийской экономической комиссии от 03.11.2016 № 89 «Об утверждении правил проведения

исследований биологических лекарственных средств Евразийского экономического союза», Директива 2010/63/EU Европейского парламента и совета Европейского союза от 22 сентября 2010 года по охране животных, используемых в научных целях (соответствует требованиям Европейской экономической зоны).

Эксперимент проведен согласно нормативно-правовой документации: Приказ Минздрава России №199н от 01.04.2016 «Об утверждении правил надлежащей лабораторной практики». Экспериментальное исследование согласовано и единогласно одобрено на заседании локального этического комитета медицинского факультета ФГБОУ ВО «Чувашский государственный университет имени И. Н. Ульянова» Министерства науки и высшего образования РФ (протокол №2 от 16.03.2026 г.).

Для индукции воспалительного процесса с последующим неопластическим преобразованием в легочной ткани в качестве канцерогена использовали этилкарбамат (уретан). Животных разделили по IV экспериментальным группам, формируя факторный дизайн «селен × этилкарбамат»:

- группа I – интактная (контроль):

а) без воздействия:

- количество особей – 8 шт;
- назначение: базовый контроль;

б) с однократным введением физиологического раствора хлорида натрия в объеме 0,5 мл внутрибрюшинно:

- количество крыс – 8 шт;
- назначение – исключение постинъекционного влияния;
- примечание – данная процедура не оказывала значимого влияния на морфологическую характеристику исследуемых органов;

- группа II – опытная, получавшая по требованию селен с питьевой водой:

- количество крыс – 30 шт;
- дозировка селена – 20 мкг на кг массы тела;
- длительность приема – 1 месяц;
- питьевой режим – без ограничений, индивидуальный объем воды потребления исходил из физиологической потребности (суточный объем воды на 1 крысу составлял 30 мл);
- среднесуточная дозировка селена на 1 крысу через питьевую воду составляла  $4 \pm 0,4$  мкг;
- качество воды – ГОСТ Р 51309-99, ГОСТ Р 52109-2003, СанПин 2.1.4.1116-02, также международному стандарту ISO 11885-96;
- основание расчета дозы – источник «Лабораторные крысы: содержание, разведение и биоэтические аспекты использования в экспериментах по физиологии поведения», в котором указаны средние показатели потребления воды крысами в условиях вивария.

- группа III – опытная, которой проводилась инъекция этилкарбамата:

- количество крыс – 30 шт (по 10 особей на каждый срок);
- дозировка этилкарбамата – 1 г на кг массы тела крысы;
- средняя доза на 1 крысу –  $287 \pm 10,3$  мг;
- способ инъекции – внутривентрикулярно;
- частота введения – однократно;
- растворитель – 1 мл 0,9% – ого физиологического раствора;

- группа IV – опытная, получавшая предварительно в течении месяца селен, а затем проводилась инъекция этилкарбамата:

- количество крыс – 30 шт;

- этап 1 – поступление селена (как в группе II);
- этап 2 – инъекция этилкарбамата (как в группе III), которая проводилась в последний день приема селена.

## **2 этап – выведение животных из эксперимента.**

Животные (крысы) контрольной и опытных групп выводились из эксперимента через 1, 2 и 6 месяцев после окончания воздействий путем применения телазола из расчета 15 мг на 1 кг массы внутримышечно с последующей декапитацией в соответствии с международными правилами работы с экспериментальными животными. Масса тела крыс взвешивалась с помощью порционных весов SW-02 (производитель Cas, страна Южная Корея). Для исследования во всех группах извлекали селезенку.

После изъятия селезенку взвешивали на электронных лабораторных весах серии «Эва» Ска-120В (производитель ООО «Скейл-КАС», страна Российская Федерация). Затем рассчитывали относительную массу селезенки, применяя следующую формулу:

$$\text{относительная масса селезенки (\%)} = \frac{\text{масса селезенки, мг}}{\text{масса тела, мг}} \times 100\%.$$

Часть селезенки фиксировали в нейтрально-буферном 10% формалине, после чего выполняли заливку парафином и изготавливали серийные срезы толщиной 4 мкм на санном микротоме для последующей окраски гематоксилином и эозином и проведения иммуногистохимического исследования; другую часть селезенки фиксировали в 1% растворе глутарового альдегида для получения полутонких срезов.

## **2.2. Методы исследования**

### **3 этап – формирование методологической основы исследования.**

Для исследования использовали следующие методы:

*1. Окрашивание гематоксилином и эозином* – для изучения морфологии структур селезенки и проведения морфометрии. Полученную

часть селезенки фиксировали в нейтральном забуференном 10% растворе формалина в течении 24 часов. По истечении времени промывали орган под проточной водой. Далее проводили стандартную проводку в тканевом гистологическом процессоре карусельного типа модели АГТ-11ФМП. Затем полученные кусочки селезенки заливали в парафин и получали готовые парафиновые блоки. Далее приготавливали парафиновые срезы, которые были нанесены на стекла «BioVitrum», и выполняли стандартную методику окрашивания гематоксилином и эозином. Полученные срезы фиксировали канадским бальзамом и покрывали покровным стеклом.

**2. Просвечивающая электронная микроскопия** – часть исследуемого органа фиксировали в 1% растворе глутарового альдегида, приготовленного на фосфатном буфере (0,1 М, рН 7,4), в течение 12 часов. Далее переносили в 2,5 % раствор глутарового альдегида на 2 часа. Постфиксацию проводили в 1 % растворе OsO<sub>4</sub> в течение 2 часов. Образцы обезвоживали в серии спиртов и в окиси пропилена, после чего последовательно пропитывали в течение 24 часов эпоксидной смолой Epon 812 (Fluka, Швейцария) и окисью пропилена в соотношениях 1:2; 1:1; 2:1. Затем помещали в чистую смолу и проводили полимеризацию при температурах 37°C, 45°C и 60°C в течение 24 часов. С помощью ультрамикротомы Leica UC7 получали полутонкие срезы толщиной 100 мкм. Далее срезы были окрашены метиленовой синью и выбрана область для получения ультратонких срезов. Ультратонкие срезы селезенки толщиной 60-80 нм были нанесены на медные сеточки и окрашивались в течение 20 минут насыщенным водным раствором уранилацетата и 5 минут цитратом свинца.

На начальном этапе исследований нами были выбраны полутонкие срезы со всей площади селезенки с помощью микроскопа Axio Imager. Далее выполнили микрографии ультратонких срезов на электронном микроскопе Hitachi HT7700 Exalens (Hitachi, Япония) при ускоряющем напряжении 100 кэВ с разрешением 0,144 нм.

3. *Иммуногистохимические методы* – для определения клеточного компонента селезенки, благодаря связыванию его с антителами [25, 34, 144, 145, 196]. Исследование выполняли в соответствии со стандартными протоколами. После забора материала ткань селезенки фиксировали в 10% нейтральном забуференном формалине в течении 24 часов. После завершения фиксации материал подвергали стандартной автоматизированной проводке на автоматическом гистологическом процессоре, включавшей ступенчатую дегидратацию, просветление и фиксацию парафином. Из полученных парафиновых блоков на микротоме изготавливали серийные срезы, которые наносили на высокоадгезивные предметные стекла. После проводили иммуногистохимическую реакцию с использованием следующих моноклональных (МКАТ) и поликлональных (ПКАТ) антител, которые представлены в таблице 3.

Для визуализации иммуногистохимической реакции использовали систему детекции ultraVIEW Universal DAB в соответствии с рекомендациями производителя.

Цифровые снимки микропрепаратов селезенки были получены с помощью цифровой фотокамеры модели Canon 1000, персонального компьютера, микроскопа Микромед 3 Люм под увеличением  $\times 100$  и  $\times 400$ . Количественный подсчет интенсивности мембранной и цитоплазматической иммуногистохимической реакции проводилась с помощью лицензионной программы "Микроанализ" (Санкт-Петербург, 2010).

Для каждого среза было измерено минимум десять интересующих областей. Методом автоматического выделения и вычисления площади конкретного цветового сектора (окрашенного DAB) была определена площадь участков, отражающих иммуногистохимические реакции цитоплазмы и мембраны. Результирующие данные были переведены в процентное соотношение от общей площади изображения.

Таблица 3 – Описание антител, использованных  
в иммуногистохимическом анализе

Маркер	Тип антитела	Производитель	Назначение
CD68	МКАТ к кластеру дифференцировки 68 типа	Leica Biosystems, Великобритания	маркер макрофагов
CD3	ПКАТ к кластеру дифференцировки 3 типа	Leica Biosystems, Великобритания	маркер зрелых Т-лимфоцитов
CD2	ПКАТ к кластеру дифференцировки 2 типа	Leica Biosystems, Великобритания	общий Т-клеточный маркер
CD21	МКАТ к кластеру дифференцировки 21 типа	Leica Biosystems, Великобритания	маркер фолликулярных дендритных клеток, зрелых В-клеток
Ki67	ПКАТ к белку Ki67, клон ММ-1	Daako, Дания	маркер клеточной пролиферации
p53	ПКАТ к белку p53	Leica Biosystems, Великобритания	проапоптотический белок p53
Vimentin	МКАТ к белку Vimentin, клон V9	Leica Biosystems, Великобритания	маркер клеток мезенхимального происхождения, включая фибробласты, эндотелиальные клетки, гладкие мышцы, меланоциты

**4. Компьютерная морфометрия** – ручным способом определяли параметрические характеристики белой и красной пульпы и количественно оценивали результаты иммуногистохимической реакции путем расчета процентного содержания иммунопозитивных клеток. Вся используемая терминология приведена в соответствии с международной номенклатурой по цитологии и гистологии человека. Морфометрический анализ выполнялся с

использованием программного обеспечения «Микроанализ», в котором рассчитывали следующие морфометрические параметры:

- площади лимфоидного узелка селезенки, мкм<sup>2</sup>;
- толщины периартериолярной муфты селезенки, мкм;
- площади и толщины маргинальной и мантийной зон лимфоидного узелка селезенки, мкм<sup>2</sup> и мкм;
- толщины стенки и внутреннего диаметра центральной артериолы селезенки, мкм.

**5. Оценка морфологических индексов** для характеристики иммуноморфологии селезенки проводилась по методике, предложенной В. П. Волковым [12]:

- *Лимфоидный коэффициент (ЛК)* – вычислялся для оценки соотношения В- и Т- зависимых зон. Соотношение и интенсивность иммунологических реакций гуморального и клеточного ответа объективно описывает ЛК. Снижение ЛК косвенно свидетельствует о подавлении клеточной формы иммунного ответа и преобладании гуморальной формы иммунологического ответа и наоборот. Вычислялся коэффициент по следующей формуле:

$$ЛК = D_{лу} / L_{пм},$$

где  $D_{лу}$  – диаметр лимфоидных узелков,  $L_{пм}$  – толщина периартериолярных лимфоидных муфт.

- *Индекс Керногана (ИК)* – отражает степень пропускной способности микрососудов:

$$ИК = 2 \times L / D,$$

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

**6. Статистическая обработка.** Цифровые данные, полученные в ходе морфологических и количественных исследований, были структурированы и предварительно проанализированы с использованием

электронных таблиц Microsoft Office Excel 2020. Статистическая обработка результатов проводилась с применением лицензионной программы Statistica 10.0 (Stat Soft Inc., США) с использованием общепринятых методов параметрической и непараметрической статистики. Анализ распределения выборок осуществлялся с применением критерия Колмогорова-Смирнова с поправкой Лиллиефорса для оценки соответствия нормальному закону распределения. Центральные тенденции и вариабельности количественных данных, распределенных вблизи нормального закона, представлены в виде среднего арифметического ( $M$ ) и стандартной ошибки среднего ( $SE$ ). Для оценки межгрупповых значений применялись критерий Стьюдента (при нормальном распределении) и U-критерия Манна-Уитни (в случае нарушения нормальности). Различия считали статистически значимыми при уровне значимости  $p < 0,05$ .

## ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ СОБСТВЕННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ

### 3.1. Влияние селена на морфологическую и иммуногистохимическую структуру селезенки

#### 3.1.1. Морфологическое и иммуногистохимическое исследование селезенки через месяц с момента завершения приема селена

Спустя месяц абсолютная масса тела крыс снизилась и составляла  $258 \pm 19,6$  гр ( $p < 0,033$ ) в отличие от контрольной группы животных аналогичного возраста ( $285 \pm 24$  гр).

При этом абсолютная масса селезенки осталась практически неизменной по сравнению с контрольной группой ( $665,1 \pm 71,17$  мг) и составила  $648,35 \pm 60,33$  мг ( $p < 0,01$ ). Однако относительная масса селезенки увеличилась –  $0,251\%$ , в контрольной группе –  $0,233\%$  ( $p < 0,01$ ).

Микроскопическая картина селезенки опытной группы не отличалась от контрольной группы. Определялась белая и красная пульпы, а также пульпарные тяжи. КП была полнокровная, с выраженным количеством эритроцитов. Определялись синусы и трабекулы – структуры, отходящие внутрь от капсулы, окрашенные оксифильно. Визуализировались другие клетки: плазматические, макрофаги и моноциты. В подкапсульной зоне клетки располагались близко друг к другу.

БП представлена ЛУ и ПМ. Через месяц с момента завершения приема селена отмечалось слияние ЛУ между собой и с ПМ (рисунок 1). Относительная толщина ПМ в опытной группе была достоверно больше, чем в контрольной группе, увеличившись с  $336,3 \pm 30,2$  мкм до  $428,2 \pm 28,6$  мкм ( $p < 0,03$ ). Вблизи центральной артериолы наблюдалось скопление плотно расположенных базофильно окрашенных клеток.

В исследуемой группе обнаруживались ЛУ как с ГЦ, так и без них. Преимущественно определялись ЛУ без ГЦ. Соотношение узелков без ГЦ к узелкам с ГЦ составляло 1,6:1. В контрольной группе это соотношение – 1:1,2.

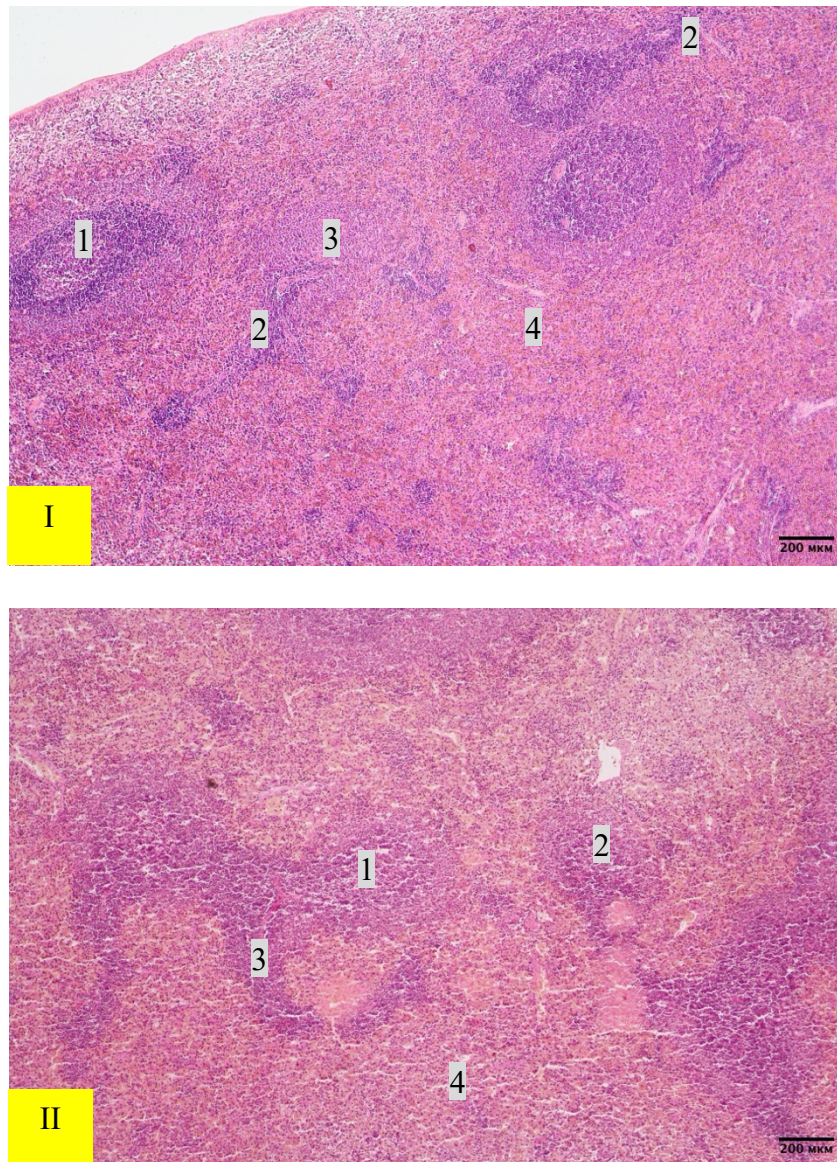


Рисунок 1 – Селезенка крыс.

**I – контрольной группы.** Паренхима селезенки представлена БП и КП, в которой определяли: 1 – ЛУ с ГЦ; 2 – ПМ; 3 – ЛУ без ГЦ; 4 – КП.

**II – 1 месяц с момента завершения приема селена.** Слияние ЛУ между собой и широкая ПМ. 1 – ЛУ без ГЦ; 2 – ЛУ с ГЦ; 3 – ПМ; 4 – КП.

Окраска гематоксилином и эозином. Ув.  $\times 100$

Морфометрический анализ показал, что в опытной группе относительная средняя площадь ЛУ снизилась на 21% и составила  $19,91 \pm 0,99$  мм<sup>2</sup>, тогда как в контрольной группе этот показатель был  $25,19 \pm 2,89$  мм<sup>2</sup>.

По форме ЛУ без ГЦ не отличались от контрольной группы, имели правильную округлую форму с четкой, ровной, отчерченной границей с КП и границами между зонами ЛУ и сливались между собой (рисунок 1). Но площадь данной структуры достоверно уменьшилась на 20% ( $p < 0,05$ ) и составляла  $18,39 \pm 1,34$  мм<sup>2</sup>. ЛУ с ГЦ также имели правильную округлую форму с разграниченными границами между собой и КП, а также со светлым ГЦ и эксцентрично расположенной центральной артериолой, окруженной Т-клетками. ГЦ был представлен светлыми клетками (рисунок 1), преимущественно В-лимфоцитами на разных стадиях созревания, а также выявлялись макрофаги. Площадь ЛУ с ГЦ составила  $20,639 \pm 1,503$  мм<sup>2</sup>, что в 1,64 раза ( $p < 0,05$ ) меньше по сравнению с контрольной группой ( $33,769 \pm 9,591$  мм<sup>2</sup>).

В опытной группе зона мантии, ограничивающая ГЦ по периферии, сохраняла базофильное окрашивание. Морфометрический анализ показал умеренное увеличение ее площади на 22% (таблица 4) по сравнению с контролем, при этом толщина данного структурного компартмента оставалась сопоставимой с контрольными значениями ( $p < 0,03$ ).

Площадь и толщина МрЗ, наоборот, уменьшились в 1,5 раза ( $p < 0,009$ ) и в 1,4 раза ( $p < 0,009$ ) соответственно (таблица 4). В этой зоне отмечались вакуолизированные клетки с расположенным по центру ядром. Вероятно, это макрофаги или дендритные клетки.

При измерении морфометрических показателей центральной артериолы выявили, что ее толщина и внутренний диаметр увеличились на 23% ( $p < 0,012$ ) и в 1,5 раза ( $p < 0,05$ ) соответственно (таблица 4). При этом ИК изменился незначительно и составил  $1,5 \pm 0,94$  (таблица 4). При вычислении ЛК выявили, что он повышен с  $1,77 \pm 0,75$  до  $2,0 \pm 0,9$ .

Таблица 4 – Морфометрические показатели структур селезенки контрольной и опытной групп через месяц с момента завершения приема селена

Морфометрические параметры	Контрольная группа	Опытная группа
Площадь МнЗ, мм <sup>2</sup>	6,26±0,87	7,59±0,19
Толщина МнЗ, мкм	95,6±10,1	<b>81,4±3,27*</b>
Площадь МрЗ, мм <sup>2</sup>	20,73±2,55	<b>14,31±1,56*</b>
Толщина МрЗ, мкм	125,23±8,34	<b>94,6±5,95*</b>
Толщина стенки центральной артериолы, мкм	11,58±0,72	<b>14,21±0,65*</b>
Внутренний диаметр центральной артериолы, мкм	12,58±1,75	<b>18,91±1,38*</b>
ИК	1,84±0,82	<b>1,5±0,94*</b>

Примечание: \* $p \leq 0,05$  – по сравнению с контрольной группой

На ультрамикроскопическом уровне значительных изменений в БП и в КП по сравнению с контрольной группой не выявлялось. КП была представлена эритроцитами неправильной формы, тесно прилегающих друг к другу. Между ними располагались макрофаги с крупным ядром и выраженными многочисленными пиноцитозными пузырьками с продуктами расщепления. Также отмечались сегментоядерные клетки, сосуды и плазматические клетки со слабо выраженным аппаратом Гольджи и ЭПР. Такое строение наблюдалось и в МрЗ.

В БП выявлялись лимфоциты на разных стадиях развития. Определялись лимфоциты от юных до плазматических клеток. ГЦ состоял из незрелых лимфоцитов, имеющих ядра с гетерохроматином, эухроматином и ядрышком. Большая часть гетерохроматина ядра сконцентрирована по периферии в виде ободка (рисунок 2). Ядро располагалось в центре клетки, а по его периферии в цитоплазме находились митохондрии, количество которых варьировало от 2 до 3, с очерченной двойной стенкой и кристами, а также с

слабо выраженной ЭПС. Также визуализировались единичные макрофаги с малым количеством пиноцитозных пузырьков (3-4 шт).

МнЗ и МрЗ содержали как темные, так и светлые лимфоциты, лимфобласты, макрофаги и эритроциты. Лимфоциты имели неправильную округлую форму, в центре цитоплазмы было расположено крупное ядро с ярко выраженными органоидами по периферии. Ядро было овальной, вытянутой формы. В ПМ отмечалось плотное скопление лимфоцитов на разных стадиях развития.

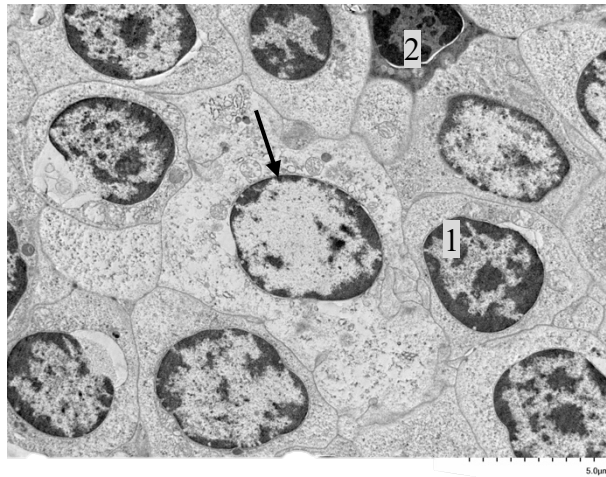


Рисунок 2 – Ультраструктура селезенки крысы. 1 месяц с момента завершения поступления селена. Скопление светлых и темных лимфоцитов в ГЦ ЛУ селезенки через месяц с момента завершения приема селена. Гетерохроматин сконцентрирован на периферии ядра (указан стрелкой). 1 – светлый лимфоцит; 2 – темный лимфоцит.  
Ув.  $\times 3\ 000$

С использованием иммуногистохимического метода определялся клеточный состав селезенки. При анализе срезов контрольной группы, окрашенных ПКАТ, с использованием анти-CD2 маркера для обнаружения Т-клеток и натуральных киллеров было установлено, что CD2<sup>+</sup>-клетки присутствовали как в КП, так и в БП, причем наибольшее их количество наблюдалось в КП. Преимущественно они располагались по периферии синусов и около кровеносных сосудов. Клетки были округлой или овальной формы, с плохо различимым ядром. Помимо этого, CD2<sup>+</sup>-клетки были обнаружены в ПМ и в ГЦ, и в МнЗ.

В опытной группе отмечалось преимущественное увеличение доли  $CD2^+$ -клеток в БП. Их процентное количество по сравнению с контрольной группой увеличилось в ЛУ без ГЦ на 31% ( $p < 0,04$ ), а в ЛУ с ГЦ недостоверно повышено на 22%. Среднее процентное количество в ЛУ увеличилось на 22,5% ( $p < 0,01$ ), чем в контрольной группе. Количество исследуемых клеток увеличено в ГЦ и в МнЗ (рисунок 3).

Данные клетки располагались возле центральной артериолы. Анализируя полученные данные, установлено, что  $CD2^+$ -клетки в ПМ и в КП снизились в 1,7 раза ( $p < 0,05$ ) и в 1,5 раза ( $p < 0,0001$ ) соответственно.

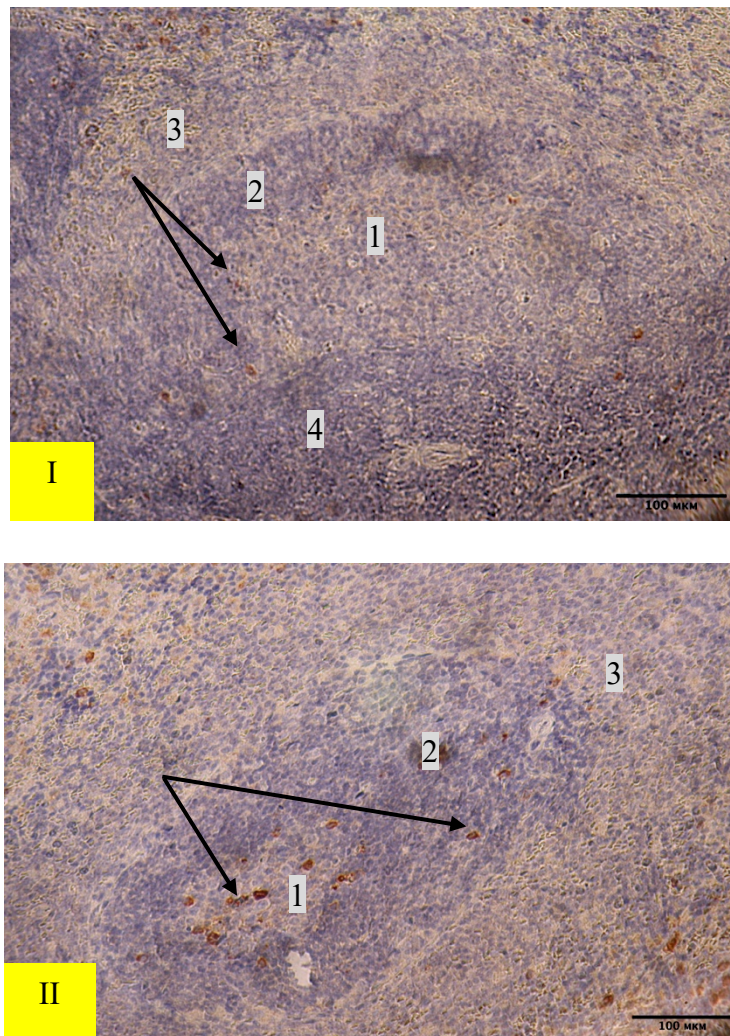


Рисунок 3 – Селезенка крыс. ЛУ с ГЦ.

*I* – контрольной группы. Единичные  $CD2^+$ -клетки (указаны стрелками) в ГЦ и в МнЗ. 1 – ГЦ; 2 – МнЗ; 3 – МрЗ; 4 – ПМ.

*II* – 1 месяц с момента завершения приема селена. Количество  $CD2^+$ -клеток (указаны стрелками) повышено в ГЦ и в МнЗ ЛУ с ГЦ. 1 – ГЦ; 2 – МнЗ; 3 – МрЗ.

Иммуногистохимическая реакция к  $CD2^+$ -клеткам. Ув.  $\times 400/400$

При исследовании гистологических препаратов селезенки контрольной группы с применением ПКАТ к CD3 клетки обнаруживались преимущественно в БП. Данные клетки распределялись как по периферии, так и в центре ПМ. CD3<sup>+</sup>-клетки имели округлую или овальную форму, со светлым ядрышком посередине и располагались рядом с центральной артериолой селезенки (рисунок 4).

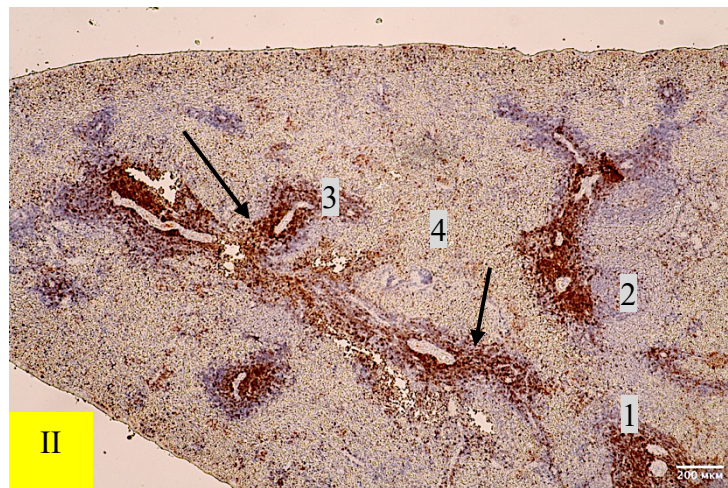
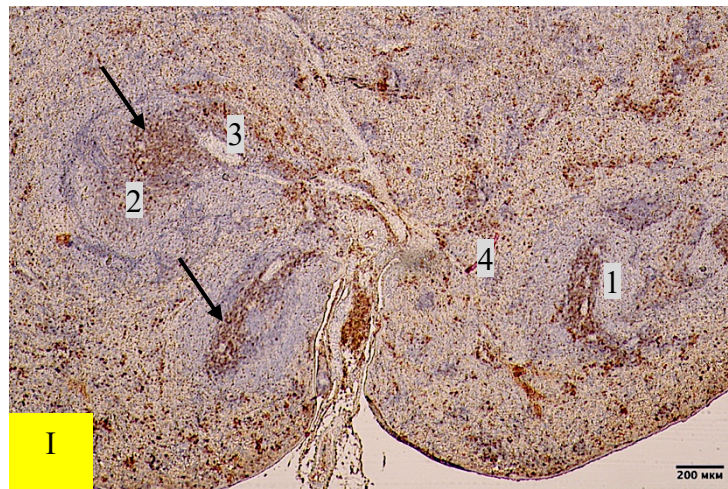


Рисунок 4 – Селезенка крыс.

**I – контрольной группы.** Ворота селезенки, в которых выявлялись следующие структуры: 1 – ЛУ без ГЦ, CD3<sup>+</sup>-клетки (указаны стрелкой) окружают центральную артериолу селезенки; 2 – ЛУ с ГЦ; 3 – ПМ; 4 – КП.

**II – 1 месяц с момента завершения приема селена.**

Количество CD3<sup>+</sup>-клеток (указаны стрелками) увеличено возле центральной артериолы селезенки. 1 – ЛУ без ГЦ; 2 – ЛУ с ГЦ; 3 – ПМ; 4 – КП.

Иммуногистохимическая реакция к CD3<sup>+</sup>-клеткам. Ув. ×100/100

CD3<sup>+</sup>-клетки обнаруживались во всех зонах ЛУ, с наибольшей концентрацией в МнЗ и в ГЦ. Их распределение было неравномерным: в КП они были сконцентрированы около венозных синусов и на границе с ПМ.

В опытной группе отмечено, что доля CD3<sup>+</sup>-клеток преимущественно увеличивалось в БП органа. Клетки имели различные размеры и располагались многослойно. Отмечено увеличение количества клеток в ЛУ без ГЦ в 1,5 раза и в ЛУ с ГЦ в 2,2 раза ( $p < 0,05$ ). CD3<sup>+</sup>-клетки неравномерно распределялись в МнЗ и локализовались в МрЗ возле центральной артериолы ПМ. Также они хаотично располагались в герминативном центре.

Наблюдалось значительное увеличение CD3<sup>+</sup>-клеток в ПМ. Их количество возросло в 1,5 раза ( $p < 0,0006$ ), и они располагались слоями и густо населяли область вокруг артериолы (рисунок 4). В КП выраженных изменений не наблюдалось (рисунок 4).

Было установлено, что CD21<sup>+</sup>-клетки в контрольной группе равномерно распределены в ЛУ. Преимущественно клетки были локализованы в ГЦ и незначительно – в МрЗ. Клетки были овальной или округлой формы. В ПМ количество CD21<sup>+</sup>-клеток неравномерно возрастало на границе с КП. Эти клетки размещались близко друг к другу, образуя группы.

CD21<sup>+</sup>-клетки в контрольной группе в КП располагались возле синусов селезенки и по всей ее поверхности.

В опытной группе через месяц с момента завершения приема микроэлемента количество CD21<sup>+</sup>-клеток снизилось в ПМ в 1,5 раза ( $p < 0,002$ ). Расположение клеток не отличалось от контрольной группы. Также выявлялось статистически значимое снижение клеток в красной пульпе в 1,64 раза ( $p < 0,001$ ).

В ЛУ среднее процентное содержание CD21<sup>+</sup>-клеток в опытной группе незначительно снизилось на 18%. В ЛУ без ГЦ количество этих клеток также уменьшилось на 20% ( $p < 0,02$ ), а в ЛУ с ГЦ снижение составило 24%. Отмечали CD21<sup>+</sup>-клетки в МнЗ и в ГЦ.

В контрольной группе CD68<sup>+</sup>-клетки, в основном, обнаруживались в КП и ПМ. Скопление клеток отмечалось на границе муфты с КП, около венозных синусов и трабекул органа. Они были различной формы и размера. В центре CD68<sup>+</sup>-клеток наблюдалось базофильно окрашенное ядро овальной формы. В ЛУ CD68<sup>+</sup>-клетки преимущественно располагались в ГЦ и около центральной артериолы в ПМ, окруженной МнЗ.

В опытной группе животных процентное количество CD68<sup>+</sup>-клеток уменьшилось в каждой структуре селезенки. Выявлено значимое снижение клеток в ПМ в 2,7 раза ( $p < 0,00001$ ) и в КП в 1,43 раза ( $p < 0,000022$ ) (рисунок 5).

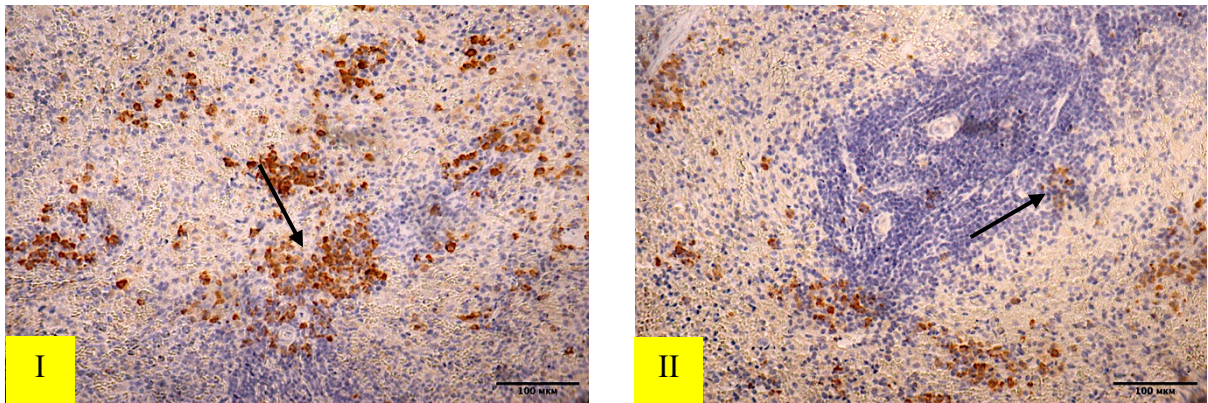


Рисунок 5 – Селезенка крыс. ПМ и КП.  
**I – контрольной группы.** CD68<sup>+</sup>-клетки (указаны стрелкой) расположены на границе между ПМ и КП.  
**II – 1 месяц с момента завершения приема селена.**  
 Количество CD68<sup>+</sup>-клеток (указаны стрелками) снижено по всей ПМ.  
 Иммуногистохимическая реакция к CD68<sup>+</sup>-клеткам. Ув.  $\times 400/400$

Среднее процентное число CD68<sup>+</sup>-клеток в ЛУ было в 1,53 раза ниже ( $p < 0,02$ ), чем в контрольной группе. Они располагались вблизи центральной артериолы. По большей части клетки имели круглую форму. Исследуемые клетки преимущественно снижались в ЛУ с ГЦ в 1,7 раза ( $p < 0,02$ ) по сравнению с контрольной группой, а в ЛУ без ГЦ процентное содержание оставалось без изменений.

В группе, где крысы получали селен в течение месяца, процентное содержание p53<sup>+</sup>-клеток уменьшилось в следующих структурах: в ЛУ – в 1,5 раза, (p<0,02); в ПМ – в 1,8 раза (p<0,003); в КП – в 1,7 раза (p<0,001) по сравнению с контрольной группой крыс.

В ЛУ клетки были локализованы в зоне мантии и вблизи центральной артериолы. В КП p53<sup>+</sup>-клетки преимущественно располагались возле синусов и на границе с ПМ, наиболее часто выявлялись клетки правильной округлой формы, которые располагались скоплениями, образуя группы.

Для оценки уровня клеточной пролиферации применялся МКАТ к Ki67. Иммуногистохимический анализ показал, что у животных контрольной группы Ki67<sup>+</sup>-клетки округлой формы, напоминающие бусины, в центре которых было расположено ядро, обнаруживались преимущественно в ЛУ с ГЦ. В меньшем количестве они располагались в остальных зонах ЛУ. В ПМ клетки определялись как возле сосуда, так и на ее границе, а в КП – рассеяны по всей паренхиме, образуя скопления возле синусов и сосудов.

Спустя месяц с момента завершения приема селена выявлялось увеличение числа Ki67<sup>+</sup>-клеток в ПМ в 1,5 раза (p<0,004) по сравнению с контрольной группой животных. Выявленные клетки имели многослойное расположение, что указывало на значительное усиление пролиферативной активности клеточного пула. В других зонах БП, а также КП подобного увеличения количества клеток не наблюдалось.

Для выявления эндотелиальных и фибробластических клеток селезенки применяли МКАТ к Vimentin. В контрольной группе животных Vimentin<sup>+</sup>-клетки равномерно распределялись по всей площади среза (рисунок 6). Они были округлой и нитевидной формы с отростками. Vimentin<sup>+</sup>-клетки располагались по всей площади в ЛУ и в ПМ.

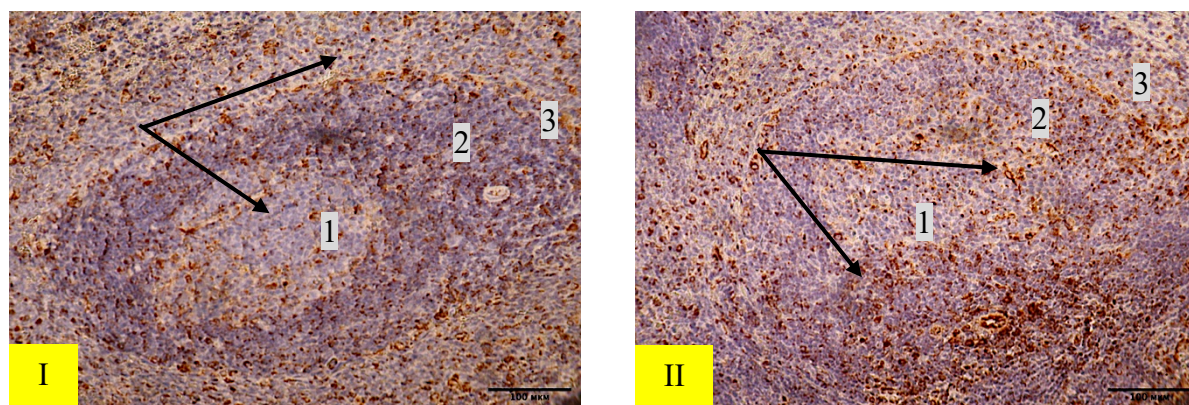


Рисунок 6 – Селезенка крыс. ЛУ с ГЦ.

**I – контрольной группы.** ЛУ с ГЦ. Vimentin<sup>+</sup>-клетки (указаны стрелками) локализованы во всех зонах ЛУ. 1 – ГЦ; 2 – МнЗ; 3 – МрЗ.

**II – 1 месяц с момента завершения приема селена.** ЛУ с ГЦ. Количество Vimentin<sup>+</sup>-клеток (указаны стрелками) увеличено во всех зонах ЛУ. 1 – ГЦ; 2 – МнЗ; 3 – МрЗ.

Иммуногистохимическая реакция к Vimentin<sup>+</sup>-клеткам. Ув. ×400/400

В группе, где животные получали селен в течение месяца, количество Vimentin<sup>+</sup>-клеток увеличивалась во всех структурах селезенки. Клетки по форме не отличались от контрольной группы. В ЛУ среднее процентное количество Vimentin<sup>+</sup>-клеток статистически значимо повышалось во всех ее зонах в 1,3 раза ( $p < 0,04$ ) (рисунок 6). Vimentin<sup>+</sup>-клетки заметно преобладали в МнЗ и около артериолы.

В ПМ данные клетки были рассеяны по всей площади, особенно сконцентрированы на границе с КП и увеличены в 1,43 раза ( $p < 0,05$ ) по сравнению с контрольной группой животных (рисунок 6). В КП отмечено повышение Vimentin<sup>+</sup>-клеток на 23% ( $p < 0,0004$ ).

Можно сделать вывод, что поступление селена в течение месяца вызывает морфологические изменения в селезенке. В частности, преобладали ЛУ без ГЦ и, вероятно, по этой причине уменьшен морфометрический показатель – средняя площадь ЛУ. Кроме этого, определялось увеличение толщины ПМ, а также повышение процентного содержания Т-клеток во всех структурах селезенки и ЛК. Скорее всего, данные изменения возникли из-за преобладания клеточного иммунного ответа.

Кроме того, предполагаем, что через месяц с момента завершения приема селена уменьшается количество макрофагов, находящихся в стадии

фагоцитоза, и снижается количество белка р53, а также улучшается пропускная способность артериолы.

### **3.1.2. Морфологическое и иммуногистохимическое исследование селезенки через 2 месяца с момента завершения приема селена**

У опытных животных масса тела крыс незначительно снизилась –  $263 \pm 6,11$  гр в отличие от контрольной группы ( $294 \pm 7,77$  гр); при этом относительно предшествующего срока оставался без заметной динамики.

Напротив, абсолютные и относительные показатели массы селезенки демонстрировали достоверное увеличение. Если в группе контроля масса органа составила  $685,3 \pm 24,26$  мг, что соответствовало 0,233% от массы тела, то в опытной группе она достигла  $866,47 \pm 60,28$  мг, или 0,329% ( $p < 0,04$ ). Кроме того, во внутри-групповой динамике у тех же животных относительная и абсолютная массы органа увеличились в 1,33 раза ( $p < 0,05$ ).

Микроскопическая картина селезенки не отличалась от контрольной группы. Сохранялась структура БП и КП. КП умеренного кровенаполнения. БП окрашена ярче, чем КП (рисунок 7).

ПМ не отличалась от таковой у контрольной группы (рисунок 7). Относительная толщина ПМ увеличилась с  $326,85 \pm 28,38$  мкм до  $451,79 \pm 57,33$  мкм ( $p < 0,04$ ) по сравнению с контрольными животными, при этом наблюдалось усиление базофильной окраски ткани. Относительно предыдущего срока наблюдения показатель оставался стабильным. Рядом с центральной артериолой сохранялось плотное скопление базофильно окрашенных клеток.

Были обнаружены ЛУ как с ГЦ, так и без них. Преимущественно определялись ЛУ без ГЦ. Соотношение узелков без ГЦ к узелкам с ГЦ составляло 1,5:1. В контрольной группе это соотношение – 1:2.

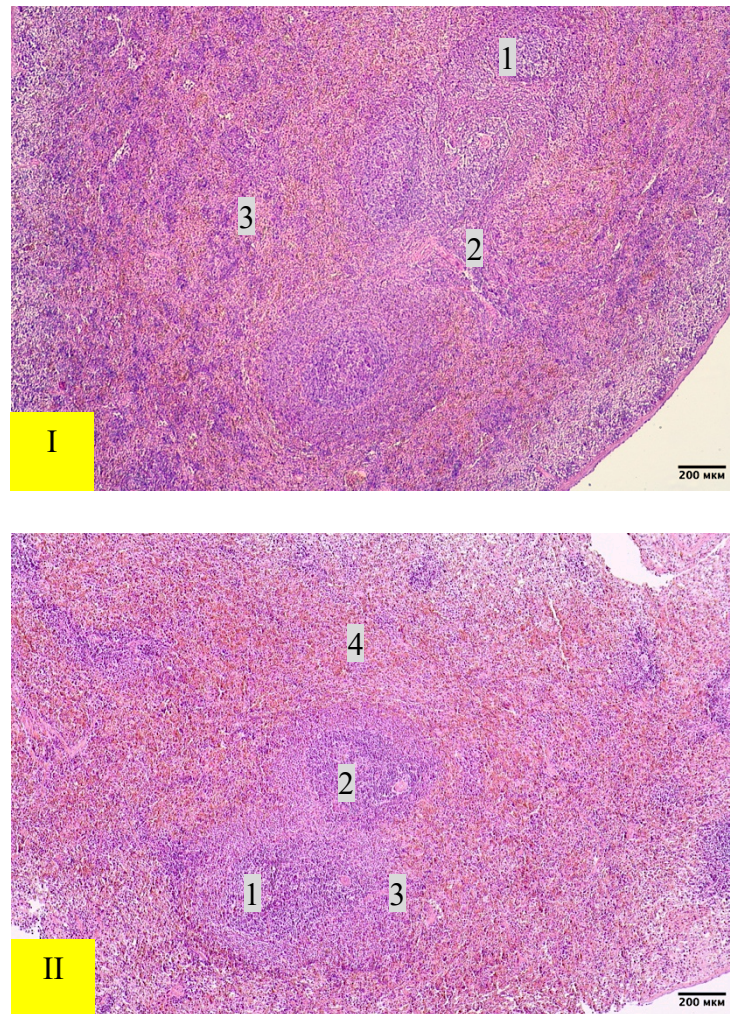


Рисунок 7 – Селезенка крыс.

*I* – контрольной группы. Определили слияние ЛУ между собой. 1 – ЛУ с ГЦ; 2 – ПМ; 3 – КП.

*II* – 2 месяца с момента завершения приема селена. Снижена площадь ЛУ, преобладают ЛУ без ГЦ. 1 – ЛУ с ГЦ; 2 – ЛУ без ГЦ; 3 – ПМ; 4 – КП.

Окрашивание гематоксилином и эозином. Ув.  $\times 100/100$

Морфометрические данные показали, что относительная средняя площадь ЛУ у животных опытной группы достоверно снизилась в 1,4 раза  $27,321 \pm 2,032 \text{ мм}^2$  ( $p < 0,014$ ) по сравнению с контрольной группой ( $37,489 \pm 3,017 \text{ мм}^2$ ). Вместе с тем, относительно предыдущего срока у тех же животных данный показатель, напротив, возрос в 1,4 раза ( $p < 0,05$ ). По своей структуре ЛУ без ГЦ сохранял четкую архитектуру с очерченными границами и не демонстрировал отличий ни от контрольной группы, ни от более раннего срока наблюдения. Площадь ЛУ без ГЦ уменьшилась в 1,4 раза ( $p < 0,04$ ) по сравнению с группой контроля и составляла  $22,587 \pm 2,539 \text{ мм}^2$ .

ЛУ с ГЦ имел правильную округлую форму с отчетливыми границами между собой и КП. ГЦ был представлен светлыми клетками, преимущественно В-лимфоцитами. Площадь ЛУ с ГЦ была  $31,668 \pm 3,115 \text{ мм}^2$ , что в 1,4 раза ниже контрольной группы  $43,867 \pm 3,854 \text{ мм}^2$  и одновременно меньше показателя, выявленного на предыдущем сроке исследования.

Площадь МнЗ, которая окружает ГЦ увеличилась на 23%, также происходило незначительное повышение ее толщины на 23,2% (таблица 5) относительно контрольной группы.

Таблица 5 – Морфометрические показатели структур селезенки контрольной и опытной групп через 2 месяца с момента завершения приема селена

Морфометрические параметры	Контрольная группа	Опытная группа
Площадь МнЗ, $\text{мм}^2$	$6,409 \pm 1,735$	$7,873 \pm 0,768$
Толщина МнЗ, мкм	$77,55 \pm 5,99$	$85,72 \pm 3,01$
Площадь МрЗ, $\text{мм}^2$	$14,701 \pm 1,561$	<b><math>19,861 \pm 1,333^*</math></b>
Толщина МрЗ, мкм	$107,9 \pm 3,83$	<b><math>121,4 \pm 3,8^*</math></b>
Толщина стенки центральной артериолы, мкм	$14,34 \pm 0,75$	<b><math>26,61 \pm 2,61^{**}</math></b>
Внутренний диаметр центральной артериолы, мкм	$20,31 \pm 3,24$	$26,77 \pm 1,27$
ИК	$1,41 \pm 0,46$	$1,99 \pm 4,1$

Примечание: \* $p < 0,05$  – по сравнению с контрольной группой; \*\* $p < 0,005$  – по сравнению с контрольной группой

Параллельно отмечено статистически значимое расширение МрЗ: ее площадь превышала показатели как контрольной группы, так и предыдущего срока наблюдения в 1,4 раза ( $p < 0,03$ ). Толщина МрЗ также умеренно повышена на 13% ( $p < 0,02$ ) относительно контроля и на 28% ( $p < 0,05$ ) по сравнению с предшествующим сроком (таблица 5).

При измерении морфометрических показателей центральной артериолы было выявлено, что ее толщина и внутренний диаметр достоверно увеличены в 1,8 раза ( $p < 0,0005$ ) и на 32% соответственно (таблица 5). При этом ИК незначительно изменен (таблица 5).

Выявлено снижение ЛК –  $1,71 \pm 0,44$ , что в 1,4 раза ниже коэффициента контрольной группы животных.

На ультрамикроскопическом уровне не было обнаружено существенных изменений в БП и в КП по сравнению с контрольной группой и предыдущим сроком наблюдения. КП также была представлена эритроцитами неправильной формы. Между ними располагались макрофаги и плазматические клетки. Также встречались сегментоядерные клетки и сосуды.

В БП выявлялись лимфоциты на разных стадиях созревания. В МнЗ и в МрЗ содержались как темные, так и светлые лимфоциты, лимфобласты, плазматические клетки, макрофаги и эритроциты. Лимфоциты имели неправильную округлую форму, в центре цитоплазмы располагалось крупное ядро с ярко выраженными органоидами по периферии. Ядро овальной вытянутой формы. В ПМ визуализировали плотное скопление лимфоцитов на разных стадиях развития.

У крыс контрольной группы  $CD2^+$ -клетки присутствовали как в КП, так и в БП (рисунок 8). Причем наибольшее их количество определялось в КП, которые преимущественно располагались по периферии синусов и около кровеносных сосудов. Клетки округлой или овальной формы.

В опытной группе животных содержание  $CD2^+$ -клеток в КП увеличилось в 1,5 раза ( $p < 0,0002$ ) по сравнению с контрольной группой. Клетки преимущественно наблюдались в непосредственной близости от венозных синусов.

Кроме этого, было зафиксировано увеличение среднего процентного количества  $CD2^+$ -клеток в ЛУ в 1,7 раза ( $p < 0,002$ ) по сравнению с контрольной группой. Эти клетки, в основном, определялись в МнЗ (рисунок 8).

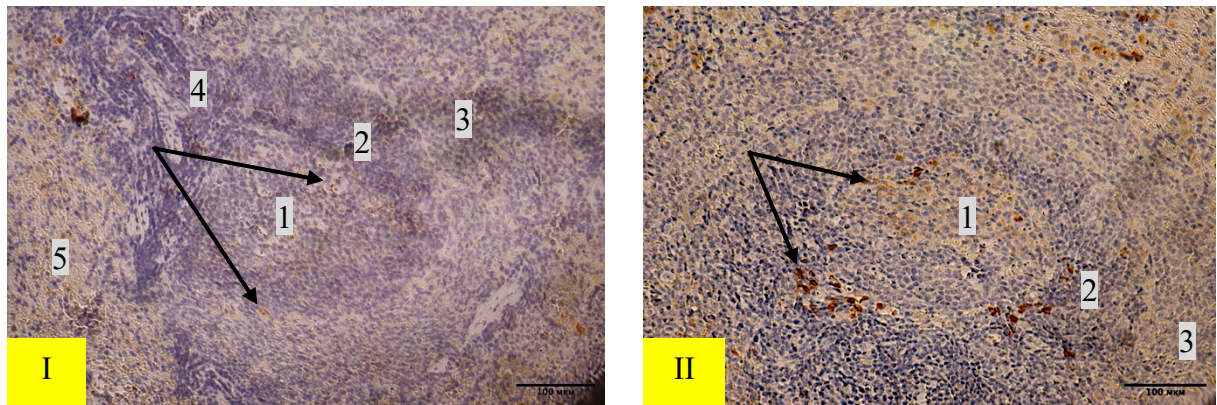


Рисунок 8 – Селезенка крыс. ЛУ с ГЦ.

**I – контрольной группы.** CD2<sup>+</sup>-клетки (указаны стрелками) расположены в единичных количествах во всех зонах ЛУ. 1 – ГЦ; 2 – МнЗ; 3 – МрЗ; 4 – ПМ; 5 – КП.

**II – 2 месяца с момента завершения приема селена.** Количество CD2<sup>+</sup>-клеток (указаны стрелками) увеличено в МнЗ и на границе с МрЗ. 1 – ГЦ; 2 – МнЗ; 3 – МрЗ.

Иммуногистохимическая реакция к CD2<sup>+</sup>-клеткам. Ув. ×400/400

Доля CD2<sup>+</sup>-клеток в ПМ возросла в 1,4 раза ( $p < 0,0009$ ) относительно группы контроля и в 2,2 раза ( $p < 0,01$ ) при сопоставлении с предыдущим сроком исследования. Клетки преимущественно располагались на границе этой структуры, а также вблизи центральной артериолы.

Анализ гистологических препаратов селезенки контрольной группы с использованием иммуногистохимической реакции на CD3<sup>+</sup>-клетки показал их распределение как в БП, так и в КП. В БП CD3<sup>+</sup>-клетки в ПМ формировали многослойные скопления (рисунок 9). В ЛУ клетки преимущественно распределялись в МнЗ и в ГЦ. В КП CD3<sup>+</sup>-клетки были диффузно рассеяны по всей структуре.

В опытной группе процентное содержание CD3<sup>+</sup>-клеток увеличилось во всех структурах селезенки. Общее среднее процентное содержание данных клеток в ЛУ достоверно повышено в 2,4 раза ( $p < 0,0006$ ) по сравнению с животными контрольной группы (рисунок 9). Локализация CD3<sup>+</sup>-клеток была преимущественно отмечена в МнЗ, в МрЗ и в ГЦ. В динамике внутри исследуемой группы их доля в ЛУ без ГЦ увеличилась в 2 раза ( $p < 0,01$ ).

В ПМ содержание клеток увеличилось в 1,7 раза ( $p < 0,0003$ ). CD3<sup>+</sup>-клетки располагались многослойно и плотно друг к другу (рисунок 9).

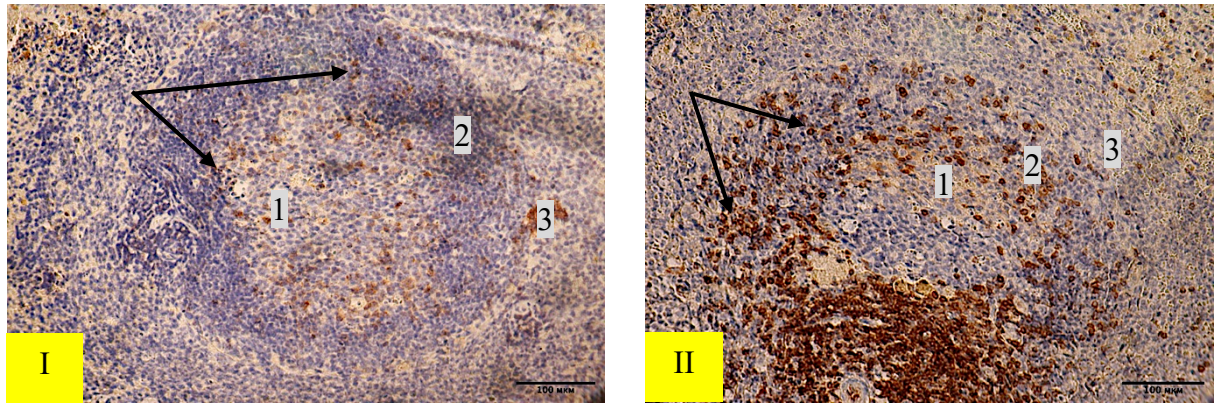


Рисунок 9 – Селезенка крыс. ЛУ с ГЦ.

*I – контрольной группы.* CD3<sup>+</sup>-клетки (указаны стрелками) расположены в ГЦ и в МнЗ. 1 – ГЦ; 2 – МнЗ; 3 – МрЗ.

*II – 2 месяца с момента завершения приема селена.* Увеличено количество CD3<sup>+</sup>-клеток (указаны стрелками) в ЛУ с ГЦ. 1 – ГЦ; 2 – МнЗ; 3 – МрЗ. Иммуногистохимическая реакция к CD3<sup>+</sup>-клеткам. Ув. ×400/400

В КП данные клетки были локализованы возле венозных синусов, и их количество в 1,7 раза ( $p < 0,002$ ) выше, чем в контрольной группе животных.

В контрольной группе CD21<sup>+</sup>-клетки располагались и в БП, и в КП. В ЛУ данные клетки определялись преимущественно в ГЦ и в МрЗ. В ПМ клетки были обнаружены группами и слоями на границе с КП. А в КП рассеяны по всей структуре.

Количество CD21<sup>+</sup>-клеток в селезенке в опытной группе значительно увеличилось как в белой, так и в КП. Выявили увеличение среднего процентного содержания в ЛУ в 1,7 раза ( $p < 0,007$ ) по сравнению с контрольной группой. Наиболее выраженное увеличение наблюдалось в ЛУ без ГЦ, где количество CD21<sup>+</sup>-клеток оказалось в 1,9 раза выше (рисунок 10), а в ЛУ с ГЦ – в 1,5 раза ( $p < 0,05$ ) больше.

В ПМ также было отмечено существенное повышение содержания, что в 1,6 раза ( $p < 0,0006$ ) превышает уровень, наблюдаемый в контрольной группе. В КП процентное содержание CD21<sup>+</sup>-клеток также увеличилось в 1,6 раза ( $p < 0,001$ ).

По сравнению с предшествующим сроком наблюдения отмечено увеличение доли CD21<sup>+</sup>-клеток во всех компартаментах исследуемого органа.

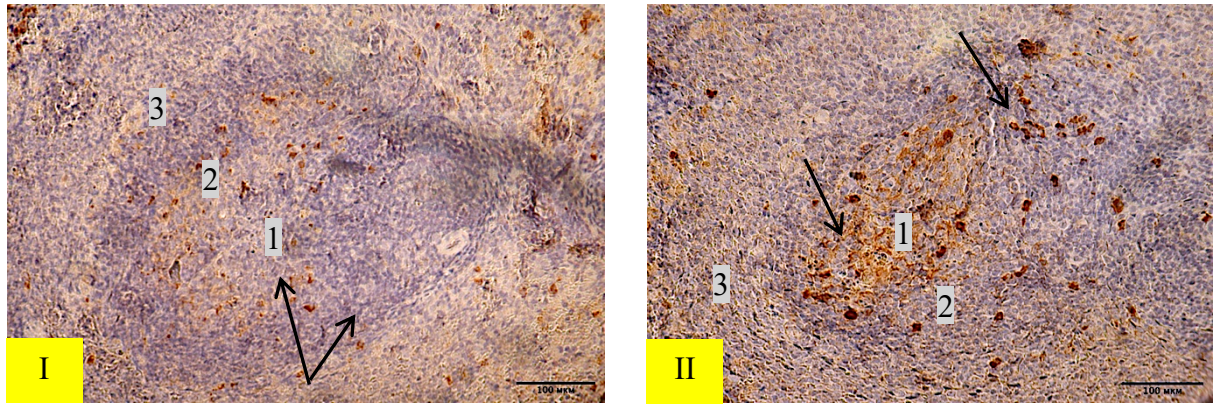


Рисунок 10 – Селезенка крыс. ЛУ с ГЦ.

*I – контрольной группы.* CD21<sup>+</sup>-клетки (указаны стрелками) расположены в ГЦ и в МнЗ. 1 – ГЦ; 2 – МнЗ; 3 – МрЗ.

*II – 2 месяца с момента завершения приема селена.* Увеличено количество CD21<sup>+</sup>-клеток (указаны стрелками) в ГЦ ЛУ. 1 – ГЦ; 2 – МнЗ; 3 – МрЗ.

Иммуногистохимическая реакция к CD21<sup>+</sup>-клеткам. Ув. ×400/400

В контрольной группе CD68<sup>+</sup>-клетки были равномерно распределены во всех морфологических структурах селезенки. В ЛУ данные клетки располагались в ГЦ и определялись единичные макрофаги в МрЗ. В ПМ макрофаги были локализованы по периферии центральной артериолы селезенки и на границе с КП. В КП макрофаги рассеяны диффузно по всей структуре.

Количество CD68<sup>+</sup>-клеток в опытной группе незначительно увеличивалось во всех структурах селезенки. В ЛУ CD68<sup>+</sup>-клетки располагались как в ГЦ, так и в МрЗ и их среднее процентное содержание достоверно увеличивалось в 1,6 раза ( $p < 0,01$ ) по сравнению с контрольной группой, при этом в ЛУ без ГЦ количество было выше, чем в ЛУ с ГЦ. Количество данных клеток в ПМ и в КП также увеличилось в 2,1 раза ( $p < 0,000011$ ) и в 1,92 раза ( $p < 0,0009$ ) соответственно.

При оценке изменений численности CD68<sup>+</sup>-клеток в отдельных структурах селезенки крыс, получавших селен, внутри данной опытной группы по сравнению с предыдущим сроком исследования выявлен прирост их содержания: в ПМ – в 4,2 раза ( $p < 0,05$ ), тогда как в ЛУ с ГЦ – в 2,7 раза ( $p < 0,01$ ).

В контрольной группе p53<sup>+</sup>-клетки обнаруживались во всех структурах органа в незначительном количестве. В БП количество их не велико. В ЛУ данные клетки распределялись преимущественно в ГЦ и зоне мантии. В ПМ p53<sup>+</sup>-клетки обнаруживались возле центральной артериолы и группами на границе с КП.

В опытной группе было зафиксировано увеличение числа p53<sup>+</sup>-клеток в селезенке. Среднее процентное содержание этих клеток в ЛУ оказалось в 2 раза ( $p < 0,0009$ ) выше по сравнению с контрольной группой. В ЛУ без ГЦ количество p53<sup>+</sup>-клеток было повышено в 2,1 раза ( $p < 0,03$ ), а в ЛУ с ГЦ – в 1,6 раза ( $p < 0,03$ ).

В ПМ p53<sup>+</sup>-клетки располагались около центральной артериолы. Их количество увеличилось по всей исследуемой площади и было в 3,1 раза больше контрольной группы. P53<sup>+</sup>-клетки также статистически значимо увеличивались и в КП в 2 раза ( $p < 0,001$ ). Динамический анализ выявил рост доли p53<sup>+</sup>-клеток в ПМ в 2,89 ( $p < 0,01$ ) и в ЛУ с ГЦ – в 2,5 ( $p < 0,01$ ).

При анализе контрольной группы на этом сроке исследования Ki67<sup>+</sup>-клетки визуализировали во всех структурах селезенки. Данные клетки имели округлую форму, образуя местами скопления. В ЛУ клетки были локализованы, в основном, в ГЦ. В ПМ клетки располагались возле центральной артериолы и на границе с КП. В КП они распространялись диффузно, образуя скопления возле венозных синусов.

Количество Ki67<sup>+</sup>-клеток в опытной группе достоверно увеличивалось во всех структурах и зонах. В ЛУ клетки были локализованы в ГЦ многослойно группами и их среднее процентное содержание увеличивалось в 1,5 раза ( $p < 0,0002$ ) по сравнению с контрольной группой животных (рисунок 11). В ЛУ без ГЦ и в ЛУ с ГЦ количество данных клеток было повышено в 1,5 раза ( $p < 0,03$ ) и в 1,6 раза ( $p < 0,03$ ) соответственно. Внутри данной опытной группы по сравнению с предыдущим сроком исследования выявлено нарастание доли Ki67<sup>+</sup>-клеток в ЛУ с ГЦ в 2,1 раза ( $p < 0,05$ ). В ПМ количество Ki67<sup>+</sup>-клеток увеличивалось лишь на 12% ( $p < 0,05$ ). В КП также наблюдалось

увеличение их количества на 20,5% ( $p < 0,0002$ ) по сравнению с контрольной группой.

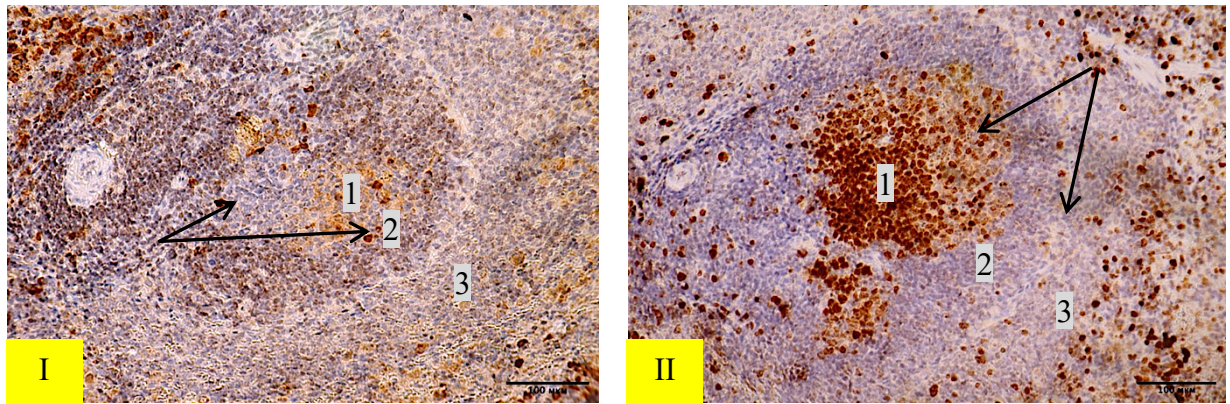


Рисунок 11 – Селезенка крыс. ЛУ с ГЦ.

*I* – контрольной группы. Ki67<sup>+</sup>-клетки (указаны стрелками) расположены в ГЦ.

1 – ГЦ; 2 – МнЗ; 3 – МрЗ.

*II* – 2 месяца с момента завершения приема селена. Увеличено количество Ki67<sup>+</sup>-клеток (указаны стрелками) в ГЦ ЛУ селезенки. 1 – ГЦ; 2 – МнЗ; 3 – МрЗ.

Иммуногистохимическая реакция к Ki67<sup>+</sup>-клеткам. Ув.  $\times 400/400$

Количество Vimentin<sup>+</sup>-клеток в контрольной группе крыс не отличалось от контрольной группы предыдущего возраста. Встречались клетки округлой и нитевидной формы, а также клетки с отростками. Больше всего данные клетки обнаруживались в КП. В ЛУ клетки располагались во всех зонах равномерно. Vimentin<sup>+</sup>-клетки были локализованы как возле артериолы, так и на границе с КП.

Количество Vimentin<sup>+</sup>-клеток в ПМ в опытной группе увеличилось в 2,2 раза ( $p < 0,03$ ). Клетки были расположены плотно, многослойно и встречались по всей исследуемой структуре. Число указанных клеток в ПМ оказалось выше в 1,5 раза ( $p < 0,05$ ) по сравнению с предыдущим сроком исследования.

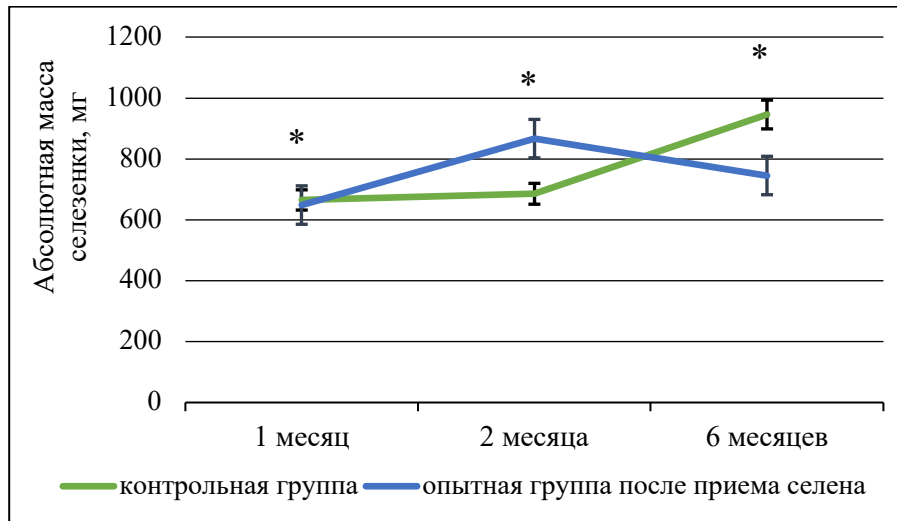
В ЛУ среднее процентное количество данных клеток также повысилось в 1,5 раза ( $p < 0,00005$ ) по сравнению с контрольной группой. Установлено увеличение Vimentin<sup>+</sup>-клеток в ЛУ без ГЦ в 1,5 ( $p < 0,03$ ) и в ЛУ с ГЦ – в 1,4 раза ( $p < 0,007$ ) по сравнению с контрольной группой. Vimentin<sup>+</sup>-клетки

обнаруживались во всех зонах ЛУ. Также Vimentin<sup>+</sup>-клетки достоверно увеличились в КП в 1,6 раза ( $p < 0,002$ ).

Таким образом, изменялся клеточный состав селезенки через 2 месяца с момента завершения приема селена. В частности, увеличилось количество CD2<sup>+</sup>, CD3<sup>+</sup> и CD21<sup>+</sup>-клеток, что привело к увеличению процентного содержания Ki67<sup>+</sup>-клеток в зонах их локализации. Предполагаем, что через 2 месяца с момента завершения приема селена возникло преобладание гуморального иммунного ответа. На это также указывает снижение ЛК, преобладание CD21<sup>+</sup>-клеток во всех структурах селезенки и появление плазматических клеток, обнаруженные на ультрамикроскопическом уровне. Кроме того, отмечено увеличение числа макрофагов, находящихся на стадии фагоцитоза, а также возросло количество белка p53 и клеток мезенхимального происхождения. Возможно, эти изменения связаны с усилением активности иммунного ответа.

### **3.1.3. Морфологическое и иммуногистохимическое исследование селезенки через 6 месяцев с момента завершения приема селена**

Масса тела самцов в опытной группе ( $317,3 \pm 14,24$  гр) незначительно снизилась на 18,6% ( $p < 0,013$ ) по сравнению с контрольной группой ( $390 \pm 9,08$  гр). При сравнении массы тела с предыдущим сроком наблюдения выявлено ее увеличение в 1,4 раза ( $p < 0,05$ ). Абсолютная масса селезенки также уменьшилась –  $745,3 \pm 3,2$  мг ( $p < 0,004$ ), что на 21,2% меньше по сравнению с контрольной группой ( $945,65 \pm 12,55$  мг) (рисунок 12). Относительная масса селезенки контрольной группы составляла 0,242%, а через 6 месяцев с момента завершения приема селена – 0,235%. Сравнивая с предыдущем сроком исследования, относительная масса снижена в 1,4 раза.



Примечание: \* $p < 0,05$  – по сравнению с контрольной группой

Рисунок 12 – Изменение абсолютной массы селезенки крыс-самцов контрольной и опытной групп на разных сроках с момента завершения приема селена в питьевой форме

Анализируя микроскопическую картину исследуемого органа контрольной группы, отмечалось, что БП имела нечеткие и размытые границы с КП, что косвенно указывает на развитие возрастной инволюции БП (рисунок 13). Между зонами ЛУ также границы размыты и сливались между собой. КП содержала умеренное количество эритроцитов и большое количество клеток с выраженной цитоплазмой, вероятно, это макрофаги. Под капсулой селезенки отмечена разреженность клеток.

Толщина ПМ в контрольной группе составила  $360,14 \pm 18,12$  мкм. Вокруг центральной артериолы селезенки выявлены клетки с выраженной светлой широкой цитоплазмой, в центре которой находили крупное ядро.

В опытной группе микроскопическая картина селезенки отличалась от контрольной группы. Границы структур БП четкие и ровные (рисунок 13). Определялось «слияние» ЛУ между собой, а также ПМ друг с другом. В КП выявлялись крупные сосуды и выраженное количество венозных синусов.

Относительная толщина ПМ достоверно увеличилась на 17% по сравнению с контрольной группой и составила  $421,63 \pm 21,86$  мкм. Около центральной артериолы выявлялись единичные клетки со светлой широкой цитоплазмой.

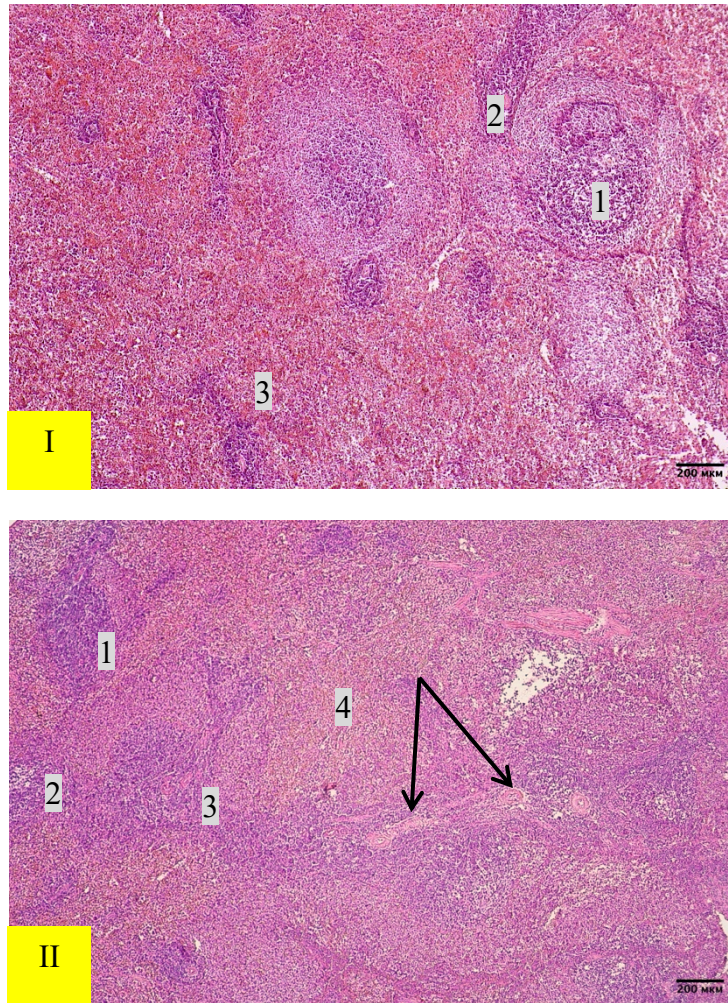


Рисунок 13 – Селезенка крыс.

**I – контрольной группы.** Признаки возрастных изменений БП селезенки. Увеличенные в площади ЛУ с нечеткими границами между ее зонами и между КП.

1 – ЛУ с ГЦ; 2 – ПМ; 3 – КП.

**II – 6 месяцев с момента завершения приема селена.** Слияние ПМ между собой.

Множество артериол (указаны стрелками). Четкие границы ЛУ.

1 – ЛУ без ГЦ; 2 – ЛУ с ГЦ; 3 – ПМ; 4 – КП.

Окрашивание гематоксилином и эозином. Ув.  $\times 100/100$

Соотношение ЛУ без ГЦ к ЛУ с ГЦ в исследуемой опытной группе составило 1:1,14. В контрольной группе это соотношение составило 1:3,5, что указывает на выраженное преобладание ЛУ с ГЦ.

При подсчете морфометрических показателей селезенки в опытной группе животных отмечено незначительное снижение общей средней площади ЛУ на 12% по сравнению с контрольной группой. При этом относительно предшествующего срока наблюдения данный параметр был в 1,5 раза ( $p < 0,05$ ) больше. Отмечалось снижение площади как у ЛУ без ГЦ, так и у ЛУ с ГЦ с

33,659±2,091 мм<sup>2</sup> на 26,054±1,307 мм<sup>2</sup> (p<0,05) и с 47,339±4,406 мм<sup>2</sup> на 42,079±0,789 мм<sup>2</sup> соответственно. В опытной исследуемой группе ЛУ сохраняли округлую форму.

МнЗ БП селезенки животных контрольной группы имела более рыхлое строение. Отсутствовало плотное расположение клеток между собой. Площадь данной зоны ЛУ составляла 8,658±0,268 мм<sup>2</sup>, а толщина – 96,62±5,35 мкм (таблица 6). МрЗ также имела рыхлую структуру, в которой клетки содержали выраженную светлую цитоплазму с базофильным ядром в центре.

Таблица 6 – Морфометрические показатели структур селезенки контрольной и опытной групп крыс через 6 месяцев с момента завершения приема селена

Морфометрические параметры	Контрольная группа	Опытная группа
Площадь МнЗ, мм <sup>2</sup>	8,658±0,268	<b>7,259±0,199*</b>
Толщина МнЗ, мкм	96,62±5,35	89,176±3,78
Площадь МрЗ, мм <sup>2</sup>	21,851±1,880	20,185±0,529
Толщина МрЗ, мкм	125,3±5,65	125,15±6,67
Толщина стенки центральной артериолы, мкм	7,59±0,42	<b>17,36±1,27**</b>
Внутренний диаметр центральной артериолы, мкм	8,132±1,25	<b>16,89±2,26*</b>
ИК	1,86±0,6	2,06±1,1

Примечание: \*p<0,05 – по сравнению с контрольной группой; \*\*p<0,005 – по сравнению с контрольной группой

В опытной группе крыс в МнЗ было сохранено плотное скопление клеток, и отсутствовали признаки дистрофии БП. Площадь и толщина МрЗ не отличались от контрольной группы аналогичного возраста, а МнЗ – снижены на 17% (таблица 6). При сопоставлении с предыдущим сроком наблюдения значения морфометрических показателей оставалось стабильным.

При измерении морфометрических параметров центральной артериолы селезенки в опытной группе животных определили, что толщина стенки

сосуда увеличена в 2,3 раза ( $p < 0,001$ ) по сравнению с контрольной группой (таблица 6) и в 1,5 раза ( $p < 0,001$ ) меньше при динамическом наблюдении с предшествующим сроком. Также происходило достоверное увеличение внутреннего диаметра с  $8,13 \pm 1,25$  мкм до  $16,8 \pm 2,2$  мкм ( $p < 0,03$ ) сравнивая с группой контроля, однако оставался меньше показателя предшествующего срока в 1,6 раза ( $p < 0,001$ ). При этом ИК увеличивался незначительно на 11% (таблица 6). В опытной группе самцов ЛК изменялся незначительно с  $2,26 \pm 1,3$  до  $2,48 \pm 1,4$ .

Оценивая ультраструктуру селезенки у крыс контрольной группы, отметили широкую цитоплазму у лимфоцитов с содержанием в них митохондрий до 8 штук и липидных включений (рисунок 14). Ядро в данных клетках расположено в центре с преобладанием эухроматина над гетерохроматином, который визуализировали по периферии данного органоида. В КП определялись макрофаги в процессе фагоцитоза и расщепления клеточных элементов с наличием вакуолей и гранул.

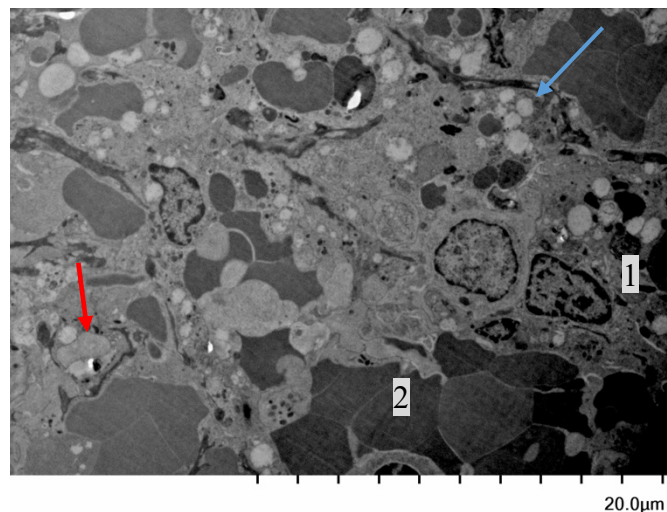


Рисунок 14 – Ультраструктура селезенки крысы контрольной группы. Макрофаги в стадии фагоцитоза (указаны красной стрелкой). Множество липидных капель (указаны синей стрелкой). 1 – светлый лимфоцит; 2 – эритроцит. Ув.  $\times 1\ 000$

На ультрамикроскопическом уровне выраженных изменений в опытной группе крыс через 6 месяцев с момента завершения приема селена по сравнению с контрольной группой не выявлено. В БП определялись темные и

светлые лимфоциты, в центре которых располагалось крупное ядро и узкая цитоплазма. В ядре клеток гетерохроматин был сконцентрирован в виде узкого ободка на его периферии. В цитоплазме присутствовали различные органоиды, среди которых хорошо различимы митохондрии. Количество последних достигло 4, их мембрана двойная с хорошо выраженными кристами. Плазматические клетки были локализованы преимущественно в ГЦ, и определялись единичные в КП с ядром на апикальной части и на противоположной стороне ЭПС и комплекса Гольджи. КП представлена эритроцитами и макрофагами.

Иммуногистохимический анализ, проведенный с целью количественной оценки содержания  $CD2^+$ -клеток в различных морфофункциональных структурах селезенки, выявил значительные различия между контрольной и опытной групп. В КП контрольной группы эти клетки формировали многослойные скопления преимущественно вокруг венозных синусов и трабекул. В ПМ  $CD2^+$ -клетки выявлялись как вблизи центральной артериолы, так и на границе с КП.

В опытной группе в КП наблюдалось достоверное снижение содержания  $CD2^+$ -клеток на 15,1% ( $p < 0,04$ ). В ЛУ их среднее процентное количество в данной группе достоверно снизилось в 1,7 раза ( $p < 0,002$ ). Определялись единичные клетки в ГЦ и в МнЗ. В ЛУ без ГЦ и в ЛУ с ГЦ процентное содержание данных клеток снизилось в 1,7 раза ( $p < 0,00035$ ) и в 2,2 раза ( $p < 0,0304$ ) по сравнению с контрольной группой. Процентное содержание  $CD2^+$ -клеток в ПМ достоверно ниже на 16,1% ( $p < 0,009$ ).

По сравнению с предшествующим сроком наблюдения доля  $CD2^+$ -клеток уменьшилась во всех компартментах селезенки, особенно в ЛУ с ГЦ в 3 раза ( $p < 0,04$ ) и в ЛУ без ГЦ в 2,6 раза ( $p < 0,04$ ).

Исследуя гистологические препараты контрольной группы животных, отмечалось плотное многослойное скопление  $CD3^+$ -клеток по всей площади ПМ. В ЛУ данные клетки в основном определялись в ГЦ и в МнЗ.  $CD3^+$ -

клетки в КП располагались на границе с ПМ и с МрЗ ЛУ, а также были выявлены скопления возле венозных синусов.

В опытной группе крыс было зафиксировано выраженное количественное изменение содержания  $CD3^+$ -клеток. В ПМ их количество достоверно увеличилось в 1,7 раза ( $p < 0,001$ ). По сравнению с контрольной группой крыс в данной структуре клетки располагались очень близко друг к другу, что затрудняло различие их границ (рисунок 15). При межсроковом сравнении доля этих клеток оставалась увеличенной в 1,3 раза.

В ЛУ также возникло достоверное увеличение среднего процентного количества этих клеток в 1,5 раза ( $p < 0,0008$ ), анализируя с контрольной группой. Клетки преимущественно увеличились как в ГЦ, так и в МнЗ. В ЛУ без ГЦ  $CD3^+$ -клетки повысились в 1,34 раза ( $p < 0,0187$ ), а в ЛУ с ГЦ – в 1,65 раза ( $p < 0,0378$ ).

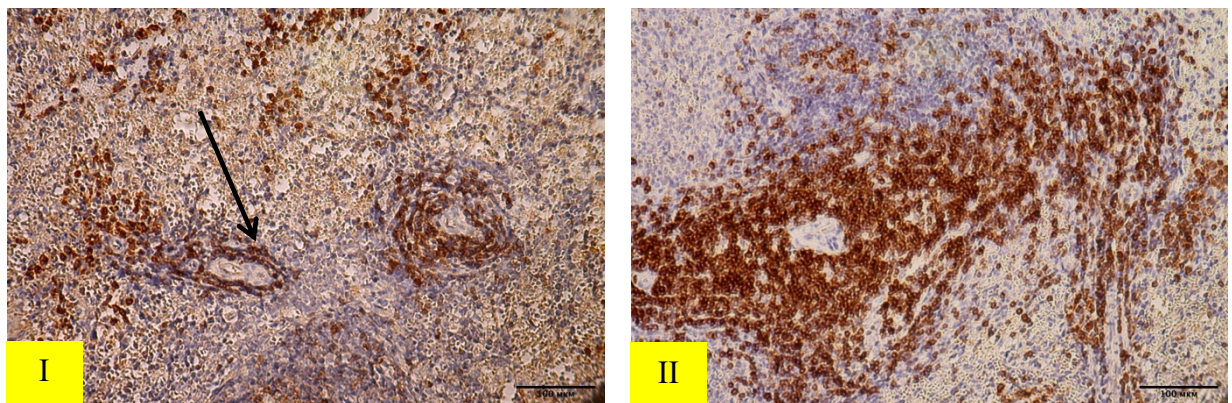


Рисунок 15 – Селезенка крыс. ПМ.

*I – контрольной группы.  $CD3^+$ -клетки расположены в ПМ (указаны стрелкой).  
II – 6 месяцев с момента завершения приема селена. Увеличено количество  $CD3^+$ -клеток в ПМ. Иммуногистохимическая реакция к  $CD3^+$ -клеткам. Ув.  $\times 400/400$*

$CD21^+$ -клетки в контрольной группе были локализованы преимущественно в КП. Эти клетки в КП образовывали скопления на границе с МрЗ ЛУ.  $CD21^+$ -клетки были овальной или округлой формы со светлым ядром в центре. В ПМ исследуемые клетки располагались около центральной артериолы и на границе с КП.

В опытной группе в селезенке наблюдалось снижение процентного содержания CD21<sup>+</sup>-клеток во всех структурах органа. В КП их количество достоверно уменьшилось на 22% ( $p < 0,00432$ ) по сравнению с контрольной группой животных.

Среднее процентное количество данных клеток в ЛУ снизилось в 1,4 раза ( $p < 0,0000411$ ), при этом в ЛУ с ГЦ – в 1,6 раза ( $p < 0,00793$ ) меньше по сравнению с контрольной группой. Клетки снизились преимущественно в МрЗ. В ПМ количество CD21<sup>+</sup>-клеток в 2,2 раза ( $p < 0,0001817$ ) ниже, чем в контрольной группе. При внутригрупповом сравнении установлено уменьшение количества CD21<sup>+</sup>-клеток во всех структурах селезенки, особенно в ЛУ без ГЦ в 2,73 раза ( $p < 0,01$ ).

В контрольной группе крыс макрофаги выявлялись во всех отделах селезенки. В КП исследуемые клетки образовывали скопления, которые визуализировались возле венозных синусов и трабекул, в БП – по всей площади ПМ и в МнЗ, и в ГЦ ЛУ (рисунок 16).

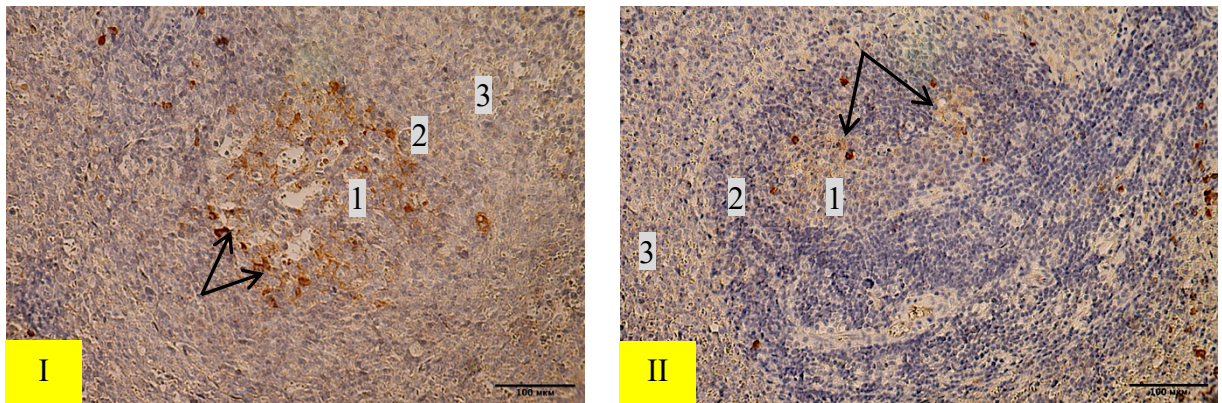


Рисунок 16 – Селезенка крыс. ЛУ с ГЦ.

**I – контрольной группы.** CD68<sup>+</sup>-клетки расположены в ГЦ ЛУ селезенки (указаны стрелками). 1 – ГЦ; 2 – МнЗ; 3 – МрЗ.

**II – 6 месяцев с момента приема селена.** Количество CD68<sup>+</sup>-клеток (указаны стрелками) снижено в ГЦ. 1 – ГЦ; 2 – МнЗ; 3 – МрЗ.

Иммуногистохимическая реакция к CD68<sup>+</sup>-клеткам. Ув.  $\times 400/400$

В опытной группе животных количество CD68<sup>+</sup>-клеток снизилось в БП, но в КП незначительно повысилось. Анализируя содержание CD68<sup>+</sup>-клеток в ПМ, опытная группа не продемонстрировала значительных

изменений в сравнении с контрольной группой. В ЛУ среднее процентное количество исследуемых клеток ниже на 28% ( $p < 0,029$ ), чем в контрольной группе. Клетки также располагались в ГЦ и в МрЗ (рисунок 16).

Динамический анализ внутри опытной группы выявил уменьшение доли CD68<sup>+</sup>-клеток во всех компартментах селезенки, особенно в ЛУ без ГЦ – в 2,8 раза ( $p < 0,05$ ) и в ЛУ с ГЦ – в 2 раза ( $p < 0,05$ ).

В селезенке крыс контрольной группы p53<sup>+</sup>-клетки выявлялись в незначительном количестве. В ЛУ клетки располагались в ГЦ и в МнЗ. В ПМ p53<sup>+</sup>-клетки были локализованы как по всей ее площади, так и возле центральной артериолы, и на границе с КП. В КП p53<sup>+</sup>-клетки формировали скопления, больше всего возле венозных синусов и по площади ПМ.

Через 6 месяцев с момента завершения приема селена в селезенке крыс содержание p53<sup>+</sup>-клеток имело невыраженные изменения во всех структурах. В ЛУ количество данных клеток оставалось стабильным в ЛУ без ГЦ, однако в ЛУ с ГЦ выявили их умеренный рост. В КП выявлено увеличение p53<sup>+</sup>-клеток на 33,8% ( $p < 0,04$ ). При сравнительной оценке временных интервалов после поступления селена внутри исследуемой группы количество p53<sup>+</sup>-клеток было снижено во всех структурах БП селезенки: в ЛУ без ГЦ – в 2 раза ( $p < 0,05$ ), в ЛУ с ГЦ – в 1,9 раза ( $p < 0,05$ ), в ПМ – в 1,8 раза ( $p < 0,001$ ).

В КП селезенки в контрольной группе Ki67<sup>+</sup>-клетки определялись по всей структуре, но местами они образовывали скопления. В ЛУ клетки преимущественно располагались по всей площади ГЦ, а также их определяли в МнЗ и в МрЗ. В ПМ пролиферирующие клетки были локализованы непосредственно около артериолы.

В опытной группе крыс в КП доля Ki67<sup>+</sup>-клеток увеличилась на 18% ( $p < 0,035$ ) по сравнению с контрольной группой. Клетки преимущественно были сконцентрированы возле венозных синусов и трабекул. Среднее процентное количество Ki67<sup>+</sup>-клеток в ЛУ в опытной группе достоверно ниже на 19% ( $p < 0,05$ ) по сравнению с группой контроля. При этом отмечалось

статистически значимое снижение пролиферирующих клеток в ЛУ с ГЦ в 1,4 раза ( $p < 0,00017$ ) (рисунок 17).

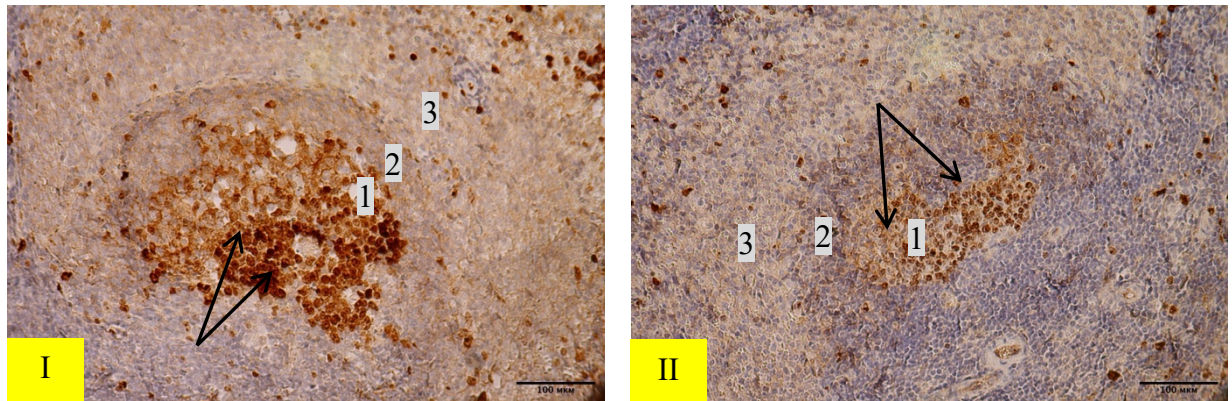


Рисунок 17 – Селезенка крыс. ЛУ с ГЦ.

*I – контрольной группы.* Ki67<sup>+</sup>-клетки расположены в ГЦ ЛУ селезенки (указаны стрелками). 1 – ГЦ; 2 – МнЗ; 3 – МрЗ.

*II – 6 месяцев с момента приема селена.* Количество Ki67<sup>+</sup>-клеток (указаны стрелками) снижено в ГЦ. 1 – ГЦ; 2 – МнЗ; 3 – МрЗ.

Иммуногистохимическая реакция к Ki67<sup>+</sup>-клеткам. Ув.  $\times 400/400$

В ЛУ без ГЦ содержание Ki67<sup>+</sup>-клеток осталось неизменным. По сравнению с предыдущим сроком исследования доля Ki67<sup>+</sup>-клеток в ЛУ без ГЦ и в ЛУ с ГЦ уменьшено в 2,6 раза ( $p < 0,01$ ,  $p < 0,01$ ). В опытной группе в ПМ количество Ki67<sup>+</sup>-клеток достоверно повысилось на 32,3% ( $p < 0,05$ ).

Vimentin<sup>+</sup>-клетки в контрольной группе хаотично располагались по всей площади среза. Эти клетки имели различные размеры и формы от округлых до нитевидных. В ПМ они располагались по всей ее площади и имитировали стенку сосуда.

В исследуемой группе животных процентное количество Vimentin<sup>+</sup>-клеток достоверно увеличилось в 1,4 раза ( $p < 0,0000086$ ). Среднее процентное количество в ЛУ также повысилось в 1,7 раза ( $p < 0,00019$ ), чем в контрольной группе. В ЛУ без ГЦ и в ЛУ с ГЦ Vimentin<sup>+</sup>-клетки увеличились в 2 раза ( $p < 0,0287$ ) и в 1,7 раза ( $p < 0,011$ ) выше контрольной группы (таблица 7). В ПМ значимых изменений в количестве Vimentin<sup>+</sup>-клеток не наблюдалось.

Таким образом, в контрольной группе крыс к концу срока наблюдения (возраст крыс составлял 9 месяцев) были выявлены признаки дезорганизации

БП селезенки, которые включают в себя стертость границ между БП и КП, увеличенную площадь ЛУ и уменьшение толщины ПМ. Кроме этого, отметили разреженность клеток под капсулой селезенки.

В опытной группе через 6 месяцев с момента завершения приема селена, в отличие от контрольной, признаки возрастной инволюции БП селезенки выражены в меньшей степени. На ультрамикроскопическом уровне значимых изменений не наблюдалась. Отметили снижение количества CD2<sup>+</sup>-, CD21<sup>+</sup>- и CD68<sup>+</sup>-клеток, а количество CD3<sup>+</sup>-, Vimentin<sup>+</sup>- и Ki67<sup>+</sup>-клеток, наоборот, увеличены.

Таблица 7. Динамика иммуногистохимических изменений в структуре селезенки на разных сроках с момента завершения поступления селена, %.

<i>Структура селезенки</i>	<b>Срок воздействия</b>	<b>Группа крыс</b>	<b>Маркер к CD2</b>	<b>Маркер к CD3</b>	<b>Маркер к CD21</b>	<b>Маркер к CD68</b>	<b>Маркер к p53</b>	<b>Маркер к Ki67</b>	<b>Маркер к Vimentin</b>
<i>ЛУ</i>	через 1 месяц	контрольная	5,86±0,23	8,84±0,43	7,6±0,13	5,74±0,53	6,42±0,59	9,72±0,54	9,71±0,99
		селен	7,17±0,35 p<0,01	16,25±1,46 p<0,006	6,29±0,77	3,76±0,43 p<0,02	4,32±0,33 p<0,02	9,34±0,39	12,33±0,46 p<0,04
	через 2 месяца	контрольная	5,04±0,52	9,41±0,29	8,71±0,56	5,41±0,69	5,06±0,44	11,41±0,58	8,3±0,45
		селен	8,59±0,69 p<0,002	22,31±1,76 p<0,0006	14,36±1,37 p<0,007	8,65±0,47	9,63±0,55 p<0,0009	17,33±0,72 p<0,0002	12,63±0,72 p<0,00005
	через 6 месяцев	контрольная	6,27±0,42	11,57±0,96	10,31±0,44	5,88±0,59	3,93±0,27	8,19±0,63	9,13±1,02
		селен	3,68±0,41 p<0,002	17,02±1,22 p<0,0008	7,12±0,39 p<0,000041	4,23±0,62 p<0,03	4,71±0,48	6,65±0,26 p<0,05	15,82±0,66 p<0,00019
<i>ЛУ без ГЦ</i>	через 1 месяц	контрольная	6,04±0,34	8,62±0,79	10,59±0,73	4,96±0,34	4,47±0,68	7,76±0,75	8,14±0,07
		селен	7,89±0,33 p<0,04	12,63±1,34	8,25±0,086 p<0,02	4,07±0,95	4,35±0,63	10,29±0,61 p<0,03	12,35±0,97
	через 2 месяца	контрольная	6,28±0,25	9,76±0,24	9,45±0,72	5,83±1,17	3,97±0,28	11,6±1,11	9,58±0,2
		селен	9,49±1,05 p<0,03	25,5±0,9 p<0,03	17,75±1,31	9,56±0,5 p<0,03	8,44±0,99 p<0,03	16,83±0,7 p<0,03	14,88±0,91 p<0,03
	через 6 месяцев	контрольная	6,67±0,26	12,06±0,84	10,59±0,73	5,88±0,92	3,93±0,42	6,07±0,43	9,05±1,14
		селен	3,71±0,32 p<0,00035	16,2±1,98 p<0,02	6,51±0,68 p<0,029	3,39±0,44	4,17±1,27	6,54±0,57	17,36±0,44 p<0,03
<i>ЛУ с ГЦ</i>	через 1 месяц	контрольная	5,59±0,27	9,06±0,47	10,08±0,58	6,34±0,44	7,03±0,6	10,69±0,39	9,76±0,55
		селен	6,79±0,35	19,67±1,46 p<0,05	7,6±0,36 p<0,1	3,91±0,84 p<0,02	4,29±0,39	8,37±0,54 p<0,003	11,88±0,91
	через 2 месяца	контрольная	5,97±0,47	8,93±0,54	8,15±0,76	5,12±0,39	6,14±0,44	11,22±0,57	8,79±0,65
		селен	8,08±0,72 p<0,04	18,04±2,04	12,57±0,97 p<0,05	7,76±0,5	10,56±0,72 p<0,03	17,83±1,29 p<0,03	12,03±0,59 p<0,007

<i>ПМ</i>	через 6 месяцев	контрольная	5,72±0,93	10,95±1,98	10,08±0,59	5,88±0,93	3,93±0,39	9,41±0,56	9,18±1,53	
		селен	2,63±0,13 p<0,03	18,06±0,16 p<0,04	7,604±0,37 p<0,0079	5,41±0,68	5,64±0,46 p<0,032	6,9±0,36 p<0,00017	15,46±1,16 p<0,011	
	через 1 месяц	контрольная	8,95±1,54	12,18±0,84	12,14±0,67	8,97±0,77	8,35±0,77	8,59±0,57	8,75±0,36	
		селен	5,13±0,43 p<0,05	18,13±0,74 p<0,00006	8,45±0,83 p<0,002	3,36±0,34 p<0,00001	4,76±0,28 p<0,003	13,17±1,18 p<0,004	12,5±0,95 p<0,05	
	через 2 месяца	контрольная	8,24±0,59	10,74±0,8	9,77±0,75	6,71±0,72	4,47±0,5	13,68±0,57	8,16±0,91	
		селен	11,53±0,46 p<0,0009	18,48±1,22 p<0,0003	15,55±1,03 p<0,0006	13,97±0,35 p<0,000011	13,76±0,75	15,25±0,38 p<0,05	18,31±2,47 p<0,03	
	через 6 месяцев	контрольная	7,66±0,41	12,96±0,91	14,89±1,001	8,44±0,36	6,25±0,46	8,06±0,45	14,59±0,43	
		селен	6,43±0,25 p<0,009	22,27±1,41 p<0,000002	6,73±0,44 p<0,0002	8,86±0,52	7,7±0,22 p<0,014	10,66±0,87 p<0,05	14,57±1,4	
	<i>КП</i>	через 1 месяц	контрольная	9,11±0,36	9,07±0,35	12,79±0,34	8,1±0,39	8,68±0,3	15,73±0,47	9,31±0,37
			селен	6,2±0,35 p<0,0001	10,53±0,6 p<0,05	7,82±0,32 p<6,844e-10	5,67±0,25 p<0,000022	5,21±0,27 p<2,03e-10	9,39±0,03 p<2,29e-10	13,25±0,54 p<0,0004
		через 2 месяца	контрольная	7,69±0,4%	8,45±0,56	10,49±0,37	6,75±0,43	5,07±0,25	13,51±0,45	10,77±1,12
			селен	11,52±0,69 p<0,0002	14,6±0,5 p<0,002	16,85±0,69 p<1,521e-8	12,94±0,89 p<0,0009	10,06±0,27 p<7,692e-7	16,28±0,49 p<0,0002	16,99±0,86 p<0,002
через 6 месяцев		контрольная	8,69±0,55	11,42±0,51	15,39±0,79	7,56±0,35	6,44±0,63	11,89±0,63	12,25±0,5	
		селен	7,38±0,28 p<0,04	13,58±0,68 p<0,0212	12,05±0,42 p<0,00432	8,72±0,87	8,61±0,37 p<0,04	13,97±0,5 p<0,035	17,57±0,59 p<0,000009	

## **3.2. Морфологическая картина селезенки после инъекции этилкарбамата**

### **3.2.1. Морфологическое и иммуногистохимическое исследование селезенки через месяц после инъекции этилкарбамата**

Однократная инъекция ЭК сопровождалась достоверным уменьшением массы тела у крыс опытной группы до  $190,33 \pm 8,84$  гр ( $p < 0,022$ , снижение относительно контроля в 1,5 раза). Параллельно уменьшились показатели селезенки: абсолютная масса –  $334,8 \pm 40,6$  мг ( $p < 0,028$ ), относительная – 0,18%.

Микроскопическая картина селезенки опытной группы отличалась от группы контроля. Отметим следующие различия: слияние ЛУ между собой и между ПМ, также они имели неправильную вытянутую форму. Кроме этого, было выявлено увеличение количества ЛУ с ГЦ, соответственно отношение ЛУ без ГЦ к ЛУ с ГЦ составило 1:1,33. Границы между всеми структурами селезенки хорошо различимы, однако, в ЛУ все зоны просматривались нечетко. КП сохраняла свою структуру.

При подсчете морфометрических показателей было выявлено, что в опытной группе происходит незначительное повышение общей средней площади ЛУ, достигая значения в  $26,82 \pm 2,1$  мм<sup>2</sup>. При этом площадь ЛУ без ГЦ увеличена –  $31,135 \pm 2,71$  мм<sup>2</sup> ( $p < 0,0168$ ), что в 1,4 раза больше, а площадь ЛУ с ГЦ, наоборот, снижена –  $21,897 \pm 1,13$  мм<sup>2</sup>, что в 1,5 раза меньше, чем показатели площадей контрольной группы. Однако, площадь ГЦ увеличена в 1,4 раза, достигая значения  $3,69 \pm 0,25$  мм<sup>2</sup>.

В опытной группе крыс площадь и толщина МнЗ достоверно повысились в 1,49 раза ( $p < 0,02$ ) и в 1,3 раза ( $p < 0,0232$ ) соответственно (таблица 8). Выраженных изменений в площади и в толщине МрЗ не отмечено.

Таблица 8 – Морфометрические показатели структур селезенки контрольной и опытной групп через месяц после инъекции этилкарбамата

Морфометрические параметры	Контрольная группа	Опытная группа
Площадь МнЗ, мм <sup>2</sup>	6,25±0,87	<b>9,16±0,77*</b>
Толщина МнЗ, мкм	82,1±10,1	<b>106,21±3,35*</b>
Площадь МрЗ, мм <sup>2</sup>	20,73±2,55	18,94±1,7
Толщина МрЗ, мкм	125,23±8,34	111,78±5,17
Толщина стенки центральной артериолы, мкм	11,58±0,72	<b>17,84±0,665**</b>
Внутренний диаметр центральной артериолы, мкм	12,58±1,75	<b>7,71±0,69*</b>
ИК	1,84±0,82	<b>4,63±1,9*</b>

Примечание: \* –  $p < 0,05$  при сравнении с контрольной группой; \*\* –  $p < 0,005$  при сравнении с контрольной группой

Толщина ПМ статистически значимо увеличилась в 2 раза при сравнении с контрольной группой, достигая  $624,28 \pm 28$  мкм ( $p < 0,001$ ).

При измерении морфометрических показателей центральной артериолы выявлено, что толщина ее стенки достоверно увеличилась в 1,5 раза ( $p < 0,00000154$ ), а внутренний диаметр, наоборот, достоверно снизился в 1,6 раза ( $p < 0,05$ ) по сравнению с контрольной группой (таблица 8).

ИК повысился с  $1,84 \pm 0,82$  до  $4,63 \pm 1,9$ , что в 2,5 раза выше при сравнении с контрольной группой (таблица 8). При вычислении ЛК отмечено, что он незначительно уменьшился с  $1,77 \pm 0,75$  до  $1,24 \pm 0,39$ .

Исследуя ультратонкие срезы селезенки опытной группы животных, отметили скопление макрофагов в КП с включениями до 9-12, увеличение количества митохондрий до 8 штук по сравнению с контрольной группой. Увеличилась макрофагальная активность, поскольку в цитоплазме определяли

клеточные фрагменты. Кроме этого, в КП в 1 поле зрения увеличены сегментоядерные клетки до 2-3 штук.

Также повысилось количество плазматических клеток с хорошо определяемой эндоплазматической сетью и комплексом Гольджи с увеличенным количеством рибосом в МрЗ. Кроме этого, в этой зоне отметили, что макрофаги находились в тесном контакте со светлыми лимфоцитами. В лимфоцитах определяли набухшие митохондрии до 7-9 шт с трудноопределимыми кристами (рисунок 18).

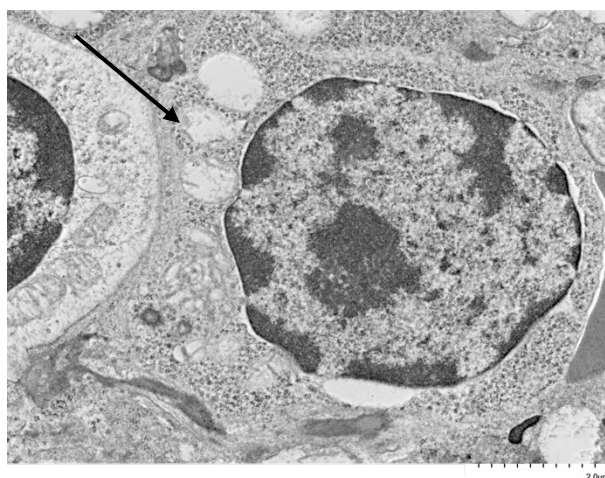


Рисунок 18 – Ультраструктура селезенки крысы. 1 месяц после инъекции этилкарбамата. Лимфоцит селезенки с набухшими и шарообразными митохондриями (указаны стрелкой). Клеточная стенка ядра неровная. Ув.  $\times 7\ 000$

Исследование с использованием ПКАТ к CD2 в опытной группе показало, что CD2<sup>+</sup>-клетки в ПМ локализованы преимущественно на ее периферии. Сравнительный анализ полученных данных с контрольной группой животных выявил незначительное их уменьшение на 19,2% ( $p < 0,0246$ ).

Установлено снижение исследуемых клеток и в других структурах органа. В КП через месяц после введения ЭК клетки располагались хаотично и их количество уменьшилось в 1,4 раза ( $p < 0,00013$ ). CD2<sup>+</sup>-клетки в КП в большей части наблюдались возле венозных синусов и сосудов.

В опытной группе среднее процентное содержание  $CD3^+$ -клеток в ЛУ уменьшилось на 21% ( $p < 0,0099$ ), а в ПМ – на 22% ( $p < 0,03$ ). В КП количество  $CD3^+$ -клеток незначительно снизилось на 14,2% ( $p < 0,035$ ). При сравнении данных клеток с контрольной группой животных отсутствовало их слоистое расположение (рисунок 19).

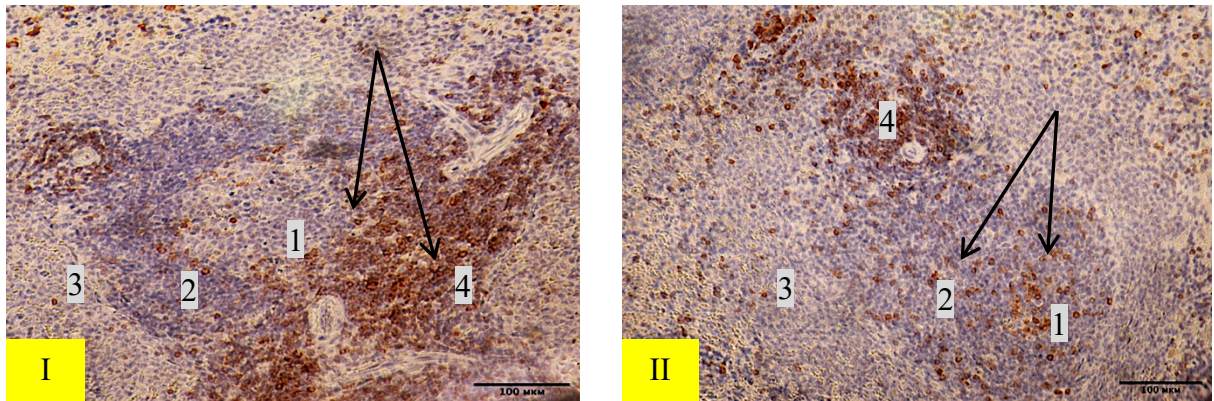


Рисунок 19 – Селезенка крыс. ЛУ с ГЦ.

*I – контрольной группы.*  $CD3^+$ -клетки расположены в ГЦ ЛУ и ПМ селезенки (указаны стрелками). 1 – ГЦ; 2 – МнЗ; 3 – МрЗ; 4 – ПМ.

*II – 1 месяца после инъекции ЭК.* Количество  $CD3^+$ -клеток (указаны стрелками) снижено в ГЦ и в ПМ. 1 – ГЦ; 2 – МнЗ; 3 – МрЗ; 4 – ПМ.

Иммуногистохимическая реакция к  $CD3^+$ -клеткам. Ув.  $\times 400/400$

Сравнительный анализ среднего процентного количества  $CD21^+$ -клеток в ЛУ у опытных животных показал отсутствие значимых изменений по сравнению с контрольной группой. Исследуемые клетки визуализировались в МнЗ и в МрЗ. В ПМ данные клетки достоверно уменьшились на 19% ( $p < 0,0125$ ). В этой структуре клетки в основном располагались на границе с КП и возле артериолы, образуя небольшие группы. Количество данных клеток в КП незначительно снизилось на 25% ( $p < 0,001$ ) при сравнении с контрольной группой и  $CD21^+$ -клетки были хаотично расположены.

В КП  $CD68^+$ -клетки выявлялись преимущественно группами на границе с ПМ. Их количество в данной структуре снизилось в 1,3 раза ( $p < 0,02$ ).

Количество  $p53^+$ -клеток уменьшилось во всех структурных зонах селезенки. Среднее процентное количество данных клеток в ЛУ в 2,3 раза ( $p < 0,048$ ) ниже, чем значения контрольной группы. При этом исследуемые

клетки снижены именно в ЛУ с ГЦ. В ПМ количество данных клеток в опытной группе через месяц после введения ЭК уменьшились на 25% ( $p < 0,05$ ). P53<sup>+</sup>-клетки располагались группами на границе с КП. В КП снижение исследуемых клеток оказалось значительным – 1,6 раза ( $p < 0,000082$ ) при сравнении с контрольной группой крыс.

Пролиферация клеток в ПМ на 29% ниже ( $p < 0,02$ ), чем в контрольной группе животных. Снижение числа Ki67<sup>+</sup>-клеток наблюдалось на границе с КП и визуализировалась их многослойность. Также отметили снижение среднего процентного содержания данных клеток в ЛУ. Но при этом в ЛУ с ГЦ пролиферация клеток не изменена (рисунок 20). В КП Ki67<sup>+</sup>-клетки достоверно уменьшились в 1,5 раза ( $p < 0,001$ ) при сравнении с контрольной группой.

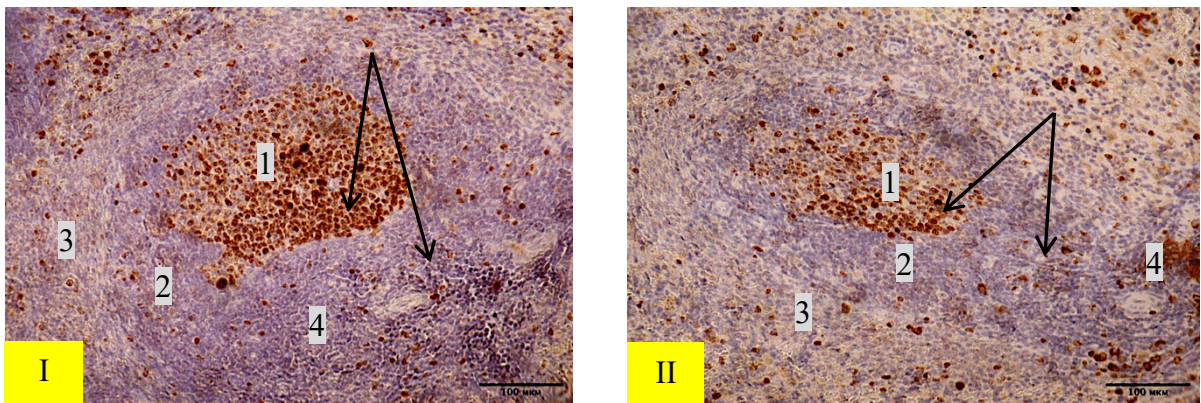


Рисунок 20 – Селезенка крыс. ЛУ с ГЦ.

*I – контрольной группы.* Ki67<sup>+</sup>-клетки расположены в ГЦ ЛУ и в МнЗ селезенки (указаны стрелками). 1 – ГЦ; 2 – МнЗ; 3 – МрЗ; 4 – ПМ.

*II – 1 месяц после инъекции ЭК.* Ki67<sup>+</sup>-клетки (указаны стрелками) определяли в ГЦ ЛУ и в МнЗ. 1 – ГЦ; 2 – МнЗ; 3 – МрЗ; 4 – ПМ.

Иммуногистохимическая реакция к Ki67<sup>+</sup>-клеткам. Ув.  $\times 400/400$

Сравнительный анализ содержания Vimentin<sup>+</sup>-клеток в селезенке показал отсутствие существенных изменений по сравнению с контрольной группой животных.

Таким образом, на данном сроке исследования в селезенке морфометрически определяли гиперплазию ЛУ и ПМ, увеличение толщины стенки артериолы и снижение ее внутреннего диаметра. При этом выявлено

уменьшение количества CD2<sup>+</sup> и CD3<sup>+</sup>-клеток, и белка p53 практически во всех структурах органа. На ультрамикроскопическом уровне выражена ЭПС и аппарат Гольджи в плазматических клетках, в лимфоцитах повышено количество видоизмененных митохондрий.

### **3.2.2. Морфологическое и иммуногистохимическое исследование селезенки через 2 месяца после инъекции этилкарбамата**

Масса тела и селезенки самцов крыс в опытной группе достоверно снизилась в 1,4 раза при анализе с контрольной группой. Масса тела составила 213,29±9,96 гр ( $p<0,0166$ ), а масса селезенки – 482,7±39,55 мг ( $p<0,05$ ) соответственно. Также снизилась относительная масса селезенки, составив 0,2%. Однако, сравнительный анализ с предыдущим сроком исследования продемонстрировал увеличение массы селезенки в 1,5 раза ( $p<0,05$ ).

Микроскопическая картина БП селезенки опытной группы отличалась от группы контроля. Наблюдали слияние ЛУ и ПМ между собой (рисунок 21). ЛУ имели неправильную форму с трудноразличимыми границами. В КП определялось значительное количество эритроцитов, окрашенных в рыжий цвет, а также единичные сегментоядерные клетки, макрофаги и плазматические клетки. Визуально отмечено увеличение количества трабекул, отходящих от капсулы селезенки. В ГЦ обнаружены клетки в процессе митоза. Соотношение количества ЛУ без ГЦ к ЛУ с ГЦ составило 1:2,6.

Относительная толщина ПМ достоверно увеличилась и составила 497,72±20,11 мкм ( $p<0,00069$ ), что в 1,5 раза выше по сравнению с контрольной группой и в 1,3 раза меньше по сравнению с предыдущим сроком исследования.

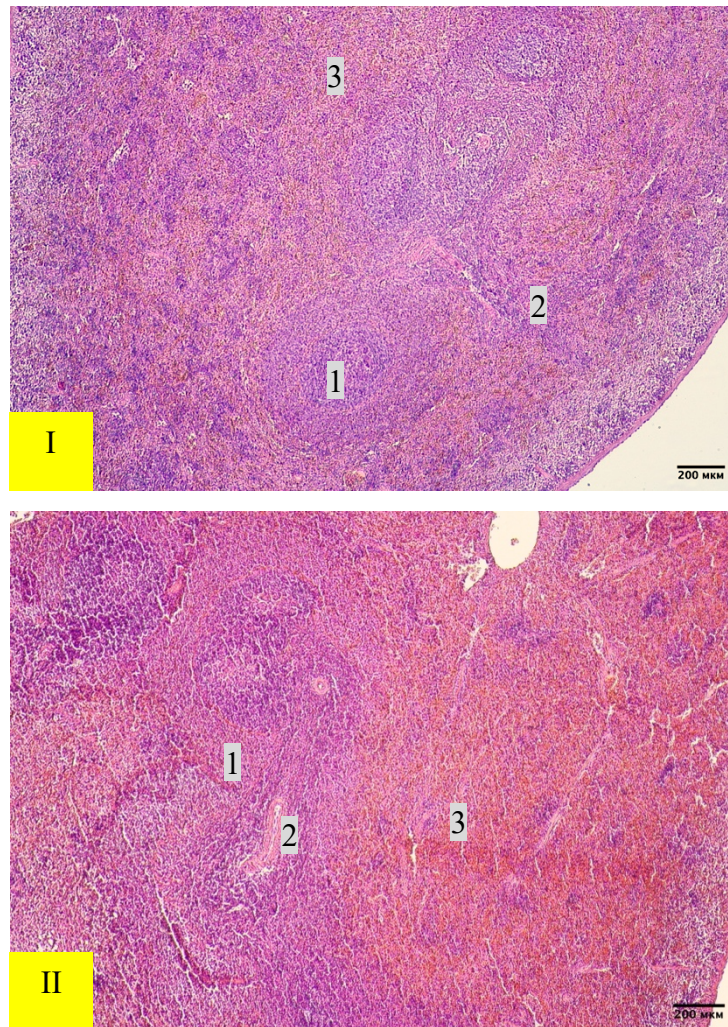


Рисунок 21 – Селезенка крыс.

*I* – контрольной группы. 1 – ЛУ с ГЦ; 2 – ПМ; 3 – КП.

*II* – 2 месяца после инъекции ЭК. Слияние ПМ между собой.

1 – ЛУ с ГЦ; 2 – ПМ; 3 – КП. Окрашивание гематоксилином и эозином. Ув.  $\times 100/100$

Относительная средняя площадь ЛУ селезенки на анализируемом сроке исследования достигла  $42,92 \pm 1,74 \text{ мм}^2$ , что на 15% выше контрольных значений и в 1,6 раза больше при сравнении с предыдущим сроком исследования. Площадь ЛУ без ГЦ повысилась на 23,2%, достигая значения –  $38,32 \pm 1,78 \text{ мм}^2$ , а площадь ЛУ с ГЦ, наоборот, снизилась на 16% –  $37,07 \pm 1,39 \text{ мм}^2$  ( $p < 0,04$ ), преимущественно за счет уменьшения площади ГЦ, где расположены В-лимфоциты. Однако, сравнивая с предыдущим сроком исследования площадь ЛУ с ГЦ увеличилась в 1,7 раза ( $p < 0,001$ ).

Площадь и толщина МнЗ по сравнению с контрольной группой увеличились на 23% (таблица 9). Эти параметры МрЗ также повысились на 30% и на 14,2% ( $p < 0,015$ ) соответственно (таблица 9).

Таблица 9 – Морфометрические показатели структур селезенки контрольной и опытной групп через 2 месяца после инъекции этилкарбамата

Морфометрические параметры	Контрольная группа	Опытная группа
Площадь МнЗ, мм <sup>2</sup>	6,41±1,74	7,79±0,67
Толщина МнЗ, мкм	77,55±5,99	<b>95,51±3,97*</b>
Площадь МрЗ, мм <sup>2</sup>	14,7±1,56	19,11±1,04
Толщина МрЗ, мкм	107,9±3,83	<b>123,2±3,75*</b>
Толщина стенки центральной артериолы, мкм	14,34±0,75	<b>19,38±0,84**</b>
Внутренний диаметр центральной артериолы, мкм	20,31±3,24	<b>12,17±2,18*</b>
ИК	1,41±0,46	<b>3,18±0,77*</b>

Примечание: \* –  $p < 0,05$  при сравнении с контрольной группой; \*\* –  $p < 0,005$  при сравнении с контрольной группой

Размеры центральной артериолы через 2 месяца после введения ЭК изменились. Определили статистически значимое увеличение толщины стенки артериолы на 35,2% ( $p < 0,000017$ ), а ее просвет, наоборот, достоверно снизился в 1,6 раза ( $p < 0,019$ ). Изменения параметров артериолы привели к увеличению ИК 3,18±0,77 (таблица 9). Показатель ЛК был снижен и составил 1,66±0,01.

На ультрамикроскопическом уровне в ЛУ выявлялись темные и светлые лимфоциты (рисунок 22), в которых увеличилось количество набухших митохондрий до 5-6 шт. Выявлено визуальное увеличение размеров митохондрий, сопровождаемое размытостью и слабой дифференцировкой крист, а также истончением их стенки. Ядро лимфоцитов имело неправильную

округлую форму с неровными стенками, а также местами с отдельными глыбками. В центре расположено ядрышко. В плазматических клетках выражена ЭПС и аппарат Гольджи с многочисленными цистернами. В КП и в ПМ выявлялись макрофаги с фагоцитированными клеточными компонентами, а также фагосомы (рисунок 22).

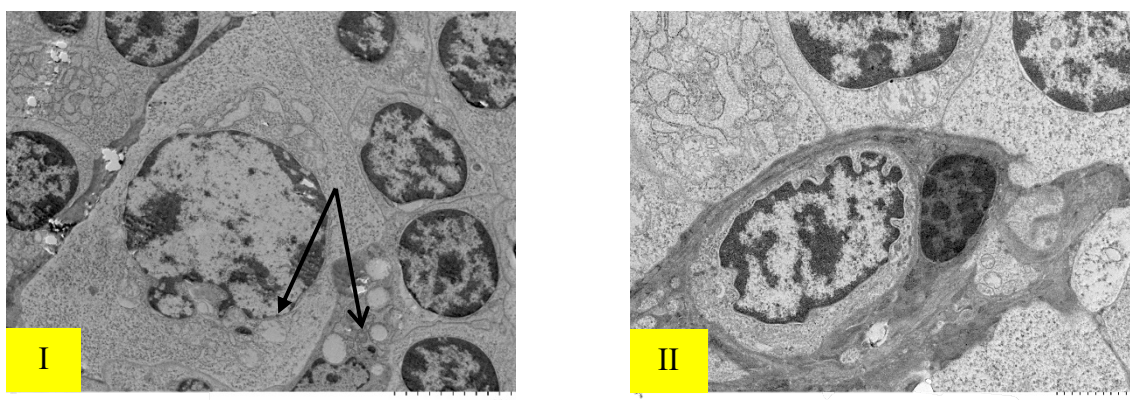


Рисунок 22 – Ультраструктура селезенки крысы. 2 месяца после инъекции этилкарбамата. I – светлые лимфоциты селезенки с набухшими митохондриями (указаны стрелкой). II – макрофаг в процессе фагоцитоза. Ув.  $\times 3\ 000/5\ 000$

Количество  $CD2^+$ -клеток в ЛУ на данном сроке исследования оставалось стабильным при сравнении с контрольной группой. В ЛУ с ГЦ их доля достоверно снизилась на 37% ( $p < 0,012$ ), в ЛУ без ГЦ статистически значимо уменьшилось в 1,5 раза ( $p < 0,0285$ ). Клетки были локализованы в ГЦ и в МнЗ. В ПМ наблюдалось снижение  $CD2^+$ -клеток на 32% ( $p < 0,033$ ) непосредственно возле центральной артериолы селезенки.

В опытной группе определилось снижение  $CD3^+$ -клеток в КП на 19,6% ( $p < 0,05$ ), чем в контрольной группе. Отмечено уменьшение клеток в области венозных синусов и на границе с ПМ селезенки. В ПМ наблюдали отрицательную динамику по количеству  $CD3^+$ -клеток, то есть их содержание достоверно уменьшилось на 20,3% ( $p < 0,041$ ) при сопоставлении с контролем. Среднее процентное количество в ЛУ  $CD3^+$ -клеток оставалось неизменным.

В структуре ЛУ  $CD21^+$ -клетки выявлялись во всех морфофункциональных компартментах, однако их основная локализация

наблюдалась в ГЦ. Средняя процентная доля этих клеток в рассматриваемой структуре оказалась на 18% ниже контрольной группы.

В ПМ количество данных клеток, наоборот, увеличилось в 1,4 раза ( $p < 0,05$ ). Клетки располагались группами и многослойно как по всей ее площади, так и на границе с КП (рисунок 23). Эти изменения сопровождались достоверным увеличением количества CD21<sup>+</sup>-клеток в КП на 21% ( $p < 0,015$ ) при анализе с контрольной группой.

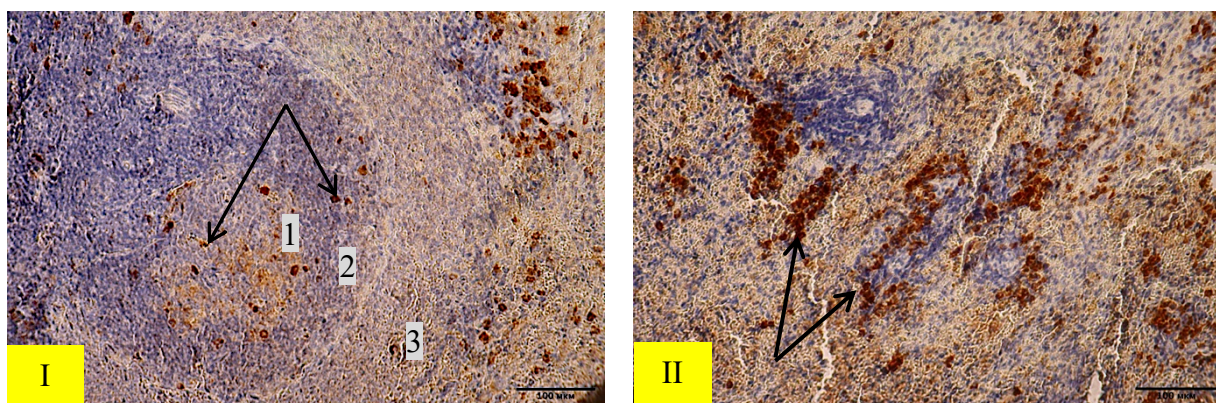


Рисунок 23 – Селезенка крыс. 2 месяца после инъекции этилкарбамата.

*I* – ЛУ с ГЦ. Количество CD21<sup>+</sup>-клеток (указаны стрелками) снижено в ГЦ и в МнЗ. 1 – ГЦ; 2 – МнЗ; 3 – МрЗ.

*II* – ПМ и КП. Количество CD21<sup>+</sup>-клеток (указаны стрелками) увеличено по всей площади ПМ. Иммуногистохимическая реакция к CD21<sup>+</sup>-клеткам. Ув.  $\times 400/400$

В опытной группе содержание CD68<sup>+</sup>-клеток в КП повышено на 26,9% ( $p < 0,031$ ). Клетки рассеивались по всей структуре КП в виде групп возле трабекул и венозных синусов. Среднее процентное количество клеток в ЛУ селезенки при сравнении с крысами контрольной группы достоверно увеличилось на 18%. CD68<sup>+</sup>-клетки выявляли в ГЦ и в МнЗ. При этом в ЛУ без ГЦ количество макрофагов оставалось неизменным, а в ЛУ с ГЦ их количество статистически значимо возросло. Исследуемые клетки в ПМ достоверно повышены в 1,4 раза ( $p < 0,0317$ ). Преимущественно CD68<sup>+</sup>-клетки располагались возле артериолы данной зоны.

Количество p53<sup>+</sup>-клеток увеличилось во всех структурах селезенки. В КП данные клетки достоверно повысились в 1,5 раза ( $p < 0,0000973$ ) по

сравнению с контрольной группой животных. Клетки располагались группами возле венозных синусов.

Среднее процентное количество клеток в ЛУ больше в 1,5 раза ( $p < 0,00382$ ), при этом в ЛУ без ГЦ – в 1,8 раза ( $p < 0,0284$ ), а в ЛУ с ГЦ – в 1,3 раза по сравнению с контрольной группой. Кроме того, по мере увеличения срока наблюдения их доля возросла в 2,7 раза ( $p < 0,01$ ). Повышение доли клеток наблюдали в ГЦ и в МрЗ. P53<sup>+</sup>-клетки в ПМ также увеличились в 1,8 раза при сравнении с контрольной группой. Повышение было обнаружено на границе с КП.

Количество пролиферирующих клеток в опытной группе в селезенке снижено во всех структурах органа. Среднее процентное количество Ki67<sup>+</sup>-клеток в ЛУ достоверно уменьшилось и составило  $7,14 \pm 0,31\%$  ( $p < 0,001$ ), в ЛУ без ГЦ –  $7,52 \pm 0,42\%$  ( $p < 0,0285$ ) и в ЛУ с ГЦ –  $7,17 \pm 0,36\%$  ( $p < 0,029$ ). Снижение числа клеток наблюдалось преимущественно в ГЦ и в МнЗ. В ПМ Ki67<sup>+</sup>-клетки достоверно уменьшились в 1,7 раза ( $p < 0,000041$ ). Клетки снизились по всей площади ПМ и преимущественно располагались на границе с КП.

В КП доля пролиферирующих клеток статистически значимо меньше в 1,4 раза ( $p < 0,001$ ) при сравнении с контрольной группой. Клетки располагались многослойно скоплениями вокруг венозных синусов и на границе с ПМ.

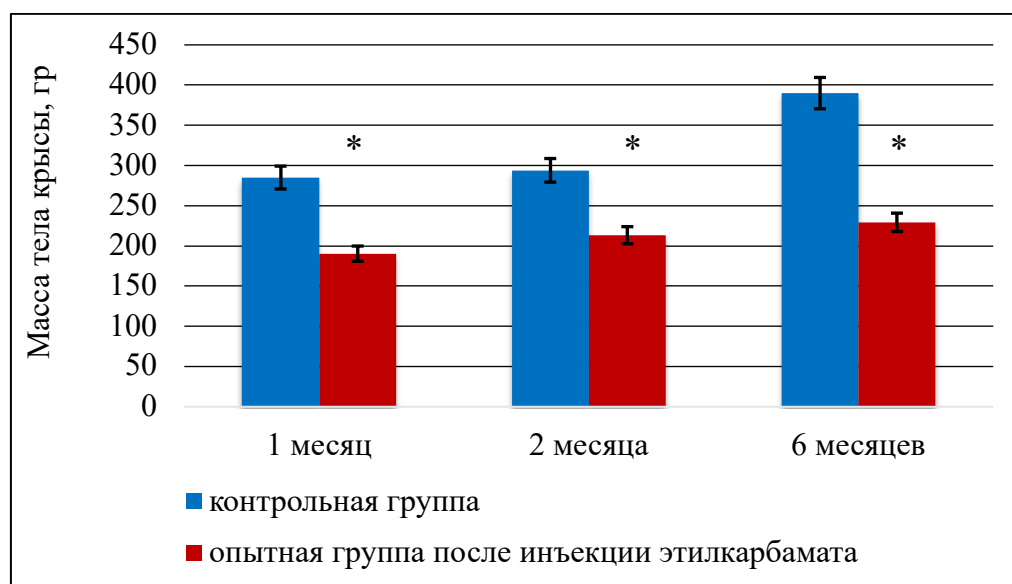
Иммуногистохимическое исследование выявило увеличение содержания Vimentin<sup>+</sup>-клеток в БП селезенки, охватывающее все морфологические структуры. Среднее процентное количество этих клеток в ЛУ превышало показатели контрольной группы животных в 1,4 раза ( $p < 0,00055$ ). Также было установлено, что в ПМ наблюдается увеличение Vimentin<sup>+</sup>-клеток по всей площади. Через 2 месяца после инъекции ЭК количество мезенхимальных клеток в КП возросло в 1,4 раза ( $p < 0,00275$ ) по сравнению с контрольной группой.

Таким образом, через 2 месяца после инъекции ЭК выявили выраженные морфологические и клеточные изменения. На

ультрамикроскопическом уровне возникла перестройка в сторону увеличения количества митохондрий в лимфоцитах. Определяли признаки гиперплазии БП, увеличен ИК, который косвенно отражает нарушение кровоснабжения в органе. Иммуногистохимическим методом отметили увеличение количества макрофагов, белка p53 и CD21<sup>+</sup>-клеток, а также наибольшее снижение пролиферативной активности в ПМ и Т-клеток по всей структуре селезенки. Вероятно, данные изменения связаны с активным иммунным ответом, как со стороны макрофагов, так и клеток В-зависимой зоны.

### 3.2.3. Морфологическое и иммуногистохимическое исследование селезенки через 6 месяцев после инъекции этилкарбамата

Абсолютная масса тела самцов опытной группы уменьшилась в 1,7 раза – 229,3±18,49 гр ( $p < 0,0046$ ) при сравнении с контрольной группой животных (рисунок 24) и не изменилась при динамическом наблюдении.



Примечание: \* –  $p < 0,05$  при сравнении с контрольной группой животных

Рисунок 24 – Изменение массы тела крыс-самцов контрольной и опытных групп на разных сроках с момента инъекции этилкарбамата

Через 6 месяцев после инъекции ЭК масса селезенки снизилась и составила  $720,26 \pm 26,98$  мг, что соответствует снижению на 23,8% относительно контроля. Однако, сравнивая с предыдущими сроками исследования, она увеличилась в 1,5 ( $p < 0,01$ ) и в 2 раза ( $p < 0,001$ ).

Типичное строение селезенки через 6 месяцев после инъекции ЭК не сохранилось в БП. В структуре БП отсутствовали ЛУ, выявлялись только ПМ (рисунок 25). В КП преимущественно определялись эритроциты, макрофаги и лимфоциты.

Толщина ПМ достоверно снизилась в 1,6 раза и составила  $231,49 \pm 19,58$  мкм ( $p < 0,0004$ ) по сравнению с контрольной группой. Относительно предыдущего срока исследования выявлялось выраженное уменьшение данного показателя в 2 раза ( $p < 0,001$ ). Вычисление соотношений ЛУ и его морфометрических параметров оказалось невозможным.

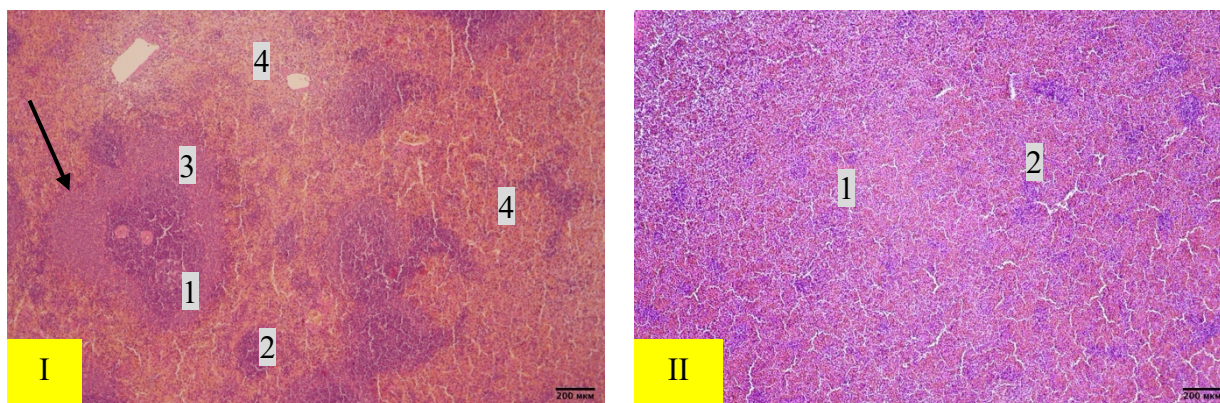


Рисунок 25 – Селезенка крыс.

**I – через месяц после инъекции ЭК. Сливающиеся ЛУ между собой.** У ЛУ выраженная и широкая МнЗ (указана стрелкой). 1 – ЛУ с ГЦ; 2 – ПМ; 3 – ЛУ без ГЦ; 4 – КП.

**II – 6 месяцев после инъекции.** Микроскопическая картина представлена КП и ПМ.

Отсутствуют ЛУ. 1 – КП; 2 – ПМ.

Окрашивание гематоксилином и эозином. Ув.  $\times 100/100/100$

При измерении параметров центральной артериолы селезенки опытной группы были отмечены выраженные изменения. Толщина стенки артериолы достоверно увеличилась на 37% ( $p < 0,044$ ), достигая  $10,37 \pm 1,09$  мкм, тогда как внутренний ее диаметр, напротив, снизился на 19,1% –  $6,58 \pm 0,37$  мкм (таблица 10) по сравнению с группой контроля. При динамическом наблюдении

толщина стенки и внутренний диаметр центральной артериолы уменьшились в 1,6 раза ( $p < 0,001$ ).

Таблица 10 – Морфометрические показатели центральной артериолы селезенки контрольной и опытной групп через 6 месяцев после введения этилкарбамата

Морфометрические показатели	Контрольная группа	Опытная группа
Толщина стенки центральной артериолы, мкм	7,59±0,42	<b>10,37±1,09*</b>
Внутренний диаметр центральной артериолы, мкм	8,13±1,25	6,58±0,37
ИК	1,86±0,67	3,15±5,4

Примечание: \* –  $p < 0,05$  при сравнении с контрольной группой животных

На данном сроке исследования выявлено увеличение ИК – 3,15±5,4, что в 1,7 раза выше контрольной группы (таблица 10, рисунок 26). ЛК вычислить не удалось, поскольку отсутствовали ЛУ.

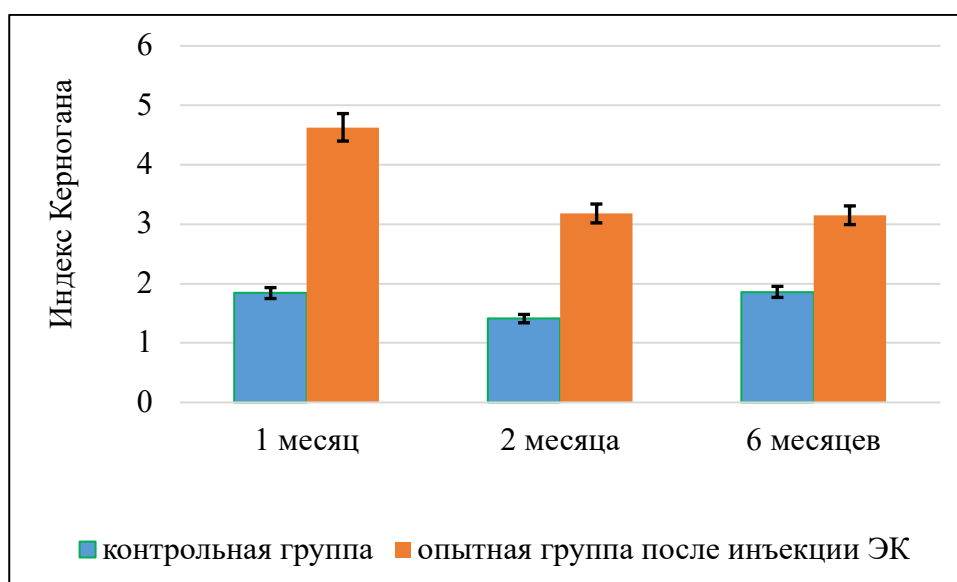


Рисунок 26 – Изменение индекса Керногана контрольной и опытной групп крыс-самцов на разных сроках с момента инъекции этилкарбамата

На ультрамикроскопическом уровне были выявлены значительные изменения в клеточном составе. Вся площадь была заполнена эритроцитами, макрофаги и лимфоциты с выраженными отечными митохондриями в количестве до 9-11 шт. Обнаружены макрофаги на стадии фагоцитоза и образования фагосомы (рисунок 27). В клетках также выявлялись липидные капли.

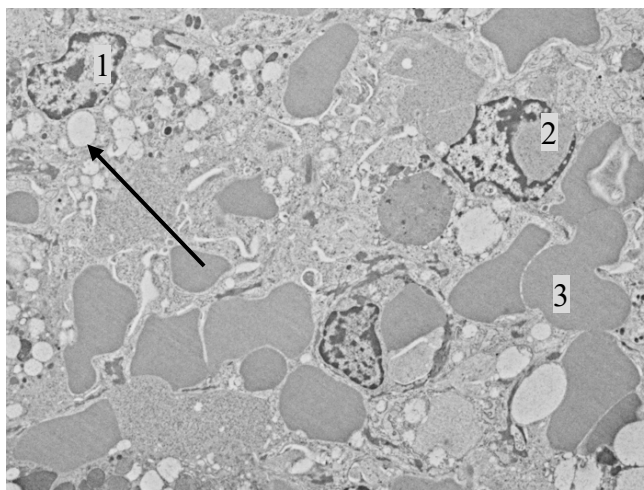


Рисунок 27 – Ультраструктура селезенки крысы. 6 месяцев после инъекции этилкарбамата. В лимфоцитах определялись липидные включения (указаны черной стрелкой). 1 – светлый лимфоцит; 2 – фагосома; 3 – эритроцит. Ув.  $\times 1\,000$

Содержание  $CD2^+$ -клеток в ПМ у животных опытной группы достоверно снизилось на 15,4% ( $p < 0,05$ ). Клетки располагались по всей площади ПМ. В КП содержание исследуемых клеток достоверно уменьшено в 1,5 раза ( $p < 0,00089$ ) по сравнению с группой контроля.  $CD2^+$ -клетки располагались группами возле сосудов и венозных синусов.

Наблюдалось достоверное снижение количества  $CD3^+$ -клеток в ПМ – на 18,8% ( $p < 0,03$ ). Уменьшение клеток происходило по всей площади данной структуры селезенки (рисунок 28).

Процентное количество  $CD21^+$ -клеток через 6 месяцев после инъекции ЭК в ПМ достоверно уменьшилось в 1,6 раза ( $p < 0,00032$ ) по сравнению с группой контроля и в 1,5 раза ( $p < 0,03$ ) при сопоставлении с предыдущим сроком исследования. Данные клетки были локализованы в большей части на

границе ПМ с КП группами, образуя слои. В КП также определялось снижение  $CD21^+$ -клеток в 1,5 раза ( $p < 0,0022$ ). Клетки располагались около венозных синусов селезенки.

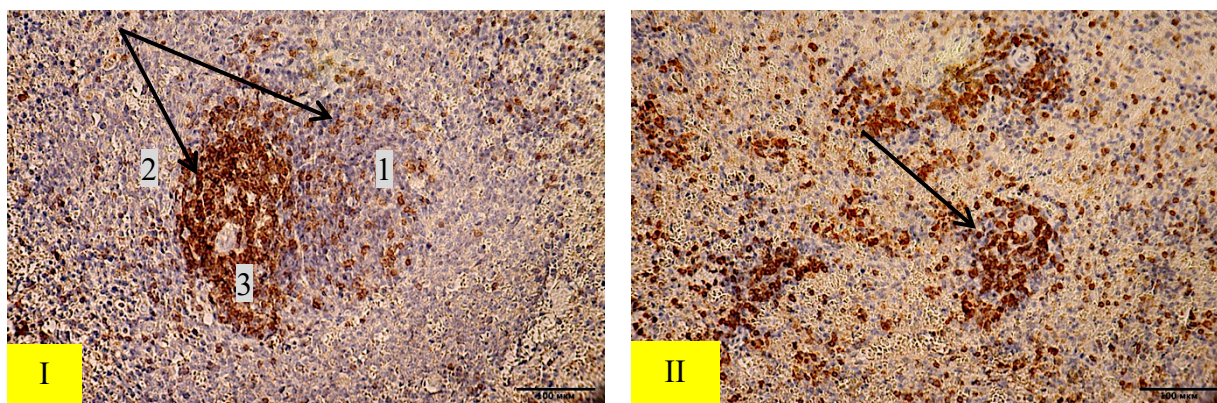


Рисунок 28 – Селезенка крыс.

*I* – контрольной группы.  $CD3^+$ -клетки расположены в ПМ и в МнЗ селезенки (указаны стрелками). 1 – МнЗ; 2 – МрЗ; 3 – ПМ.

*II* – 6 месяцев после инъекции ЭК. Количество  $CD3^+$ -клеток уменьшено в ПМ (указано стрелкой). Иммуногистохимическая реакция к  $CD3^+$ -клеткам. Ув.  $\times 400/400$

В опытной группе крыс количество  $CD68^+$ -клеток в ПМ уменьшилось на 24% ( $p < 0,0012$ ) по сравнению с контрольной группой. Снижение клеток наблюдалось по всей площади структуры, при этом они преимущественно локализовались на границе с КП. В КП количество  $CD68^+$ -клеток достоверно снизилось на 25,3% ( $p < 0,025$ ) и, в основном, клетки располагались возле венозных синусов. Внутригрупповой анализ доли  $CD68^+$ -клетки в КП установил, что они также снижены в 1,5 раза ( $p < 0,02$ ).

Содержание  $p53^+$ -клеток через 6 месяцев после введения ЭК в ПМ достоверно увеличено на 25,4% ( $p < 0,022$ ) по сравнению с контрольной группой. Повышенное содержание данных клеток отмечалось по всей площади структуры селезенки.

Количество  $Ki67^+$ -клеток в ПМ повысилось на 41,1% ( $p < 0,05$ ). Увеличение исследуемых клеток наблюдалось по всей площади, и они образовали многослойные скопления. В КП, напротив, содержание  $Ki67^+$ -клеток достоверно снизилось на 15,4% ( $p < 0,023$ ).

Анализ Vimentin<sup>+</sup>-клеток в опытной группе показал, что в ПМ их содержание снизилось на 29,1% ( $p < 0,0285$ ). Сохранялось расположение данных клеток в исследуемой структуре селезенки. В КП Vimentin<sup>+</sup>-клетки были рассеяны, а их количество было на 14,3% ниже ( $p < 0,026$ ) при сравнении с контрольной группой животных (таблица 11).

Таким образом, через 6 месяцев после инъекции ЭК у животных возникла дезорганизация БП селезенки, что проявилось полным отсутствием ЛУ и выраженной гипоплазией ПМ, указывающая на полную атрофию БП. Также было отмечено снижение изучаемых иммуногистохимическим методом клеток как в ПМ, так и в КП. Кроме этого, произошло уменьшение пропускной способности центральной артериолы селезенки. На ультрамикроскопическом уровне выявили в большом количестве эритроциты и макрофаги, в лимфоцитах увеличено количество набухших митохондрий.

Таблица 11 – Динамика иммуногистохимических изменений в структуре селезенки на разных сроках после инъекции ЭК крысам-самцам, %

<i>Структура селезенки</i>	<b>Срок воздействия</b>	<b>Группа крыс</b>	<b>Маркер к CD2</b>	<b>Маркер к CD3</b>	<b>Маркер к CD21</b>	<b>Маркер к CD68</b>	<b>Маркер к p53</b>	<b>Маркер к Ki67</b>	<b>Маркер к Vimentin</b>
<i>ЛУ</i>	через 1 месяц	контрольная	5,86±0,23	8,84±0,43	7,6±0,13	5,74±0,53	6,42±0,59	9,72±0,54	9,71±0,99
		ЭК	4,92±0,21	6,98±0,36 p<0,0099	7,27±0,36	5,9±0,3	2,79±0,81 p<0,05	7,12±0,46 p<0,004	9,39±0,39 p<0,05
	через 2 месяца	контрольная	5,04±0,52	9,41±0,29	8,71±0,56	5,41±0,69	5,06±0,44	11,41±0,58	8,3±0,45
		ЭК	4,98±0,45	9,92±0,31	7,16±0,3	6,37±0,28	7,39±0,3 p<0,00382	7,14±0,31 p<0,000008	11,58±0,63 p<0,00055
	через 6 месяцев	контрольная	6,27±0,42	11,57±0,96	10,31±0,44	5,88±0,59	3,93±0,27	8,19±0,63	9,13±1,02
		ЭК	–	–	–	–	–	–	–
<i>ЛУ без ГЦ</i>	через 1 месяц	контрольная	6,04±0,34	8,62±0,79	10,59±0,73	4,96±0,34	4,47±0,68	7,76±0,75	8,14±0,07
		ЭК	4,59±0,1 p<0,035	6,01±0,45	6,86±0,3 p<0,05	5,02±0,84	-	5,29±0,3 p<0,05	10,91±0,69
	через 2 месяца	контрольная	6,28±0,25	9,76±0,24	9,45±0,72	5,83±1,17	3,97±0,28	11,6±1,11	9,58±0,2
		ЭК	4,29±0,44 p<0,0285	10,25±0,48	7,3±0,1 p<0,05	5,3±0,93	7,06±0,43 p<0,0284	7,52±0,42 p<0,0285	12,15±0,94 p<0,0285
	через 6 месяцев	контрольная	6,67±0,26	12,06±0,84	10,59±0,73	5,88±0,92	3,93±0,42	6,07±0,43	9,05±1,14
		ЭК	–	–	–	–	–	–	–
<i>ЛУ с ГЦ</i>	через 1 месяц	контрольная	5,59±0,27	9,06±0,47	10,08±0,58	6,34±0,44	7,03±0,6	10,69±0,39	9,76±0,55
		ЭК	4,81±0,35	7,23±0,45	8,23±0,47 p<6,71e-9	5,71±0,52	2,79±0,81	8,02±0,35 p<0,0026	10,08±0,29
	через 2 месяца	контрольная	5,97±0,47	8,93±0,54	8,15±0,76	5,12±0,39	6,14±0,44	11,22±0,57	8,79±0,65
		ЭК	3,79±0,43 p<0,012	9,48±0,21	7,3±0,2 p<0,05	6,17±0,18 p<0,036	7,73±0,4	7,17±0,36 p<0,029	11,39±0,82 p<0,0378

<i>ПМ</i>	через 6 месяцев	контрольная	5,72±0,93	10,95±1,98	10,08±0,59	5,88±0,93	3,93±0,39	9,41±0,56	9,18±1,53
		ЭК	–	–	–	–	–	–	–
	через 1 месяц	контрольная	8,95±1,54	12,18±0,84	12,14±0,67	8,97±0,77	8,35±0,77	8,59±0,57	8,75±0,36
		ЭК	7,23±0,19 p<0,025	9,48±0,6 p<0,03	9,82±0,47 p<0,013	7,12±0,33	6,26±0,55 p<0,05	6,5±0,36 p<0,02	7,93±0,29 p<0,028
	через 2 месяца	контрольная	8,24±0,59	10,74±0,8	9,77±0,75	6,71±0,72	4,47±0,5	13,68±0,57	8,16±0,91
		ЭК	5,6±0,81 p<0,033	8,56±0,54 p<0,041	13,34±1,4 p<0,05	9,21±0,36 p<0,0317	7,88±0,92	8,13±0,34 p<0,000041	10,07±0,86
через 6 месяцев	контрольная	7,66±0,41	12,96±0,91	14,89±1,001	8,44±0,36	6,25±0,46	8,06±0,45	14,59±0,43	
	ЭК	6,48±0,39 p<0,05	10,52±0,49 p<0,03	9,07±0,73 p<0,00032	6,45±0,4 p<0,0012	7,8±0,4 p<0,022	11,4±0,9 p<0,05	10,34±0,38 p<0,0285	
<i>КП</i>	через 1 месяц	контрольная	9,11±0,36	9,07±0,35	12,79±0,34	8,1±0,39	8,68±0,3	15,73±0,47	9,31±0,37
		ЭК	6,55±0,94 p<0,00013	7,78±0,36 p<0,035	9,61±0,31 p<3,91e-7	6,42±0,53 p<0,05	5,49±0,5 p<0,00008	10,82±0,29 p<3,18e-8	8,78±0,36 p<0,000033
	через 2 месяца	контрольная	7,69±0,4%	8,45±0,56	10,49±0,37	6,75±0,43	5,07±0,25	13,51±0,45	10,77±1,12
		ЭК	6,39±0,21 p<0,01	6,79±1,03 p<0,05	12,69±0,63 p<0,0151	8,56±0,64 p<0,031	7,39±0,35 p<0,000009	9,53±0,25 p<7,76e-8	14,52±0,88 p<0,00275
	через 6 месяцев	контрольная	8,69±0,55	11,42±0,51	15,39±0,79	7,56±0,35	6,44±0,63	11,89±0,63	12,25±0,5
		ЭК	5,65±0,44 p<0,00089	8,88±0,41 p<0,0014	10,27±0,44 p<0,0022	5,65±0,7 p<0,025	5,42±0,6	10,1±0,48 p<0,023	10,49±0,53 p<0,026

### **3.3. Морфологическая картина селезенки после последовательного приема селена и инъекции этилкарбамата**

#### **3.3.1. Морфологическое и иммуногистохимическое исследование селезенки через месяц после последовательного приема селена и инъекции этилкарбамата**

Масса тела крыс у опытной группы оказалась на 13% ниже контрольной группы –  $247,66 \pm 6,89$  гр. Вместе с тем, относительно показателя опытной группы через месяц после изолированного введения ЭК наблюдалось увеличение на 30%.

Абсолютная и относительная массы селезенки в сравнении с контрольной группой животных не изменились и составили  $609,3 \pm 38,2$  мг и 0,24% соответственно. Однако, по сравнению с опытной группой через месяц после введения ЭК данный показатель увеличился в 1,8 раза ( $p < 0,0286$ ).

Микроскопическое строение селезенки в опытной группе через месяц после последовательного приема селена и инъекции ЭК сохраняло типичную морфологическую картину (рисунок 29). Отмечалось «слияние» ЛУ между собой и между ПМ.

Толщина ПМ достоверно увеличилась на 25,5% при сравнении с контрольной группой животных, достигнув  $421,89 \pm 20,09$  мкм ( $p < 0,002$ ). При сравнении с опытной группой через месяц после инъекции ЭК данный морфометрический параметр ниже на 32,4% ( $p < 0,000042$ ). В данной структуре отмечалось увеличение количества артериол до 3-5.

В опытной группе животных выявлялись ЛУ без ГЦ и ЛУ с ГЦ. Их соотношение составило 1:1,14. При сравнении данного отношения опытной группы с контрольной не было обнаружено существенных различий.

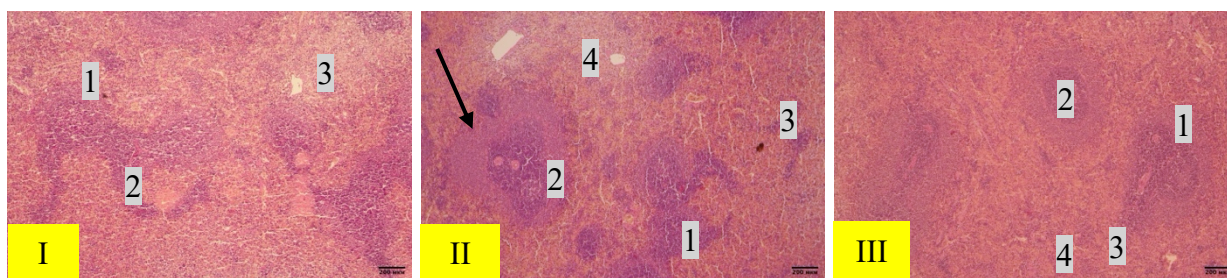


Рисунок 29 – Селезенка крыс.

**I – 1 месяц с момента завершения приема селена.** Слияние ЛУ между собой и широкая ПМ. 1 – ЛУ без ГЦ; 2 – ПМ; 3 – КП.

**II – 1 месяц после инъекции этилкарбамата.** Слияние ЛУ между собой. У ЛУ выраженная и широкая МнЗ (указана черной стрелкой).

1 – ЛУ без ГЦ; 2 – ЛУ с ГЦ; 3 – ПМ; 4 – КП.

**III – 1 месяц после последовательного приема селена и инъекции этилкарбамата.**

Сохранена типичная картина БП и КП. 1 – ЛУ без ГЦ; 2 – ЛУ с ГЦ; 3 – ПМ; 4 – КП.

Окрашивание гематоксилином и эозином. Ув.  $\times 100/100/100$

Средняя площадь ЛУ в опытной исследуемой достоверно увеличилась в 1,6 раза, составив  $39,95 \pm 2,27 \text{ мм}^2$  ( $p < 0,000012$ ) при сравнении с контрольной группой крыс. Если сопоставлять данный показатель с опытной группой через месяц после введения ЭК, то он повысился в 1,5 раза ( $p < 0,00005$ ). ЛУ имели правильную округлую форму. Между зонами ЛУ прослеживалась четкая граница. В ГЦ определялось увеличение количества делящихся клеток.

Площадь ЛУ без ГЦ достоверно увеличилась –  $33,19 \pm 4,02 \text{ мм}^2$  ( $p < 0,021$ ), что на 45% больше, чем в контрольной группе, но не отличался при сравнении с опытной группой через месяц после введения ЭК. Площадь ЛУ с ГЦ также увеличилась на 47% до  $49,48 \pm 2,38 \text{ мм}^2$  ( $p < 0,014$ ) по сравнению с контрольной группой, а при сопоставлении с опытной группой через месяц после введения ЭК данный показатель оказался выше в 2,3 раза ( $p < 0,001$ ).

При сравнении морфологической картины селезенки через месяц после последовательного приема селена и инъекции ЭК с контрольной группой толщина МнЗ и МрЗ не изменились (таблица 12). Однако, при сравнении с опытной группой через месяц после введения ЭК толщина МнЗ была ниже на 24,3% ( $p < 0,00018$ ), тогда как толщина МрЗ незначительно увеличилась на 17,5% ( $p < 0,035$ ).

Таблица 12 – Морфометрические показатели структур селезенки контрольной и опытной групп через месяц после инъекции этилкарбамата и опытной группы через месяц после последовательного приема селена и инъекции этилкарбамата

Морфометрические параметры	Контрольная группа	Опытная группа через месяц после инъекции этилкарбамата	Опытная группа через месяц после последовательного приема селена и инъекции этилкарбамата
Площадь МнЗ, мм <sup>2</sup>	6,25±0,87	<b>9,16±0,77*</b>	7,98±0,89 <sup>••</sup>
Толщина МнЗ, мкм	82,1±10,1	<b>106,21±3,35*</b>	80,36±5,35 <sup>••</sup>
Площадь МрЗ, мм <sup>2</sup>	20,73±2,55	18,94±1,7	20,18±1,19
Толщина МрЗ, мкм	125,23±8,34	111,78±5,17	131,39±5,96 <sup>•</sup>
Толщина стенки центральной артериолы, мкм	11,58±0,72	<b>17,84±0,665**</b>	<b>14,22±0,66*<sup>••</sup></b>
Внутренний диаметр центральной артериолы, мкм	12,58±1,75	<b>7,71±0,69*</b>	13,72±1,27 <sup>•</sup>
ИК	1,84±0,82	<b>4,63±1,9*</b>	2,07±1,03 <sup>•</sup>

Примечание: \* – p<0,05 при сравнении с контрольной группой; \*\* – p<0,005 при сравнении с контрольной группой;

• – p<0,05 при сравнении с опытной группой через месяц после инъекции этилкарбамата; •• – p<0,005 при сравнении с опытной группой через месяц после инъекции этилкарбамата

Площадь МнЗ оказалась несколько выше – на 28% (таблица 12) по сравнению с контрольной группой животных, однако это различие не было статистически значимыми. При сопоставлении с опытной группой через месяц после инъекции ЭК достоверных различий также не выявлено. Анализ площади МрЗ через месяц после последовательного приема селена и инъекции ЭК показал отсутствие изменений по сравнению с контрольной группой и незначительное увеличение на 7% относительно показателей опытной группы через месяц после инъекции ЭК.

Толщина стенки центральной артериолы исследуемого органа при сравнении с контрольной группой повысилась на 22,8% ( $p < 0,0066$ ) и снизилась на 20,3% ( $p < 0,00075$ ), сравнивая ее с группой через месяц после инъекции ЭК (таблица 12).

Внутренний диаметр артериолы на данном сроке исследования не изменился (таблица 12), но достоверно увеличился в 1,8 раза ( $p < 0,004$ ), по сравнению его с опытной группой через месяц после введения ЭК. ИК увеличился незначительно (таблица 12). Оценивая ЛК, определяли его увеличение в 1,4 раза –  $2,49 \pm 1,5$ , при сравнении с контрольной группой крыс.

На ультрамикроскопическом уровне через месяц после последовательного приема селена и инъекции ЭК в БП присутствовало большое количество лимфоцитов, из которых большую часть составляли светлые клетки (рисунок 30). В их цитоплазме определялись митохондрии без признаков отечности в количестве до 2 – 4 шт.

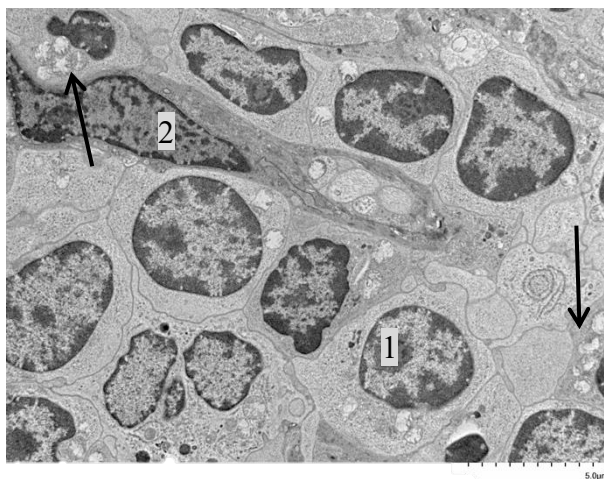


Рисунок 30 – Ультраструктура селезенки крысы. 1 месяц после последовательного поступления селена и инъекции этилкарбамата. Лимфоциты с неправильно округлыми ядрами, в которых определялись митохондрии в количестве до 4 шт (указаны стрелками). 1 – светлый лимфоцит; 2 – ретикулоцит. Ув.  $\times 3\ 000$

Ядро лимфоцитов содержало эухроматин и гетерохроматин. Выявлены ретикулоциты, в которых наблюдались множество органелл. В МнЗ и ПМ определялись безъядерные светлые клетки. КП содержала большое количество эритроцитов, а также макрофагов.

Среднее процентное количество CD2<sup>+</sup>-клеток в ЛУ в опытной группе достоверно снизилось на 24,7% ( $p < 0,0019$ ). Клетки, в основном, были локализованы в МнЗ и в ГЦ. В ЛУ без ГЦ исследуемые клетки снизились в 1,5 раза ( $p < 0,0079$ ). В ЛУ с ГЦ количество CD2<sup>+</sup>-клеток достоверно уменьшилось на 22,9% ( $p < 0,029$ ) по сравнению с контрольной группой. При сравнении с опытной группой через месяц после инъекции ЭК процентное содержание CD2<sup>+</sup>-клеток не изменилось. В ПМ количество CD2<sup>+</sup>-клеток уменьшилось в 1,5 раза ( $p < 0,0381$ ) относительно контрольной группы и на 14,5% ( $p < 0,036$ ) ниже при сравнении с опытной группой животных через месяц после инъекции ЭК. Клетки располагались по всей ее площади.

Доля CD2<sup>+</sup>-клеток в КП достоверно уменьшилась относительно контроля в 1,4 раза ( $p < 0,001$ ), при этом при сопоставлении с опытной группой через месяц после инъекции ЭК значимых различий не было выявлено.

В КП число CD3<sup>+</sup>-клеток ниже контрольных значений на 25,2% ( $p < 0,000029$ ). Кроме того, относительно опытной группы через месяц после инъекции ЭК было зафиксировано уменьшение на 12,9% ( $p < 0,0488$ ).

В ПМ доля CD3<sup>+</sup>-клеток при сопоставлении с контролем статистически не отличалась. При сравнении с показателями опытной группы через 1 месяц после введения ЭК отмечалось недостоверное увеличение на 29%. В ЛУ средняя доля CD3<sup>+</sup>-клеток в опытной группе была выше контроля на 30,4%. Сравнивая содержание клеток с группой через месяц после инъекции ЭК, отметили повышение на 22% ( $p < 0,004$ ). Данные клетки рассеивались в ГЦ и в МнЗ, а также обнаруживались в МрЗ (рисунок 31). При этом в ЛУ без ГЦ CD3<sup>+</sup>-клетки повысились в 1,5 раза ( $p < 0,0286$ ), а в ЛУ с ГЦ – не изменились при сравнении с контрольной группой крыс.

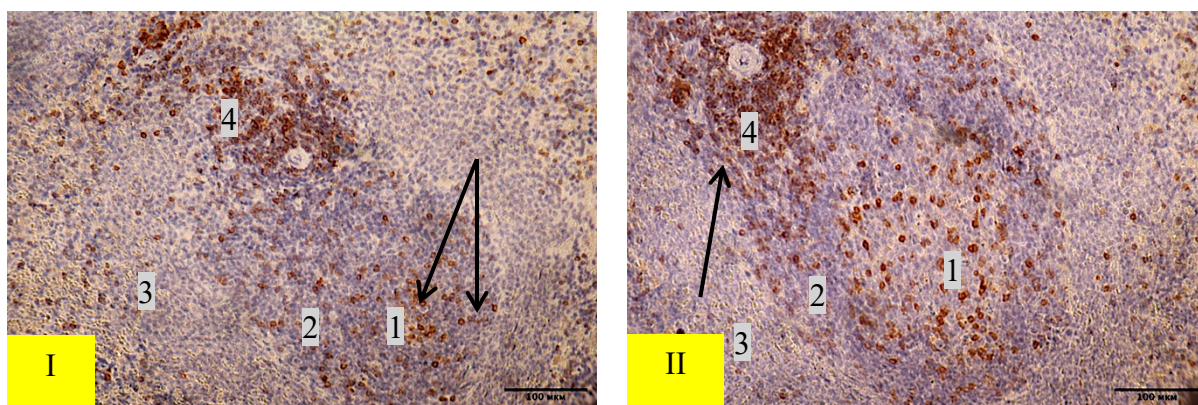


Рисунок 31 – Селезенка крыс. ЛУ с ГЦ.

**I – 1 месяц после инъекции этилкарбамаата.** Количество  $CD3^+$ -клеток снижено в МнЗ и в ГЦ (указаны стрелками). 1 – ГЦ; 2 – МнЗ; 3 – МрЗ; 4 – ПМ.

**II – 1 месяц после последовательного приема селена и инъекции этилкарбамаата.** Число  $CD3^+$ -клеток увеличено в ПМ и МнЗ ЛУ (указаны стрелкой). 1 – ГЦ; 2 – МнЗ; 3 – МрЗ; 4 – ПМ. Иммуногистохимическая реакция к  $CD3^+$ -клеткам. Ув.  $\times 400/400$

Количество  $CD21^+$ -клеток в КП снизилось в 1,5 раза ( $p < 0,001$ ) при сравнении с контрольной группой. Сопоставляя полученные данные с опытной группой через месяц после инъекции ЭК, количество клеток незначительно уменьшилось на 12% ( $p < 0,0063$ ). Клетки образовывали скопления возле венозных синусов.

В опытной группе в ПМ селезенки количество данных клеток снизилось на 21,8% ( $p < 0,0053$ ) относительно контроля, однако при сравнении с опытной группой животных через месяц после инъекции ЭК показатель оставался неизменным. Среднее процентное содержание  $CD21^+$ -клеток в ЛУ составило  $8,54 \pm 0,35\%$  ( $p < 0,042$ ), что на 12,4% выше при сравнении с контрольной группой, а сравнивая с опытной группой через месяц после инъекции ЭК – выше на 17,5% ( $p < 0,05$ ). При этом в ЛУ без ГЦ они увеличились на 15,9% ( $p < 0,005$ ), а в ЛУ с ГЦ, наоборот, снизились на 15,1%. Клетки были локализованы в ГЦ и в МнЗ.

Количество  $CD68^+$ -клеток в КП достоверно снизилось в 1,4 раза ( $p < 0,00005$ ) при сравнении с контрольной группой и осталось неизменным при сравнении с опытной группой через месяц после введения ЭК. Клетки рассеивались по всей КП, местами были локализованы группами возле венозных синусов.

В ПМ исследуемые клетки достоверно снизились в 1,8 раза ( $p < 0,00049$ ) по сравнению с контрольной группой и в 1,5 раза ( $p < 0,02$ ) ниже по сравнению с опытной группой самцов после инъекции ЭК. Клетки в большинстве располагались на границе с КП.

Среднее процентное количество CD68<sup>+</sup>-клеток в ЛУ достоверно снизилось в 1,5 ( $p < 0,026$ ) при сравнении с контрольной группой и в 1,6 раза ( $p < 0,011$ ) ниже, анализируя с опытной группой через 1 месяц после введения ЭК. При этом в ЛУ без ГЦ количество данных клеток не изменилось при сравнении их как с контрольной группой, так и с опытной группой через месяц после инъекции ЭК. В ЛУ с ГЦ CD68<sup>+</sup>-клетки снизились в 2 раза ( $p < 0,0079$ ) при сравнении их и с контрольной группой животных и с опытной группой через 1 месяц после введения ЭК. Клетки расположены во всех зонах ЛУ.

В КП доля p53<sup>+</sup>-клеток не демонстрировала значимых расхождений относительно контрольных значений, однако повысилась в 1,5 раза ( $p < 0,0019$ ) по сравнению с опытной группой через 1 месяц после инъекции ЭК. P53<sup>+</sup>-клетки в КП располагались скоплениями возле трабекул селезенки и венозных синусов.

В ПМ белок p53 снизился на 26% ( $p < 0,038$ ) при сравнении с контрольной группой и не изменился в сравнении с опытной группой после введения ЭК. P53<sup>+</sup>-клетки располагались на границе с КП.

При сравнении среднего процентного количества p53<sup>+</sup>-клеток в ЛУ с контрольной группой значительных изменений не было выявлено. Однако через месяц после последовательного приема селена и инъекции ЭК количество p53<sup>+</sup>-клеток в данном компартменте значительно увеличилось в 2 раза ( $p < 0,05$ ) по сравнению с опытной группой через 1 месяц после введения ЭК. В ЛУ без ГЦ содержание белка p53 не изменилось при сравнении с контрольной группой, в то время как в ЛУ с ГЦ оно снизилось в 1,5 раза. P53<sup>+</sup>-клетки были расположены как в ГЦ, так и в МнЗ.

В опытной группе через месяц после последовательного приема селена и введения ЭК содержание пролиферирующих клеток в КП уменьшилось в 1,4

раза ( $p < 0,001$ ) при сравнении с контрольной группой крыс, но не изменилось при сравнении с опытной группой через 1 месяц после введения ЭК.

Ki67<sup>+</sup>-клетки в ПМ располагались по всей ее площади, больше всего на границе с КП. Их количество в 1,6 раза ( $p < 0,0049$ ) выше при сравнении с контрольной группой и на 26,7% ( $p < 0,029$ ) больше при сравнении с опытной группой через месяц после введения ЭК.

В ЛУ Ki67<sup>+</sup>-клетки располагались преимущественно в ГЦ и в МрЗ (рисунок 32). Их среднее процентное количество в ЛУ составляло  $12,14 \pm 0,55\%$  ( $p < 0,0072$ ), что на 24,9% выше при сравнении с контрольной группой и в 1,7 раза ( $p < 0,000058$ ) больше, сравнивая с опытной группой через месяц после инъекции ЭК. В ЛУ без ГЦ пролиферирующие клетки выше в 1,4 раза ( $p < 0,029$ ) при анализе с контрольной группой и в 2,1 раза ( $p < 0,029$ ) выше, сравнивая с опытной группой через 1 месяц после введения ЭК. В ЛУ с ГЦ пролиферирующие клетки увеличились на 17% при сравнении с контрольной группой и в 1,6 раза ( $p < 0,0013$ ) выше, чем в опытной группе через 1 месяц после инъекции ЭК.

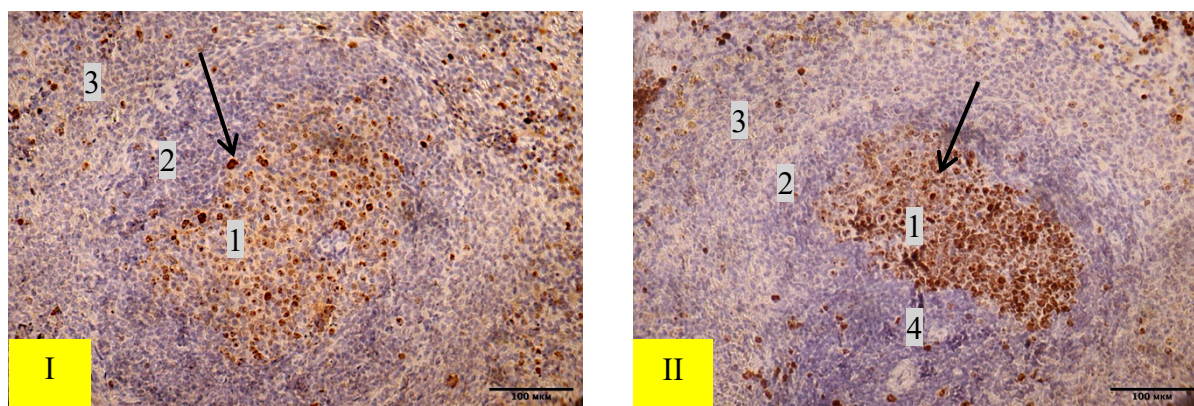


Рисунок 32 – Селезенка крыс. ЛУ с ГЦ.

***I*** – 1 месяц после инъекции этилкарбамата. Количество Ki67<sup>+</sup>-клеток снижено в ГЦ (указаны стрелкой). 1 – ГЦ; 2 – МнЗ; 3 – МрЗ.

***II*** – 1 месяц после последовательного приема селена и инъекции этилкарбамата. Количество Ki67<sup>+</sup>-клеток увеличено в ГЦ (указаны стрелкой). 1 – ГЦ; 2 – МнЗ; 3 – МрЗ; 4 – ПМ. Иммуногистохимическая реакция к Ki67<sup>+</sup>-клеткам. Ув.  $\times 400/400$

Через месяц после последовательного приема селена и введения ЭК количество Vimentin<sup>+</sup>-клеток в КП достоверно увеличилось на 22,8% ( $p < 0,02$ ),

сравнивая с контрольной группой и в 1,3 раза ( $p < 0,0067$ ) выше, чем в опытной группе только с введением ЭК.

Также определили, что Vimentin<sup>+</sup>-клетки в ПМ по всей ее площади на 22,8% в количестве выше, чем в контрольной группе и в 1,4 раза ( $p < 0,0079$ ) больше при сравнении с опытной группой через месяц после инъекции ЭК.

Среднее процентное количество Vimentin<sup>+</sup>-клеток в ЛУ не отличалось от групп сравнения. Клетки распределялись по всей структуре. В ЛУ без ГЦ количество исследуемых клеток увеличилось на 33% при сравнении с контрольной группой и на 11,5% – в сравнении с опытной группой животных через месяц после инъекции ЭК. В ЛУ с ГЦ доля Vimentin<sup>+</sup>-клеток оставалась неизменной.

Таким образом, через месяц после последовательного приема селена и инъекции ЭК выраженных морфологических изменений в селезенке не отмечалось, за исключением гиперплазии ЛУ. На ультрамикроскопическом уровне отметили плотное скопление лимфоцитов и сохраненное строение митохондрий. Кроме этого, выявилось уменьшение количества CD21<sup>+</sup>- и CD68<sup>+</sup>-клеток во всех структурах селезенки. Количество CD2<sup>+</sup>- и CD3<sup>+</sup>-клеток и белка p53 относительно сохранялось при сравнении с группой контроля.

### **3.3.2. Морфологическое и иммуногистохимическое исследование селезенки через 2 месяца после последовательного приема селена и инъекции этилкарбамата**

В опытной группе масса тела крыс не отличалась от контрольной группы и составила  $290 \pm 12,86$  гр. При сравнении с опытной группой через 2 месяца после инъекции ЭК данный параметр увеличился на 36% ( $p < 0,036$ ). В ходе наблюдения отмечалась тенденция к постепенному увеличению массы тела животных на 20%.

Абсолютная масса селезенки в опытной группе самцов сохранялась на уровне контрольной группы. При сравнении с группой животных через 2 месяца после инъекции ЭК отмечено ее увеличение на 27,4% ( $p < 0,03$ ). Относительная масса селезенки животных не изменялась по сравнению с контрольной группой и с группой через 2 месяца после инъекции ЭК. Масса селезенки в исследуемой опытной группе составила  $614,85 \pm 12,53$  мг, а относительная – 0,212%.

Оценивая микроскопическую картину селезенки, выявили, что КП была богата эритроцитами с трабекулами и венозными синусами. В БП отмечалось слияние ЛУ и ПМ между собой и друг с другом. Между КП и ЛУ граница была размыта.

Относительная толщина ПМ увеличилась в 1,8 раза, достигая значения  $577,21 \pm 42,26$  мкм ( $p < 0,0003$ ), по сравнению с контрольной группой животных и на 16% выше, чем в опытной группе через 2 месяца после инъекции ЭК. В ПМ определялось плотное скопление клеток, среди которых выявлялись клетки со светлой и широкой цитоплазмой. Визуализировали 2-3 центральные артериолы.

При оценке соотношения ЛУ без ГЦ к ЛУ с ГЦ было выявлено, что оно составляет 1:2 и не отличается от показателей контрольной группы крыс.

Относительная средняя площадь ЛУ в опытной группе животных увеличилась на 23,3% по сравнению с группой контроля, составив  $46,21 \pm 2,95$  мм<sup>2</sup> ( $p < 0,042$ ), и не отличалась от опытной группы через 2 месяца после введения ЭК. При этом в ЛУ без ГЦ площадь достоверно выше в 1,5 раза ( $p < 0,05$ ) по сравнению с контрольной группой и на 23,8% ( $p < 0,05$ ) больше, чем в опытной группе, достигая  $46,19 \pm 4,67$  мм<sup>2</sup>. Площадь ЛУ с ГЦ увеличилась на 23,4% ( $p < 0,008$ ) при сравнении с контрольной группой и в 1,5 раза ( $p < 0,0002$ ) выше, чем в опытной группе через 2 месяца после инъекции ЭК, составляя  $54,14 \pm 2,29$  мм<sup>2</sup>. В ЛУ границы между зонами четкие и не размыты.

Толщина МнЗ повысилась в 1,6 раза ( $p < 0,0002$ ) (таблица 13) по сравнению с контрольной группой и на 31% выше ( $p < 0,001$ ), чем в опытной

группе. Площадь МнЗ через 2 месяца после последовательного приема селена и введения ЭК была в 1,5 раза больше при сравнении с контрольной группой и на 19,1% выше, чем в группе через 2 месяца после введения ЭК (таблица 13).

Таблица 13 – Морфометрические показатели структур селезенки контрольной и опытной групп через 2 месяца после инъекции этилкарбамата, опытной группы через 2 месяца после последовательного приема селена и инъекции этилкарбамата

Морфометрические параметры	Контрольная группа	Опытная группа через 2 месяца после инъекции этилкарбамата	Опытная группа через 2 месяца после последовательного приема селена и инъекции этилкарбамата
Площадь МнЗ, мм <sup>2</sup>	6,41±1,74	7,79±0,67	9,28±1,39
Толщина МнЗ, мкм	77,55±5,99	<b>95,51±3,97*</b>	<b>124,91±7,011**••</b>
Площадь МрЗ, мм <sup>2</sup>	14,7±1,56	19,11±1,04	20,07±4,69
Толщина МрЗ, мкм	107,9±3,83	<b>123,2±3,75*</b>	133,33±8,49*
Толщина стенки центральной артериолы, мкм	14,34±0,75	<b>19,38±0,84**</b>	<b>20,42±1,53*</b>
Внутренний диаметр центральной артериолы, мкм	20,31±3,24	<b>12,17±2,18*</b>	15,23±0,37 •
ИК	1,41±0,46	3,18±0,77	2,68±8,2

Примечание: \* – p<0,05 при сравнении с контрольной группой; \*\* – p<0,005 при сравнении с контрольной группой;

• – p<0,05 при сравнении с опытной группой через 2 месяца после инъекции этилкарбамата; •• – p<0,005 при сравнении с опытной группой через 2 месяца после инъекции этилкарбамата.

Толщина и площадь МрЗ увеличились на 23,6% (p<0,04) и на 36,5% соответственно, сравнивая с контрольной группой животных (таблица 13). При анализе с опытной группой через 2 месяца после введения ЭК выраженных изменений не было выявлено.

При измерении параметров центральной артериолы селезенки в исследуемой группе выявлено увеличение толщины ее стенки на 42,4% ( $p < 0,004$ ), а диаметр просвета, наоборот, снизился на 24%, по сравнению с контрольной группой (таблица 13). Изучая диаметр просвета и толщину стенки в опытной группе крыс через 2 месяца после инъекции ЭК, было установлено, что диаметр просвета был выше на 25,2% ( $p < 0,0002$ ), а толщина стенки не отличалась (таблица 13).

ИК увеличился и составил  $2,68 \pm 8,2$  через 2 месяца после последовательного приема селена и инъекции ЭК по сравнению с контрольной группой (таблица 13). ЛК снизился –  $1,47 \pm 0,72$ , что на 39,8% ниже, сравнивая с контрольной группой.

Изучая ультратонкие срезы опытной группы, не было выявлено отличий от группы контроля. Отмечалось плотное скопление лимфоцитов на разных стадиях созревания. Встречались как темные, так и светлые клетки.

Через 2 месяца после последовательного приема селена и введения ЭК количество  $CD2^+$ -клеток в КП достоверно увеличилось в 1,6 раза относительно контрольной группы крыс и в 2 раза ( $p < 0,001$ ) выше, чем у животных через 2 месяца после введения ЭК. Клетки были локализованы возле венозных синусов и на границе с ПМ. В ПМ количество исследуемых клеток увеличилось на 70% ( $p < 0,00005$ ) по отношению к контрольной группе самцов и в 2,5 раза ( $p < 0,002$ ) больше, чем в опытной группе через 2 месяца после введения ЭК.  $CD2^+$ -клетки в ПМ располагались по всей ее структуре.

Среднее процентное количество  $CD2^+$ -клеток в ЛУ увеличилось в 1,8 раза ( $p < 0,00009$ ) при сравнении с контрольной группой и в 1,9 раза ( $p < 0,00009$ ) при сравнении с опытной группой через 2 месяца после инъекции ЭК. Клетки располагались по всей структуре ЛУ. В ЛУ без ГЦ количество этих клеток повысилось в 1,4 раза ( $p < 0,03$ ) и в 2,1 раза ( $p < 0,02$ ) относительно контрольной и опытной групп сравнения. В ЛУ с ГЦ количество  $CD2^+$ -клеток увеличилось в 1,6 раза ( $p < 0,0008$ ), сравнивая с контрольной группой и в 2,5 раза ( $p < 0,001$ )

больше, при сравнении с опытной группой. Они располагались в виде ободка на границе с МнЗ.

При динамическом наблюдении внутри исследуемой группы доля  $CD2^+$ -клеток увеличилась во всех компартментах селезенки: в ЛУ без ГЦ – в 2,2 раза ( $p < 0,05$ ), в ЛУ с ГЦ – в 2,2 раза ( $p < 0,05$ ), в ПМ – в 2,3 раза ( $p < 0,001$ ) и в КП – в 2 раза ( $p < 0,001$ ).

В ПМ число  $CD3^+$ -клеток достоверно в 2,2 раза ( $p < 0,002$ ) выше при сравнении с группой контроля и в 2,7 раза ( $p < 0,0022$ ) больше, чем в опытной группе через 2 месяца после введения ЭК (рисунок 33). Клетки повысились по всей ПМ и располагались многослойно.

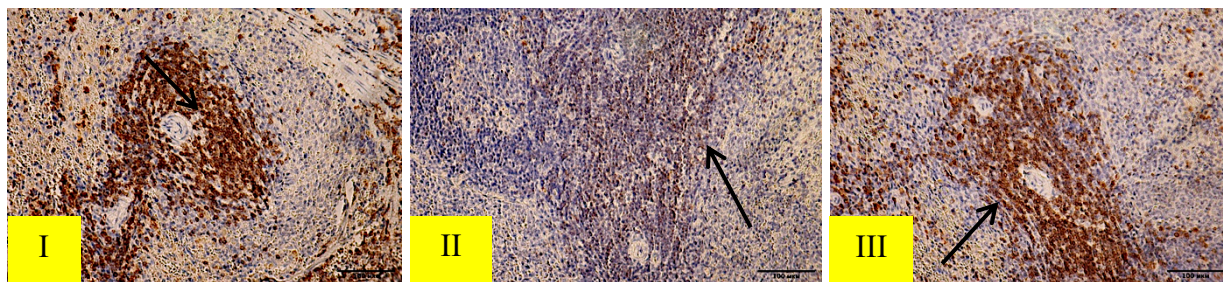


Рисунок 33 – Селезенка крыс. ПМ.

***I – 2 месяца с момента завершения приема селена.***

Количество  $CD3^+$ -клеток увеличено по всей площади ПМ (указаны стрелкой).

***II – 2 месяца после инъекции этилкарбамата.***

Количество  $CD3^+$ -клеток уменьшено по всей площади ПМ (указаны стрелкой).

***III – 2 месяца после последовательного приема селена и инъекции этилкарбамата.***

Количество  $CD3^+$ -клеток увеличено по всей площади ПМ (указаны стрелкой) при сравнении с опытной группой через 2 месяца после инъекции этилкарбамата.

Иммуногистохимическая реакция к  $CD3^+$ -клеткам. Ув.  $\times 400/400/400$

Среднее процентное количество исследуемых клеток в ЛУ в 2 раза ( $p < 0,0006$ ) выше по сравнению контрольной и опытной группой через 2 месяца после введения ЭК, при этом они распределялись по всем зонам ЛУ. В ЛУ без ГЦ число  $CD3^+$ -клеток возросло в 2,6 раза ( $p < 0,03$ ) по отношению к контрольной группе и в 2,5 раза больше ( $p < 0,03$ ), чем в опытной группе через 2 месяца после инъекции ЭК.

$CD3^+$ -клетки увеличились во всех структурах селезенки. В КП они в 2 раза ( $p < 0,00004$ ) выше по сравнению с контрольной группой и в 2,3 раза

( $p < 0,00004$ ) больше, анализируя с опытной группой через 2 месяца после введения ЭК. Клетки рассеяны по всей КП.

После прекращения последовательного поступления селена и этилкарбамата при динамическом наблюдении отмечено, что доля CD3<sup>+</sup>-клеток увеличилась во всех структурах селезенки: в ЛУ без ГЦ – в 1,9 раза ( $p < 4,5715E-05$ ), в ЛУ с ГЦ – в 1,9 раза ( $p < 0,03$ ), в ПМ – в 1,9 раза ( $p < 9,3278E-05$ ) и в КП – в 2,3 раза ( $p < 1,7098E-13$ ).

Количество CD21<sup>+</sup>-клеток в КП увеличилось в 1,7 раза ( $p < 0,001$ ) относительно контрольной группы и в 1,4 раза ( $p < 0,000008$ ) выше, чем в опытной группе после инъекции ЭК. Клетки образовывали многослойные скопления возле венозных синусов и на границе с ПМ. В ПМ также отмечалось увеличение количества клеток в 2 раза ( $p < 0,0006$ ) по всей ее структуре при сравнении с контрольной группой и в 1,5 раза ( $p < 0,03$ ) больше опытной группы.

В ЛУ средняя доля CD21<sup>+</sup>-клеток достоверно увеличилась на 28% по отношению к контрольной группе, при этом превышала значения опытной группы через 2 месяца после введения ЭК в 1,6 раза ( $p < 0,002$ ). Клетки преимущественно возросли в ГЦ и в МнЗ. В ЛУ без ГЦ клетки увеличились на 33% по отношению к контрольной группе и в 1,7 раза больше, чем в опытной группе через 2 месяца после введения ЭК. В ЛУ с ГЦ CD21<sup>+</sup>-клетки повысились на 28,1% ( $p < 0,03$ ) и на 43,3% ( $p < 0,001$ ), сравнивая с контрольной группой и опытной группой через 2 месяца после введения ЭК соответственно.

Анализ доли CD21<sup>+</sup>-клеток в динамике внутри исследуемой группы показал ее увеличение во всех компартментах селезенки: в ЛУ без ГЦ – в 1,5 раза ( $p < 0,02$ ), в ЛУ с ГЦ – в 1,7 раза ( $p < 0,03$ ), в ПМ – в 2 раза ( $p < 0,001$ ) и в КП – в 2 раза ( $p < 6,1054E-07$ ).

Через 2 месяца после последовательного приема селена и введения ЭК в КП число CD68<sup>+</sup>-клеток увеличилось в 1,5 раза ( $p < 0,0014$ ) при сравнении с группой контроля и незначительно повысилось на 14,1% относительно

опытной группы с введением ЭК. В ПМ доля CD68<sup>+</sup>-клетки повысилась в 1,5 раза ( $p < 0,032$ ), сравнивая с контрольной группой.

В ЛУ среднее процентное количество CD68<sup>+</sup>-клеток в 1,6 раза больше ( $p < 0,009$ ) при сравнении с группой контроля и на 33% больше ( $p < 0,004$ ) при анализе с опытной группой через 2 месяца после инъекции ЭК. Они в большей части визуализировались в ГЦ и в МнЗ. Исследуемые клетки в ЛУ без ГЦ выше в 1,4 раза, чем в контрольной группе и в 1,5 раза ( $p < 0,05$ ), по отношению к опытной группе через 2 месяца после введения ЭК. В ЛУ с ГЦ изучаемые клетки увеличились в 1,7 раза и в 1,5 раза ( $p < 0,05$ ) при подобном сравнении.

При динамическом наблюдении в пределах исследуемой группы доля CD68<sup>+</sup>-клетки увеличилась во всех структурах селезенке: в ЛУ без ГЦ – в 1,5 раза ( $p < 0,05$ ), в ЛУ с ГЦ – в 1,9 раза ( $p < 5,7526E-06$ ), в ПМ – в 2 раза ( $p < 1,0603E-05$ ) и в КП – в 1,7 раза ( $p < 5,1059E-9$ ).

Число p53<sup>+</sup>-клеток в ПМ увеличилось в 3 раза ( $p < 0,04$ ), анализируя с контрольной группой и в 1,7 раза выше ( $p < 0,036$ ), чем в опытной группе животных через 2 месяца после введения ЭК (рисунок 34). При внутригрупповом сравнении доля p53<sup>+</sup>-клеток в ПМ также увеличилась в 2,2 раза ( $p < 0,05$ ).

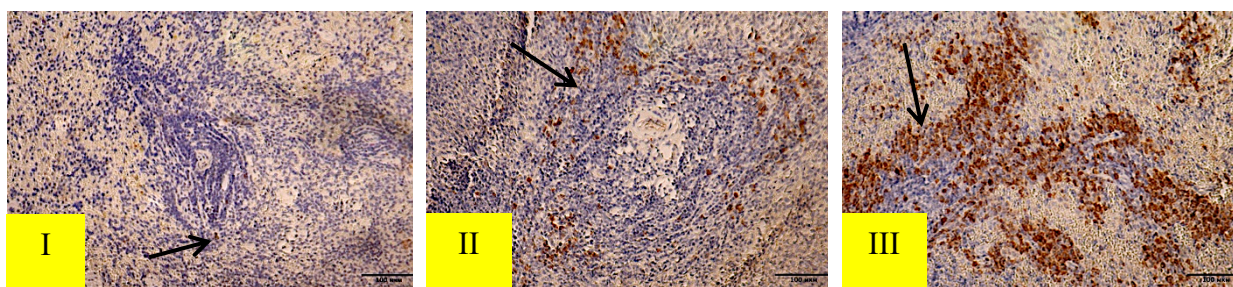


Рисунок 34 – Селезенка крыс. ПМ.

*I – контрольной группы.* Единичные p53<sup>+</sup>-клетки в ПМ (указаны стрелкой).

*II – 2 месяца после инъекции этилкарбамата.*

Количество p53<sup>+</sup>-клеток незначительно увеличено по всей площади ПМ (указаны стрелкой).

*III – 2 месяца после последовательного приема селена и инъекции этилкарбамата.*

Количество p53<sup>+</sup>-клеток увеличено по всей площади ПМ (указаны стрелкой) при сравнении с опытной группой через 2 месяца после инъекции этилкарбамата.

Иммуногистохимическая реакция к p53<sup>+</sup>-клеткам. Ув.  $\times 400/400/400$

Среднее процентное количество p53<sup>+</sup>-клеток в ЛУ составило 9,53±0,3%. Данное содержание указывало, что исследуемые клетки, сравнивая их с контрольной группой, повысились в 1,9 раза (p<0,0009) и на 29% (p<0,0003) при сравнении с опытной группой с введением ЭК. В ЛУ без ГЦ их количество увеличилось в 2,4 раза (p<0,03) при сравнении с контрольной группой крыс и на 33% (p<0,03) выше, чем в опытной группе. В ЛУ с ГЦ их содержание повысилось в 1,6 раза (p<0,03) относительно контрольной группы и на 24,1% (p<0,03) больше, чем в опытной группе через 2 месяца после инъекции ЭК. P53<sup>+</sup>-клетки были локализованы в ГЦ и в МнЗ.

Через 2 месяца после последовательного приема селена и введения ЭК количество Ki67<sup>+</sup>-клеток в КП не отличалось от контрольной группы, но достоверно увеличено в 1,5 раза (p<0,001) по сравнению с опытной группой животных через 2 месяца после введения ЭК.

Доля Ki67<sup>+</sup>-клеток в ПМ не отличалась от контрольной группы животных, а сравнивая с опытной группой через 2 месяца после введения ЭК их количество увеличилось в 1,7 раза (p<0,00004). Ki67<sup>+</sup>-клетки обнаруживались на всем протяжении структуры, формируя многослойные скопления.

Среднее процентное количество в ЛУ достоверно ниже в 1,4 раза (p<0,002), анализируя с контрольной группой крыс, но на 18% больше опытной группы через 2 месяца после введения ЭК. При этом в ЛУ без ГЦ Ki67<sup>+</sup>-клетки снизились в 1,5 раза (p<0,05) при сравнении с контрольной группой и не изменились при сравнении с опытной группой после введения ЭК. В ЛУ с ГЦ данные клетки на 22% (p<0,03) меньше и, наоборот, на 22% больше контрольной и опытной групп соответственно.

Через 2 месяца после последовательного приема селена и введения ЭК наблюдалось увеличение количества Vimentin<sup>+</sup>-клеток в КП на 24,9% (p<0,014) относительно контрольной группы. При этом сравнивая с экспериментальной группой, получавшей только этилкарбамата, существенных изменений в количестве клеток не было выявлено.

В ПМ количество Vimentin<sup>+</sup>-клеток повысилось в 1,4 раза ( $p < 0,03$ ) при сравнении с группой контроля, и они не изменились при сравнении с опытной группой через 2 месяца после введения ЭК.

Среднее процентное количество данных клеток в ЛУ в 1,4 раза больше ( $p < 0,00003$ ), анализируя с контрольной группой крыс и не изменилось, сравнивая с опытной группой через 2 месяца после введения ЭК. Данная тенденция характерна как для ЛУ с ГЦ, так и для ЛУ без ГЦ. Клетки рассеивались по всей структуре.

Таким образом, через 2 месяца после последовательного приема селена и инъекции ЭК при оценке микроскопической картины селезенки выявлялось увеличение толщины ПМ и площади ЛУ, увеличение морфометрических данных МнЗ, а также увеличение CD2<sup>+</sup>- и CD3<sup>+</sup>-клеток, что косвенно может указывать на индукцию Т-клеточного иммунного ответа. Кроме этого, увеличены CD68<sup>+</sup>-клетки и p53<sup>+</sup>-клетки, что, по нашему мнению, может говорить о выраженной реакции иммунного ответа. На ультрамикроскопическом уровне в клетках селезенки выраженных изменений в органоидах не было отмечено.

### **3.3.3. Морфологическое и иммуногистохимическое исследование селезенки через 6 месяцев после последовательного приема селена и инъекции этилкарбамата**

Масса тела крыс исследуемой группы не отличалась от массы животных контрольной группы. Анализируя с опытной группой через 6 месяцев после инъекции ЭК, масса больше в 1,4 раза.

Абсолютная масса селезенки в опытной группе через 6 месяцев после последовательного приема селена и инъекции ЭК составила  $840,86 \pm 74,62$  мг. Данный параметр достоверно не изменился относительно контрольной группы животных, но превышает на 17% массу селезенки опытной группы самцов через 6 месяцев после инъекции ЭК. Относительная масса селезенки

при сравнении с группой контроля не изменилась, а сравнивая с группой через 6 месяцев после инъекции ЭК – снизилась до 0,24%.

Микроскопическая картина изучаемого органа, после окрашивания гематоксилином и эозином, представлена БП и КП. Сравнивая картину с опытной группой животных через 6 месяцев после инъекции ЭК, нужно отметить, что отсутствовали признаки дезорганизации белой пульпы (рисунок 35).

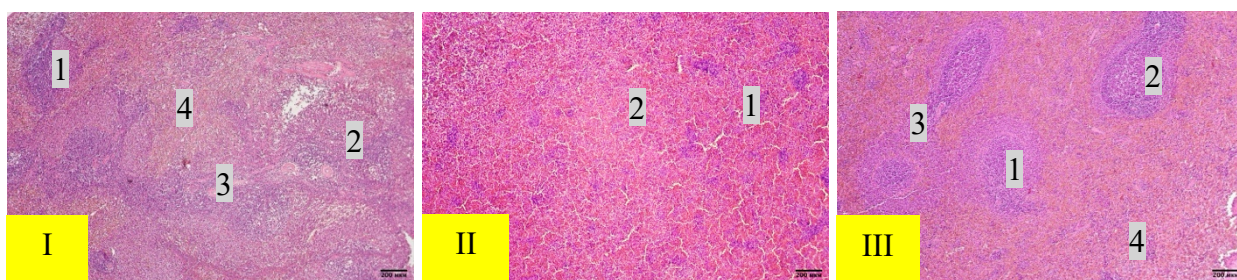


Рисунок 35 – Селезенка крыс.

**I – 6 месяцев с момента завершения приема селена.** Слияние ПМ между собой. Множество артериол. 1 – ЛУ без ГЦ; 2 – ЛУ с ГЦ; 3 – ПМ; 4 – КП.

**II – 6 месяцев после инъекции этилкарбамата.** Отсутствуют ЛУ. Косвенные признаки атрофии БП. 1 – ПМ; 2 – КП.

**III – 6 месяцев после последовательного приема селена и инъекции этилкарбамата.**

ЛУ округлой и вытянутой овальной формы со стертыми границам с КП.

1 – ЛУ без ГЦ; 2 – ЛУ с ГЦ; 3 – ПМ; 4 – КП.

Окрашивание гематоксилином и эозином. Ув.  $\times 100/100/100$

Толщина ПМ составляла  $445,1 \pm 43,49$  мкм. Данный показатель увеличился на 24% ( $p < 0,04$ ) и на 92,3% ( $p < 0,002$ ), анализируя с контрольной группой и опытной группой через 6 месяцев после инъекции ЭК. Вокруг центральной артериолы рыхло располагались клетки, среди которых определялись клетки с широкой светлой цитоплазмой.

Соотношение ЛУ без ГЦ к ЛУ с ГЦ на данном сроке исследования составило 1:4, указывающее на снижение количества ЛУ без ГЦ.

ЛУ имели неправильную округлую и вытянутую форму, в которых границы между зонами и с КП стерты и размыты. Их средняя площадь статистически значимо увеличилась на 24,3% ( $p < 0,03$ ) при анализе с контрольной группой и составляла  $58,84 \pm 2,35$  мм<sup>2</sup>. Сравнить с опытной

группой через 6 месяцев после введения ЭК не удалось, потому что у этих крыс отсутствовали ЛУ. Площадь ЛУ без ГЦ составляла  $49,49 \pm 1,93$  мм<sup>2</sup>, что достоверно выше в 1,5 раза ( $p < 0,02$ ) при сравнении с контрольной группой животных. Площадь ЛУ с ГЦ достоверно на 24,3% больше ( $p < 0,03$ ), чем в контрольной группе животных. Данный параметр составил  $58,84 \pm 2,35$  мм<sup>2</sup>.

Толщина и площадь МнЗ ЛУ опытной группы увеличились на 22% ( $p < 0,03$ ) и на 24% относительно контрольной группы соответственно (таблица 14).

Таблица 14 – Морфометрические показатели структур селезенки контрольной и опытных групп через 6 месяцев после инъекции этилкарбамата, через 6 месяцев после последовательного приема селена и инъекции этилкарбамата

Морфометрические параметры	Контрольная группа	Опытная группа через 6 месяцев после инъекции этилкарбамата	Опытная группа через 6 месяцев после последовательного приема селена и инъекции этилкарбамата
Площадь МнЗ, мм <sup>2</sup>	$8,66 \pm 0,27$	-	<b><math>10,72 \pm 0,54^*</math></b>
Толщина МнЗ, мкм	$96,62 \pm 5,35$	-	$117,8 \pm 7,34$
Площадь МрЗ, мм <sup>2</sup>	$21,85 \pm 1,88$	-	$24,08 \pm 6,31$
Толщина МрЗ, мкм	$125,3 \pm 5,65$	-	$120,51 \pm 9,85$
Толщина стенки центральной артериолы, мкм	$7,59 \pm 0,42$	<b><math>10,37 \pm 1,09^*</math></b>	<b><math>11,63 \pm 0,89^{**}</math></b>
Внутренний диаметр центральной артериолы, мкм	$8,13 \pm 1,25$	$6,58 \pm 0,37$	<b><math>15,99 \pm 2,01^* \bullet</math></b>
ИК	$1,86 \pm 0,67$	$3,15 \pm 5,4$	$1,45 \pm 0,88$

Примечание: \* –  $p < 0,05$  при сравнении с контрольной группой; \*\* –  $p < 0,005$  при сравнении с контрольной группой;

• –  $p < 0,05$  при сравнении с опытной группой через 6 месяцев после инъекции этилкарбамата

Толщина и площадь МрЗ ЛУ не изменены при сравнении с группой контроля (таблица 14). Сравнительный анализ указанных параметров ЛУ с опытной группой через 6 месяцев после введения ЭК представляется невозможным, поскольку к данному моменту морфофункциональная структура в селезенке не выявлялась.

Через 6 месяцев после последовательного приема селена и инъекции ЭК толщина артериолы увеличилась в 1,5 раза ( $p < 0,00053$ ), сравнивая с контрольной группой (таблица 14). Исследуя полученные данные и изучая с опытной группой через 6 месяцев после инъекции ЭК, выраженных изменений не выявлялось (таблица 14).

Внутренний диаметр просвета центральной артериолы достоверно увеличился в 2 раза ( $p < 0,04$ ) относительно контрольной группы и выше в 2,4 раза ( $p < 0,022$ ) по сравнению с опытной группой после инъекции ЭК (таблица 14). ИК незначительно снизился с  $1,86 \pm 0,67$  до  $1,45 \pm 0,88$  при сравнении с контрольной группой и уменьшился в 2,2 раза, анализируя с опытной группой животных после введения ЭК (таблица 14). ЛК составил  $1,87 \pm 0,43$ , что на 17% ниже, чем в контрольной группе самцов.

На ультратонких срезах селезенки отмечалось рыхлое расположение лимфоцитов, между клетками была замечена соединительная ткань. В ядрах лимфоцитов преобладал гетерохроматин. Ядра клеток имели неправильные округлые формы, местами с неровными контурами и выемками. Ядрышко имело не типичное положение возле стенки ядра. В цитоплазме лимфоцитов выявляли набухшие митохондрии в количестве до 4-5 шт и липидные включения (рисунок 36). В ГЦ и в КП отмечалось увеличение плазмоцитов с большим количеством рибосом и выраженной шероховатой ЭПС. В КП определялись макрофаги на разных стадиях фагоцитоза.

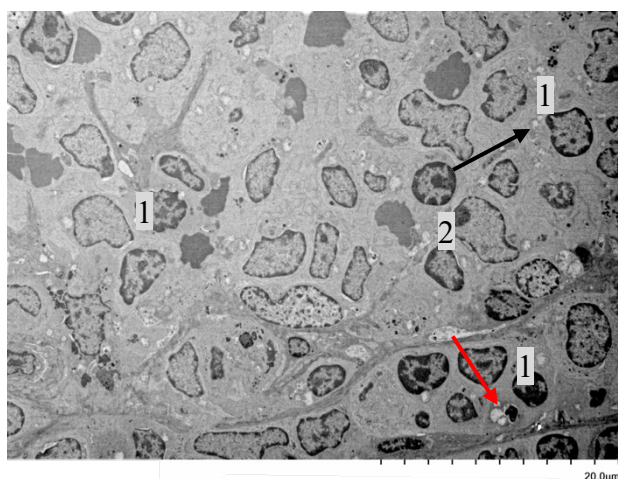


Рисунок 36 – Ультраструктура селезенки крысы. 6 месяцев после последовательного приема селена и инъекции этилкарбамата. МрЗ ЛУ селезенки с лимфоцитами и единичными эритроцитами. В лимфоцитах признаки набухших митохондрий (указаны черной стрелкой) и липидных включений (красная стрелка). 1 – лимфоцит; 2 – эритроцит.  
Ув.  $\times 1\ 000$

Количество  $CD2^+$ -клеток в КП на 17% ( $p < 0,008$ ) ниже при сравнении с группой контроля, но на 28% ( $p < 0,007$ ) больше, анализируя с опытной группой через 6 месяцев после инъекции ЭК. Динамический анализ установил, что доля  $CD2^+$ -клеток в КП на этом сроке уменьшилась в 1,7 раза ( $p < 0,05$ ). Клетки в КП визуализировали по всей структуре.

В ПМ содержание  $CD2^+$ -клеток незначительно снизилось на 15% ( $p < 0,04$ ), сравнивая с контрольной группой и не отличалось от опытной группы. Среднее процентное количество  $CD2^+$ -клеток в ЛУ в исследуемой группе составило  $4,19 \pm 0,19\%$ , что в 1,5 раза ( $p < 0,002$ ) меньше, чем в группе контроля. В ЛУ без ГЦ содержание данных клеток достоверно снизилось на 39,4% ( $p < 0,03$ ). В ЛУ с ГЦ количество  $CD2^+$ -клеток уменьшилось на 23,1%, сравнивая с контрольной группой. При сравнении внутри исследуемой группы доля данных клеток снижена в ЛУ без ГЦ в 2,3 раза ( $p < 0,05$ ) и в ЛУ с ГЦ в 2,2 раза ( $p < 0,01$ ) Исследуемые клетки обнаруживались во всех зонах ЛУ.

Содержание  $CD3^+$ -клеток в КП снизилось на 17% ( $p < 0,008$ ), сравнивая с контрольной группой, и не отличалось от значения опытной группы через 6 месяцев после введения ЭК. При динамическом наблюдении их доля в КП была в 1,7 ( $p < 3,8089E-09$ ) раза ниже предыдущего срока исследования

В ПМ содержание CD3<sup>+</sup>-клеток достоверно увеличилось в 1,6 раза ( $p < 0,0002$ ) и в 2 раза ( $p < 0,001$ ) сравнивая с контрольной и группой после инъекции ЭК. Данные клетки располагались многослойно и близко друг к другу (рисунок 37).

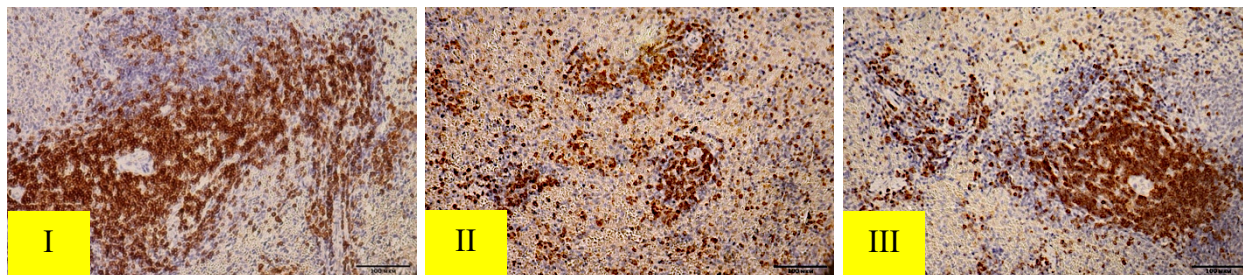


Рисунок 37 – Селезенка крыс. ПМ.

***I – 6 месяцев с момента завершения приема селена.***

Количество CD3<sup>+</sup>-клеток увеличено по всей площади ПМ.

***II – 6 месяцев после инъекции этилкарбамата.***

Количество CD3<sup>+</sup>-клеток уменьшено по всей площади ПМ.

***III – 6 месяцев после последовательного приема селена и инъекции этилкарбамата.***

Количество CD3<sup>+</sup>-клеток увеличено по всей площади ПМ.

Иммуногистохимическая реакция к CD3<sup>+</sup>-клеткам. Ув.  $\times 400/400/400$

Среднее процентное количество CD3<sup>+</sup>-клеток в ЛУ составило  $15,82 \pm 1,31\%$ . Данный показатель увеличился в 1,4 раза ( $p < 0,02$ ) при сравнении с контрольной группой. В ЛУ без ГЦ и в ЛУ с ГЦ исследуемые клетки повысились в 1,5 раза ( $p < 0,02$ ) и на 22,4% соответственно, анализируя с группой контроля.

Доля CD21<sup>+</sup>-клеток в КП снизилась в 1,5 раза ( $p < 0,0022$ ) относительно группы контроля и не отличались от группы животных через 6 месяцев после инъекции ЭК. По сравнению с предшествующим сроком исследования количество CD21<sup>+</sup>-клеток уменьшилось в 1,7 раза.

В ПМ число CD21<sup>+</sup>-клетки уменьшилось на 25% ( $p < 0,01$ ), сравнивая с контрольной группой, но на 24% больше ( $p < 0,04$ ), чем в группе крыс через 6 месяцев после инъекции ЭК. В ходе динамического наблюдения отмечено снижение содержания данных клеток в ПМ в 1,8 раза ( $p < 5,6078E-05$ ). Клетки визуализировали как возле артериолы, так и на границе с КП. Среднее

процентное содержание CD21<sup>+</sup>-клеток в ЛУ на 23% ( $p < 0,002$ ) ниже, чем в контрольной группе. В основном клетки снизились в ГЦ. В ЛУ с ГЦ данные клетки уменьшились на 25,3% ( $p < 0,032$ ) по сравнению с группой контроля.

Количество CD68<sup>+</sup>-клеток в КП не отличалось от группы контроля. При сравнении с группой через 6 месяцев после инъекции ЭК количество клеток увеличилось на 26%.

В ПМ содержание CD68<sup>+</sup>-клеток при сравнении с контрольной группой снизилось на 25% ( $p < 0,02$ ), но не изменилось при сравнении с группой после введения ЭК. Среднее содержание макрофагов в ЛУ было на 24% ниже по сравнению с контролем. В ЛУ без ГЦ количество CD68<sup>+</sup>-клетки снижено в 1,5 раза, тогда как в ЛУ с ГЦ показатели соответствовали контрольным. В ЛУ без ГЦ доля CD68<sup>+</sup>-клеток ниже в 2,6 раза ( $p < 0,04$ ) по сравнению с предыдущим сроком исследования.

Количество p53<sup>+</sup>-клеток в КП в опытной группе не отличалось от группы контроля и от группы через 6 месяцев после инъекции ЭК. В ПМ содержание p53<sup>+</sup>-клеток уменьшилось по всей ее площади на 21% ( $p < 0,0082$ ), сравнивая с контрольной группой и снизилось в 1,6 раза ( $p < 0,00013$ ), относительно группы после введения ЭК. В ходе динамического наблюдения отмечено снижение содержания данных клеток в КП в 1,9 раза ( $p < 9,4001E-06$ ).

В ЛУ среднее процентное количество p53<sup>+</sup>-клеток ниже в 1,5 раза ( $p < 0,011$ ), при сравнении с контрольной группой. P53<sup>+</sup>-клетки уменьшились во всех его зонах. В ЛУ без ГЦ их содержание не изменилось по сравнению с группой контроля, а в ЛУ с ГЦ уменьшилось в 1,8 раза ( $p < 0,008$ ). При динамическом наблюдении по сравнению с предыдущим сроком выявлено уменьшение доли p53<sup>+</sup>-клеток в БП: в ПМ в 2,7 раза ( $p < 0,05$ ), в ЛУ без ГЦ – в 2,7 раза ( $p < 0,001$ ) и в ЛУ с ГЦ – в 4 раза ( $p < 1,7152E-06$ ).

Содержание Ki67<sup>+</sup>-клеток в КП меньше на 21,2% ( $p < 0,02$ ), сравнивая с группой контроля и не изменилось относительно опытной группы после введения ЭК. Расположение Ki67<sup>+</sup>-клеток в КП не отличалось от группы контроля.

В ПМ количество исследуемых клеток в 1,7 раза ( $p < 0,0003$ ) больше, чем в группе контроля и на 20% выше, анализируя с группой животных через 6 месяцев после инъекции ЭК.

В ЛУ среднее процентное содержание указанных клеток достигало  $10,55 \pm 0,66\%$ , что на 28,8% ( $p < 0,04$ ) больше, сравнивая с контрольной группой. В большей части клетки увеличились в ГЦ. В ЛУ без ГЦ значение  $Ki67^+$ -клеток не отличалось от группы контроля. Исследуемые клетки в ЛУ с ГЦ были в количестве  $11,15 \pm 0,68\%$ , что на 19% выше контрольной группы.

Через 6 месяцев после последовательного приема селена и инъекции ЭК количество  $Vimentin^+$ -клеток в КП не изменялось по сравнению с группой контроля. Однако при сопоставлении с группой через 6 месяцев после инъекции ЭК отмечали их увеличение на 32,4% ( $p < 0,00007$ ).

В ПМ  $Vimentin^+$ -клетки незначительно увеличились на 16% ( $p < 0,03$ ), сравнивая с животными из группы контроля и в 1,6 раза ( $p < 0,03$ ) больше, анализируя с животными из опытной группы через 6 месяцев после введения ЭК. Повышение клеток наблюдалось по всей структуре ПМ (рисунок 38).

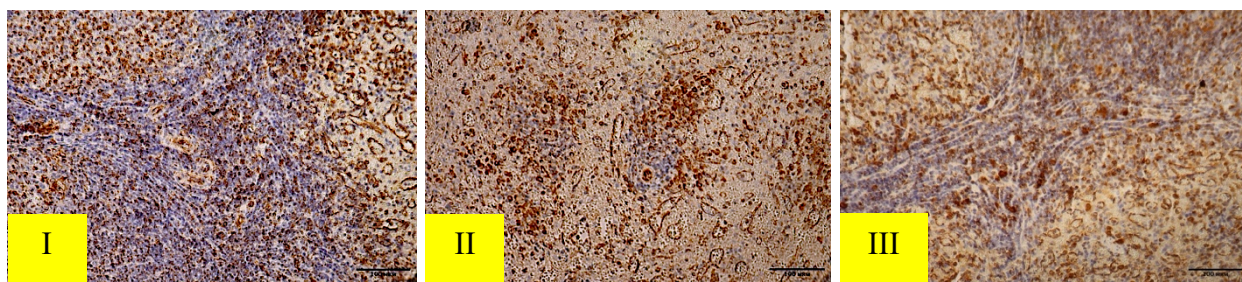


Рисунок 38 – Селезенка крыс. ПМ.

***I – 6 месяцев с момента завершения приема селена.***

Количество  $Vimentin^+$ -клеток увеличено по всей площади ПМ.

***II – 6 месяцев после инъекции этилкарбамата.***

Количество  $Vimentin^+$ -клеток уменьшено по всей площади ПМ.

***III – 6 месяцев после последовательного приема селена и инъекции этилкарбамата.***

Количество  $Vimentin^+$ -клеток увеличено по всей площади ПМ.

Иммуногистохимическая реакция к  $Vimentin^+$ -клеткам. Ув.  $\times 400/400/400$

Среднее процентное количество  $Vimentin^+$ -клеток в ЛУ в 1,5 раза ( $p < 0,002$ ) больше, чем в контрольной группе животных. Увеличение

наблюдалось во всех зонах ЛУ. В ЛУ без ГЦ исследуемые клетки повышены в 1,7 раза ( $p < 0,03$ ) и в ЛУ с ГЦ в 1,6 раза ( $p < 0,011$ ), анализируя с группой контроля (таблица 15).

Таким образом, установлено, что через 6 месяцев после однократной инъекции ЭК возникла дезорганизация БП селезенки, что проявилось полным отсутствием ЛУ и выраженной гипоплазией ПМ, указывающая на полную атрофию БП и уменьшилась пропускная способность центральной артериолы селезенки. В отличие от этого, через 6 месяцев после последовательного приема селена и инъекции этилкарбамата сохранялись КП и БП, выявлялись ЛУ как с ГЦ, так и без ГЦ, диаметр просвета центральной артериолы не уменьшен, площадь ПМ резко увеличена.

Кроме того, через 6 месяцев после введения ЭК отмечено снижение изучаемых иммуногистохимическим методом клеток как в ПМ, так и в КП, тогда как через 6 месяцев после последовательного приема селена и инъекции ЭК отмечали повышение количества  $CD2^{+-}$ ,  $CD68^{+-}$ ,  $Vimentin^{+-}$  клеток в КП, повышение  $CD3^{+-}$ ,  $CD21^{+-}$ ,  $Ki67^{+-}$  и  $Vimentin^{+-}$  клеток в ПМ. На ультраструктурном уровне через 6 месяцев после последовательного приема селена и инъекции ЭК уменьшено количество набухших митохондрий в лимфоцитах, отмечали рыхлое расположение клеток.

Таблица 15 – Динамика иммуногистохимических изменений в структуре селезенки на разных сроках после последовательного приема селена и инъекции ЭК крысам-самцам, %

Структура селезенки	Срок воздействия	Группа крыс	Маркер к CD2	Маркер к CD3	Маркер к CD21	Маркер к CD68	Маркер к p53	Маркер к Ki67	Маркер к Vimentin
ЛУ	через 1 месяц	контрольная	5,86±0,23	8,84±0,43	7,6±0,13	5,74±0,53	6,42±0,59	9,72±0,54	9,71±0,99
		селен+ЭК	4,41±0,25 p<0,0019	11,53±1,11	8,54±0,35 p<0,042	3,72±0,48 p<0,026	5,57±0,53 p<0,0019	12,14±0,55 p<0,0072	9,96±0,31 p<0,0019
	через 2 месяца	контрольная	5,04±0,52	9,41±0,29	8,71±0,56	5,41±0,69	5,06±0,44	11,41±0,58	8,3±0,45
		селен+ЭК	9,31±0,78 p<0,00009	21,85±1,6 p<0,0006	11,11±0,76	8,47±0,26 p<0,009	9,53±0,3 p<0,0009	8,38±0,57 p<0,002	11,4±0,47 p<0,00003
	через 6 месяцев	контрольная	6,27±0,42	11,57±0,96	10,31±0,44	5,88±0,59	3,93±0,27	8,19±0,63	9,13±1,02
		селен+ЭК	4,19±0,319 p<0,002	15,82±1,31 p<0,02	7,94±0,32 p<0,002	4,46±0,61	2,69±0,3 p<0,011	10,55±0,66 p<0,04	14,01±0,69 p<0,002
ЛУ без ГЦ	через 1 месяц	контрольная	6,04±0,34	8,62±0,79	10,59±0,73	4,96±0,34	4,47±0,68	7,76±0,75	8,14±0,07
		селен+ЭК	4,11±0,23 p<0,0079	13,29±1,07 p<0,0286	8,89±0,3 p<0,0005	5,38±0,46	5,33±0,94	11,1±0,7 p<0,029	12,16±0,7
	через 2 месяца	контрольная	6,28±0,25	9,76±0,24	9,45±0,72	5,83±1,17	3,97±0,28	11,6±1,11	9,58±0,2
		селен+ЭК	9,1±0,88 p<0,03	25,19±0,29 p<0,03	12,58±0,81	8,02±0,33 p<0,00004	9,43±0,44 p<0,03	8,02±0,88 p<0,05	12,03±0,77 p<0,05
	через 6 месяцев	контрольная	6,67±0,26	12,06±0,84	10,59±0,73	5,88±0,92	3,93±0,42	6,07±0,43	9,05±1,14
		селен+ЭК	4,04±0,24 p<0,03	17,69±1,9 p<0,02	8,44±0,29 p<0,05	3,77±0,83	3,51±0,37	6,2±1,34	13,39±0,94 p<0,03
ЛУ с ГЦ	через 1 месяц	контрольная	5,59±0,27	9,06±0,47	10,08±0,58	6,34±0,44	7,03±0,6	10,69±0,39	9,76±0,55
		селен+ЭК	4,31±0,29 p<0,029	9,26±1,79	6,19±0,12	3,06±0,27 p<0,0709	4,62±0,52 p<0,0019	12,51±0,72	10,7±0,42
		контрольная	5,97±0,47	8,93±0,54	8,15±0,76	5,12±0,39	6,14±0,44	11,22±0,57	8,79±0,65

<i>ПМ</i>	через 2 месяца	селен+ЭК	9,62±0,62 p<0,0008	17,38±0,72 p<0,05	10,44±0,6 p<0,03	8,93±0,2	9,62±0,46 p<0,03	8,75±0,61 p<0,05	11,59±0,35 p<0,05	
	через 6 месяцев	контрольная	5,72±0,93	10,95±1,98	10,08±0,59	5,88±0,93	3,93±0,39	9,41±0,56	9,18±1,53	
		селен+ЭК	4,4±0,41	13,4±1,3	7,53±0,482 p<0,05	5,16±0,81	2,2±0,26 p<0,008	11,15±0,68	14,77±0,91 p<0,011	
	через 1 месяц	контрольная	8,95±1,54	12,18±0,84	12,14±0,67	8,97±0,77	8,35±0,77	8,59±0,57	8,75±0,36	
		селен+ЭК	6,19±0,18 p<0,0381	12,23±1,5	9,49±0,39 p<0,0053	4,94±0,42 p<0,00049	6,19±0,5 p<0,038	14,03±0,87 p<0,0049	10,75±0,72	
	через 2 месяца	контрольная	8,24±0,59	10,74±0,8	9,77±0,75	6,71±0,72	4,47±0,5	13,68±0,57	8,16±0,91	
		селен+ЭК	13,98±0,45 p<0,00005	23,27±0,9 p<0,0022	19,69±1,5 p<0,0006	9,7±0,48 p<0,032	13,35±0,05 p<0,04	13,31±0,6	11,71±0,64 p<0,03	
	через 6 месяцев	контрольная	7,66±0,41	12,96±0,91	14,89±1,001	8,44±0,36	6,25±0,46	8,06±0,45	14,59±0,43	
		селен+ЭК	6,49±0,3 p<0,04	20,49±1,34 p<0,0002	11,22±0,73 p<0,01	6,32±0,59	4,95±0,18 p<0,0082	13,63±0,89 p<0,0003	16,85±0,42 p<0,03	
	<i>КП</i>	через 1 месяц	контрольная	9,11±0,36	9,07±0,35	12,79±0,34	8,1±0,39	8,68±0,3	15,73±0,47	9,31±0,37
			селен+ЭК	6,13±0,21 p<1,96e-7	6,78±0,35 p<0,0000029	8,49±0,28 p<2,593e-10	5,78±0,25 p<0,00005	7,96±0,4 p<0,0019	11,25±0,56 p<9,513e-8	11,44±0,7 p<0,02
		через 2 месяца	контрольная	7,69±0,4%	8,45±0,56	10,49±0,37	6,75±0,43	5,07±0,25	13,51±0,45	10,77±1,12
селен+ЭК			12,33±0,57	15,92±0,65 p<0,00004	18,14±0,75 p<1,66e-11	9,76±0,36 p<0,0014	11,49±0,49 p<1,92e-7	13,81±0,42	13,44±0,54 p<0,014	
через 6 месяцев		контрольная	8,69±0,55	11,42±0,51	15,39±0,79	7,56±0,35	6,44±0,63	11,89±0,63	12,25±0,5	
		селен+ЭК	7,24±0,13 p<0,008	9,44±0,34 p<0,008	10,24±0,75 p<0,0022	7,15±0,3	5,98±0,51	9,37±0,88 p<0,02	13,89±0,41 p<0,02	

## ГЛАВА 4. ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ И ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Обсуждение взаимосвязи между воспалением и развитием онкологических процессов легких активно ведется в научных кругах на протяжении последних десяти лет, так как именно эта связь представляет особый интерес с точки зрения патогенеза онкологических заболеваний. На основании многочисленных экспериментальных исследований установлено, что хроническое воспаление создает благоприятные условия для инициирования и прогрессирования неопластических процессов в легочной ткани [121, 150, 194]. В настоящее время спектр факторов, влияющих на воспалительные процессы в легких, значительно расширился, включая новые вирусные агенты, такие как SARS-CoV-2, который вызывает значительные структурные изменения в паренхиме легких, а также химические вещества, обнаруживаемые в воздухе, в продуктах питания, в сигаретах и спиртных напитках и в материалах синтетического происхождения (композиты, фунгициды, красители и другие) [51, 96, 193].

ЭК, являющийся одним из таких химических агентов, широко используется в экспериментах как модельный канцероген для изучения механизма возникновения аденомы и аденокарциномы. Доказано, что его дозировка в 1 г/кг массы тела животного эффективно инициирует воспалительные реакции в ткани легкого, которые затем переходят в патологический процесс, завершающийся аденомой. Эта дозировка активно используется для моделирования опухолевых процессов через генетические и молекулярные трансформации [96, 120, 140]. Применение ЭК приводит к выраженным морфологическим изменениям в легких: наблюдается гиперплазия альвеолярного эпителия и мезотелия плевры с инфильтрацией лимфоцитами паренхимы легкого, что является предпосылкой для перехода воспаления в злокачественное новообразование [120, 222]. В литературе подчеркивается, что для развития таких неопластических изменений

необходимо от шести и более месяцев после начала воздействия ЭК [143, 157]. Однако, несмотря на обширные исследования, посвященные изменениям легочной паренхимы, вызванных введением ЭК, недостаточно уделено внимания изучению вторичных органов иммунной системы, таких как селезенка, которая участвует в модуляции воспалительного процесса и ответа организма на опухолевый процесс.

Известно, что селезенка выступает в качестве органа, ответственного за воспалительный процесс, включающий компоненты гуморального и клеточного иммунного ответа. В этих процессах активно участвуют ферменты, содержащие в своем составе селен [50, 188]. В исследованиях были проанализированы различные дозы селена, которые указывают, что терапевтическое окно для его положительного эффекта очень широкое. Известно, что пероральная медиана смертельной дозы для селенита натрия составляет 7 мг на 1 кг массы тела, для сульфидов селена – 138 мг на 1 кг массы тела, и для элементарного селена 6700 мг на 1 кг массы тела [16, 33, 58, 60, 67, 77, 308]. Исследование, опубликованное в 2023 году в *Science China Life Sciences*, указывает, что дефицит селена (содержание Se составило 0,008 мг/кг<sup>-1</sup> диеты) привел к ингибированию иммунной функции селезенки [334]. Связь между приемом селена, активностью селезенки и риском опухолевого образования легких все еще не ясна.

Учитывая, что селен обладает проокислительными и провоспалительными свойствами, которые могут способствовать развитию опухоли [165, 188, 221, 260, 271, 283, 323], удивительно было обнаружить, что в нашем исследовании прием селена в дозировке 20 мкг/кг массы тела животного снизил множественность воспалительного и в последующем развитие опухолевого процесса в легких. Кроме этого, в нашем исследовании впервые описаны морфологические, морфометрические, ультраструктурные и иммуногистохимические изменения селезенки при поступлении селена (20 мкг/кг в питьевой форме). Через месяц с момента завершения поступления селена наблюдалось преобладание ЛУ без ГЦ, что, вероятно, способствовало

снижению их средней площади. Помимо этого, было зафиксировано расширение ПМ, а также повышение процентного содержания CD3<sup>+</sup>– и CD2<sup>+</sup>– клеток во всех структурах селезенки. На ультраструктурном уровне наблюдали лимфоциты на разных стадиях созревания. Вокруг центральной артериолы определили скопление юных лимфоцитов. Ki67<sup>+</sup>–клетки увеличены в БП, что указывает на активную пролиферацию клеток [73]. Кроме этого, определили увеличение ЛК. Скорее всего, данные изменения возникли из-за преобладания Т-клеточного иммунного ответа [63]. Активация Th1–опосредованных иммунных реакций также отмечена в других исследованиях на фоне перорального приема селена [100, 167, 207, 333]. Кроме этого, предполагаем, что через месяц после приема микроэлемента улучшена пропускная способность артерий в органе [12]. Вероятно, это может быть связано с действием селена на сердечно-сосудистую систему за счет включения его в состав ферментов, например, глутатионпероксидазы – 1 (GХ-1) [178, 267, 278]. GХ-1 защищает клетки от окислительного повреждения.

Через 6 месяцев с момента завершения приема селена в питьевой форме были определены лишь незначительные изменения в строении селезенки по сравнению с контрольной группой того же возраста, где отмечались признаки возрастной атрофии БП. В КП селезенки животных через 6 месяцев с момента завершения поступления селена обнаруживали увеличенные в размере сосуды и значительное количество венозных синусов, а также расширение ПМ и увеличение показателей центральной артериолы, наряду с повышением процентного содержания CD3<sup>+</sup>–клеток, ИК и ЛК. В тоже время, в этой экспериментальной группе определили снижение количества CD68<sup>+</sup>– и CD21<sup>+</sup>– клеток в ПМ, в КП и в ЛУ с ГЦ, что, согласно литературным данным, может быть связано с участием селенопротеинов в регулировании миграции и фагоцитарной активности макрофагов [100, 115]. В ряде других экспериментальных исследований прием селена приводил к увеличению CD21<sup>+</sup>–клеток в структурах печени, мышцах и крови [289].

В нашей работе впервые проведен подробный анализ морфологических, иммуногистохимических и ультраструктурных изменений в селезенке крыс, вызванных ЭК. Через месяц после поступления данного вещества выявили уменьшение массы тела животных и селезенки. Кроме этого, отметили слияние и неправильную форму ЛУ. Однократная инъекция ЭК привела к преобладанию ЛУ с ГЦ с уменьшением его площади и к увеличению площади ЛУ без ГЦ, а также толщины ПМ. Согласно исследованиям К. А. Васянина, М. О. Тимофеева с соавторами, это изменение говорит о гиперпластических явлениях и об усиленном митотическом делении клеток, преимущественно бластных форм в Т- и В-зависимых зонах селезенки [24]. Е. А. Стаценко в своей работе подчеркивает, что селезенка обладает высокой пластичностью и способностью к адаптации под воздействием различных патологических факторов, что может проявляться в виде изменений количества лимфоидных и миелоидных клеток и изменениями морфометрических параметров [68]. Автор отметила, что перечисленные морфометрические сдвиги можно интерпретировать как признаки гиперфункции данного органа. Кроме этого, эти трансформации сопоставляются с результатами Д. Б. Никитюка, в работах которого указано, что наибольшая плотность ЛУ с ГЦ свидетельствует о повышении пролиферативной активности клеток, таких как В-лимфоцитов, и их активации в ответ на антигенные стимулы [47]. В контексте введения ЭК это может отражать увеличение активности Тх-2.

При подсчете параметрических данных толщины и площади МнЗ, значения лимфоидного коэффициента определили их увеличение, которое косвенно указывает на начальные признаки антигенного стимула с преобладанием гуморального иммунного ответа [12, 170]. Полученные нами результаты совпадают с данными работы И. С. Цветкова с соавторами, которые описали гиперплазию ГЦ, обосновывая смещение баланса Тх-1 и Тх-2 клеток в сторону индукции гуморального иммунного ответа [44].

На ультраструктурном уровне увеличено количество плазматических клеток с выраженной шероховатой ЭПС и комплексом Гольджи. Т. П. Макалиш, В. В. Шаланин описывают схожие изменения и утверждают о повышении активности плазматических клеток [38, 39]. Согласно данным работы Е. К. Нужной, расширенные цистерны ЭПС и комплекса Гольджи, заполненные содержимым в плазматических клетках, указывают на усиленный синтез и повышенную секреторную активность клеток [48]. В работе К. Zhang et al у лимфоцитов БП селезенки выявили отекающие митохондрии, которые увеличены в количестве, и они указывают на повышенный окислительный процесс в клетке в ответ на воспаление, локализованное в легких [331].

Кроме этого, было выявлено уменьшение внутреннего просвета центральной артериолы вместе с утолщением ее стенки и увеличением ИК. ИК характеризует цифровую морфофункциональную оценку сосудов селезенки, в частности, центральную артериолу. По данным Л. А. Шарафутдиновой и В. П. Волкова изменение индекса и параметров центральной артериолы связано с периваскулярным отеком, который приводит к нарушению гемодинамики и поступлению циркулирующих лимфоцитов в иммунокомпетентные зоны [84].

Иммуногистохимическое исследование селезенки выявило изменения в органе уже через месяц после инъекции ЭК. Определяли снижение  $CD2^+$ - и  $CD3^+$ -клеток в КП, в ЛУ и в ПМ;  $CD68^+$ -клеток в КП;  $p53^+$ -клеток в ЛУ и в КП и уменьшение количества  $Ki67^+$ -клеток в ПМ и в КП. Уменьшение содержания количества  $CD2^+$ -клеток через месяц после инъекции ЭК крысам во всех структурах селезенки указывает на уменьшение активности Т-клеток или на изменение Т-клеточной популяции, что может привести к ослаблению клеточного иммунного ответа [105]. Также на угнетение данного звена иммунного ответа указывает снижение экспрессии клетками  $CD3$  (маркер Т-лимфоцитов) [15].

$CD68^+$ -клетки – это макрофаги. Селезенка служит источником популяции зрелых инфильтрирующих макрофагов и регулирующих

посредников, которые контролируют чувствительность макрофагов [21, 90, 311]. Эти клетки выполняют функцию, заключающуюся в снижении патологических изменений, вызванных травмами, воспалением и фиброгенезом в легких [312]. Их уменьшение в селезенке говорит о подавлении фагоцитарной активности или о снижении воспалительной реакции клеток, или о перераспределении клеток [311, 312]. В исследовании, опубликованном в 2015 году A. Venosa et al. [312] указано, что при развитии воспаления в легких возникает миграция CD68<sup>+</sup>-клеток из иммунокомпетентных органов в очаг. Исследование Н. В. Бубновой доказывает клеточную миграцию макрофагов в центральный орган иммунной системы – тимус [10]. В ее работе показано, что через 30 дней после инъекции ЭК наблюдается увеличение числа макрофагов в тимусе. Это указывает на вероятную миграцию CD68<sup>+</sup>-клеток в этот центральный орган иммунного ответа [10]. Снижение Ki67<sup>+</sup>-клеток в ПМ демонстрирует снижение пролиферации клеток. Уменьшение p53 положительных клеток, согласно исследованию С. Чао, говорит о снижении клеточного стресса или адаптации клеток к повреждениям агента [118]. В работе Л. М. Рождественского описано, что снижение апоптической функции p53 могло быть следствием прохождения части клеток с поврежденным геномом и усиления нестабильности генома [55]. Эти изменения подчеркивают перестройку иммунной системы и ее адаптации в ответ на воздействие ЭК.

Через 2 месяца после инъекции ЭК в структуре селезенки продолжается перестройка ее морфологии с нарушением архитектоники иммунокомпетентной зоны. Сохранялось увеличение площади ЛУ без ГЦ и уменьшение площади ЛУ с ГЦ, а также «слияние» ЛУ между собой. Кроме этого, выявили увеличение толщины и площади МрЗ и МнЗ. В данных структурах определили рыхлое расположение клеток, а также отсутствие границ между зонами ЛУ и КП. Увеличение площади ЛУ без ГЦ указывает на то, что иммунная система активно реагирует на поступление ЭК. Лимфоциты накапливаются, готовясь к переходу в стадию В-лимфоцитов и последующему

формированию ГЦ. По этой причине определяли увеличение количества ЛУ с ГЦ и снижение площади ЛУ с ГЦ и самого ГЦ, которые указывают на динамический процесс с их функциональной активностью [1, 12]. Кроме этого, увеличен ЛК, который демонстрирует, что гуморальный иммунный ответ может быть ведущим. Увеличение толщины и площади МрЗ и МнЗ может быть ответом на воздействие агента, что говорит об адаптации организма. Подобные изменения наблюдаются в работах Ю. Х. М. Шидакова, Ш. Р. Давронова, М. Н. Гонохова, В. И. Герунова, которые указывают на лимфопоэтическую активность и гиперстимуляцию В-зависимой лимфоидной структуры и взаимодействие антигена с нарушением перехода, и угнетения Т-клеток в соответствующую зону ЛУ [14, 16, 23, 51, 88]. Эти изменения подтверждаются на ультрамикроскопическом уровне, включая нарушение формы ядра, увеличение количества цистерн аппарата Гольджи и шероховатой ЭПС, заполненных гомогенным содержимым. Кроме этого, в лимфоцитах увеличено количество митохондрий с отечной мембраной и тонкой стенкой. Эти изменения отражают усиление окислительного стресса в клетке. Отек митохондрий с увеличением их количества и истончением мембран подтверждает нарушение их нормальной функциональной активности [203, 247].

Продолжалось утолщение стенки центральной артериолы, что вызвало уменьшение ее внутреннего диаметра. Это говорит о сохранении периваскулярного отека [84]. Выявили сдвиг ИК в сторону увеличения, что указывает на нарушение пропускной способности артериолы селезенки и нарушение миграции клеток [12].

Иммуногистохимический анализ селезенки показал значительные изменения ее клеточного состава. Зарегистрировали незначительное снижение CD2 положительных клеток в КП, ЛУ и ПМ. Согласно данным С. Binder et al. снижение экспрессии клетками CD2 связано с нарушением активации и дифференцировки Т-лимфоцитов, что, в частности, указывает на уменьшение клеточного иммунного ответа [105]. При этом процентное содержание CD3

положительных клеток в ЛУ увеличилось до количества клеток контрольной группы, что подтверждает компенсаторный механизм активности Т-лимфоцитов. Аналогичная реакция отмечена в исследовании Р. О. Симонова [59] и А. В. Шурлыгиной [89]. Также в работе Y. Tai et al. [300] написано, что при ингибировании активации и пролиферации CD2<sup>+</sup>-клеток индуцируется апоптоз эффекторных Т-клеток памяти. Тем самым, вероятно, нарушается один из этапов механизма формирования иммунного комплекса [300].

Увеличение CD21<sup>+</sup>-клеток в ПМ и КП указывает на значительное активационное состояние В-клеток и дендритных клеток. Вероятно, имеется выраженная стимуляция иммуноглобулинов или презентация антигена лимфоцитам [242]. Увеличение количества макрофагов в ПМ и КП подтверждает наличие интенсивной антигенной стимуляции.

Через 2 месяца после инъекции ЭК увеличено количество Vimentin<sup>+</sup>-клеток в ЛУ, в ПМ и КП в 1,5 раза. Имеются исследования, в которых авторы работ К. Uehara, А. Uehara и М. Nieminen et al. [235, 306] подтверждают участие виментина в трансмиграции лимфоцитов и их адгезии к эндотелию. Выраженная реорганизация сети, образованной виментином, во время экстравазации циркулирующих лимфоцитов является первичным структурным поддерживающим источником лимфоцитов [235, 306]. Она ограничивает механическую деформацию клеток при индуцированной хемокином поляризации и способствует их миграции через ограниченные по размеру поры эндотелия [306, 317]. Сообщается, что уменьшение сети указывает на увеличение миграции клеток в иммунокомпетентных структурах селезенки. Кроме этого, в исследованиях С. McDonald-Hyman et al. и А. Prigge et al. указано [217, 252], что Vimentin<sup>+</sup>-клетки являются ключевым метаболическим и функциональным контролером активности Т-лимфоцитов. Авторы считают, что с его снижением возникает увеличение активности Т-лимфоцитов.

Увеличение экспрессии p53 отражает активацию иммунного ответа на повреждение ДНК, ассоциированное с процессами апоптоза и клеточного

старения, что согласуется с литературными данными, описывающими индукцию p53 как универсального маркера повреждения клеток при воздействии различных токсических агентов, включая никотин и другие индукторы окислительного стресса [93]. Также, согласно данным Brömme H. J. и Holtz J. [111], активация p53 сопровождается развитием апоптоза, что подтверждает гипотезу о включении апоптических процессов в ответ на действие ЭК. Исследование Su L. J. et al. [299] демонстрирует, что активация p53 также связана с усилением перекисного окисления и генерацией активных форм кислорода.

Спустя 6 месяцев после инъекции ЭК масса исследуемого органа снижена, преобладала красная пульпа, уменьшена толщина ПМ и полностью исчезли ЛУ. Также снижено количество макрофагов, Т-клеток, CD21<sup>+</sup>-клеток, Vimentin<sup>+</sup>-клеток. На ультрамикроскопическом уровне отметили дезорганизацию клеточного состава селезенки с преобладанием эритроцитов, макрофагов на разных стадиях фагоцитоза, лимфоцитов с деформированным ядром, увеличенными в количестве набухших митохондрий и липидными включениями. Полученные изменения указывают на полную атрофию или инволюцию белой пульпы селезенки с нарушением как клеточного, так и гуморального иммунного ответа [20, 35, 37, 53, 65, 248]. Аналогичные сдвиги в селезенке происходят при тяжелых формах хронических заболеваний, когда инволюция БП достигает такой степени, что ЛУ с ГЦ больше не обнаруживаются [162]. Также в исследовании X. Xu et al. указано, что у детей после COVID-19 клеточный состав селезенки уменьшился, БП атрофирована на разных уровнях, и ЛУ уменьшались или отсутствовали; кроме того, соотношение красной пульпы к белой пульпе увеличивалось с разной степенью [328]. Помимо указанных изменений, они наблюдали уменьшение содержания CD3<sup>+</sup>-, CD8<sup>+</sup>- и CD20<sup>+</sup>-клеток, что говорит о снижении активности компонентов Т- и В-клеточного иммунного ответа в селезенке и выраженной иммунной супрессии в организме [328].

Таким образом, в нашем исследовании выявлены как гиперпластические и пролиферативные процессы на ранних сроках, так и значительные атрофические процессы на более поздних сроках после введения ЭК. Ультраструктурные и иммуногистохимические изменения подтверждают перестройку структуры селезенки. Все это указывает на адаптацию и ответ на поступление ЭК в организм крыс без признаков восстановления гистоструктуры. Для установления подробных механизмов активации компонентов гуморального иммунного ответа необходимо дальнейшее исследование.

При последовательном приеме селена и инъекции ЭК в селезенке изменения были отсрочены. Через 1 и 2 месяца в структуре селезенки отсутствуют морфологические, ультраструктурные и иммуногистохимические изменения, характерные на этих сроках после однократной изолированной инъекции ЭК. Вероятно, это связано с положительным действием селена: активацией клеточного иммунного ответа и улучшением кровотока через центральную артериолу. В работе А. Л. Тишина [71] описано, что микроструктура селезенки животных на 7-е сутки после инъекции селена, имела менее выраженный отек и густое заселение лимфоцитами периартериолярной зоны. В период восстановления отмечено увеличение площади ЛУ и преобладание ЛУ с ГЦ, в которых повышено число плазматических клеток. Эти изменения, по мнению автора, говорят о высокой иммунной реактивности органа после инъекции селена [71]. В исследовании R. F. Fan et al. селен оказывал противоположные действия окислительному повреждению и воспалению, вызванного  $HgCl_2$ , заключающиеся в снижении NF-κB и уменьшении интерлейкинов в селезенке [138]. Положительные эффекты селена, наблюдаемые в группе через 1 и 2 месяца после последовательного поступления веществ, подтверждаются в работе Y. Nan et al. В исследовании указано, что в лимфоцитах селезенки селен уменьшает ультраструктурное повреждение, вызванное лечением свинцом, и

митохондрии продемонстрировали нормальную структуру без признаков крупных митохондриальных вакуолей и хроматической агглютинации [159].

Через 6 месяцев после последовательного поступления селена и ЭК отсутствовали признаки выраженной атрофии белой пульпы. Полученные изменения сопоставляются с результатами через 2 месяца после инъекции ЭК. Таким образом, поступление селена вызывает отсроченные изменения в селезенке и не приводит к атрофии белой пульпы и отсутствию иммунного ответа в последующем.

Настоящая работа содержит сведения о морфологических изменениях селезенки, возникающих в условиях предварительного поступления селена перед инъекцией ЭК. Полученные результаты демонстрируют, что селезенка, как важный периферический орган иммунной системы, обладает реактивностью с сочетанному влиянию ксенобиотиков. Использованный комплекс гистологических методов обеспечил возможность описать ряд закономерных изменений в структуре органа, включая перестройку лимфоидных и сосудисто-стромальных компонентов. Одновременно выполненное исследование позволило установить, что отдельные звенья патогенеза изменений вторичных органов иммунной системы при подобных воздействиях остаются недостаточно изученными. Это подчеркивает актуальность дальнейшего исследования механизмов иммуноморфологической адаптации селезенки.

## ВЫВОДЫ

1. Поступление селена сопровождается увеличением пропускной способности центральной артериолы селезенки (*индекс Керногана с  $1,84 \pm 0,82$  до  $1,5 \pm 0,94$* ), утолщением периартериолярных муфт и преобладанием лимфоидных узелков без сформированных герминативных центров. Однократное внутрибрюшинное введение этилкарбамата приводит к нарушению пропускной способности центральной артериолы селезенки на всех сроках исследования (*индекс с Керногана  $1,84 \pm 0,82$  до  $4,63 \pm 1,5$* ), через 6 месяцев – к исчезновению лимфоидных узелков и уменьшению толщины периартериолярных муфт, что может расцениваться как проявление атрофии белой пульпы селезенки. Предварительное поступление селена перед инъекцией этилкарбамата способствует сохранению пропускной способности центральной артериолы селезенки, толщины периартериолярных муфт и лимфоидных узелков.

2. Поступление селена приводит к увеличению количества лимфоцитов в селезенке без изменения ее ультраструктуры. Однократное введение этилкарбамата вызывает увеличение числа митохондрий через 1 месяц, через 6 месяцев – их набухание и дезорганизация крист, выраженная деструкция органелл с появлением липидных включений. При последовательном поступлении селена и инъекции этилкарбамата отмечается протективный эффект, проявляющийся в отсутствии ранних нарушений и появлением изменений митохондрий и рибосом лимфоцитов только через 6 месяцев.

3. Поступление селена увеличивает число Т-клеток (*CD2, CD3*) и клеток мезенхимального происхождения (*Vimentin*) в белой пульпе (*↑ в 1,5 раза*), а инъекция этилкарбамата, наоборот, снижает количество Т-клеток и клеток мезенхимального происхождения в красной пульпе и периартериолярной муфте (*↓ в 1,5 раза*). Последовательное поступление селена и инъекция этилкарбамата сопровождается стойким ростом зрелых Т-

клеток (*CD3*) и мезенхимальных клеток в 1,5 раза в белой пульпе, что, скорее всего, указывает на усиление иммунного ответа.

4. Поступление селена активирует антигенпрезентирующие клетки и клетки гуморального звена иммунитета, что проявляется увеличением макрофагов (*CD68*) и В-клеток (*CD21*) в белой пульпе селезенки в 1,5 раза. Инъекция этилкарбамата сопровождается угнетением указанных популяций: через 6 месяцев их число снижается в 1,4 раза в красной пульпе и в периартериолярной муфте при полном отсутствии лимфоидных узелков. Последовательное поступление селена и инъекция этилкарбамата приводит к умеренному повышению числа В-клеток (*CD21*) и макрофагов (*CD68*) в 1,3 раза, а через 6 месяцев происходит их снижение во всех структурах селезенки, что, возможно, связано с последствием выведения селена из организма животных.

5. Через 2 месяца после приема селена во всех структурах селезенки обнаруживается увеличение белка р53 в 2 раза и клеточной пролиферации (*Ki67*) в 1,4 раза. Инъекция этилкарбамата, напротив, вызывает уменьшение белка р53 и *Ki67*. При предварительном поступлении селена перед инъекцией этилкарбамата отмечается умеренное снижение белка р53 при одновременном увеличении пролиферации клеток.

## ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

1. Экспериментально подтвержденный факт, что поступление селена оказывает положительное воздействие на морфологию селезенки при инъекции этилкарбамата, имеет определенную клиническую значимость. Результаты могут быть использованы при проведении доклинических исследований в качестве обоснования для разработки ведомственных профилактических программ, направленных на охрану здоровья работников предприятий, где осуществляется контакт с этилкарбаматом.

2. Учитывая выявленные иммунозащитные свойства селена при его предварительном применении до воздействия этилкарбамата, рекомендуется использовать данную модель в качестве экспериментального прототипа для дальнейшего изучения механизмов действия микроэлементов с иммуностимулирующим и иммуномодулирующим свойствами, направленных на разработку новых подходов в профилактике онкогенеза и коррекции иммунных дисфункций.

3. Теоретические положения, научные выводы и эмпирические результаты, полученные в рамках диссертационного исследования, могут быть интегрированы в образовательный процесс на профильных кафедрах медицинских вузов. В частности, они успешно внедрены в учебный процесс кафедры биохимии, клеточной биологии и микробиологии ФГБОУ ВО «Марийский государственный университет». Представленные материалы используются при преподавании теоретических дисциплин и проведении практических и лабораторных занятий со студентами 1-3 курсов медицинских специальностей 31.05.01 Лечебное дело и 31.05.02 Педиатрия.

**СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ**

- АФК – активные формы кислорода
- БП – белая пульпа
- ГЦ – герминативный центр
- Г $\delta$  – гамма-дельта
- ДК – дендритные клетки
- ДНК – дезоксирибонуклеиновая кислота
- ИК – индекс Керногана
- КП – красная пульпа
- ЛК – лимфоидный коэффициент
- MZMs – макрофаги маргинальных зон
- МКАТ – моноклональное антитело
- МММs – маргинальные металлофильные макрофаги
- МнЗ – мантийная зона
- МрЗ – маргинальная зона
- мРНК – матричная рибонуклеиновая кислота
- ПКАТ – поликлональное антитело
- ПМ – периартериолярная лимфоидная муфта
- тРНК – транспортная рибонуклеиновая кислота
- тРНКSec - транспортная рибонуклеиновая кислота селеноцистеина
- ЭК – этилкарбамат
- ЭПР – эндоплазматический ретикулум
- Blimp-1 – B lymphocyte-induced maturation protein-1
- Bsl-2 – регулятор апоптоза
- CCL19 – C-C motif chemokine ligand 19
- CCL21 – C-C motif chemokine ligand 21
- CCR7 – C-C chemokine receptor type 7

CD141 – поверхностный рецептор эндотелиальных клеток  
CD169 – макрофаг-специфический маркер воспаления и иммунорегуляции  
CD202b – маркер эндотелиальных клеток и субпопуляции моноцитов  
CD206 – ген-маркер M2  
CD23 – маркер активации В-лимфоцитов  
CD271 – рецептор фактора роста нервов  
CD4 – Т-хелперы  
CD47 – поверхностный клеточный гликопротеин  
CD8<sup>+</sup> – Т-киллеры  
CD8 $\alpha$  – дендритные клетки  
CXCL12 – chemokine C-X-C motif ligand 12  
CXCL13 – chemokine C-X-C motif ligand 13  
CXCR3 – C-X-C motif chemokine receptor 3  
DIO – йодотирониндейодиназа  
FDC – Follicular dendritic cells  
IGF-II – инсулиноподобный фактор роста II  
GM-CSF – гранулоцитарно-макрофагальный колониестимулирующий фактор  
GPX – глутатионпероксидаза  
GPx1, GPX1 – глутатионпероксидаза 1  
GPx2, GPX2 – глутатионпероксидаза 2  
GPx3, GPX3 – глутатионпероксидаза 3  
GPx5, GPX5 – глутатионпероксидаза 5  
IgD – иммуноглобулин D  
IGF-I – инсулиноподобный фактор роста I  
IgM – иммуноглобулин M  
IL-10 – интерлейкин 10  
IL-2 – интерлейкин 2  
IL-4 – интерлейкин 4  
IL-6 – интерлейкин 6

LYVE-1 – lymphatic vessel endothelial hyaluronan receptor 1

MHC – главный комплекс гистосовместимости

NF- $\kappa$ B – ядерный фактор Каппа- $\beta$

PSTK – фосфосерил-тРНКSec-киназой

RBCs – Red blood cells

SARS-COVID 19 – коронавирусная инфекция

Se – селен

Se<sup>2-</sup> – селенид

Sec – селеноцистеин

SelH – селенопротеин H

SelI – селенопротеин I

SelK – селенопротеин K

SelP, SEP1 – селенопротеин P

SelS – селенопротеин S

SelT – селенопротеин T

SeO<sub>3</sub><sup>2-</sup> – селенит

SeO<sub>4</sub><sup>2-</sup> – селенат

SMA – smooth muscle  $\alpha$ -actin

TGF $\beta$ 3 – трансформирующий фактор роста бета3

TIE-2 – тирозинкиназа

TLR4 – Toll-подобные рецепторы

TNF- $\alpha$  – фактор некроза опухоли альфа

TNF- $\alpha$  – фактор некроза опухоли- $\alpha$

TR, TrxR – тиоредоксинредуктаза

TR1 – тиоредоксинредуктаза 1

UGA – урацил-гуанин-аденин

VEGFR-3 – vascular endothelial growth factor receptor 3

**СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ**

1. Александрова Л. И. и др. Морфология органов иммуногенеза при воздействии электромагнитных излучений // Вестник Волгоградского государственного медицинского университета. – 2013. – №. 2 (46). – С. 32-36.
2. Антонов Н. С. и др. Динамика заболеваемости болезнями органов дыхания среди населения Российской Федерации в 2010–2022 гг. // Медицина. – 2023. – Т. 11. – №. 3. – С. 1-17.
3. Арлашкина О. М. и др. Изменения белой пульпы селезенки у потомства спленэктомированных крыс различных возрастных периодов после введения 1, 2-диметилгидразина // Научно-практический рецензируемый журнал Клиническая и экспериментальная морфология. – 2019. – Т. 8. – №. 4. – С. 49-58.
4. Арлашкина О. М. и др. Морфологические характеристики белой пульпы и дендритных клеток селезенки при экспериментальном канцерогенезе // Иммунология. – 2019. – Т. 40. – №. 2. – С. 17-22.
5. Арлашкина, О. М. Морфологическая и иммуногистохимическая характеристика структур селезенки потомства спленэктомированных крыс при введении 1,2-диметилгидразина: специальность 03.03.04 "Клеточная биология, цитология, гистология": диссертация на соискание ученой степени кандидата медицинских наук / Арлашкина Ольга Михайловна, 2021. – 183 с.
6. Афанасьев Ю. И. Гистология, эмбриология, цитология: учебник / Афанасьев Ю.И., Юрина Н.А., Алешин Б.В. и др // М: ГОЭТАР-Медиа. – 2014. – С. 436- 424.
7. Ахметзянов Ф. Ш., Гайнаншин Р. Р. Клеточные и гуморальные изменения после спленэктомии // Казанский медицинский журнал. – 2018. – Т. 99. – №. 5. – С. 802-807.
8. Бадман А. Л. Селен и его соединения / А. Л. Бадман // Вредные химические вещества. Неорганические соединения V-VIII групп: Справ. Изд. / под ред. В. А. Филова и др. – Л.: Химия, 1989. – 592 с. – С. 257 – 284.

9. Белик И. А. Влияние высокой дозы тартразина на изменение ультрамикроскопических показателей селезенки и тимуса половозрелых крыс-самцов // Морфологический альманах имени В. Г. Ковешникова. – 2020. – Т. 18. – №. 4. – С. 6-12.
10. Бубнова Н. В. Реакция CD68-положительных клеток тимуса у крыс при введении селена и канцерогена // Биомедицина. – 2023. – Т. 19. – №. 2. – С. 54-60.
11. Веснушкин Г. М. Влияние мелатонина на канцерогенез, индуцируемый уретаном и бенз(а)пиреном у мышей: специальность 14.00.1414.00.15: диссертация на соискание ученой степени кандидата медицинских наук / Веснушкин Георгий Михайлович. – Санкт-Петербург, 2007. – 137 с. – EDN NJBKND
12. Волков В. П. Новый алгоритм морфометрической оценки функциональной иммуноморфологии селезенки // Universum: медицина и фармакология. – 2015. – №. 5-6 (18).
13. Гаврилин П. Н., Масюк Д. Н. Особенности макромикроскопической структуры функциональных сегментов в лимфатических узлах у зрело рождающих млекопитающих // Вісник морфології (Reports of Morphology) – 2003. – С. 1:4-6.
14. Гонохова М. Н., Герунов В. И. Структурные изменения в селезенке крыс при хронической интоксикации Конфидором экстра // Актуальные вопросы ветеринарии. – 2020. – С. 610.
15. Гринько Е. К. и др. Динамика восстановления Т-лимфоцитов после индукции лимфопении циклофосфаном // Иммунология. – 2020. – Т. 41. – №. 4. – С. 285-294.
16. Давронова Ш. Р. Особенности площадей Т-и В-зависимых зон селезенки в динамике антигенного воздействия // Research Journal of Trauma and Disability Studies. – 2023. – Т. 2. – №. 12. – С. 454-458.
17. Дедов Д. В. Селен и селенсодержащие препараты: биологическое и фармакологическое действие на организм человека / Д. В. Дедов //

Фармация. – 2023. – Т. 72 – № 1. – С. 5-8. – DOI 10.29296/25419218-2023-01-01. – EDN CLBRFC.

18. Досаев Т. М. и др. Моноклональные антитела в исследовании сосудистого компартмента селезенки человека // Вестник Казахского Национального медицинского университета. – 2021. – №. 4. – С. 119-122.

19. Досаев Т. М. и др. Сравнительная анатомия лимфоидного и сосудистого компартментов селезенки человека и лабораторных животных // Астана медициналық журналы. – 2022. – №. S1. – С. 21-29.

20. Дрозд М. Н. Эффективность минерального адаптогена в условиях экспериментальной иммуносупрессии // Аграрный вестник Урала. – 2021. – №. 12 (215). – С. 29-40.

21. Завьялова М. В., Перельмутер В. М. Макрофаги селезенки: особенности популяционного состава и функции // Цитология. – 2022. – Т. 64. – №. 1. – С. 14-25.

22. Зайцев В. Б. Морфометрические особенности структуры селезенки / В. Б. Зайцев, Н. С. Федоровская, Л. М. Железнов // Вестник новых медицинских технологий. – 2018. – Т. 25. – №3. – С. 153-159.

23. Закирова Н. Р. Новые параметры изучения морфометрических показателей селезенки // Образование наука и инновационные идеи в мире. – 2023. – Т. 34. – №. 5. – С. 50-54.

24. Изменение площади лимфоидных образований селезенки и лимфоидных бляшек тонкой кишки при пероральном поступлении различной концентрации антигенного материала / К. А. Васянина, М. О. Тимофеева, Л. А. Ключева [и др.] // Материалы Международной научно-практической конференции "Бородинские чтения", посвященной 90-летию академика РАН Юрия Ивановича Бородина, Новосибирск, 22 марта 2019 года / ИПЦ НГМУ. – Новосибирск: Новосибирский государственный медицинский университет, 2019. – С. 75-84. – EDN BYYYYRX

25. Иммуногистохимические методы: Руководство / Ed. by George L. Kumar, Lars Rudbeck.: ДАКО / Пер. с англ. под ред. Г.А.Франка и П.Г.Малькова. – 2011. – 224 с.

26. Камышный А. М., Топол И. А. Механизмы активации кишечной ассоциированной лимфоидной ткани в условиях хронического социального стресса // Медицинская иммунология. – 2015. – Т. 17. – № 5. – С. 455-460.

27. Каприн А. Д., Старинского В. В., Шахзадовой А. О. Состояние онкологической помощи населению России в 2023 году. – М.: МНИОИ им. П.А. Герцена – филиал ФГБУ «НМИЦ радиологии» Минздрава России, 2024. – илл. – с. 239.

28. Карелина С. И., Кашпур Я. О., Косарева Е. А. Анализ статистических данных за период эпидемии с 2020 г. по 2023 г. новой коронавирусной инфекции на территории РФ и ее субъектов по данным средств массовой информации // Universum: медицина и фармакология. – 2023. – №. 4-5 (98). – С. 42-46.

29. Кащенко С. А., Бобрышева И. В. Особенности гистологического строения белой пульпы селезенки крыс в разные периоды постнатального онтогенеза в условиях экспериментальной иммуносупрессии // Журнал Гродненского государственного медицинского университета. – 2014. – №. 1 (45). – С. 51-54.

30. Ким И. Л. Морфологические изменения, происходящие в селезенке и тимусе при воздействии никотин содержащими продуктами орального потребления // Research Journal of Trauma and Disability Studies. – 2023. – Т. 2. – №. 12. – С. 819-827. 29

31. Клименко Н. А., Варваричева О. С. Экспрессия белка p53 в лимфоцитах тимуса и селезенки крыс при действии низкоинтенсивного гамма-излучения на фоне хронического воспаления // Український радіологічний журнал. – 2007. – Т. 15. – №. 1. – С. 71-75.

32. Клименко Н. А., Татарко С. В., Сорокина И. В. Морфофункциональное состояние селезенки в динамике первично

хронического воспаления // Український морфологічний альманах. – 2008. – Т. 6. – №. 4. – С. 50-52.

33. Климова Е. В. Биодоступность различных форм селена, содержащегося в рационе крыс, и влияние его на некоторые физиологические и биохимические показатели состояния животных. Зорин С.Н. // Вопр. питания. – 2010. – Т.79 – N 1. – С. 74-77.-Рез. англ.-Библиогр.: с.77. Шифр П1514 / Е. В. Климова // Экологическая безопасность в АПК. Реферативный журнал. – 2014. – № 1. – С. 1. – EDN RZWHDF.

34. Коржевский Д. Э. Теоретические основы и практическое применение методов иммуногистохимия: руководство / Д. Э. Коржевский, О. В. Кирик, М. Н. Карпенко [и др.]. – Санкт-Петербург : СпецЛит, 2014. – С. 10.

35. Кузнецова Е. П. и др. Селезенка: онтогенез и старение // Геронтология. – 2013. – №. 2. – С. 135.

36. Лузикова Е. М., Сергеева В. Е. Влияние преднизолона на морфотипы NSE- и CD-68 – позитивных клеток селезенки / Лузикова Е. М., Сергеева В. Е. / Вестник РУДН – 2009. – №. 4 – С. 559-561.

37. Магруппов Б. А., Раджапов А. А. Морфологические изменения подмышечных лимфатических узлов и селезенки при экспериментальном термическом ожоге // Университетская наука: взгляд в будущее. – 2020. – С. 622-626.

38. Макалиш Т. П. Морфофункциональные особенности селезенки при воздействии на организм факторов различного генеза // Таврический медико-биологический вестник. – 2013.

39. Макалиш Т. П., Шаланин В. В. Ультраструктура селезенки крыс различных возрастов после введения ксеногенной спинномозговой жидкости // Крымский журнал экспериментальной и клинической медицины. – 2017. – Т. 7. – №. 4. – С. 48-52.

40. Маленков, А. Г. Биологические основы профилактики и нетоксической терапии рака / А. Г. Маленков, Е. А. Модянова; А. Г. Маленков,

Е. А. Модянова. – Москва : Mageric, 2006. – 375 с. – ISBN 5-902778-08-5. – EDN QLSUBD.

41. Меркулова Л. М. и др. Морфологические изменения селезенки в условиях экспериментального канцерогенеза // Acta medica Eurasica. – 2016. – №. 3. – С. 54-58.

42. Моделирование синдрома системного воспалительного ответа на анестезированных крысах / Александров В. Г., Губаревич Е. А., Данилова Г.А., Туманова Т. С. // Интегративная физиология – 2020. – Т. 1. – №1 – С. 51-60

43. Молдавская А. А., Долин А. В. Сравнительная характеристика изменений дефинитивной структуры селезенки на фоне хронической алкогольной интоксикации в эксперименте у человека / Успехи современного естествознания – 2009. – №2. – С. 11-14.

44. Морфологические изменения органов иммунной системы у самцов мышей С57BL/6 при воздействии высокой дозы тестостерона / И. С. Цветков, М. Т. Добрынина, В. А. Мхитаров [и др.] // Клиническая и экспериментальная морфология. – 2018. – № 2(26). – С. 19-24. DOI 10.31088/2226-5988-2018-26-2-19-24.

45. Москалев Ю. И. Минеральный обмен / Ю. И. Москалев. – М.: Медицина – 1985. – 288 с.

46. Никитенко О. В. Структурно-клеточные перестройки лимфоидных органов после внутрибрюшинного введения селенита натрия в токсической дозе / О. В. Никитенко, И. Н. Путалова // Вестник новых медицинских технологий. – 2010. – Т. 17 – № 2. – С. 32-35.

47. Никитюк Д.Б., Шадлинская С.В. Изменчивость лимфоидных структур преддверия влагалища в разные фазы овариально-менструального цикла // Медицинский вестник Башкортостана. – 2018. – №2 (74). URL: <https://cyberleninka.ru/article/n/izmenchivost-limfoidnyh-struktur-preddveriya-vlagalischa-v-raznye-fazy-ovarialno-menstrualnogo-tsikla> (дата обращения: 03.10.2024).

48. Нужная Е. К. и др. Ультраструктура селезенки половозрелых крыс при введении бисфосфоната Зомета и иммуностимулятора тимогена // Український медичний альманах. – 2011. – №. 4. – С. 107-109.

49. Нуклеиновые кислоты / сост. группой авторов ; под ред. Э. Чаргаффа, Дж. Дэвидсона ; пер. с англ. Н. М. Абросимовой [и др.] ; под ред. и с предисл. А. Н. Белозерского. — Москва : Изд-во иностр. лит., 1962. — 455 С., 1 л. ил. : черт. ; 27 см.

50. Обухова О. А. Селен в онкологии / О. А. Обухова, И. А. Курмуков // Онкогинекология. – 2019. – № 1(29). – С. 66-72. – DOI 10.52313/22278710\_2019\_1\_66. – EDN LDWJIB.

51. Онищенко М. И. Морфологические изменения селезенки белых крыс инфантильного возраста, подвергавшихся ингаляционному воздействию формальдегида / М. И. Онищенко // Морфологический альманах имени В.Г. Ковешникова. – 2022. – Т. 20, № 1. – С. 91-99. – EDN ATUMZU.

52. Особенности метаболизма и спектра действия селена, возможности применения селеносодержащих пищевых добавок в условиях пандемии SARS-CoV-2. // Окладникова Е. В., Потупчик Т. В., Эверт Л. С., Веселова О. Ф., Ширококов Я.Е. Вопросы биологической, медицинской и фармацевтической химии – 2022. – №3 – Т.25 – С. 23 – 29.

53. Перепелица С. А. Иммуно-клеточная реакция селезенки при COVID-19 // Общая реаниматология. – 2024. – Т. 20. – №. 1. – С. 15-23.

54. Распределение S100-позитивных клеток в белой пульпе селезенки крыс в возрастном аспекте / Капитонова М.Ю., Морозова З.Ч., Сидоркина А.В., Нестерова А.А., Мураева Н.А., Фомина Н.Г., Демидович И.Л. // Успехи современного естествознания – 2006. – №. 1 – С. 83-84.

55. Рождественский Л. М. Проблемные вопросы разработки противолучевых средств // Радиационная биология. Радиоэкология. – 2019. – Т. 59. – №. 2. – С. 117-126.

56. Рукавицын О. А. Парапротеинемические гемобластозы / О. А. Рукавицын, Г. И. Сидорович. - Москва: ГЭОТАР-Медиа; Санкт-Петербург: Д-П, 2008. – С. 14, 97-99, 150

57. Селезенка: Анатомия, физиология, патология и клиника [Текст] / пер. с перераб. нем. изд. д-р М. Сиза. – Будапешт: Изд-во Акад. наук Венгрии, 1976. – 264 с.

58. Селицкая А. В. Роль селена в регуляции физиологических и метаболических процессов организма / А. В. Селицкая, И. А. Шапошникова // Молодёжь XXI века: шаг в будущее: Материалы XXIII региональной научно-практической конференции. В 4 т., Благовещенск, 24 мая 2022 года. Том 3. – Благовещенск: Дальневосточный государственный аграрный университет, 2022. – С. 196-197. – EDN DXАНВК.

59. Симонов Р. О. и др. Изучение Т-клеточного звена иммунитета у ВИЧ-инфицированных пациентов с гельминтозами // Инфекционные болезни. – 2021. – Т. 19. – №. 1. – С. 33-38.

60. Синдирева А. В. и др. Эколого-токсикологическая оценка влияния Se и I содержащих соединений на крыс линии WISTAR // Проблемы региональной экологии. – 2023. – №. 6. – С. 42-48.

61. Синельников, Р.Д. Атлас анатомии человека [Текст]. В 3 т. Т. 2: Учение о внутренностях и сосудах: [для мед. ин-тов] / Р. Д. Синельников, проф. – 3-е изд., перераб. и доп. – М.: Медгиз, 1963. – С. 474–477.

62. Скальный А. В. Биоэлементы в медицине / А. В. Скальный, И. А. Рудаков. – М.: «Оникс 21 век»: Мир, 2004. – 272 с.

63. Сметанина М. В. и др. Структурно-клеточный состав белой пульпы селезенки при экспериментальной фуросемид-индуцированной гипомагнемии //Вестник Российского университета дружбы народов. Серия: Медицина. – 2024. – Т. 28. – №. 1. – С. 114-122.

64. Смирнова Т.С. Строение и функции селезенки [Текст] / Т. С. Смирнова, О.Д. Ягмуров // Морфология. – 1993. – Т. 104 – № 5/6. – С. 142–156.

65. Собиров Б. М. Влияние спленэктомии и ГАТС на весовые показатели экспериментальных животных // Prospects of development of science and education. – 2023. – Т. 1. – №. 14. – С. 7-9.

66. Соболева О. А. и др. Эффективность спленэктомии при первичной иммунной тромбоцитопении // Гематология и трансфузиология. – 2021. – Т. 66. – №. 3. – С. 362-373.

67. Сравнительный анализ структурных изменений лимфатического региона при различных патологических состояниях организма в эксперименте / И. Н. Путалова, С. Н. Широченко, О. В. Гриненко [и др.] // Сибирский медицинский вестник. – 2019. – № 2. – С. 34-37. – EDN JOXOZA.

68. Стаценко Е. А. Современные представления об анатомии селезенки человека / Е. А. Стаценко // Украинский медицинский альманах. – 2009. – Т. 12. – №3. – С. 229-232.

69. Сыдилов А. А. Эритродермия. Клиника-морфологические, молекулярно-генетические и дифференциально-диагностические особенности: диссертация на соискание доктора медицинских наук: 14. 03. 02 : 14. 01. 10 / Сыдилов Акмал Абдиказарович [место защиты: ФГБОУВО «Военно-медицинская академия имени С. Кирова» Министерства обороны Российской Федерации – Санкт-Петербург, 2019. – 290 с.

70. Тарасова И. М. Изменения физико-химических свойств лимфоцитов в процессах развития индуцированного канцерогенеза и общей реакции на повреждение : специальность 03.00.02 «биофизика» : Диссертация на соискание кандидата физико-математических наук / Тарасова И. М.; . — Москва, 1985. — 186 с.

71. Тишин А. Л. Микроструктура селезенки под влиянием противопаразитарного препарата клозаверм-а и двукратной инъекции е-селена / А. Л. Тишин, Г. И. Коцюмбас // Вестник Воронежского государственного аграрного университета. – 2014. – № 1-2(40-41). – С. 131-138.

72. Топтыгина А. П. В-клетки. - Москва: МАКС Пресс, – 2023. – С. 44-

73. Тройнич Я. Н. и др. Влияние рекомбинантного гликоделина на структуру селезенки при введении аллогенных клеток костного мозга // Пермский медицинский журнал. – 2022. – Т. 39. – №. 6. – С. 125-132.

74. Тулеметов С. К., Ашуrow Т. А., Акрамова М. Ю. Ультраструктурные и морфометрические особенности тимуса при хроническом токсическом гепатите на фоне предварительной спленэктомии в половозрелом периоде // Республикалык ғылыми журнал республиканский научный журнал “VESTNIK” – 2021. – № 1-2 (92) – С. 2.

75. Туманова Т. С., Александров В.Г. Влияние бактериального липополисахарида на рефлекторные механизмы кардиореспираторной системы анестезированной крысы / Acta Naturae. Спецвыпуск – 2016. – Т. 1. – С. 158

76. Умарова М. З. Структурно-функциональная характеристика и закономерности морфогенеза селезенки человека / Экономика и социум. – 2021. – №. 2-2 (81). – С. 262-267.

77. Ушаков С. С., Шманай В. В., Белявский В. Н. Влияние различных препаратов селена на физиологический статус крыс // Журнал Гродненского государственного медицинского университета. – 2007. – №. 4 (20). – С. 23-25.

78. Файзуллаев Т. С. Методология изучение морфологическое изменения потомства тимуса и селезенки при воздействии этанола // Academic research in educational sciences. – 2023. – №. 1. – С. 188-192.

79. Фенотипическая характеристика и функциональные особенности Т- и В-клеток иммунной памяти / Н. А. Сохоневич, О. Г. Хазиахматова, К. А. Юрова [и др.] // Цитология. – 2015. – Т. 57. – № 5. – С. 311-318

80. Хаитов, Р.М. Физиология иммунной системы / Р.М. Хаитов // Рос. физиол. журнал им. И.М. Сеченова. – 2000. – Т. 86. – № 3. – С. 252-256.

81. Хаитов, Р.М. Иммунология: учебник / Р.М. Хаитов, Г.А. Игнатъева, И.Г. Сидорович // М.: Медицина. – 2000. – 432 с.

82. Характеристика иммуноморфологических процессов в селезенке пациентов с иммунной тромбоцитопенией / Федоровская Н.С., Железнов Л.М.,

Петрова В.С., Зайцев В.Б. // Журнал анатомии и гистологии – 2020. – №9(3). – С. 54 – 63.

83. Хасанова Д. Структурно–функциональные особенности селезенки крыс в норме и при введении генно-модифицированного продукта // Общество и инновации. – 2021. – Т. 2. – №. 4. – С. 114-122.

84. Шарафутдинова Л. А., Валиуллин В. В. Морфологическая характеристика селезёнки крыс при воздействии на организм наночастиц диоксида титана // Вестник Уральской медицинской академической науки. – 2018. – Т. 15. – №. 6. – С. 830-839.

85. Шастин А. С. и др. Заболеваемость болезнями органов дыхания в период пандемии новой коронавирусной инфекции COVID-19 в Российской Федерации // Врач. – 2021. – Т. 11. – С. 11-17.

86. Шатских О.А. Морфофункциональная реакция натуральных киллеров и макрофагов селезенки на введение мелатонина животным, содержащимся при различных световых режимах / О. А. Шатских, Е. М. Лузикова // Морфология. – 2012. – Т. 141. – № 1. – С. 43-46.

87. Шахзадова А. О., Старинский В. В., Лисичникова И. В. Состояние онкологической помощи населению России в 2022 году // Сибирский онкологический журнал. – 2023. – Т. 22. – №. 5. – С. 5-13.

88. Шидаков Ю. Х. М. и др. Влияние прохладительного напитка Кока-Кола на гистоструктуру поджелудочной железы и селезенки крыс в условиях предгорья // Вестник Кыргызско-Российского Славянского университета. – 2021. – Т. 21. – №. 5. – С. 153-160.

89. Шурлыгина А. В. и др. Влияние мелатонина на показатели иммунной и нервной систем мышей линий сВА и с57BL/6J при нарушении светового режима // Иммунология. – 2016. – Т. 37. – №. 2. – С. 68-75.

90. Ястребова С.А. Реакция CD68-позитивных клеток селезенки и тимуса на введение иммуномодуляторов / С.А. Ястребова, С.В. Илларионова, В.Е. Сергеева // Международный журнал прикладных и фундаментальных исследований. – 2016. – № 4-3. – С. 589-593.

91. Abt E. et al. Occurrence of ethyl carbamate in foods and beverages: review of the formation mechanisms, advances in analytical methods, and mitigation strategies // *Journal of food protection*. – 2021. – Vol. 84. – no. 12. – pp. 2195-2212.
92. Ahmed M. A. et al. Role of vitamin C and selenium in attenuation of nicotine induced oxidative stress, p53 and Bcl2 expression in adult rat spleen // *Pathophysiology*. – 2014. – Vol. 21. – no. 3. – P. 211-217.
93. Akahoshi N. et al. Dietary selenium deficiency or selenomethionine excess drastically alters organ selenium contents without altering the expression of most selenoproteins in mice // *The Journal of nutritional biochemistry*. – 2019. – Vol. 69. – P. 120-129.
94. Al-Mubarak A. A., van der Meer P., Bomer N. Selenium, selenoproteins, and heart failure: current knowledge and future perspective // *Current heart failure reports*. – 2021. – Vol. 18. – P. 122-131.
95. Aldosary B. M. et al. Case series of selenium toxicity from a nutritional supplement // *Clinical Toxicology*. – 2012. – Vol. 50. – no. 1. – P. 57-64.
96. Allen J. W. et al. Tumorigenesis and genotoxicity of ethyl carbamate and vinyl carbamate in rodent cells // *Cancer research*. – 1986. – Vol. 46. – no. 10. – P. 4911-4915.
97. Alwall N. Urethane and stilbamidine in multiple myeloma: report on two cases // *The Lancet*. – 1947. – Vol. 250. – no. 6472. – P 388-389.
98. Anouar Y. et al. Selenoprotein T is a key player in ER proteostasis, endocrine homeostasis and neuroprotection // *Free Radical Biology and Medicine*. – 2018. – Vol. 127. – P. 145-152.
99. Auerbach A. et al. Splenic manifestations of chronic autoimmune disorder: a report of five cases with histiocytic necrotizing change in four cases // *Histopathology*. – 2013. – Vol. 63. – no. 1. – P. 19-28.
100. Avery J. C., Hoffmann P. R. Selenium, selenoproteins, and immunity // *Nutrients*. – 2018. – Vol. 10. – no. 9. – P. 1203.

101. Bajenoff, M. Fibroblastic reticular cells guide T lymphocyte entry into and migration within the splenic T cell zone / M. Bajenoff, N. Glichenhaus, R.N. Germain // *The Journal of Immunology*. – 2008. – Vol. 181 – no 6. – P. 3947–3954.
102. Barchielli G., CaPerucci A., Tanini D. The role of selenium in pathologies: an updated review // *Antioxidants*. – 2022. – Vol. 11. – no. 2. – P. 251.
103. Beltrami C. A., Bearzi I., Fabris G. Storage cells of spleen and bone marrow in thalassemia: an ultrastructural study // *Blood*. – 1973. – Vol. 41. – no. 6. – P. 901-912.
104. Bianco A. C. et al. Biochemistry, cellular and molecular biology, and physiological roles of the iodothyronine selenodeiodinases // *Endocrine reviews*. – 2002. – Vol. 23. – no. 1. – P. 38-89.
105. Binder C. et al. CD2 immunobiology // *Frontiers in immunology*. – 2020. – Vol. 11. – P. 1090.
106. Birte S. S. Human spleen microanatomy: why mice do not suffice / Birte S. S. // *Immunology*. – 2015. – p. 334-346
107. Bitterli C., Bañuelos G. S., Schulin R. Use of transfer factors to characterize uptake of selenium by plants // *Journal of Geochemical Exploration*. – 2010. – Vol. 107. – no. 2. – P. 206-216.
108. Bray F. et al. Global cancer statistics 2022: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries // *CA: a cancer journal for clinicians*. – 2024. – Vol. 74. – no. 3. – P. 229-263.
109. Brigelius-Flohé R., Arnér E. S. J. Selenium and selenoproteins in (redox) signaling, diseases, and animal models-200-year anniversary issue // *Free Radical Biology & Medicine*. – 2018. – Vol. 127. – P. 1-2.
110. Brigelius-Flohé R., Flohé L. Selenium and redox signaling // *Archives of biochemistry and biophysics*. – 2017. – Vol. 617. – P. 48-59.
111. Brömme H. J., Holtz J. Apoptosis in the heart: when and why? // *Biochemical Regulation of Myocardium*. – 1996. – P. 261-275.

112. Burhanovich F. X. Characteristic features of morphological changes in the spleen tissue of white rats after a moderate traumatic brain injury // *Asian Journal of Multidimensional Research*. – 2021. – Vol. 10. – no. 9. – P. 615-620.

113. Burk R. F., Hill K. E. Regulation of selenium metabolism and transport // *Annual review of nutrition*. – 2015. – Vol. 35. – no. 1. – P. 109-134.

114. Caniceiro B. D. et al. Immunosuppressive effects of *Pteridium aquilinum* enhance susceptibility to urethane-induced lung carcinogenesis // *Journal of Immunotoxicology*. – 2015. – Vol. 12. – no. 1. – P. 74-80.

115. Carlson B. A. et al. Role of selenium-containing proteins in T-cell and macrophage function // *Proceedings of the Nutrition Society*. – 2010. – T. 69. – №. 3. – C. 300-310.

116. Carruba M. O. et al. Effects of diethyl ether, halothane, ketamine and urethane on sympathetic activity in the rat // *European journal of pharmacology*. – 1987. – Vol. 134. – no. 1. – P. 15-24.

117. Cesta M. F. Normal structure, function, and histology of the spleen // *Toxicologic pathology*. – 2006. – Vol. 34. – no. 5. – P. 455-465.

118. Chao C. et al. p53 transcriptional activity is essential for p53-dependent apoptosis following DNA damage // *The EMBO journal*. – 2000.

119. Chauveau A. et al. Visualization of T cell migration in the spleen reveals a network of perivascular pathways that guide entry into T zones // *Immunity*. – 2020. – Vol. 52. – no. 5. – P. 794-807. e7

120. Chen T. et al. Inhibition role of atherogenic diet on ethyl carbamate induced lung tumorigenesis in C57BL/6J mice // *Scientific Reports*. – 2017. – Vol. 7. – no. 1. – P. 4723.

121. Cho W. C. S. et al. The role of inflammation in the pathogenesis of lung cancer // *Expert opinion on therapeutic targets*. – 2011. – Vol. 15. – no. 9. – P. 1127-1137.

122. Chun S. H., Cha Y. N., Kim C. Urethane increases reactive oxygen species and activates extracellular signal-regulated kinase in RAW 264.7

macrophages and A549 lung epithelial cells // Archives of Pharmacal Research. – 2013. – Vol. 36. – P. 775-782.

123. Cole K. E. et al. Comparative phenotypes of peripheral blood and spleen cells from cancer patients // International Immunopharmacology. – 2020. – Vol. 85. – P. 106655.

124. Cools N. et al. Balancing between immunity and tolerance: an interplay between dendritic cells, regulatory T cells, and effector T cells // Journal of Leucocyte Biology. – 2007. – Vol. 82. – no. 6. – P. 1365-1374.

125. Coussens L. M., Werb Z. Inflammation and cancer // Nature. – 2002. – Vol. 420. – no. 6917. – P. 860-867.

126. Cui J. et al. Targeting selenoprotein H in the nucleolus suppresses tumors and metastases by Isovalerylspiramycin I // Journal of Experimental & Clinical Cancer Research. – 2022. – Vol. 41. – no. 1. – P. 126.

127. Dammers P. M. et al. Most marginal zone B cells in rat express germline encoded Ig VH genes and are ligand selected // The Journal of Immunology. – 2000. – Vol. 165. – No. 11. – P. 6156-6169.

128. Dammers P. M. et al. The origin of marginal zone B cells in the rat // European journal of immunology. – 1999. – Vol. 29. – no. 5. – P. 1522-1531.

129. Dammers P. M., Kroese F. G. M. Recruitment and selection of marginal zone B cells is independent of exogenous antigens // European journal of immunology. – 2005. – Vol. 35. – no. 7. – P. 2089-2099.

130. Den Haan J. M. M., Kraal G. Innate immune functions of macrophage subpopulations in the spleen // Journal of innate immunity. – 2012. – Vol. 4. – no. 5-6. – P. 437-445.

131. Dijkstra C. D. et al. The heterogeneity of mononuclear phagocytes in lymphoid organs: distinct macrophage subpopulations in rat recognized by monoclonal antibodies ED1, ED2 and ED3 // Microenvironments in the Lymphoid System. – 1985. – P. 409-419.

132. Dijkstra C. D., Veerman A. J. P. Normal anatomy, histology, ultrastructure, rat // Hemopoietic System. – Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg – 1990. – P. 185-193.

133. Dong Y. et al. Bisphenol A impairs mitochondrial function in spleens of mice via oxidative stress // Molecular & Cellular Toxicology. – 2013. – Vol. 9. – P. 401-406.

134. Dzhalilova D. S. et al. Morphological characteristics of the thymus and spleen and the subpopulation composition of lymphocytes in peripheral blood during systemic inflammatory response in male rats with different resistance to hypoxia // International Journal of Inflammation. – 2019. – Vol. 2019. – no. 1. – P. 7584685.

135. Elmore S. A. Enhanced histopathology of the spleen // Toxicologic pathology. – 2006. – Vol. 34. – no. 5. – P. 648-655.

136. European Food Safety Authority (EFSA). Ethyl carbamate and hydrocyanic acid in food and beverages-Scientific Opinion of the Panel on Contaminants // EFSA Journal. – 2007. – Vol. 5. – no. 10. – P. 551.

137. Fairweather-Tait S. J., FiliPini T., Vinceti M. Selenium status and immunity // Proceedings of the Nutrition Society. – 2023. – Vol. 82. – no. 1. – P. 32-38.

138. Fan R. F. et al. Selenium relieves oxidative stress, inflammation, and apoptosis within spleen of chicken exposed to mercuric chloride // Poultry science. – 2020. – Vol. 99. – no. 11. – P. 5430-5439.

139. Ferreira R. L. U. et al. Selenium in human health and gut microflora: bioavailability of selenocompounds and relationship with diseases // Frontiers in nutrition. – 2021. – Vol. 8. – P. 685317.

140. Field K. J., Lang C. M. Hazards of urethane (ethyl carbamate): a review of the literature // Laboratory Animals. – 1988. – Vol. 22. – no. 3. – P. 255-262.

141. FiliPini T., Fairweather-Tait S., Vinceti M. Selenium and immune function: a systematic review and meta-analysis of experimental human studies // The American Journal of Clinical Nutrition. – 2023. – Vol. 117. – no. 1. – P. 93-110.

142. Flecknell P. Chapter 3 - Special Techniques. // *Laboratory Animal Anaesthesia (Fourth Edition)* – 2016 – P. 109-140

143. Forkert P. G. Mechanisms of lung tumorigenesis by ethyl carbamate and vinyl carbamate // *Drug metabolism reviews.* – 2010. – Vol. 42. – no. 2. – P. 355-378.

144. Garcia C. F., Swerdlow S. H. Best practices in contemporary diagnostic immunohistochemistry: panel a proach to hematolymphoid proliferations // *Archives of pathology & laboratory medicine.* – 2009. – Vol. 133. – no. 5. – P. 756-765.

145. Gatter K. C. Diagnostic immunocytochemistry: achievements and challenges // *The Journal of Pathology.* – 1989. – Vol. 159. – no. 3. – P. 183-190.

146. Gencheva R., Arnér E. S. J. Thioredoxin reductase inhibition for cancer therapy // *Annual Review of Pharmacology and Toxicology.* – 2022. – Vol. 62. – no. 1. – P. 177-196.

147. Gereben B. et al. Cellular and molecular basis of deiodinase-regulated thyroid hormone signaling // *Endocrine reviews.* – 2008. – Vol. 29. – no. 7. – P. 898-938.

148. Giorno R. Unusual structure of human splenic sinusoids revealed by monoclonal antibodies // *Histochemistry.* – 1984. – Vol. 81. – no. 5. – P. 505-507.

149. Gladyshev V. N. et al. Selenoprotein gene nomenclature // *Journal of Biological Chemistry.* – 2016. – Vol. 291. – no. 46. – P. 24036-24040.

150. Gomes M. et al. The role of inflammation in lung cancer // *Inflammation and cancer.* – 2014. – P. 1-23.

151. Gordon S., Plüddemann A., Mukhopadhyay S. Sinusoidal immunity: macrophages at the lymphohematopoietic interface // *Cold Spring Harbor perspectives in biology.* – 2015. – Vol. 7. – no. 4. – P. a016378.

152. Gowd V. et al. Ethyl carbamate: An emerging food and environmental toxicant // *Food Chemistry.* – 2018. – Vol. 248. – P. 312-321.

153. Gray D. et al. Migrant  $\mu^+ \delta^+$  and static  $\mu^+ \delta^-$  B lymphocyte subsets // *European journal of immunology.* – 1982. – Vol. 12. – no. 7. – P. 564-569.

154. Greten F. R., Grivennikov S. I. Inflammation and cancer: triggers, mechanisms, and consequences // *Immunity*. – 2019. – Vol. 51. – no. 1. – P. 27-41.
155. Guillin O. M. et al. Interplay between selenium, selenoproteins and HIV-1 replication in human CD4 T-lymphocytes // *International Journal of Molecular Sciences*. – 2022. – Vol. 23. – no. 3. – P. 1394.
156. Guo N. et al. Lung adenocarcinoma-related TNF- $\alpha$ -dependent inflammation upregulates MHC-II on alveolar type II cells through CXCR-2 to contribute to Treg expansion // *The FASEB Journal*. – 2020. – T. 34. – №. 9. – C. 12197-12213.
157. Gurley K. E., Moser R. D., Kemp C. J. Induction of lung tumors in mice with urethane // *Cold Spring Harbor Protocols*. – 2015. – Vol. 2015. – no. 9. – P. pdb. prot077446.
158. Ha H. Y. et al. From selenium absorption to selenoprotein degradation // *Biological trace element research*. – 2019. – Vol. 192. – P. 26-37.
159. Han Y. et al. Antagonistic effects of selenium on lead-induced autophagy by influencing mitochondrial dynamics in the spleen of chickens // *Oncotarget*. – 2017. – Vol. 8. – no. 20. – P. 33725.
160. Hariharan S., Dharmaraj S. Selenium and selenoproteins: It's role in regulation of inflammation // *Inflammo pharmacology*. – 2020. – Vol. 28. – P. 667-695.
161. He Y. et al. Selenium contamination, consequences and remediation techniques in water and soils: A review // *Environmental Research*. – 2018. – Vol. 164. – P. 288-301.
162. Hermida M. E. R. et al. Histological disorganization of spleen compartments and severe visceral leishmaniasis // *Frontiers in cellular and infection microbiology*. – 2018. – Vol. 8. – P. 394.
163. Heyns A. P. et al. Kinetics and mobilization from the spleen of indium-111-labeled platelets during platelet apheresis // *Transfusion*. – 1985. – Vol. 25. – no. 3. – P. 215-218.

164. Hu H. et al. Inorganic selenium sensitizes prostate cancer cells to TRAIL-induced apoptosis through superoxide/p53/Bax-mediated activation of mitochondrial pathway // *Molecular cancer therapeutics*. – 2006. – Vol. 5. – no. 7. – P. 1873-1882.

165. Hu T. et al. Selenium biofortification and antioxidant activity in *Cordyceps militaris* supplied with selenate, selenite, or selenomethionine // *Biological trace element research*. – 2019. – Vol. 187. – P. 553-561.

166. Huang Y. et al. Association of circulating selenium concentration with dyslipidemia: Results from the nhanes // *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology*. – 2020. – Vol. 58. – P. 126438.

167. Huang Z., Rose A. H., Hoffmann P. R. The role of selenium in inflammation and immunity: from molecular mechanisms to therapeutic opportunities // *Antioxidants & redox signaling*. – 2012. – Vol. 16. – no. 7. – P. 705-743.

168. IARC Working Group on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans et al. Alcohol consumption and ethyl carbamate // *IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans*. – 2010. – Vol. 96. – P. 3.

169. Ibrahim M. A. et al. The effect of *Moringa oleifera* leaf extracts against urethane-induced lung cancer in rat model // *Environmental Science and Pollution Research*. – 2023. – Vol. 30. – no. 13. – C. 37280-37294.

170. Jahankhani K. et al. Therapeutic effect of trace elements on multiple myeloma and mechanisms of cancer process // *Food and Chemical Toxicology*. – 2023. – pp. 113983.

171. Jan Treda C. et al. Secretory leukocyte protease inhibitor modulates urethane-induced lung carcinogenesis // *Carcinogenesis*. – 2014. – Vol. 35. – no. 4. – P. 896-904.

172. Jenkins D. J. A. et al. Selenium, antioxidants, cardiovascular disease, and all-cause mortality: a systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials // *The American Journal of Clinical Nutrition*. – 2020. – Vol. 112. – no. 6. – P. 1642-1652.

173. Jeong T. C. et al. Effects of Ethyl Carbamate and its Metabolites on the Antibody Response in Splenocyte Cults from Female Balb/C Mice // *Immunopharmacology and immunotoxicology*. – 1996. – Vol. 18. – no. 1. – P. 91-103.
174. Jia S. Z. et al. Selenoprotein K deficiency-induced apoptosis: A role for calpain and the ERS pathway // *Redox biology*. – 2021. – Vol. 47. – P. 102154.
175. Jiang W. et al. Spleen contributes to restraint stress induced changes in blood leukocytes distribution // *Scientific Reports*. – 2017. – Vol. 7. – no. 1. – P. 6501.
176. Jiao Z., Dong Y., Chen Q. Ethyl carbamate in fermented beverages: presence, analytical chemistry, formation mechanism, and mitigation proposals // *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*. – 2014. – Vol. 13. – no. 4. – P. 611-626.
177. Jones T. C. et al. *Monographs on pathology of laboratory animals, hemopoietic system*. – Berlin, Springer-Verlag – 1990. – P. 185-193.
178. Ju W. et al. The effect of selenium supplementation on coronary heart disease: a systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials // *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology*. – 2017. – T. 44. – C. 8-16.
179. Juloski J. T. et al. Colorectal cancer and trace elements alteration // *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology*. – 2020. – Vol. 59. – pp. 126451.
180. Kage M., Kondou R., Ogata T. Anatomy of the spleen and pathology of hypersplenism // *Clinical Investigation of Portal Hypertension*. – 2019. – P. 25-34.
181. Khanna K. M., Lefrançois L. Geography and plumbing control the T cell response to infection // *Immunology and cell biology*. – 2008. – Vol. 86. – no. 5. – P. 416-422.
182. Kieliszek M. Selenium—fascinating microelement, properties and sources in food // *Molecules*. – 2019. – Vol. 24. – no. 7. – P. 1298.

183. Kieliszek M., Błażej S. Current knowledge on the importance of selenium in food for living organisms: a review // *Molecules*. – 2016. – Vol. 21. – no. 5. – P. 609.

184. Kieliszek M., Lipinski B., Błażej S. Application of sodium selenite in the prevention and treatment of cancers // *Cells*. – 2017. – Vol. 6. – no. 4. – P. 39.

185. Kieliszek M., Sandoval S. N. S. The importance of selenium in food enrichment processes. A comprehensive review // *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology*. – 2023. – P. 127260.

186. Kim C. H., Liu Q. Periarteriolar stroma cells guide T cells from the red to the white pulp in the spleen // *Cellular & Molecular Immunology*. – 2020. – Vol. 17. – no. 10. – P. 1019-1021.

187. Kim J. et al. Association between serum selenium level and the presence of diabetes mellitus: a meta-analysis of observational studies // *Diabetes & metabolism journal*. – 2019. – Vol. 43. – no. 4. – P. 447-460.

188. Kim S. J. et al. Antitumor effects of selenium // *International Journal of Molecular Sciences*. – 2021. – Vol. 22. – no. 21. – P. 11844.

189. Korkusuz P., Dağdeviren A., Aşan E. Immunophenotypic analysis of human spleen compartments // *Annals of Anatomy-Anatomischer Anzeiger*. – 2002. – Vol. 184. – no. 5. – pp. 431-441.

190. Kotzé H. F. et al. Evidence that <sup>111</sup>In-labelled platelets pool in the spleen, but not in the liver of normal humans and baboons // *Scandinavian journal of hematology*. – 1986. – Vol. 37. – no. 3. – P. 259-264.

191. Kraal G., Mebius R. New insights into the cell biology of the marginal zone of the spleen // *International review of cytology*. – 2006. – Vol. 250. – P. 175-215.

192. Labunsky V. M., Hatfield D. L., Gladyshev V. N. Selenoproteins: molecular pathways and physiological roles // *Physiological reviews*. – 2014. – Vol. 94. – no. 3. – P. 739-777.

193. Lachenmeier D. W. et al. Cancer risk assessment of ethyl carbamate in alcoholic beverages from Brazil with special consideration to the spirits cachaça and tiquira // *BMC cancer*. – 2010. – Vol. 10. – no. 1-15.

194. Lagiou P., Trichopoulos D. Inflammatory biomarkers and risk of lung cancer // *Journal of the National Cancer Institute*. – 2011. – Vol. 103. – no. 14. – P. 1073-1075.

195. Lee S. H., Chu K. B., Quan F. S. Parasite infiltration and apoptosis in spleen upon toxoplasma gondii infection // *The Korean Journal of Parasitology*. – 2019. – Vol. 57. – no. 5. – P. 537.

196. Leong A. S. Y., Wright J. The contribution of immunohistochemical staining in tumour diagnosis // *Histopathology*. – 1987. – Vol. 11. – no. 12. – P. 1295-1305.

197. Letavayová L., Vlčková V., Brozmanová J. Selenium: from cancer prevention to DNA damage // *Toxicology*. – 2006. – Vol. 227. – no. 1-2. – P. 1-14.

198. Lewis S. M., Williams A., Eisenbarth S. C. Structure and function of the immune system in the spleen // *Science immunology*. – 2019. – Vol. 4. – no. 33. – P. eaau6085.

199. Li G. et al. A survey of ethyl carbamate in beer from Chinese market // *Food Control*. – 2017. – Vol. 79. – P. 254-257.

200. Li S., MacAlpine D. M., Counter C. M. Capturing the primordial Kras mutation initiating urethane carcinogenesis // *Nature Communications*. – 2020. – Vol. 11. – no. 1. – P. 1800.

201. Li Y. et al. Repetitive restraint stress changes spleen immune cell subsets through glucocorticoid receptor or  $\beta$ -adrenergic receptor in a stage dependent manner // *Biochemical and biophysical research communications*. – 2018. – Vol. 495. – no. 1. – P. 1108-1114.

202. Liu F. et al. Dysbiosis of the gut microbiome is associated with tumor biomarkers in lung cancer // *International Journal of Biological Sciences*. – 2019. – Vol. 15. – no. 11. – P. 2381.

203. Liu X., Chen Z. The pathophysiological role of mitochondrial oxidative stress in lung diseases // *Journal of Translational Medicine*. – 2017. – Vol. 15. – P. 1-13.

204. Long Z. et al. Soil selenium concentration and residents daily dietary intake in a selenosis area: a preliminary study in Yutangba Village, Enshi City, China // *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*. – 2020. – Vol. 105. – P. 798-805.

205. Lubos E. et al. Serum selenium and prognosis in cardiovascular disease: results from the AtheroGene study // *Atherosclerosis*. – 2010. – Vol. 209. – no. 1. – P. 271-277.

206. Ma C. et al. Selenoprotein I deficiency in T cells promotes differentiation into tolerant phenotypes while decreasing Th17 pathology // *Journal of leukocyte biology*. – 2022. – Vol. 112. – no. 6. – P. 1387-1397.

207. Ma C., Hoffmann P. R. Selenoproteins as regulators of T cell proliferation, differentiation, and metabolism // *Seminars in cell & developmental biology*. – Academic Press, 2021. – Vol. 115. – P. 54-61.

208. Makhmudova G. F. Morphological indicators of the spleen of healthy rats and its lymphoid structures // *Journal of Science in Medicine and Life*. – 2023. – Vol. 1. – no. 1. – P. 1-8.

209. Malkinson A. M. Primary lung tumors in mice: an experimentally manipulable model of human adenocarcinoma // *Cancer research*. – 1992. – Vol. 52. – no. 9\_SuPlement. – P. 2670s-2676s.

210. Mamani-Matsuda M. et al. The human spleen is a major reservoir for long-lived vaccinia virus-specific memory B cells // *Blood, The Journal of the American Society of Hematology*. – 2008. – Vol. 111. – no. 9. – P. 4653-4659.

211. Mantovani A. et al. Cancer-related inflammation // *Nature*. – 2008. – Vol. 454. – no. 7203. – P. 436-444.

212. Mao H. et al. Selenoprotein S regulates tumorigenesis of clear cell renal cell carcinoma through AKT/GSK3 $\beta$ /NF- $\kappa$ B signaling pathway // *Gene*. – 2022. – Vol. 832. – P. 146559.

213. Marsan E. S., Bayse C. A. A halogen bonding perspective on iodothyronine deiodinase activity // *Molecules*. – 2020. – Vol. 25. – no. 6. – P. 1328.

214. Martim G. C. et al. A urethane-based multimethacrylate mixture and its use in dental composites with combined high-performance properties // *Dental Materials*. – 2014. – Vol. 30. – no. 2. – P. 155-163.

215. Martinez-Pomares L. et al. Expression of mannose receptor and ligands for its cysteine-rich domain in venous sinuses of human spleen // *Laboratory investigation*. – 2005. – Vol. 85. – no. 10. – P. 1238-1249.

216. Mason R. J. et al. Surfactant protein C expression in urethane-induced murine pulmonary tumors // *The American journal of pathology*. – 2000. – Vol. 156. – no. 1. – P. 175-182.

217. McDonald-Hyman C. et al. The vimentin intermediate filament network restrains regulatory T cell suppression of graft-versus-host disease // *The Journal of clinical investigation*. – 2018. – Vol. 128. – no. 10. – P. 4604-4621.

218. Mebius R. E., Kraal G. Structure and function of the spleen // *Nature reviews immunology*. – 2005. – Vol. 5. – no. 8. – P. 606-616.

219. Mehdi Y. et al. Selenium in the environment, metabolism and involvement in body functions // *Molecules*. – 2013. – Vol. 18. – no. 3. – P. 3292-3311.

220. Men L. et al. Selenoprotein S regulates adipogenesis through IRE1 $\alpha$ -XBP1 pathway // *Journal of Endocrinology*. – 2020. – Vol. 244. – no. 3. – P. 431-443.

221. Merk D. et al. Selenoprotein T protects endothelial cells against lipopolysaccharide-induced activation and apoptosis // *Antioxidants*. – 2021. – Vol. 10. – no. 9. – P. 1427.

222. Miller Y. E. et al. Induction of a high incidence of lung tumors in C57BL/6 mice with multiple ethyl carbamate injections // *Cancer Letters*. – 2003. – Vol. 198. – no. 2. – P. 139-144.

223. Minich W. B. Selenium metabolism and biosynthesis of selenoproteins in the human body // *Biochemistry (Moscow)*. – 2022. – Vol. 87. – No. Suppl 1. – P. S168-S177.

224. Misra B. B., Misra A. The chemical exposome of type 2 diabetes mellitus: Opportunities and challenges in the omics era // *Diabetes & Metabolic Syndrome: Clinical Research & Reviews*. – 2020. – Vol. 14. – No. 1. – P. 23-38.

225. Mohammadi F. et al. The thioredoxin system and cancer therapy: a review // *Cancer Chemotherapy and Pharmacology*. – 2019. – Vol. 84. – P. 925-935.

226. Mojadadi A. et al. Role for selenium in metabolic homeostasis and human reproduction // *Nutrients*. – 2021. – Vol. 13. – no. 9. – P. 3256.

227. Mu Q. et al. The role of iron homeostasis in remodeling immune function and regulating inflammatory disease // *Science Bulletin*. – 2021. – Vol. 66. – no. 17. – pp. 1806-1816.

228. Munn L. L. Cancer and inflammation // *Wiley Interdisciplinary Reviews: Systems Biology and Medicine*. – 2017. – Vol. 9. – No. 2. – P. 1370.

229. Murata M. Inflammation and cancer // *Environmental health and preventive medicine*. – 2018. – Vol. 23. – no. 1. – P. 50.

230. Narayan C., Kumar A. Constitutive over expression of IL-1 $\beta$ , IL-6, NF- $\kappa$ B, and Stat3 is a potential cause of lung tumorigenesis in urethane (ethyl carbamate) induced Balb/c mice // *Journal of carcinogenesis*. – 2012. – Vol. 11.

231. National Toxicology Program et al. Toxicology and Carcinogenesis Studies of Urethane, Ethanol, and Urethane // *Ethanol in B6C3F1 Mice (Drinking Water Studies)*. – 2004. – P. 1-346. PMID: 15625555.

232. National Toxicology Program. 15th Report on Carcinogens [Электронный ресурс]. Research Triangle Park (NC): National Toxicology Program, 2021. Urethane: CAS No. 51-79-6. Режим доступа: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK590786/> (дата обращения: 17.03.2025).

233. Navarro-Alarcon M., Cabrera-Vique C. Selenium in food and the human body: a review // *Science of the total environment*. – 2008. – Vol. 400. – no. 1-3. – P. 115-141.

234. Neve J. et al. Assessment of selenium status in patients receiving long-term total parenteral nutrition // Trace element analytical chemistry in medicine and biology. – 1984. – Vol. 3. – P. 139-49.

235. Nieminen M. et al. Vimentin function in lymphocyte adhesion and transcellular migration // Nature cell biology. – 2006. – Vol. 8. – no. 2. – P. 156-162.

236. Niu R. et al. Selenium metabolism and regulation of immune cells in immune-associated diseases // Journal of Cellular Physiology. – 2022. – Vol. 237. – no. 9. – P. 3449-3464.

237. Nolte M. A. et al. Isolation of the intact white pulp. Quantitative and qualitative analysis of the cellular composition of the splenic compartments // European journal of immunology. – 2000. – Vol. 30. – no. 2. – P. 626-634.

238. Nolte M.A. A conduit system distributes chemokines and small blood-borne molecules through the splenic white pulp / M.A. Nolte, J.A. Beliën, I. Schadee- Eestermans [et al.] // Journal of Experimental Medicine. – 2003. – Vol. 198 – No 3. – P. 505–512.

239. NTP, National Toxicology Program. Report on Carcinogens, (RoC), 15th ed.; National Toxicology Program: Research Triangle, NC, USA, 2021

240. Oetke C., Kraal G., Crocker P. R. The antigen recognized by MOMA-I is sialoadhesin // Immunology letters. – 2006. – Vol. 106. – no. 1. – P. 96-98.

241. Okunade K. S. et al. Selenium deficiency and pregnancy outcome in pregnant women with HIV in Lagos, Nigeria // International journal of gynecology & obstetrics. – 2018. – Vol. 142. – no. 2. – P. 207-213.

242. Oleinika K., Mauri C., Blair P. A. B cell activation and B cell tolerance // The Autoimmune Diseases. – Academic Press – 2020. – P. 171-187.

243. Özerkan D. et al. Distribution of spleen connective tissue fibers in diabetic and vitamin C treated diabetic rats // Biotechnic & Histochemistry. – 2021. – Vol. 96. – no. 5. – P. 347-353.

244. Pabst R. The spleen in lymphocyte recirculation // Immunol Today – 1988. – Vol. 9 – P. 43.

245. Pagliardini S., Funk G. D., Dickson C. T. Breathing and brain state: urethane anesthesia as a model for natural sleep // *Respiratory physiology & neurobiology*. – 2013. – T. 188. – №. 3. – C. 324-332.

246. Papenfuss T. L., Cesta M. F. Spleen // *Immunopathology in Toxicology and Drug Development: Volume 2, Organ Systems*. – 2017. – P. 37-57.

247. Peoples J. N. et al. Mitochondrial dysfunction and oxidative stress in heart disease // *Experimental & molecular medicine*. – 2019. – Vol. 51. – no. 12. – P. 1-13.

248. Pereira A. V. et al. *Toxoplasma gondii* causes lipofuscinosis, collagenopathy and spleen and white pulp atrophy during the acute phase of infection // *Pathogens and Disease*. – 2019. – Vol. 77. – no. 9. – P. ftaa008.

249. Pereira J. P., Kelly L. M., Cyster J. G. Finding the right niche: B-cell migration in the early phases of T-dependent antibody responses // *International immunology*. – 2010. – Vol. 22. – no. 6. – P. 413-419.

250. Pettersen J. C., Borgen D. F., Graupner K. C. A morphological and histochemical study of the primary and secondary immune responses in the rat spleen // *American Journal of Anatomy*. – 1967. – Vol. 121. – no. 2. – P. 305-317.

251. Pizzi M. A Lucky Mistake: The splenic glands of marcello malpighi / M. Pizzi, F. Chaviano, M. Ruge [et al.] // *Human Pathology*. – 2018. – Vol. 72. – P. 191–195.

252. Prigge A. et al. Deletion of vimentin in regulatory T cells augments suppression without altering homeostasis // *C59. Dissecting acute lung injury and ards*. – American Thoracic Society – 2020. – P. A5565-A5565.

253. Prokopec K. E. et al. Cutting edge: Marginal zone macrophages regulate antigen transport by B cells to the follicle in the spleen via CD21 // *The Journal of Immunology*. – 2016. – Vol. 197. – no. 6. – P. 2063-2068.

254. Qian S., Golubnitschaja O., Zhan X. Chronic inflammation: key player and biomarker-set to predict and prevent cancer development and progression based on individualized patient profiles // *Epma Journal*. – 2019. – Vol. 10. – P. 365-381.

255. Radwan E. et al. Novel therapeutic regimens for urethane-induced early lung cancer in rats: Combined cisplatin nanoparticles with vitamin-D3 // IUBMB life. – 2021. – Vol. 73. – no. 2. – P. 362-374.

256. Rahmonjonovna K. D. Spleen histostructure, function and formation: Medical science // Ethiopian International Journal of Multidisciplinary Research. – 2023. – Vol. 10. – no. 08. – P. 86-93.

257. Randall B. Encyclopedia of Toxicology // Journal of Analytical Toxicology – 2014. – Vol.38 – P. 464.

258. Rataan A. O. et al. Potential role of selenium in the treatment of cancer and viral infections // International journal of molecular sciences. – 2022. – Vol. 23. – no. 4. – P. 2215.

259. Rayman M. P. Selenium intake, status, and health: A complex relationship // Hormones. – 2020. – Vol. 19. – no. 1. – P. 9-14.

260. Razaghi A. et al. Selenium stimulates the antitumour immunity: Insights to future research // European Journal of Cancer. – 2021. – Vol. 155. – P. 256-267.

261. Reich H. J., Hondal R. J. Why nature chose selenium // ACS chemical biology. – 2016. – Vol. 11. – no. 4. – P. 821-841.

262. Ren X. et al. Biological Functions of Selenoprotein Iodothyronine Deiodinase and its Expression in Osteoarthritis // Chinese Medical Sciences Journal. – 2022. – Vol. 37. – no. 2. – P. 142-150.

263. Robles H., Irvine C. A. Urethane / Robles H., Irvine C. A. // Encyclopedia of Toxicology – 2014. – Vol. 4 – no. 4 – P. 889-891

264. Rosin F. C. P. et al. Identification of myeloid-derived suppressor cells and T regulatory cells in lung microenvironment after Urethane-induced lung tumor // International immunopharmacology. – 2011. – Vol. 11 – no. 7 – P. 873-878.

265. Rospotrebnadzor (2009) Normal Range for Physiological Requirements in Energy and Nutrients for Various Groups of Population in the Russian Federation – Moscow – 36 p.

266. Roussel C. et al. Spleen // Hematopathology. – 2020. – P. 461-474

267. Ruseva B. et al. Effects of selenium on the vessel walls and anti-elastin antibodies in spontaneously hypertensive rats // *Experimental Biology and Medicine*. – 2012. – T. 237. – №. 2. – C. 160-166.

268. Sabirovna I. N. et al. Dysfunctions of the immune system and their role in the development of diseases // *The Peerian Journal*. – 2023. – Vol. 23. – P. 49-52.

269. Sahyon H. A. et al. Avocado peel extract loaded on chitosan nanoparticles alleviates urethane toxicity that causes lung cancer in a mouse model // *International Journal of Biological Macromolecules*. – 2023. – Vol. 234. – P. 123633

270. Santacroce L. et al. The human respiratory system and its microbiome at a glimpse // *Biology*. – 2020. – Vol. 9. – no. 10. – P. 318.

271. Santesmasses D., Mariotti M., Gladyshev V. N. Bioinformatics of selenoproteins // *Antioxidants & Redox Signaling*. – 2020. – Vol. 33. – no. 7. – P. 525-536.

272. Schomburg L. Selenium deficiency due to diet, pregnancy, severe illness, or covid-19—A preventable trigger for autoimmune disease // *International journal of molecular sciences*. – 2021. – Vol. 22. – no. 16. – P. 8532.

273. Seale L. A., Ogawa-Wong A. N., Berry M. J. Sexual dimorphism in selenium metabolism and selenoproteins // *Free Radical Biology and Medicine*. – 2018. – Vol. 127. – P. 198-205.

274. Selenium: its molecular biology and role in human health. / Hatfield D.L., Schweizer U., Tsuji P.A., Gladyshev V.N. // Cham, Switzerland: Springer International Publishing – 2016. – P. 22-31

275. Selenoprotein H is a nucleolar thioredoxin-like protein with a unique expression pattern. / Novoselov S. V., Kryukov G. V., Xu X. M., Carlson B. A., Hatfield D.L., Gladyshev V.N. // *Journal of Biological Chemistry*. – 2007. – no. 282(16) – P. 11960–11968

276. Shahid M. et al. A critical review of selenium biogeochemical behavior in soil-plant system with an inference to human health // *Environmental pollution*. – 2018. – Vol. 234. – P. 915-934.

277. Sharova L. V. et al. Immune stimulation in urethane-exposed pregnant mice increases expression level of spleen leukocyte genes for TGF $\beta$ 3 GM-CSF and other cytokines that may play a role in reduced chemical-induced birth defects // *International immunopharmacology*. – 2002. – Vol. 2. – no. 10. – P. 1477-1489.

278. Shephard R. J. Responses of the human spleen to exercise // *Journal of sports sciences*. – 2016. – Vol. 34. – no. 10. – P. 929-936.

279. Sherry M. L., Duane E. U., Dennis E. B., Joseph J. K. The Laboratory Rat. Chapter 9 - Nutrition, Editor(s) // In *American College of Laboratory Animal Medicine, The Laboratory Rat (Second Edition)*, Academic Press – 2006. – P. 219-301.

280. Shimada B. K., Alfulajj N., Seale L. A. The impact of selenium deficiency on cardiovascular function // *International journal of molecular sciences*. – 2021. – Vol. 22. – no. 19. – P. 10713.

281. Shirasaka Y., Wasterlain C. G. The effect of urethane anesthesia on evoked potentials in dentate gyrus // *European journal of pharmacology*. – 1995. – T. 282. – №. 1-3. – C. 11-17.

282. Shreenath A. P., Ameer M. A., Dooley J. Selenium deficiency. // *StatPearls*. – 2020.

283. Siddiqa A., Munir R., Faisal M. Antitumor effects of sodium selenite on acute lymphocytic leukemia // *Journal of Cancer Research and Therapeutics*. – 2021. – Vol. 17. – no. 1. – P. 266-268.

284. Siegel R. L., Giaquinto A. N., Jemal A. Cancer statistics, 2024 // *CA Cancer J Clin*. – 2024. – T. 74 – № 1. – C. 12-49. – DOI: 10.3322/caac.21820. – Epub 2024 Jan 17. – PMID: 38230.

285. Sixt M., Lämmermann T. T cells: Bridge-and-channel commute to the white pulp // *Immunity*. – 2020. – Vol. 52. – no. 5. – P. 721-723.

286. Snook T. Studies on the perifollicular region of the rat's spleen // *The Anatomical Record*. – 1964. – Vol. 148. – no. 2. – P. 149-159.

287. Song M. et al. Phase I trial of selenium plus chemotherapy in gynecologic cancers // *Gynecologic oncology*. – 2018. – Vol. 150. – no. 3. – P. 478-486.
288. Sozio F. et al. Urethane-induced lung carcinogenesis // *Methods in cell biology*. Academic Press – 2021. – Vol. 63. – P. 45-57.
289. Šperanda T. et al. Selenium and natural zeolite clinoptilolite supplementation increases antioxidative status and immune response in growing pigs // *Frontiers in veterinary science*. – 2021. – T. 8. – C. 688915.
290. Stathopoulos G. T. et al. Epithelial NF- $\kappa$ B activation promotes urethane-induced lung carcinogenesis // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. – 2007. – Vol. 104. – no. 47. – P. 18514-18519.
291. Steenbrugge J. et al. Splenic hematopoietic and stromal cells in cancer progression // *Cancer Research*. – 2021. – Vol. 81. – no. 1. – P. 27-34.
292. Steinbrenner H., Sies H. Selenium homeostasis and antioxidant selenoproteins in brain: implications for disorders in the central nervous system // *Archives of biochemistry and biophysics*. – 2013. – Vol. 536. – no. 2. – P. 152-157.
293. Steiniger B. et al. Phenotypic differences between red pulp capillary and sinusoidal endothelia help localizing the open splenic circulation in humans // *Histochemistry and cell biology*. – 2007. – Vol. 128. – P. 391-398.
294. Steiniger B. S. et al. B lymphocyte compartments in the human splenic red pulp: capillary sheaths and periarteriolar regions // *Histochemistry and cell biology*. – 2014. – Vol. 141. – P. 507-518.
295. Steiniger B. S. et al. Heterogeneity of stromal cells in the human splenic white pulp. Fibroblastic reticulum cells, follicular dendritic cells and a third superficial stromal cell type // *Immunology*. – 2014. – Vol. 143. – no. 3. – P. 462-477.
296. Steiniger B. S. Human spleen microanatomy: why mice do not suffice // *Immunology*. – 2015. – Vol. 145. – no. 3. – P. 334-346.
297. Steiniger B., Barth P., Hellinger A. The perifollicular and marginal zones of the human splenic white pulp: do fibroblasts guide lymphocyte

immigration? // *The American journal of pathology*. – 2001. – Vol. 159. – no. 2. – P. 501-512.

298. Steiniger B., Bette M., Schwarzbach H. The open microcirculation in human spleens: a three-dimensional approach // *Journal of Histochemistry & Cytochemistry*. – 2011. – Vol. 59. – no. 6. – P. 639-648.

299. Su L. J. et al. Reactive oxygen species-induced lipid peroxidation in apoptosis, autophagy, and ferroptosis // *Oxidative medicine and cellular longevity*. – 2019. – Vol. 2019. – no. 1. – P. 5080843.

300. Tai Y. et al. Molecular mechanisms of T cells activation by dendritic cells in autoimmune diseases // *Frontiers in pharmacology*. – 2018. – Vol. 9. – P. 642.

301. Tassinari R. et al. Oral, short-term exposure to titanium dioxide nanoparticles in Sprague-Dawley rat: focus on reproductive and endocrine systems and spleen // *Nanotoxicology*. – 2014. – Vol. 8. – no. 6. – P. 654-662.

302. Tinggi U. Essentiality and toxicity of selenium and its status in Australia: a review // *Toxicology letters*. – 2003. – Vol. 137. – no. 1-2. – P. 103-110.

303. Toh P. et al. Selenium in bodily homeostasis: hypothalamus, hormones, and highways of communication // *International journal of molecular sciences*. – 2022. – Vol. 23. – no. 23. – P. 15445.

304. Tomo S. et al. Selenium to selenoproteins—role in COVID-19 // *Excli Journal*. – 2021. – Vol. 20. – P. 781.

305. Uehara K., Uehara A. Immunolocalization of protease-activated receptors in endothelial cells of splenic sinuses // *Cell and Tissue Research*. – 2021. – Vol. 386. – P. 605-615.

306. Uehara K., Uehara A. Vimentin intermediate filaments: the central base in sinus endothelial cells of the rat spleen // *The Anatomical Record: Advances in Integrative Anatomy and Evolutionary Biology*. – 2010. – Vol. 293. – no. 12. – P. 2034-2043.

307. Uleckiene S. et al. Evaluation of original selenium-containing compounds for potentially chemopreventive properties in experimental lung carcinogenesis // *Trace Elements & Electrolytes*. – 2005. – Vol. 22. – №. 1.

308. Urbankova L. et al. Effects of sub-lethal doses of selenium nanoparticles on the health status of rats // *Toxics*. – 2021. – T. 9. – №. 2. – C. 28.

309. Vaghari-Tabari M. et al. Zinc and selenium in inflammatory bowel disease: trace elements with key roles? // *Biological Trace Element Research*. – 2021. – Vol. 199. – P. 3190-3204.

310. Van der Laan A. M. et al. Monocyte subset accumulation in the human heart following acute myocardial infarction and the role of the spleen as monocyte reservoir // *European heart journal*. – 2014. – Vol. 35. – no. 6. – P. 376-385.

311. Vasco P. G. et al. Immunohistochemical organization patterns of the follicular dendritic cells, myofibroblasts and macrophages in the human spleen—New considerations on the pathological diagnosis of splenectomy pieces // *International Journal of Clinical and Experimental Pathology*. – 2010. – Vol. 3. – no. 2. – P. 189-202.

312. Venosa A. et al. Protective role of spleen-derived macrophages in lung inflammation, injury, and fibrosis induced by nitrogen mustard // *American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology*. – 2015. – Vol. 309. – no. 12. – P. 1487-1498.

313. Vinceti M. et al. Blood pressure levels and hypertension prevalence in a high selenium environment: results from a cross-sectional study // *Nutrition, Metabolism and Cardiovascular Diseases*. – 2019. – Vol. 29. – no. 4. – P. 398-408.

314. Vinceti M. et al. Dietary selenium intake and risk of hospitalization for type 2 diabetes in the Moli-sani study cohort // *Nutrition, Metabolism and Cardiovascular Diseases*. – 2021. – Vol. 31. – no. 6. – P. 1738-1746.

315. Vinceti M. et al. Safety of selenium exposure and limitations of selenoprotein maximization: molecular and epidemiologic perspectives // *Environmental Research*. – 2022. – Vol. 211. – P. 113092.

316. Vinceti M., Filippini T., Wise L. A. Environmental selenium and human health: an update // *Current environmental health reports*. – 2018. – Vol. 5. – P. 464-485.
317. Wang L. et al. Vimentin suppresses inflammation and tumorigenesis in the mouse intestine // *Frontiers in Cell and Developmental Biology*. – 2022. – Vol. 10. – P. 862237.
318. Webster J. J. Urethane in leukemia // *Journal of the American Medical Association*. – 1947. – Vol. 135. – no. 14. – P. 901-903.
319. Wei Y. et al. Brain-spleen axis in health and diseases: A review and future perspective // *Brain Research Bulletin*. – 2022. – Vol. 182. – P. 130-140.
320. Weiss L. A. Scanning electron microscopic study of the spleen // *Blood*. – 1974. – Vol. 43. – P. 665–691.
321. Wen Y. et al. Chronic inflammation, cancer development and immunotherapy // *Frontiers in pharmacology*. – 2022. – Vol. 13. – P. 1040163.
322. WHO. Guidelines for Drinking-Water Quality; World Health Organization: Geneva, Switzerland – 2004 - Volume 1.
323. Wilkinson A.L., Huey S.L., Mehta S. Antioxidants and HIV/AIDS: Zinc, Selenium, and Vitamins C and E / Wilkinson A.L., Huey S.L., Mehta S. // *Nutrition and HIV: Epidemiological Evidence to Public Health*. New York (NY): CRC Press - 2018 – no. 5.
324. Winther K. H. et al. Selenium in thyroid disorders – essential knowledge for clinicians // *Nature Reviews Endocrinology*. – 2020. – Vol. 16. – no. 3. – P. 165-176.
325. Wu C., Hua Q., Zheng L. Generation of myeloid cells in cancer: the spleen matters // *Frontiers in Immunology*. – 2020. – T. 11. – C. 538044.
326. Xu C. et al. Inflammation has a role in urethane induced lung cancer in C57BL/6J mice // *Molecular medicine reports*. – 2016. – Vol. 14. – no. 4. – P. 3323-3328.
327. Xu J., Huang G., Guo T. L. Developmental bisphenol A exposure modulates immune-related diseases // *Toxics*. – 2016. – Vol. 4. – no. 4. – P. 23.

328. Xu X. et al. Pathological changes of the spleen in ten patients with coronavirus disease 2019 (COVID-19) by postmortem needle autopsy // Chinese journal of pathology. – 2020. – Vol. 49. – no. 6. – P. 576-582.

329. Yang X. et al. Esophagus cancer and essential trace elements // Frontiers in Public Health. – 2022. – Vol. 10. – P. 1038153.

330. Zhang F., Li X., Wei Y. Selenium and selenoproteins in health // Biomolecules. – 2023. – Vol. 13. – no. 5. – P. 799.

331. Zhang K. et al. Mitochondria-mediated apoptosis and endoplasmic reticulum stress are involved in the toxicity induced by copper in the porcine spleen // Environmental Science and Pollution Research. – 2023. – Vol. 30. – no. 41. – P 94928-94939.

332. Zhang X. et al. Brain control of humoral immune responses amenable to behavioral modulation // Nature. – 2020. – Vol. 581. – no. 7807. – P. 204-208.

333. Zhang X. et al. Effects of dietary selenium on immune function of spleen in mice // Journal of Functional Foods. – 2022. – T. 89. – C. 104914.

334. Zhao L. et al. Selenium deficiency-induced multiple tissue damage with dysregulation of immune and redox homeostasis in broiler chicks under heat stress // Science China Life Sciences. – 2023. – Vol. 66. – no. 9. – P. 2056-2069.