

А.А.Захаров

Луганский государственный
медицинский университет

Ключевые слова: тимус, крысы, имунофан.

Надійшла: 19.04.2008

Прийнята: 11.06.2008

УДК 591.443:615.37

ИЗМЕНЕНИЯ В СТРОЕНИИ ТИМУСА БЕЛЫХ КРЫС ПОСЛЕ ПРИМЕНЕНИЯ ИМУНОФАНА

Исследование выполнено в рамках научно-исследовательской работы «Особенности строения органов иммунной, эндокринной и нервной систем под влиянием экзогенных факторов» (номер государственной регистрации 0106U006009).

Резюме. Целью данной работы было исследование изменений строения тимуса половозрелых белых крыс после введения имунофана в дозе 0,7 мкг/кг массы тела. Контролем послужили животные, получавшие 0,9% раствор натрия хлорида. Крыс выводили из эксперимента на 15, 30 и 90 сутки наблюдения. Проведённое морфометрическое исследование, с высокой степенью достоверности показало активную реакцию тимуса после применения препарата, что проявилось снижением темпов инволютивных процессов в органе.

Морфологія.- 2008.- Т.ІІ, №3.- С.34-38.

© А.А.Захаров, 2008

Zakharov A.A. Changes of thymus structure of experimental animals after imunofan treatment.

Summary. The purpose of the current work was to determine the changes of thymus structure of mature white rats after imunofan treatment in a dosage 0,7 µg/kg of body weight. Control animals received 0,9% soluble-sodium chloride. The thymus samples were taken on 15th, 30th and 90th day after treatment. The morphometric researches showed the active reaction of thymus with the retardation of involutive processes in organ that was proved with the high degree of statistical validity.

Key words: thymus, rats, imunofan.

Введение

Проблема иммунотерапии представляет интерес для врачей практически всех специальностей в связи с неуклонным ростом инфекционно-воспалительных заболеваний склонных к хроническому и рецидивирующему течению на фоне низкой эффективности проводимой базовой терапии. Кроме соматических и инфекционных заболеваний, на организм человека оказывают неблагоприятное для здоровья влияние социальные, экологические факторы, медицинские вмешательства, при действии которых в первую очередь страдает иммунная система (Сапин М.Р., Этинген Л.Е., 1996; Singh N., Singh S.M., 2005). Зачастую причиной этих особенностей в развитии, течении и исходе заболеваний, является наличие у больных тех или иных нарушений со стороны иммунной системы. Исследования, проведенные в последние годы во многих странах мира, позволили разработать и внедрить в широкую клиническую практику новые комплексные подходы в лечении и профилактике различных нозологических форм заболеваний с использованием иммуномодулирующих препаратов направленного действия, с учетом уровня и степени нарушений в иммунной системе (Кашенко С.А., 2004; Ковешников В.Г. та співавт., 2004; Ковешников В.Г. и соавт., 2005). Однако, среди большого количества информации, доступной в литературе,

мы не нашли достаточного уровня освещённости проблемы строения органов иммунной системы после применения современных иммуномодулирующих средств нового поколения, созданных с использованием нанотехнологий.

В связи с этим, целью нашей работы явилось установление закономерностей изменений строения тимуса экспериментальных животных после применения иммуностимулирующего препарата имунофана.

Материалы и методы

Эксперимент выполнен в сертифицированной морфологической лаборатории кафедры гистологии, цитологии и эмбриологии Луганского государственного медицинского университета (свидетельство №РБ105/2008 от 01.07.2008 г.). Исследование проведено на 36 половозрелых белых беспородных крысах-самцах, полученных из вивария лабораторных животных ЛугГМУ. Эксперимент проводили с соблюдением всех действующих этических норм при работе с подопытными животными (Денисов С.Д., 1998; Закон Украины №3447, 2006). Имунофан является представителем IV поколения производных тимических гормонов, созданным с помощью нанотехнологий (Лебедев В.В., 1999). Препарат вводился по схеме на 1, 3, 5, 7, 9 сутки эксперимента в дозе 0,7 мкг/кг массы тела животного (приказ МЗУ №604 от 24.12.2003). Контролем служили крысы, получавшие 0,9% раствор натрия хлорида в эквивалентных

объёмах. Животных выводили из эксперимента через 15, 30 и 90 суток после прекращения введения препарата. Тимус фиксировали в 10% растворе формалина, подвергали стандартной гистологической проводке. Срезы органа толщиной 5 мкм окрашивали гематоксилином-эозином и изучали с помощью автоматизированного морфометрического комплекса, включавшего световой микроскоп Olympus CX41, цифровую фотокамеру и персональный компьютер с набором прикладных программ.

Результаты и их обсуждение

Тимус животных половозрелого возраста покрыт тонкой соединительнотканной капсулой и состоит из двух долей. От капсулы вглубь паренхимы органа отходят соединительнотканые перегородки, делящие его на дольки. Паренхима железы светлая, мягкой консистенции, дольки содержат корковое и мозговое вещество, хорошо различимые на светооптическом уровне (рис. 1).

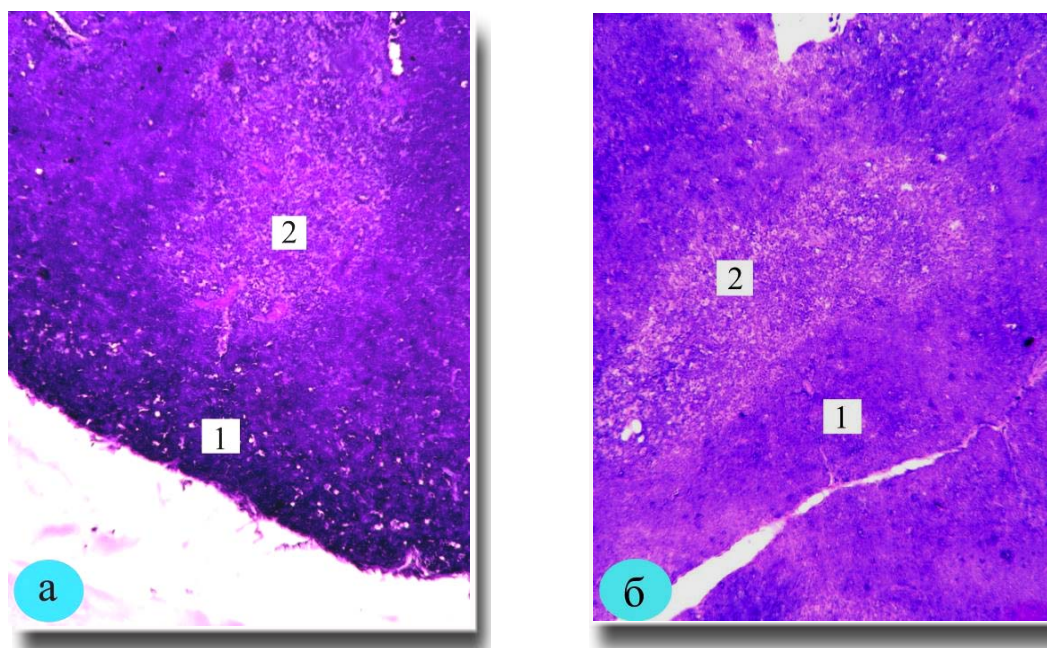


Рис. 1. Тимус половозрелых крыс: а – через 15 суток после введения имунофана; б – через 15 суток после введения физиологического раствора. 1–корковое вещество, 2–мозговое вещество. Окраска гематоксилином-эозином. Приближение: Zoom 132. Объектив: PlanC N 10^х/0.25 ∞/-FN22

Абсолютная масса тимуса животных в контрольной группе крыс в начале наблюдения (15 сут.) составляла $262,51 \pm 11,53$ мг. В дальнейшем этот показатель уменьшался: через 30 дней он достигал $254,42 \pm 27,78$ мг, а минимальная абсолютная масса тимуса отмечалась на 90 сутки и составляла

$234,62 \pm 14,86$ мг. Динамика относительной массы тимуса имела аналогичную направленность с изменением абсолютной массы органа. Динамика изменений абсолютной и относительной масс тимуса после применения имунофана представлена в таблице 1.

Таблица 1

Весовые показатели животных контрольной и экспериментальной групп

Группа	Сроки в сутках	Масса тимуса, мг	Относительная масса тимуса, мг/г
Контроль	15	$262,51 \pm 11,53$	$1,180 \pm 0,034$
	30	$256,42 \pm 5,78$	$1,130 \pm 0,009$
	90	$234,62 \pm 14,86$	$1,10 \pm 0,06$
После применения имунофана	15	$314,00 \pm 15,11^*$	$1,61 \pm 0,18^*$
	30	$285,33 \pm 8,54^*$	$1,45 \pm 0,03^*$
	90	$275,00 \pm 6,13^*$	$1,22 \pm 0,04^*$

Примечание: * – достоверные отличия от контрольных данных при $p < 0,05$.

Максимальное значение показатель относительной массы тимуса имел на 15-е сутки наблюдения – $1,180 \pm 0,034$ мг/г, к 30 суткам он снижался до $1,13 \pm 0,13$ мг/г, к 90 суткам – до $1,10 \pm 0,06$ мг/г. Таким образом, с увеличением срока наблюдения происходило постепенное уменьшение обоих показателей, связанное с возрастной инволюцией тимуса.

Функциональное значение коркового вещества тимуса заключается в дифференцировке незрелых тимоцитов. Вследствие этого ширина и площадь данной зоны могут служить показателем функциональной активности органа. Ширина коркового вещества тимуса животных контрольной группы уменьшалась с увеличением срока наблюдения. На 15 сутки после инъекции данный показатель составлял $262,80 \pm 9,08$ мкм, на 30 – $201,62 \pm 13,32$ мкм, к 90 суткам он уменьшался до $183,54 \pm 6,97$ мкм. Динамика площади сечения коркового вещества тимуса, выраженная в процентах, имела ту же тенденцию: на 15 сутки наблюдения данный показатель характеризовался максимальным значением – $77,90 \pm 0,92\%$, через 30 суток он уменьшался до $68,94 \pm 2,77\%$, к 90 суткам данный параметр приобретал минимальное значение – $67,24 \pm 1,38\%$. Площадь мозгового вещества, выраженная в процентах, соответственно несколько увеличивалась. Кортиково-мозговой индекс тимуса контрольных животных, представляющий собой отношение площадей сечения коркового и мозгового вещества, также претерпевал значительные изменения. Максимальное значение наблюдалось на 15 сутки наблюдения – $3,39 \pm 0,09$, затем данный параметр уменьшался: на 30 сутки он принимал значение $2,22 \pm 0,10$, на 90 сутки эксперимента – $2,05 \pm 0,11$.

После применения имунофана, в течение всего периода наблюдения, тимус сохранял морфологические черты: дольчатое строение, хорошо различимы корковое и мозговое вещество, наличие телец Гассалья в мозговом веществе (рис. 2).

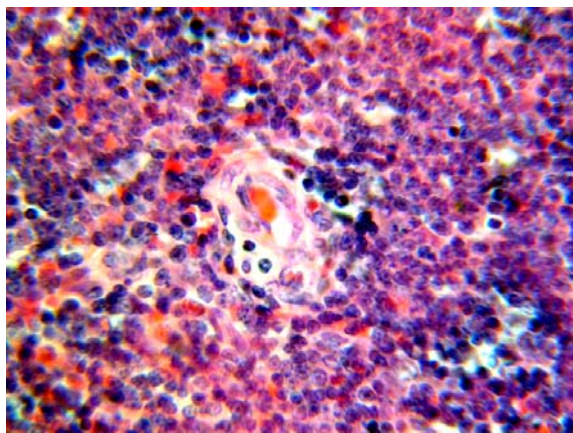


Рис 2. Тельце Гассалья в мозговом веществе тимуса животных после введения имунофана. Окраска гематоксилином-эозином. Приближение: Zoom 132. Объектив: PlanC N 60x/0.80 \approx 0.17/FN22.

Оставался неизменным также состав клеточных популяций: лимфоциты тимуса имели правильную округлую или слегка вытянутую форму с гладкой внешней поверхностью и характеризуются высоким ядерно-цитоплазматическим отношением. Эпителиоретикулоциты несколько крупнее лимфоцитов, имели более светлую цитоплазму, в мозговом веществе располагались вокруг телец Гассалья (рис. 3). Достоверное увеличение абсолютной массы тимуса крыс опытной группы по сравнению с аналогичным показателем контрольной группы на 15 сутки наблюдения составляло 16,4%, на 30 сутки различия приобретали значение 10,83%, через 90 суток – 14,68% по сравнению с контрольными данными. Относительная масса тимуса крыс интактной группы была достоверно меньше таковой в группе животных, получавших имунофан, на 26,71%, 22,07% и 9,45% соответственно срокам наблюдения.

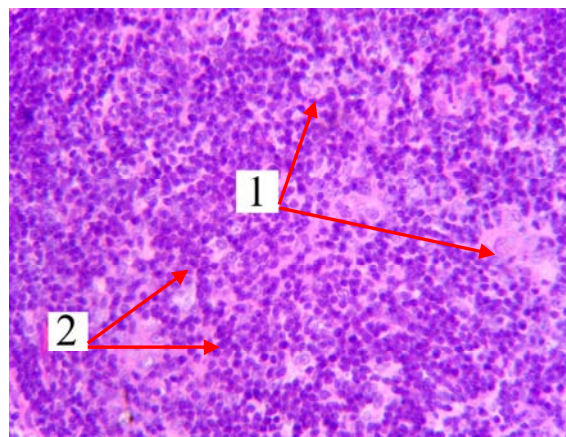


Рис. 3. Мозговое вещество тимуса половозрелых белых крыс через 30 суток после применения имунофана: 1 – эпителиоретикулоциты, 2 – лимфоциты. Окраска гематоксилином-эозином. Приближение: Zoom 132. Объектив: PlanC N 40x/0.65 \approx 0.17/FN.

Ширина коркового вещества тимуса экспериментальных животных была максимальной через 15 суток после введения препарата и составляла $352,26 \pm 1,89$ мкм, к 30 суткам данный показатель несколько уменьшался до уровня $238,31 \pm 4,31$ мкм, тогда как на 90 сутки наблюдения увеличивался до $275,31 \pm 26,06$ мкм (рис. 4). По сравнению с контрольными данными в вышеуказанные сроки наблюдения отмечалось достоверное отличие полученных данных от контрольных на 25,4%, 15,4% и 33,33% соответственно.

Изменения площадей сечения коркового и мозгового вещества тимуса животных, получавших имунофан, представляющие собой доли в процентах от общей площади дольки, имели также выраженный характер. Так, на 15 сутки наблюдения площадь сечения коркового вещества составляла $84,51 \pm 0,68\%$, уменьшаясь до $80,53 \pm 2,66\%$ через 30 суток после окончания введения препарата и принимая значение

84,27±2,60% на 90 сутки эксперимента (рис. 5).

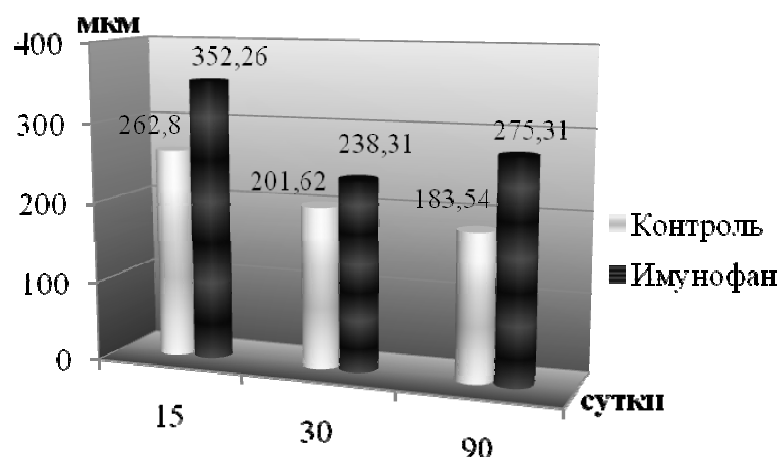


Рис. 4. Динамика изменения ширины коркового вещества тимуса (мм) половозрелых белых крыс после введения имунофана и в контроле (n=6).

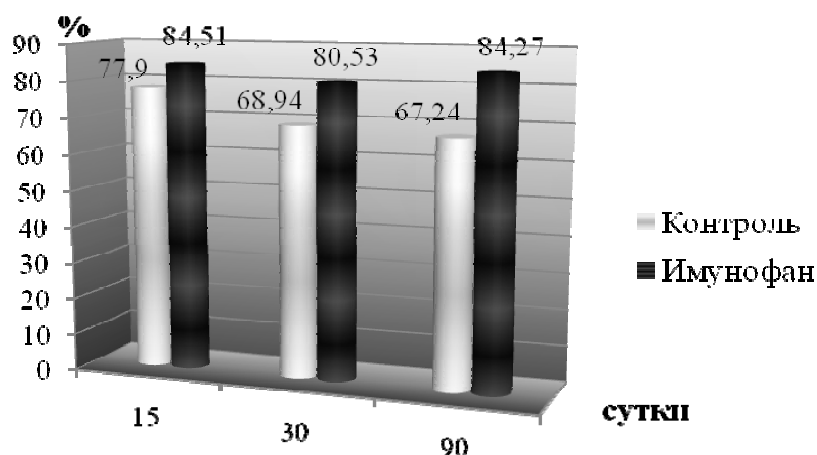


Рис. 5. Динамика изменения площади сечения коркового вещества (%) тимуса половозрелых белых крыс после введения циклофосфана и в контроле (n=6).

Площадь сечения мозгового вещества уменьшалась соответственно степени увеличения коркового вещества. Достоверное увеличение показателя коркового вещества тимуса животных экспериментальной группы относительно данных интактной групп составляло 12,13%, 14,39% и 20,21% соответственно 15, 30 и 90 суткам наблюдения.

Динамика изменений корково-мозгового индекса имели аналогичную площади сечения коркового вещества тенденцию. Максимальное значения данный показатель приобретал на 15 сутки наблюдения, составляя $5,46 \pm 0,65$, затем, к 30 суткам, он уменьшался до $4,14 \pm 0,34$, а через 90 суток после окончания введения препарата достигал уровня $5,36 \pm 0,25$.

Достоверные различия между показателями экспериментальной и контрольной групп составляли 35,53%, 46,38% и 61,75% соответственно

срокам наблюдения (рис. 6).

Выводы

1. В ответ на введение имунофана в дозе 0,7 мг/кг массы тела половозрелого экспериментального животного по схеме наблюдалось интенсивное изменение органомерических и морфометрических параметров тимуса, что свидетельствует о его активной реакции на экзогенное воздействие.

2. Максимальные позитивные изменения в строении тимуса после применения имунофана наблюдались на поздних сроках эксперимента.

3. Динамика изменений изученных морфометрических параметров свидетельствовала о замедлении естественных инволютивных процессов в органе: достоверное увеличение показателей экспериментальной группы относительно контрольных данных было установлено на 15, 30 и 90 сутки эксперимента.

4. Полученные данные указывают на актив-

ную роль тимуса половозрелых животных в адаптации организма к экзогенным воздействиям, вызывая интерес к изучению реакции органа на при-

менение иммуномодулятора в неполовозрелом возрасте, что будет освещено в наших дальнейших публикациях.

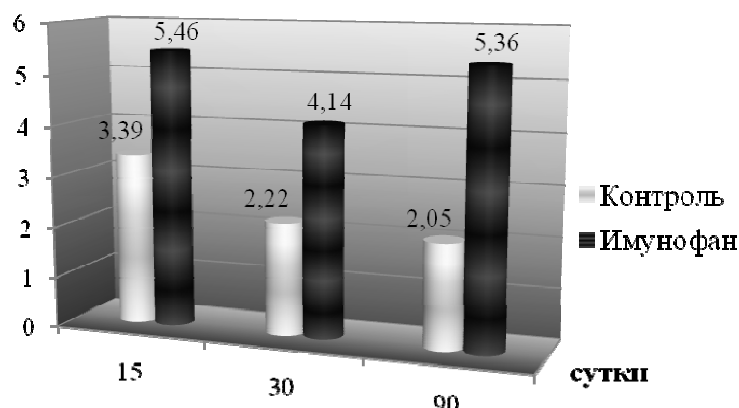


Рис. 6. Динамика изменения корково-мозгового индекса тимуса половозрелых белых крыс после введения имунофана и в контроле (n=6).

Перспективы дальнейших исследований

В дальнейшем планируется изучить механизмы, лежащие в основе снижения темпов ин-

волютивных процессов в тимусе после применения имунофана.

Литературные источники

Закон України «Про захист тварин від жорстокого поводження» від 21.02.2006 р., № 3447.

Кашенко С. А. Морфологическая реактивность тимуса белых крыс при иммуностимуляции / С. А. Кашенко // Український медичний альманах. – 2004. – Т. 2, № 1. – С. 15-19.

Ковешников В. Г. Ультраструктура тимуса в условиях иммуностимуляции и иммуносупрессии / В. Г. Ковешников, В. М. Фролов, С. А. Кашенко // Український медичний альманах. – 2005. – Т. 3, № 2. – С. 36-40.

Ковешніков В. Г. Ультрабудова органів імунної та ендокринної систем в умовах імуностимуляції / В. Г. Ковешніков, С. А. Кашенко, О. С. Болгова // Biomedical and biosocial anthropology. – 2004. – № 2. – С. 165-168.

Лебедев В. В. Имунофан – синтетический пеп-

тидный препарат нового поколения / В. В. Лебедев, В. И. Покровский // Вестник РАМН. – 1999. – № 4. – С. 56-61.

Сапин М. Р. Иммунная система человека / М. Р. Сапин, Л. Е. Этинген. – М. : Медицина, 1996. – 324 с.

Этические вопросы использования животных в учебной работе и научных исследованиях : тез. докл. Белорусско-британского симпозиума, 16-18 окт. 1997 г., Минск / Под ред. С. Д. Денисова. – Минск, 1998. – 140 с.

Singh N. Restoration of thymic homeostasis in a tumor-bearing host by in vivo administration of medicinal herb *Tinospora Cordifolia* / N. Singh, S. M. Singh // Immunopharmacology and immunotoxicology. – 2005. – № 27. – Р. 585–599.

Захаров О.О. Зміни в будові тимуса експериментальних тварин після застосування імунофану.

Резюме. Метою даної роботи було дослідження змін будови тимуса статевозрілих білих щурів після введення імунофану в дозі 0,7 мкг/кг маси тіла. В якості контролю слугували тварини, що отримували 0,9% розчин натрію хлориду. Щурів виводили з експерименту на 15, 30 та 90 добу спостереження. Проведене морфометричне дослідження з високим ступенем вірогідності показало активну реакцію тимуса після застосування препарату, що виявилось зниженням темпів інволютивних процесів в органі.

Ключові слова: тимус, щури, імунофан.