

ИЗМЕНЕНИЯ МОРФОМЕТРИЧЕСКИХ ПОКАЗАТЕЛЕЙ БЕЛОЙ ПУЛЬПЫ СЕЛЕЗЕНКИ КРЫС ПОД ВОЗДЕЙСТВИЕМ ИММУНОТРОПНЫХ ПРЕПАРАТОВ**Кашенко С.А., Золотаревская М.В.***ГЗ «Луганский государственный медицинский университет»*

Вступление. Одной из основных современных медико-социальных проблем является возрастание уровня иммунодефицитных состояний среди населения, что проявляется значительным увеличением частоты и появлением новых инфекционно-воспалительных заболеваний различной этиологии [8,12]. Данная патология сопровождается резистентностью микроорганизмов к химиотерапевтическим средствам, имеет тенденцию к хроническому течению и развитию полиорганного поражения организма [2,5]. Поскольку инфекционный синдром является одним из ведущих клинических синдромов иммунной недостаточности, особенно остро стоит проблема поиска эффективных иммуноотропных лекарственных препаратов, способных в комплексных схемах лечения нормализовать нарушения в системе иммунного гомеостаза.

В этом плане большой интерес представляет синтетический регуляторный полипептид имунофан, являющийся модифицированным фрагментом биологически активного участка молекулы тимопоэтина. Данный препарат способен на фоне иммунодефицитного состояния восстанавливать продукцию тимического гормона тимулина, что сопровождается активацией клеточного звена иммунитета, вторичной стимуляцией гуморального иммунитета, моноцитарно-макрофагальной системы и активности НК-клеток, и оказывать регуляторное влияние на продукцию провоспалительных цитокинов (ФНО, ИЛ-6) [1,4,7]. Поэтому имунофан широко применяется для лечения хронических инфекционных заболеваний различного генеза, профилактики гнойно-воспалительных осложнений при острых инфекциях и в послеоперационном периоде, при вакцинации лиц с выраженным нарушением иммунного статуса [3,9,11,13].

Морфологической основой иммунной системы является лимфоидная ткань, организованная в функциональные образования, следовательно, иммуномодулирующее воздействие имунофана может быть оценено при изучении изменений структуры органов иммунной защиты. Селезенка относится к периферическим органам иммуногенеза, здесь находятся зрелые антигенчувствительные иммунокомпетентные клетки и происходит обезвреживание чужеродных агентов [1]. Вариабельность площади сечения Т- и В-зависимых зон белой пульпы селезенки свидетельствуют о процессах, происходящих в органе [6]. В современных источниках литературы широко освещены вопросы, касающиеся результатов иммунологических исследований изменений иммунного статуса организма на фоне применения имунофана [3,8,9,11]. Однако, результаты исследований, описывающие морфогенез селезенки после введения данного иммуномодулятора, отсутствуют. Поэтому **целью нашей работы** было изучение морфометрических показателей белой пульпы селезенки под воздействием имунофана на интактный

организм и на фоне индуцированного иммуносупрессивного состояния, вызванного применением циклофосфана в высокой дозе.

Связь с научными планами и темами. Данная работа выполнена в соответствии с планом научных исследований ГЗ «Луганский государственный медицинский университет» и является составной частью научно-исследовательской темы кафедры гистологии, цитологии, эмбриологии «Особенности строения органов иммунной, эндокринной и нервной систем под действием экзогенных факторов» (номер Государственной регистрации 0106U006009).

Материалы и методы. Исследование проводилось на 54 беспородных белых крысах-самцах репродуктивного периода зрелого возраста массой 340-360г и 54 беспородных белых крысах-самцах периода полового созревания ювенильного возраста массой 150-200г. Животных разделили на 3 группы по 36 крыс, в каждой группе было 2 подгруппы (половозрелые и неполовозрелые). Крысы 1 группы получали имунофан внутримышечно по 0,71 мкг/кг на 1, 3, 5, 7, 9 сутки эксперимента; 2 группы – циклофосфан внутримышечно по 2,86 мкг/кг на 1 сутки опыта, затем вводили имунофан в качестве корректора в дозе 0,71 мкг/кг на 1, 3, 5, 7, 9 сутки после инъекции циклофосфана. Интактные животные 3 группы служили контролем.

Крысы выводились из эксперимента путем декапитации под эфирным наркозом через 7, 30 и 90 дней после завершения инъекции препаратов. Селезенка извлекалась из брюшной полости, взвешивалась на торсионных весах, фиксировалась в 10% формалине. На уровне ворот органа производились гистологические срезы толщиной 5 мкм и окрашивались гематоксилином и эозином.

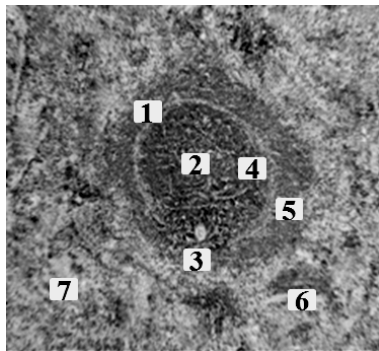
Изучение гистологических объектов производилось с помощью аппаратно-программного комплекса, в состав которого входили: цифровой микроскоп «Olympus CX 41», цифровой фотоаппарат «Olympus C 5050 Z», персональный компьютер, оригинальная морфометрическая программа «Morpholog» [10]. Исследовались диаметр лимфатических узелков и их герминативных центров, ширина мантийной, периартериальной и краевой зон лимфатических узелков, ширина периартериальных лимфатических влагиалищ, относительная площадь белой пульпы селезенки к общей площади среза. Измерения проводились в шести полях зрения каждого гистологического среза, изучались шесть срезов с каждого объекта.

Для статистической обработки полученных данных использовалась программа «Statistica 6.0». Оценка статистической значимости различий между показателями экспериментальных и контрольной групп определялась с помощью критерия Стьюдента ($p < 0,05$).

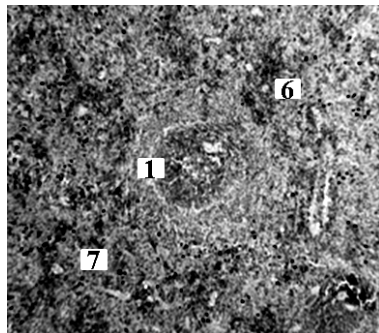
Результаты исследования и их обсуждение.

При исследовании гистологических срезов селезенки крыс экспериментальных и контрольной групп на всех этапах наблюдения выявлялись основные структуры паренхимы органа: белая пульпа (периартериальные лимфатические влагалитца (ПАЛВ), одиночные лимфатические узелки и их скопления) и красная пульпа (синусоидные гемокапилляры, селезеночные тяжи и трабекулы) (рис.1). В лимфатических узелках визуально определялись 4-е зоны: герминативный центр, мантийная, периартериальная и краевая зоны. Встречались лимфатические узелки без герминативного центра.

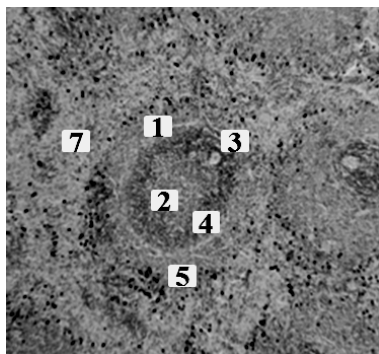
Среди крыс половозрелого возраста 1 группы выраженные изменения морфометрических показателей белой пульпы селезенки наблюдались на 7 сут. после введения имунофана (табл.1, рис.1).



А



Б



В

Рис.1. Селезенка крыс половозрелого возраста контрольной группы (а), после введения имунофана (б) и после применения циклофосфана с последующим введением имунофана (в) на 7-е сутки наблюдения. Гематоксиллин-эозин. Приближение: Zoom 18,5. Объектив – Plan 10×/ 0,25 ∞ / - / . 1 – лимфатический узелок, 2 – герминативный центр, 3 – периартериальная зона, 4 – мантийная зона, 5 – маргинальная зона, 6 – периартериальное лимфоидное влагалитце, 7 – красная пульпа.

В сравнении с контрольной группой значительно снизились параметры диаметра лимфатических узелков (на 14,83%), герминативных центров (на 25,42%), ширины мантийной (на 7,79%), маргинальной зон (на 10,46%), ширины ПАЛВ (на 24,29%) и относительной площади белой пульпы к площади среза (на 29,73%). К 30 сут. эксперимента показатели диаметра лимфатических узелков, ширины мантийной зоны, ширины ПАЛВ и относительной площади белой пульпы увеличивались, но не достигали данных, выявленных у интактных животных (соответственно на 2,72%, 4,99%, 20,97% и 23,13% ниже).

Существенно возросли значения ширины периартериальной зоны (34,82%), диаметра герминативных центров (6,16%) и ширины краевой зоны, которые не отличались от параметров контрольной группы. Показатели ширины периартериальной зоны превышали данные интактных животных на 90 сут. после применения имунофана на 32,53%, маргинальной зоны - 8,11%, диаметра лимфатических узелков - 6,72%, герминативных центров - 3,71%. Ширина мантийной зоны соответствовала контролю. Значения ширины ПАЛВ и площади сечения белой пульпы возрастали, но были ниже контрольных показателей на 3,56% и 19,86% соответственно.

Неполовозрелые крысы 1 группы реагировали на введение имунофана сходно с животными зрелого возраста. Максимальное снижение всех морфометрических параметров белой пульпы селезенки, причем более выраженное, чем у половозрелых крыс, наблюдалось на 7 сутки исследования. Показатели ширины ПАЛВ отличались от контроля на 50,35%, диаметр реактивных центров – на 29,21%, относительная площадь белой пульпы - на 25,22%, диаметр лимфатических узелков – на 10,61%, ширина периартериальной и мантийной зон - на 9,31% и 2,88% соответственно. Постепенное восстановление линейных размеров зон белой пульпы селезенки крыс неполовозрелого возраста после применения имунофана происходило к 30 сут. наблюдения. Возрастали, но не достигали показателей интактных животных, параметры, касающиеся площади сечения белой пульпы, ширины ПАЛВ, диаметра лимфатических узелков и их герминативных центров. Увеличивалась ширина периартериальной зоны, которая превышала контрольные данные на 5,33%. На 90 сут. эксперимента среди крыс вышеуказанного возраста наблюдалось реактивное увеличение большинства морфометрических показателей селезенки. Относительная площадь белой пульпы была выше аналогичных параметров интактных животных на 50,56%, ширина ПАЛВ – на 42,94%, ширина маргинальной и мантийной зон – на 7,13% и 2,73%. Отмечалось возрастание диаметра лимфатических узелков, которые соответствовали контрольным данным в указанные сроки наблюдения. Однако, происходило снижение показателей диаметра герминативных центров и ширины периартериальной зоны (на 18,08% и 3,72%).

Среди крыс половозрелого возраста 2 группы, которым вводился имунофан после иммуносупрессии, вызванной введением циклофосфана, на 7 сут. наблюдения отмечалось уменьшение большинства

линейных размеров и относительной площади белой пульпы селезенки, практически равноценное снижению соответствующих данных в 1 группе животных. В сравнении с интактными крысами, значения ширины ПАЛВ были снижены на 23,21%, диаметра лимфатических узелков – на 12,29%, диаметра реактивных центров – на 26,19%, ширины маргинальной зоны – на 6,54%, площади сечения белой пульпы – на 4,29%. Ширина мантийной зоны не отличалась от контрольных значений, а ширина периартериальной зоны превышала их на 15,78%. К 30 сут. эксперимента относительная площадь белой пульпы к площади среза, ширина маргинальной, мантийной зоны и ширина ПАЛВ продолжали уменьшаться (на 38,37%,

27,93%, 4,99% и 24,75% соответственно) и достигали минимального уровня. Показатели линейных размеров лимфатических узелков и их герминативных центров, наоборот, возрастали, таким образом, что диаметр герминативных центров оказывался больше, чем в контрольной группе на 3,56%. В поздние сроки исследования (90 сут.) все морфометрические значения белой пульпы селезенки крыс зрелого возраста 2 группы превышали соответствующие данные интактных животных: ширина периартериальной, краевой, мантийной зон – на 50,44%, 24,83%, 15,58%, ширина ПАЛВ – на 7,08%, диаметр лимфатических узелков и их реактивных центров – на 17,63% и 2,43%, площадь сечения белой пульпы – на 8,49%.

Таблица 1. Морфометрические показатели белой пульпы селезенки белых крыс-самцов на различных этапах исследования (M±m, n=72)

Группа	Возраст	Сроки наблюд. (сут.)	Диаметр лимфатич. узелка (мкм)	Диаметр герминат. центра лимф. узелка (мкм)	Ширина периартер. зоны лимф. узелка (мкм)	Ширина мантийной зоны лимф. узелка (мкм)	Ширина маргинальн. зоны лимф. узелка (мкм)	Ширина периартер. лимф. влагаллица (мкм)	Относ. площадь белой пульпы к площади среза (%)
1	Половозрел	7	385,27±74,88	158,93±18,82	44,56±4,25	72,94±9,91	62,26±10,61	206,69±24,24	40,44±3,77
		30	668,75±25,34*	200,86±20,99	65,18±5,58	113,56±6,66	110,41±3,45*	254,52±41,61	50,34±5,93
		90	733,51±42,19	258,55±25,51	87,24±8,57	127,91±12,66	124,66±10,56	262,31±53,44	31,12±4,51
	Неполовозрел	7	617,08±54,76	241,79±28,99	62,24±8,89	87,47±8,35	96,39±14,57	198,42±8,61*	35,05±4,01
		30	714,89±40,52	261,97±29,11	70,72±5,68	100,58±12,41	122,71±14,28	196,72±9,97	42,09±5,08
		90	808,21±86,01	268,79±29,59	98,17±12,41	134,99±14,08	136,83±19,26	204,81±14,62	23,41±4,54
2	Половозрел	7	666,18±46,45	232,04±34,41	71,18±7,49	104,22±3,26*	110,68±9,73	207,67±24,82	28,42±4,44
		30	741,12±69,76	242,52±29,36	88,21±16,01	111,56±10,18	144,18±14,43	220,98±25,83	38,71±4,15
		90	676,94±69,52	243,34±29,42	75,63±6,83	100,84±14,23	115,31±9,46	224,77±13,53	24,94±3,86
	Неполовозрел	7	633,29±36,58	196,95±22,15	70,45±7,32	98,26±5,55	113,44±7,95	209,61±24,56	26,21±2,12
		30	786,56±75,24	300,86±27,55	86,05±11,98	112,55±12,01	119,66±9,87	245,63±13,92	37,61±7,23
		90	822,25±40,88*	259,42±29,34	88,95±9,94	127,63±8,26	137,37±9,62	233,84±24,16	35,25±3,59
3	Половозрел	7	685,96±18,28*	229,64±19,12	80,14±7,08	111,83±5,79	115,52±3,44*	210,68±18,67	38,71±4,95
		30	695,37±59,12	236,59±22,31	73,99±4,81	111,56±10,12	102,73±13,21	210,41±16,92	31,03±3,91
		90	746,12±59,82	240,34±22,54	85,85±3,73*	117,42±9,72	133,15±12,17	249,57±51,06	33,77±3,01
	Неполовозрел	7	722,41±45,56	267,04±16,21	93,09±13,11	102,81±5,98	115,42±9,34	284,61±25,52	32,83±4,96
		30	793,08±38,23*	348,81±12,45*	87,49±4,75	118,18±9,27	106,71±10,16	268,88±27,14	31,32±3,53
		90	697,87±72,71	287,08±43,68	84,12±4,71	99,92±9,48	100,37±10,21	236,68±20,14	33,71±4,17

Примечание: * - статистически значимые различия с показателями контрольной группы (p<0,05).

В ранние сроки наблюдения неполовозрелые крысы 2 группы реагировали на последовательное введение иммуноотропных препаратов снижением показателей ширины ПАЛВ, диаметра герминативных центров и относительной площади белой пульпы к площади среза (на 32,59%, 4,01% и 6,35%). Диаметр лимфатических узелков и ширина мантийной зоны соответствовали значениям интактных животных, а ширина периартериальной и маргинальной зон превышала их на 19,82% и 5,09% соответственно. На 30 сут. наблюдения значительно снижалась площадь сечения белой пульпы и ширина краевой зоны. Диаметр герминативных центров и ширина ПАЛВ увеличивались, причем первый показатель был достоверно выше контрольного уровня на 5,79%. Приближались к контрольным цифрам значения диаметра лимфатических узелков, ширины мантийной зоны и ширины ПАЛВ. К 90 сут. происходило значительное возрастание процентного соотношения площади белой пульпы селезенки в составе ее паренхимы, в основном, за счет прироста площади ПАЛВ (на 43,98% и 44,68% больше показателей интактных

крыс). Остальные морфометрические параметры белой пульпы были снижены в сравнении с контролем: диаметр лимфатических узелков и их реактивных центров – на 16,41% и 9,35%, ширина периартериальной, мантийной и маргинальной зон – на 8,94%, 19,58% и 21,73% соответственно.

Выводы:

1. Введение иммунофана интактным крысам и на фоне экспериментальной иммуносупрессии приводит к выраженным изменениям морфометрических параметров белой пульпы селезенки.
2. На фоне неизмененного иммунного ответа иммунофан вызывает иммуносупрессивный эффект, что подтверждается в снижении морфометрических параметров белой пульпы селезенки.
3. Применение иммунофана в качестве иммуностимулятора при иммуносупрессии, вызванной введением циклофосфана, приводит к частичному нивелированию его негативных эффектов.
4. Иммунофан обладает иммуностимулирующими свойствами только при наличии структурно-функциональных изменений со стороны селезенки.
5. Селезенка неполовозрелых крыс проявляет

более высокую степень реактивности на введение иммуностропных препаратов в сравнении с селезенкой животных репродуктивного периода.

Перспективы дальнейших исследований. В последующих работах планируется осветить во-

просы структурной организации селезенки крыс на ультрамикроскопическом уровне после применения иммуностропных препаратов имунофана и циклофосфана.

ЛИТЕРАТУРА:

1. **Бибик Е. Ю.** Современные возможности медикаментозной коррекции морфогенеза органов иммунной системы / Е. Ю. Бибик, Е. В. Куцкая // Украинский медицинский альманах. – 2005. – Т.8, №4. – С. 207-212.
2. **Билибина С. В.** Варианты недостаточности иммунитета у пациентов с хроническим бронхитом и принципы назначения иммуномодулирующей терапии / С. В. Билибина // Актуальные вопросы терапии. – 2007. – №4. – С. 35-38.
3. **Гаврилова Е. Ю.** Использование имунофана при иммунокоррекции у больных хроническим остеомиелитом / Е. Ю. Гаврилова, Т. С. Белохвостикова, М. В. Промтов [и др.] // Медицинская иммунология. – 2002. – Т.4, №2. – С. 354-355.
4. **Зельоний І. І.** Вплив імунофану на вміст прозапальних цитокінів (ІЛ-1 β , ФНП α) у хворих на бешиху з гнійно-запальними ускладненнями при хірургічному лікуванні / І. І. Зельоний // Український медичний альманах. – 2006. – Т.9, №1. – С. 59-62.
5. **Караулов А. В.** Препарат пидотимод – новое эффективное средство в иммунопрофилактике и иммунотерапии респираторных инфекций у детей / Вопросы современной педиатрии. – 2008. – Т.7, №1. – С. 96-100.
6. **Кашченко С. А.** Строеие селезенки крыс старческого возраста после тимэктомии / С. А. Кашченко // Украинский медицинский альманах. – 2004. – Т.7, №2. – С. 79-81.
7. **Лебедев В. В.** Имунофан - синтетический пептидный препарат нового поколения: иммунологические и патогенетические аспекты клинического

применения / В. В. Лебедев // Иммунология. - 1999. - №1. - С. 25-30.

8. **Лоскутова І. В.** Ефективність імунофану у хворих на рецидивні форми алергодерматозів з наявністю вторинних імунодефіцитних станів / І. В. Лоскутова, С. Ю. Ціпоренко // Український медичний альманах. – 2006. – Т.9, №3. – С. 100-102.

9. Механизмы действия дифференцированной иммунотерапии гнойно-воспалительных заболеваний различного генеза / **В. А. Земскова, С. С. Земскова, В. И. Домнич, В. И. Шабунина** // Прикладные информационные аспекты медицины. – 2009. – Т.12, №2. – С. 71-77.

10. **Овчаренко В. В.** Комп'ютерна програма для морфометричних досліджень «Morpholog» // В. В.Овчаренко, В. В. Маврич / Свідощтво про реєстрацію авторського права на твір № 9604, дата реєстрації 19.03.2004.

11. **Фролов В. М.** Ефективність імунофану та амізону як засобів профілактики запальних ускладнень з боку бронхолегеневої системи у дорослих хворих на вітряну віспу з наявністю імунодефіцитних станів / В. М. Фролов, І. В. Лоскутова, І. О. Шаповалова // Український медичний альманах. – 2006. – Т.9, №3. – С. 134-138.

12. **Хайтов Р. М.** Современные иммуномодуляторы: основные принципы их применения / Р. М. Хайтов, Пинегин Б. В. // Иммунология. – 2000. – №5. – С. 4-7.

13. **Шамшева О. В.** Форсированная вакцинация против гепатита В у детей со злокачественными опухолями / О. В. Шамшева, М. А. Осипова, В. А. Поляков // Детские инфекции. – 2003. - №4. – С.10-13.

Кашченко С.А., Золотаревская М.В. Изменения морфометрических показателей белой пульпы селезенки крыс под воздействием иммуностропных препаратов // Украинский медицинский альманах. – 2011. – Том 14, № 5. – С. 74-77.

В экспериментальных условиях исследовали влияние иммуномодулятора имунофана на морфогенез белой пульпы селезенки крыс в состоянии иммуносупрессии, вызванной циклофосфаном, и на фоне неизмененного иммунного ответа. Применение имунофана вызывает снижение показателей морфометрии белой пульпы селезенки в ранние сроки наблюдения (7, 30-е сут.). Частичное восстановление морфометрических показателей органа происходит к 90-м сут. эксперимента.

Ключевые слова: крыса, селезенка, имунофан, циклофосфан.

Кашченко С.А., Золотаревська М.В. Зміни морфометричних показників білої пульпи селезінки шурів під дією імуностропних препаратів // Український медичний альманах. – 2011. – Том 14, № 5. – С. 74-77.

У експериментальних умовах досліджували вплив імуномодулятора імунофана на морфогенез білої пульпи селезінки шурів у стані імуносупресії, яка викликана циклофосфаном, і на тлі незміненої імунної відповіді. Вживання імунофана викликає зниження показників морфометрії білої пульпи селезінки в ранні терміни спостереження (7, 30-та доба). Часткове відновлення морфометричних показників органу відбувається на 90-ту добу експерименту.

Ключові слова: шур, селезінка, імунофан, циклофосфан.

Kashchenko S.A., Zolotarevskaya M.V. The changes of morphometric indexes of white pulp of rats' spleen under influence of immunomodulate drugs // Український медичний альманах. – 2011. – Том 14, № 5. – С. 74-77.

The influence of immunomodulate drug imunofan on the morphogenesis of white pulp of rats' spleen was investigated in experimental terms in the state of immunosuppression caused by cyclophosphamide and in the state of the unchanged immune answer. The decrease of morphometric indexes of white pulp of spleen in the early terms of supervision (7, 30 days) was caused by application of imunofan. Morphometric parameters partly recovered at the 90-th day of the experiment.

Key words: rat, spleen, imunofan, cyclophosphamide.

Надійшла 24.06.2011 р.
Рецензент: проф. В.І.Лузін