

© Золотаревская М.В., 2011

УДК 591.441:615.375

ОСОБЕННОСТИ УЛЬТРАСТРУКТУРЫ СЕЛЕЗЕНКИ ПОСЛЕ ВВЕДЕНИЯ ИММУНОТРОПНЫХ ПРЕПАРАТОВ В ЭКСПЕРИМЕНТЕ

М.В.Золотаревская

Кафедра гистологии, цитологии, эмбриологии (зав. – проф. С.А.Кащенко) Луганского государственного медицинского университета

ОСОБЛИВОСТІ УЛЬТРАСТРУКТУРИ СЕЛЕЗІНКИ ПІСЛЯ ВВЕДЕННЯ ІМУНОТРОПНИХ ПРЕПАРАТІВ В ЕКСПЕРИМЕНТІ

Резюме. Досліджено вплив імунофану на зміни ультрамікроскопічної структури білої пульпи селезінки інтактних щурів та після імуносупресивної дії циклофосфану. Введення імунотропних препаратів викликає виражені зміни в ультраструктурі селезінки. Одержані дані вказують на прояв імуномодельовальної дії імунофану тільки при наявності функціональних змін у системі імунітету.

Ключові слова: селезінка, ультраструктура, щур, імунофан, циклофосфан.

В условиях сложной экологической ситуации в промышленном регионе Донбасса на фоне воздействия различных негативных экзогенных факторов на организм человека все чаще развиваются состояния стойкого иммунного дисбаланса, приводящего к анергии или гиперэргии иммунной системы. Поэтому особенностью лечебной практики последних десятилетий стало возрастание численности заболеваний, в основе которых лежит развитие вторичных иммунодефицитных состояний [1]. В клинике широко используются методы устранения иммунных нарушений, называемые иммунокорректирующей или иммуномодулирующей терапией [2-4].

Пептидным иммуномодулятором нового поколения является имунофан (Иф), который обладает иммунокорректирующим, противовоспалительным, детоксикационным, мембраностабилизирующим и антиоксидантным действиями. Отличительным свойством Иф является способность оказывать выраженное действие только на клетки с резко измененными параметрами их метаболической и функциональной активности [5, 6]. В экспериментальных условиях данное состояние возможно вызвать при помощи однократного введения высокой дозы (200 мг/кг) цитостатического и иммуносупрессорного препарата циклофосфана (Цф), который подавляет пролиферацию и дифференцировку В-лимфоци-

тов [7]. Существует большое количество научных исследований, направленных на изучение функциональной активности иммунной системы после применения Иф [8, 9], однако работы, касающиеся исследования тонкой структурной организации селезенки (Сз) как периферического органа иммунной системы на фоне применения данного иммуномодулятора, отсутствуют.

Цель исследования: изучить морфологические особенности Сз на ультрамикроскопическом уровне после введения Иф и в состоянии индуцированной экспериментальной иммуносупрессии.

Работа выполнена в соответствии с планом научных исследований ЛГМУ и является фрагментом научно-исследовательской темы "Особенности строения органов иммунной, эндокринной и нервной систем под действием экзогенных факторов" (№ 0106U006009).

Материал и методы. Исследование проведено на 12 беспородных белых крысах-самцах репродуктивного периода зрелого возраста массой 300-360 г. Животных разделили на 3 группы по 4 особи в каждой. Крысам 1-й группы вводили Иф внутримышечно по 0,71 мг/кг на 1-е, 3-е, 5-е, 7-е и 9-е сутки; крысам 2-й группы – Цф внутримышечно по 200 мг/кг на 1-е сутки опыта, затем Иф в качестве иммунокорректи-

ра в дозе 0,71 мкг/кг на 1-е, 3-е, 5-е, 7-е и 9-е сутки после инъекции Цф. Интактные животные 3-й группы служили контролем. Крыс выводили из эксперимента путем декапитации под эфирным наркозом через 7 и 30 суток после завершения инъекции препаратов. Немедленно после извлечения кусочки Сз размером 1 мм³ погружали в глутаральдегидный фиксатор по Тарновскому на 24 ч. После этого материал выдерживали в 1% тетраоксиде осмия по Паладе в течение 1 ч, производили дегидратацию в этаноле возрастающей концентрации и абсолютном ацетоне, заливали смесью эпоксидных смол. Ультратонкие срезы изготавливали на ультрамикротоме УМТП-4 Сумского ПО "Электрон", контрастировали в растворе ура-нилацетата и цитрата свинца по Рейнольдсу, изучали в электронном микроскопе EM-125.

Результаты исследования и их анализ.

Клеточный состав белой пульпы Сз крыс контрольной группы при электронномикроскопическом исследовании на всех сроках наблюдения представлен малыми и средними лимфоцитами, лимфобластами, плазмочитами и макрофагами. Встречаются нейтрофильные, эозинофильные и базофильные гранулоциты, эритроциты, ретикулоциты. Лимфоциты Сз имеют округлую или неправильную форму, крупное округлое или овальное с небольшими инвагинациями ядро, которое содержит от одного до нескольких ядрышек и скопления глыбок гетерохроматина большей частью на его перифе-

рии. В узком участке цитоплазмы, окружающим ядро, наблюдается небольшое количество органелл в виде свободных рибосом, полисом, элементов гранулярной эндоплазматической сети (ГЭС), аппарата Гольджи и митохондрий. На препаратах определяются светлые и темные лимфоциты с различной электронной плотностью цитоплазмы (рис. 1, а).

Нахождение значительного количества лимфобластов в структуре Сз интактных крыс может свидетельствовать об активных процессах антигензависимого лимфопоэза, поскольку их основная функция – активное деление (рис. 1, б). Данный тип представлен крупными светлыми клетками овальной или округлой формы с ровными границами. Ядерно-цитоплазматическое соотношение сдвинуто в сторону ядра, в котором находится от одного до нескольких ядрышек. Кариоплазма светлая, так как содержит, в основном, эухроматин. Цитоплазма вмещает большое количество рибосом и полисом, структур зернистой эндоплазматической сети, что свидетельствует о высокой синтетической активности лимфобластов. Вследствие развитых процессов пролиферации довольно часто встречаются клетки с фигурами митоза и фрагментированной ядерной мембраной с размытыми границами.

Плазмочиты Сз крыс контрольной группы имеют небольшое округлое эксцентрично расположенное ядро, с характерным расположением гетерохроматина в виде "спиц колеса" и чет-

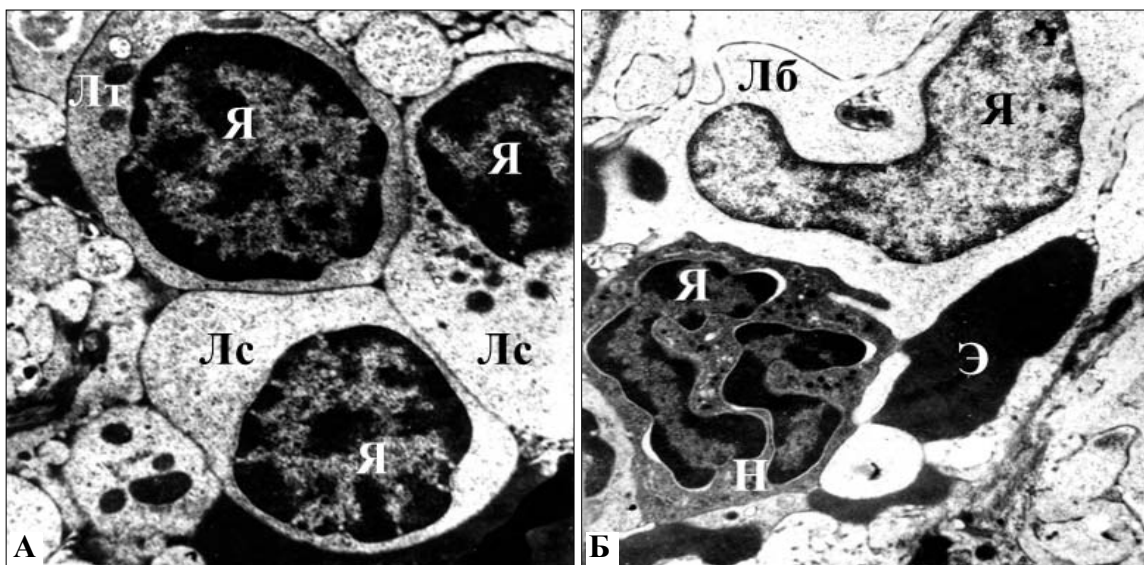


Рис. 1. Электронограмма селезенки крыс контрольной группы (7-е сутки):
Лс – светлый лимфоцит; Лт – темный лимфоцит; Н – нейтрофильный гранулоцит;
Лб – лимфобласт; Э – эритроцит; Я – ядро. Ув. 8000^x.

ко выраженными мембранами нуклеолеммы. Их хорошо развитые расширенные цистерны ГЭС свидетельствуют об активной продукции иммуноглобулинов. Макрофаги Сз относятся к мононуклеарно-фагоцитарной системе, выполняют функцию иммунного фагоцитоза и элиминации старых и поврежденных клеток крови, имеют неправильную форму за счет многочисленных псевдоподий и крупные размеры. В цитоплазме макрофагов содержится большое количество фагосом с фрагментами фагоцитированного материала, первичных лизосом и гетеролизосом. Ядро компактное, содержит отдельные участки конденсированного хроматина около ядерной мембраны, одно ядрышко. Встречающиеся нейтрофилы имеют крупное сегментированное ядро, электронноплотную цитоплазму с мелкими округлыми темными гранулами.

У крыс, которым вводили только Иф без предшествующей иммуносупрессии, Сз при всех сроках наблюдения содержит вышеперечисленные группы клеток. Особенности ультраструктуры органа на 7-е сут. эксперимента является наличие значительного количества макрофагов с крупными фагосомами, содержащими большое количество фагоцитированного материала, среди которого можно наблюдать разрушающиеся клетки (рис. 2, а). Встречаются единичные свободнолежащие нефагоцитированные дегенеративные темные клетки неправильной формы с темными ядрами и вакуолизированной цитоплазмой. Плазмциты Сз данной

группы животных имеют растянутые мешки зернистой эндоплазматической сети с размытыми мембранами и значительным количеством электронноплотных телец Русселя внутри цистерн, что свидетельствует о застойных процессах и нарушении функционирования клеток (рис. 2, б). Количество лимфоцитов и лимфобластов снижено. Наличие данных ультраструктурных особенностей Сз в ранние сроки наблюдения после введения Иф свидетельствует о снижении активности иммунных реакций и стимуляции процессов дегенерации и разрушения нормально функционирующих клеток паренхимы.

На 30-е сут. отмечается ликвидация вышеуказанных негативных эффектов иммуномодулятора на клетки паренхимы Сз и проявление его иммуностимулирующих качеств. Появляется значительное количество лимфоцитов, активных плазмцитов с расширенными канальцами ГЭС, заполненными иммуноглобулинами, и лимфобластов, в том числе, находящихся в процессе митотического деления (рис. 3, а). Данный факт указывает на активацию процессов антигензависимой пролиферации и дифференцировки иммуноцитов и на усиление процессов антителообразования. Исчезают явления гибели и дегенерации клеток в паренхиме Сз, о чем свидетельствует снижение количества наблюдаемых макрофагов и отсутствие гибнущих клеток. По всей вероятности, Иф дополнительно начинает оказывать стимулирующее влияние на кроветворение в связи с обнаружением еди-

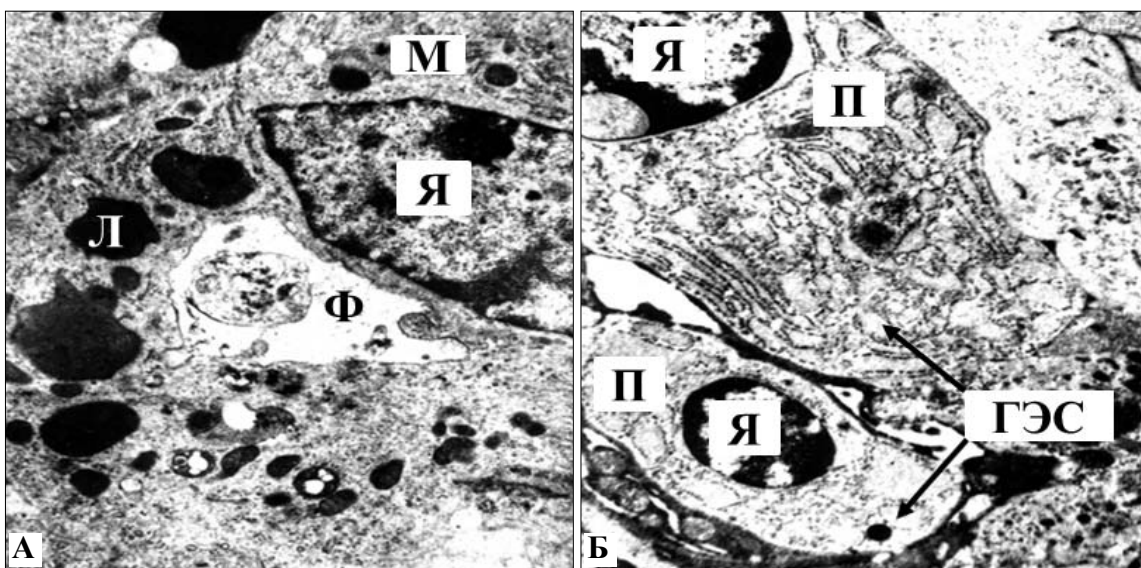


Рис. 2. Электронограмма селезенки крыс после введения иммунофана (7-е сутки): М – макрофаг; П – плазмцит; Я – ядро; Ф – фагоцитированный материал; Л – лизосома; ГЭС – гранулярная эндоплазматическая сеть. Ув. 8000 \times .

нических мегакариоцитов. Мегакариоцит представляет собой гигантскую клетку, которая принимает участие в тромбоцитопоэзе. В центре его лежит крупное дольчатое ядро с участками гетерохроматина, прилегающими к ядерной мембране, объемная цитоплазма заполнена округлыми электронноплотными гранулами различной размера и канальцами развитой агранулярной сети, которая формирует так называемые "демаркационные линии" (рис. 3, б).

Ультраструктура Сз крыс 2-й группы при применении Иф после иммуносупрессивного воздействия Цф на 7-е сут. эксперимента отличается наличием значительного количества

плазматических клеток, лимфобластов, макрофагов и эозинофильных гранулоцитов, однако зрелые лимфоциты встречаются редко (рис. 4, а, б). Плазмоциты имеют хорошо развитые цистерны ГЭС, заполненные иммуноглобулинами. Значительное количество бластных клеток лимфоидного ряда находится в стадии митотического деления. Наблюдаемые макрофаги обладают хорошо развитым фагоцитарным аппаратом и наполнены большим количеством поглощенного материала, среди которого встречаются разрушающиеся эритроциты и лимфоциты (рис. 4, а). Эозинофилы представлены светлыми клетками округлой формы с сег-

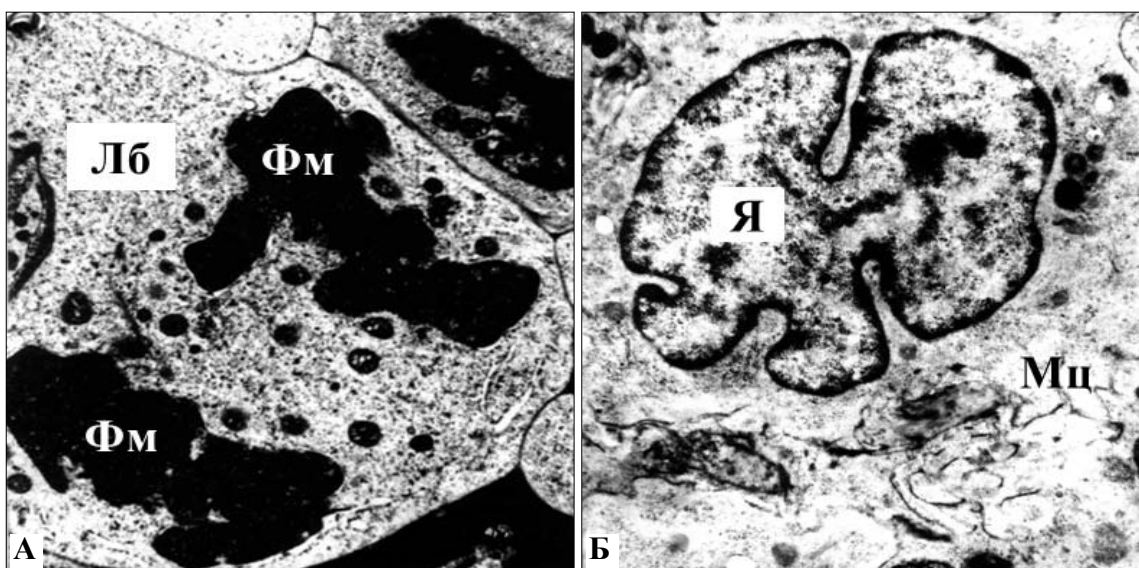


Рис. 3. Электронограмма селезенки крыс после введения иммунофана (30-е сутки): Лб – лимфобласт; Мц – мегакариоцит; Фм – фигура митоза; Я – ядро. Ув. 8000^х.

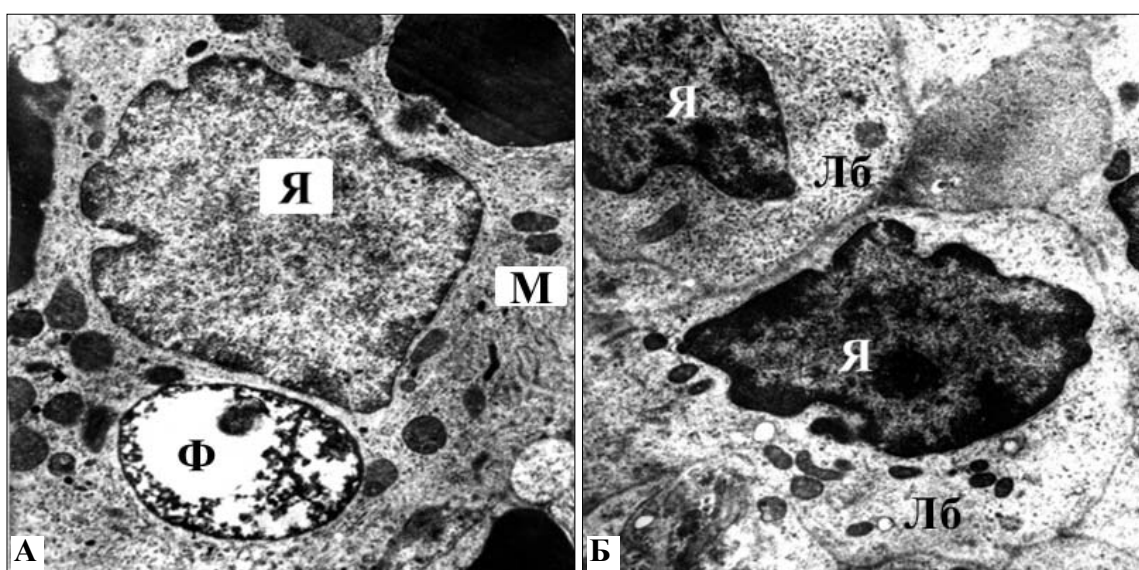


Рис. 4. Электронограмма селезенки крыс после совместного введения циклофосфана и иммунофана (7-е сутки): М – макрофаг; Лб – лимфобласт; Я – ядро; Ф – фагоцитированный материал. Ув. 8000^х.

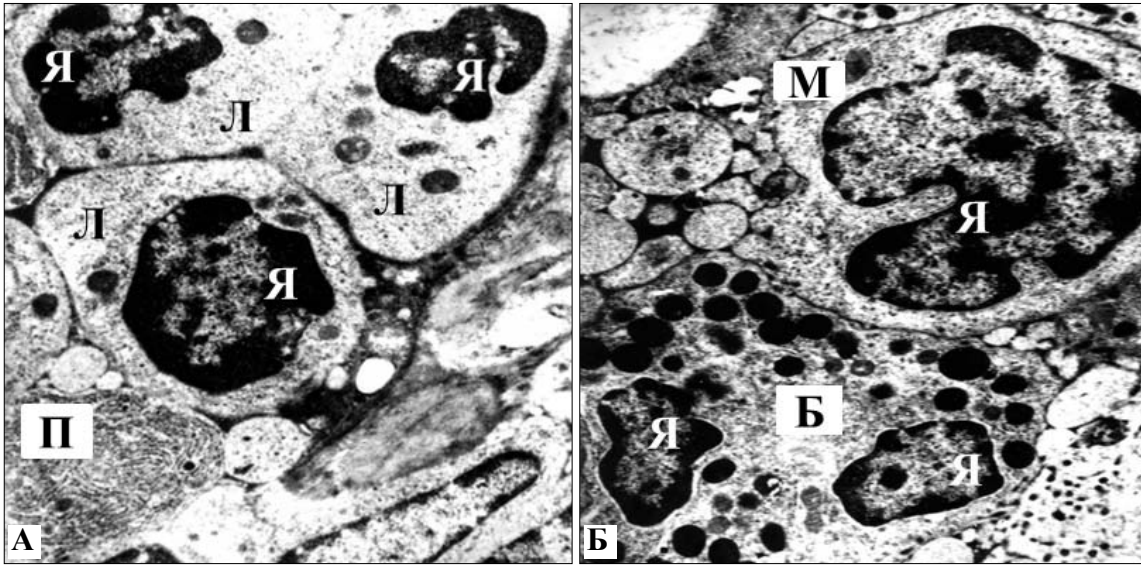


Рис. 5. Электронограмма селезенки крыс после совместного введения циклофосфана и иммунофана (30-е сутки): Л – лимфоцит; П – плазмоцит; Б – базофильный гранулоцит; М – макрофаг; Я – ядро. Ув. 8000 \times .

ментированным ядром и электронноплотными овальными гранулами, которые сосредоточены в непосредственной близости к цитолемме, что может свидетельствовать об их активной дегрануляции. Активируется процесс образования тромбоцитов в Сз, поскольку в ее структуре отмечается наличие единичных мегакариоцитов с крупным дольчатым ядром и развитыми псевдоподиями.

Приведенные данные подтверждают цитостатический эффект Цф на зрелые лимфоциты на ранних сроках наблюдения. Однако процессы пролиферации и дифференцировки лимфобластов и антителообразующих клеток не нарушены, что может быть обусловлено положительным иммуностимулирующим воздействием Иф.

Тонкое строение Сз крыс на 30-е сут. после введения Иф в комбинации с Цф имеет некоторое сходство с таковым на ранних сроках эксперимента (рис. 5, а). Однако количество наблюдаемых эозинофилов и лимфобластов снижено, встречаются нейтрофильные и базофильные гранулоциты. Активно функционирующие макрофаги в цитоплазме содержат фагосомы с поглощенными эритроцитами, первичные и вторичные лизосомы, пиноцитозные вакуоли. Границы данных клеток четкие, неровные, псевдоподии хорошо развиты, ядра овальной или неправильной формы с 1-2 ядрышками и скоплениями конденсированного хроматина по периферии. В плазматических клетках хорошо

развита ГЭС, ее мембраны имеют четкие границы и значительное количество рибосом, а цистерны заполнены гомогенным содержимым, что свидетельствует об активном функциональном состоянии данных структур. В цитоплазме плазмоцитов находится небольшое количество митохондрий с темным матриксом и нечеткими кристами. Лимфоциты представлены клетками небольших размеров с крупным, чаще округлым ядром, и слабо развитыми органеллами. Встречающиеся базофилы имеют округлую или овальную форму, сегментированное ядро и электронноплотные гомогенные округлые гранулы (рис. 5, б). Таким образом, на 30-е сут. после введения Иф на фоне индуцированной иммуносупрессии, вызванной Цф, происходит частичное восстановление клеточного состава паренхимы Сз.

Выводы и перспективы дальнейших исследований. 1. Введение иммунофана (Иф) крысам на фоне нормального функционального состояния иммунной системы и после применения циклофосфана (Цф) вызывает выраженные изменения в ультраструктуре селезенки (Сз). 2. В ранние сроки эксперимента (7-е сут.) Иф вызывает иммуносупрессивный эффект и стимулирует процессы гибели клеток белой пульпы Сз, а к 30-м сут. оказывает выраженное иммуностимулирующее влияние на иммуноциты Сз, что проявляется активацией процессов их пролиферации и дифференцировки, и усиле-

нием антителообразования. 3. На фоне экспериментальной иммуносупрессии, вызванной введением Цф, Иф оказывает мощный стимулирующий эффект на иммунокомпетентные клетки Сз и вызывает нивелирование негативных

эффектов цитостатика, более выраженное в поздние сроки наблюдения. 4. В перспективе целесообразно изучить особенности морфометрических показателей белой пульпы Сз крыс на фоне применения иммуотропных препаратов.

Литература

1. Фролов В.М. Клінічна імунологія синдрому підвищеної втомлюваності у мешканців регіону Донбасу: показники клітинної ланки імунітету / В. М. Фролов, Г. М. Драннік // Укр. мед. альманах. – 2003. – № 3. – С. 169-172.
2. Возможности коррекции нарушений иммунитета при туберкулезной инфекции / Д. С. Суханов, А. К. Иванов, М. Г. Романцов [и др.] // Клини. мед. – 2010. – № 6. – С. 14-19.
3. Терапевтический эффект иммунофана и полиоксидония при тяжелом течении атопического дерматита у детей раннего возраста / Я. Ю. Иллек, Г. А. Зайцева, А. В. Галанина [и др.] // Экол. чел. – 2005. – № 2. – С. 29-32.
4. Dhasarathan P. Immunomodulation by carbosulfan following sub chronic exposure in Swiss albino mice / P. Dhasarathan, P. Antony Pathrose, S. Paulsi // J. Biosci. Res. – 2010. – Vol. 1, № 3. – P. 130-136.
5. Епифанова Н. Ю. Влияние пептидов тимического происхождения и антитимоцитарного иммуноглобулина на течение послеоперационного периода у больных с синдромом диабетической стопы / Н. Ю. Епифанова // Аспирант. вест. Поволжья. – 2010. – № 3-4. – С. 198-203.
6. Т-зависимые иммунорегуляторные эффекты полиоксидония и иммунофана (обзор литературы) / Г.Ю. Стручко, Л.М. Меркулова, М. Н. Михайлова, З. Мухаммад // Вест. Чуваши. ун-та. – 2010. – № 3. – С. 140-145.
7. Маишковский М. Д. Лекарственные средства / Маишковский М. Д. – М.: Новая волна, 2005. – 1206 с.
8. Забродский П. Ф. Влияние иммунофана на показатели системы иммунитета и перекисного окисления липидов после острых отравлений хлорированными углеводородами / П. Ф. Забродский, В. Г. Лим, А. А. Свистунов // Иммунол. – 2005. – № 6. – С. 335-337.
9. Патогенетические аспекты лечения и профилактики хронической и рецидивирующей герпес-вирусной инфекции / А. А. Коростелев, И. А. Гаврилкина, Т. О. Кострова, И. В. Мартыненко // Сибир. мед. ж. – 2007. – № 4. – С. 36-40.

ОСОБЕННОСТИ УЛЬТРАСТРУКТУРЫ СЕЛЕЗЕНКИ ПОСЛЕ ВВЕДЕНИЯ ИММУНОТРОПНЫХ ПРЕПАРАТОВ В ЭКСПЕРИМЕНТЕ

Резюме. Исследовано влияние иммунофана на изменение ультрамикроскопической структуры белой пульпы селезенки интактных крыс и после иммуносупрессивного действия циклофосфана. Введение иммуотропных препаратов вызывает выраженные изменения в ультраструктуре селезенки. Полученные данные указывают на проявление иммуномодулирующего действия иммунофана только при наличии функциональных изменений в системе иммунитета.

Ключевые слова: селезенка, ультраструктура, крыса, иммунофан, циклофосфан.

FEATURES OF THE ULTRASTRUCTURE OF THE SPLEEN AFTER INTRODUCING IMMUNOTROPIC DRUGS IN AN EXPERIMENT

Abstract. The influence of the immunomodulative drug immunofan on changes of the ultramicroscopic structure of the white pulp of the spleen of intact rats and after the immunosuppressive action of cyclophosphan has been investigated. The introduction of immunomodulative drugs causes marked changes of the ultrastructure of the spleen. The obtained findings are indicative of the manifestation of the immunomodulating action of immunofan only in the presence of functional changes in the system of immunity.

Key words: spleen, ultrastructure, rat, immunofan, cyclophosphan.

State Medical University (Lugansk)

Надійшла 22.09.2011 р.
Рецензент – проф. Е.Ф.Барінов (Донецьк)