

DOI: 10.36361/1814-8999-2021-22-2-36-39

Морозова Е. Н., Морозов В. Н., Заболотная С. В., Михайлик Т. А.

ФГАОУ ВО «Белгородский государственный национальный исследовательский университет» (НИУ «БелГУ»), г. Белгород

УЛЬТРАМИКРОСКОПИЧЕСКОЕ СТРОЕНИЕ ПЕЙЕРОВЫХ БЛЯШЕК ТОНКОЙ КИШКИ КРЫС ПОСЛЕ КОРРЕКЦИИ ИМУНОФАНОМ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ ИММУНОСУПРЕССИИ

Цель. Изучить строение пейеровых бляшек на ультрамикроскопическом уровне после введения имунофана на фоне смоделированной в эксперименте иммуносупрессии, вызванной введением циклофосфана.

Материалы и методы. Исследование проведено на 36 белых половозрелых крысах-самцах, распределенных на 2 группы. В 1-ю группу были включены крысы, которым на 1 сутки эксперимента вводили циклофосфан в дозе 200 мг/кг, а затем имунофан по схеме на 2, 4, 6, 8, 10 сутки в дозе 0,7 мкг/кг массы тела. 2-я группа была сформирована из интактных крыс, которым вводили эквивалентное количество изотонического раствора натрия хлорида. Животных 1-й группы выводили из эксперимента на 7 и 30 сутки после коррекции имунофаном циклофосфан-индуцированной иммуносупрессии. Выделяли кусочки пейеровых бляшек и осуществляли их обработку по стандартной методике. Ультратонкие срезы контрастировали в растворе уранилацетата и цитрата свинца по E. Reynolds и изучали под электронным микроскопом с дальнейшим фотографированием.

Результаты. На 7 и 30 сутки наблюдения после коррекции имунофаном циклофосфан-индуцированной иммуносупрессии выявили, что лимфоциты, в большинстве случаев, плотно прилегают друг к другу, а в контрольной группе чаще между ними располагается строма. В ядре данных клеток гетерохроматин расположен глыбками и прилежит к мембране ядра; в контрольной группе он заполняет две трети карิโอплазмы. На 7 и 30 сутки часто встречаются клетки с картинами митоза, лимфобласты, макрофаги содержат крупные лизосомы, по сравнению с контрольной группой крыс. В плазмочитах гранулярная эндоплазматическая сеть занимала до 2/3 цитоплазмы клеток. Стромальный компонент хорошо выражен в контрольной группе животных, по сравнению с экспериментальной, и представлен ретикулоцитами, ретикулярными волокнами и сосудами, а также встречаются фибробластические ретикулярные клетки.

Заключение. При ультрамикроскопическом исследовании введение иммуномодулятора имунофана на фоне циклофосфан-индуцированной иммуносупрессии способствовало увеличению лизосом в макрофагах, лимфобластах, клеток с картинами митоза, а также развитию гранулярной эндоплазматической сети на 7 и 30 сутки эксперимента, по сравнению с контролем.

Ключевые слова: пейеровы бляшки, циклофосфан, иммуносупрессия, имунофан, ультраструктура клеток.

Актуальность. В настоящее время, научно-технический прогресс приводит к усилению воздействия различных неблагоприятных факторов на организм человека. Одной из структур, которая осуществляет контакт с внешнесредовыми факторами является слизистая оболочка тонкой кишки [17]. Ее лимфоидная ткань обеспечивает иммунный ответ на поступающие с пищей антигены и соответственно создает защитный барьер, тормозящий поступление антигенов в организм человека [11, 16]. Однако, при длительном воздействии неблагоприятного фактора адаптационные возможности тонкой кишки и ее лимфоидного аппарата нарушаются, что создает предпосылки для развития аутоиммунных, иммунодефицитных и аллергических заболеваний [20].

Данная ситуация требует поиска путей, в том числе фармакологических, с целью коррекции возникающий изменений в лимфоидной ткани тонкой кишки и увеличения ее адаптационного потенциала. Средства, воздействующие на различные звенья иммунной системы – иммуномодуляторы, получили широкое применение в современной практической медицине [12].

Однако, их назначение должно осуществляться с учетом их особенностей и механизмов действий, клинико-иммунологического состояния человека и возможных побочных эффектов. В противном случае, это грозит развитием нежелательных реакций (аллергических, аутоиммунных) [5, 9].

Одним из препаратов-иммуномодуляторов является имунофан – гексапептид с иммунорегулирующим, антиоксидантным, гепатопротекторным и дезинтоксикационным свойствами [6, 7, 10, 22].

Принимая во внимание, что в литературе практически отсутствуют сведения о влиянии имунофана на ультрамикроскопическое строение лимфоидной ткани тонкой кишки, **целью работы** было изучить строение пейеровых бляшек на ультрамикроскопическом уровне после введения имунофана на фоне смоделированной в эксперименте иммуносупрессии, вызванной введением циклофосфана.

Материалы и методы. Для эксперимента были отобраны 36 белых половозрелых крыс-самцов с исходной массой тела 210-250 г. В 1-ю группу (18 животных) были

Morozova E. N., Morozov V. N., Zabolotnaya S. V., Mikhailik T. A.

Belgorod State National Research University, Belgorod

ULTRAMICROSCOPIC STRUCTURE OF PEYER'S PATCHES IN THE RATS' SMALL INTESTINE AFTER IMUNOFAN CORRECTION OF EXPERIMENTAL IMMUNOSUPPRESSION

Aim. To study the structure of Peyer's patches at the ultramicroscopic level after the administration of imunofan against the background of experimentally modeled immunosuppression caused by the administration of cyclophosphamide.

Materials and methods. The study was carried out on 36 white mature male rats, divided into 2 groups. The Group 1 included rats, which on the 1st day of the experiment were injected with cyclophosphamide at a dose of 200 mg/kg, and then imunofan according to the scheme on days 2, 4, 6, 8, 10 at a dose of 0.7 µg/kg of body weight. Group 2 was formed from rats, which were injected with an equivalent amount of isotonic sodium chloride solution. Animals of the Group 1 were Taken out from the experiment on the days 7 and 30 after the correction of cyclophosphamide-induced immunosuppression with imunofan. Pieces of Peyer's patches were isolated and processed according to a standard technique. Ultrathin sections were contrasted in a solution of uranyl acetate and lead citrate according to E. Reynolds and studied under an electron microscope with further photographing.

Results. It was found that lymphocytes, in most cases, are tightly adjacent to each other on the days 7 and 30 after the correction of cyclophosphamide-induced immunosuppression with imunofan; in the control group, the stroma is more often located between them. In the nucleus of these cells, heterochromatin is located in clumps and adjoins the nuclear membrane; in the control group, it fills two-thirds of the karyoplasm. The cells with patterns of mitosis, lymphoblasts are often found, macrophages contain large lysosomes on days 7 and 30 of experiment, compared with the control group of rats. In plasmocytes, the granular endoplasmic reticulum occupied up to 2/3 of the cell cytoplasm. The stromal component is well expressed in the control group of animals, compared with the experimental one, and is represented by reticulocytes, reticular fibers and vessels, and fibroblastic reticular cells are also found.

Conclusion. In an ultramicroscopic study, the administration of the immunomodulator imunofan against the background of cyclophosphamide-induced immunosuppression promoted an increase in lysosomes in macrophages, lymphoblasts, cells with mitotic patterns, as well as the development of a granular endoplasmic reticulum on days 7 and 30 of the experiment, compared with the control group.

Keywords: peyer's patches, cyclophosphamide, immunosuppression, imunofan, cell ultrastructure.

включены крысы, которым на 1 сутки эксперимента вводили циклофосфан в дозе 200 мг/кг, а затем имунофан по схеме на 2, 4, 6, 8, 10 сутки в дозе 0,7 мкг/кг массы тела. 2-я группа была сформирована из крыс, которым вводили эквивалентное количество изотонического раствора натрия хлорида. Содержание и манипуляции над животными проводились в соответствии с правилами содержания экспериментальных животных, установленной Директивой 2010/63 / EU Европейского парламента и Совета Европейского союза [15].

Электронная микроскопия. Животных I группы выводили из эксперимента на 7 и 30 сутки после коррекции имунофаном циклофосфан-индуцированной иммуносупрессии. Сразу после извлечения тонкой кишки выделяли кусочки пейеровых бляшек объемом 1 мм³. Обработку материала осуществляли по стандартной методике. Ультратонкие срезы контрастировали в растворе уранилацетата и цитрата свинца по E. Reynolds и изучали под электронным микроскопом с дальнейшим фотографированием [21].

Результаты и их обсуждение. На 7 и 30 сутки наблюдения после коррекции имунофаном циклофосфан-индуцированной иммуносупрессии при ультрамикроскопическом исследовании выявили, что лимфоциты, в большинстве случаев, плотно прилегают друг к другу, а в контрольной группе чаще между ними располагается строма. В ядре данных клеток гетерохроматин расположен глыбками и прилежит к мембране ядра,

в контрольной группе он заполняет две трети кариоплазмы (рисунок 1).

На 7 и 30 сутки часто встречаются клетки с картинами митоза, лимфобласты, макрофаги содержат крупные лизосомы по сравнению с контрольной группой крыс. В плазмocyтах гранулярная эндоплазматическая сеть занимала до 2/3 цитоплазмы клеток. Стромальный компонент хорошо выражен в контрольной группе животных, по сравнению с экспериментальной, и представлен ретикулоцитами, ретикулярными волокнами и сосудами, а также встречаются фибробластические ретикулярные клетки. Следует отметить, что на 7 сутки наблюдения в пейеровых бляшках тонкой кишки выявляются клетки с явлениями как апоптоза, так и некроза, к 30 суткам только с явлениями апоптоза (рисунок 2).

Ультрамикроскопическое исследование показало, что в состав пейеровой бляшки тонкой кишки контрольных половозрелых крыс входят: М-клетки, лимфоциты, макрофаги, клетки с картинами митоза и апоптоза, сосуды, ретикулярные клетки и волокна, что соответствует данным полученным В. Г. Гринь и др. (2020), E. Balcan and S. Karaçali (2017) [2, 14].

F. A. Manente et al. (2018) в своих исследованиях описывают выраженный цитостатический эффект высокой дозы циклофосфана на лимфоциты селезенки и лимфатических узлов, что приводит к усилению антигенной нагрузки на организм [19]. По данным Н. А. Al-Salih et al. (2020), у крыс породы Wistar это способствует появ-

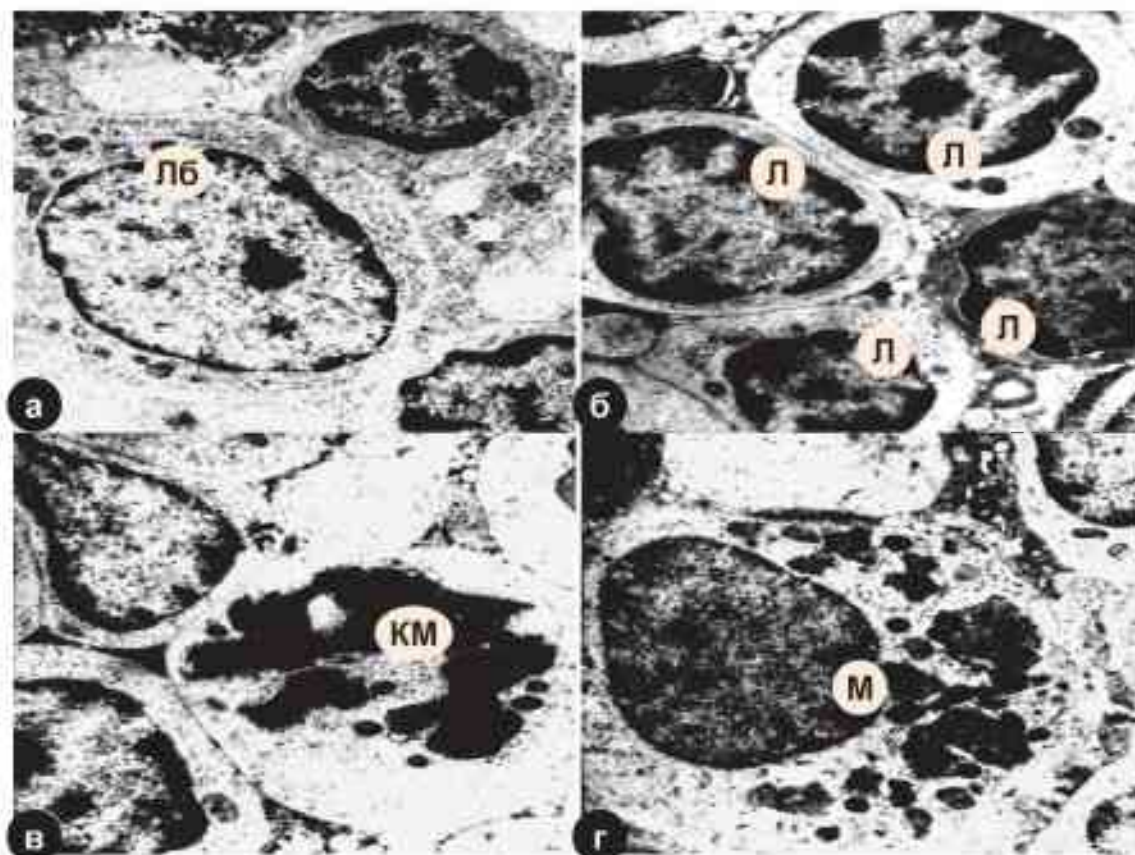


Рисунок 1 – Участок лимфатического узелка в пейеровой бляшке тонкой кишки половозрелых крыс на 30 сутки после коррекции иммунофаном циклофосфан-индуцированной иммуносупрессии: а – лимфобласт (Лб), б – лимфоциты (Л), в – клетка с картиной митоза (КМ), г – макрофаг (М). Увеличение $\times 12000$

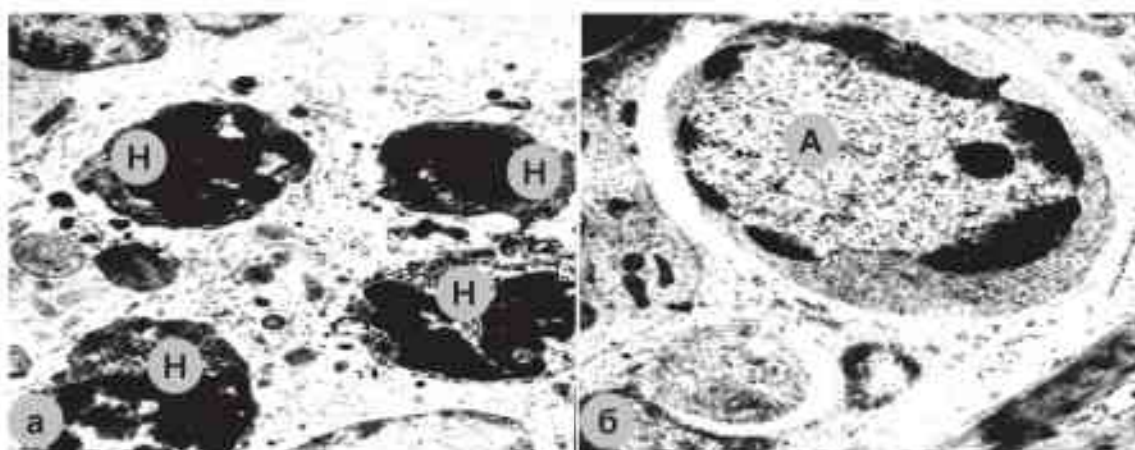


Рисунок 2 – Участок лимфатического узелка в пейеровой бляшке тонкой кишки половозрелых крыс на 7 сутки после коррекции иммунофаном циклофосфан-индуцированной иммуносупрессии: а – клетки с признаками некроза (Н), б – клетка с признаками апоптоза (А). Увеличение $\times 12000$

лению в паренхиме лимфатических узлов и скоплений лимфоидной ткани тонкой кишки явлений некроза [13], а следовательно, может служить причиной выявления этого процесса в пейеровых бляшках у белых крыс. К 30 суткам в лимфоцитах данных лимфоидных скоплений тонкой кишки определяются только процессы апоптоза и фигуры митоза, органеллы синтеза занимают до половины цитоплазмы плазмочитов, что свидетельствует об иммуномодулирующем эффекте иммунофана после

действия циклофосфана. М. В. Золотаревская (2011) выявила сходную реакцию иммунокомпетентных клеток на аналогичные воздействия в селезенке [3]. Введение иммунофана, согласно результатам исследования И. В. Бобрышевой (2013), начиная с 7 суток, способствует стимуляции процессов обновления клеточной популяции: наблюдается активизация процессов митоза, развитие органелл синтеза в плазмочитах, увеличение количества лимфоцитов, а также лизосом

в макрофагах [1]. По данным О. Р. Мухамедеева и соавт. (2014), введение иммунофана усиливает синтез лимфоцитами интерлейкина-2, что приводит к активации в данных клетках синтетических процессов в ядре (гетерохроматин занимает только периферическую часть нуклеоплазмы) и в цитоплазме (высокое содержание рибосом) [8]. Это способствует восстановлению активности лимфоцитов и, как следствие, стимулирует синтез иммуноглобулинов плазмочитами. В свою очередь, Е. Н. Кологривова и соавт. (2020) показывают, что введение препарата ускоряет фагоцитоз антигенного материала и тем самым объясняет увеличение количества лизосом в макрофагах [4].

Выводы:

1. При ультрамикроскопическом исследовании на фоне введения иммуномодулятора иммунофана после циклофосфан-индуцированной иммуносупрессии в паренхиме пейеровых бляшек наблюдалось снижение гетерохроматина в ядрах лимфоцитов, увеличение лимфобластов, лизосом в цитоплазме макрофагов, клеток с картинами митоза, а также развитие в цитоплазме плазмочитов гранулярной эндоплазматической сети в поле зрения на 7 и 30 сутки эксперимента, по сравнению с контролем.
2. На электронограммах на 7 и 30 сутки эксперимента стромальный компонент в пейеровых бляшках тонкой кишки половозрелых животных выражен меньше, чем в контроле.

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

ЛИТЕРАТУРА

1. Бобрышева И. В. Ультрамикроскопическое исследование селезенки крыс разных периодов постнатального онтогенеза после введения иммунофана // Журнал гродненского государственного медицинского университета. 2013. № 4 (44). С. 56-60.
2. Гринь В. Г. Імуногістохімічний аналіз пейерових бляшок тонкої кишки білих щурів у нормі // Вісник проблем біології і медицини. 2020. 1 (155). С. 292-296.
3. Золотаревская М. В. Особенности ультраструктуры селезенки после введения иммунотропных препаратов в эксперименте // Клінічна анатомія та оперативна хірургія. 2011. № 10(4). С. 23-28.
4. Кологривова Е. Н., Плешко Р. И., Щербик Н. В., Староха А. В. «и др.» Влияние интраназального применения иммунофана на активность фагоцитов при комплексной терапии экссудативного среднего отита у детей // Медицинская Иммунология. 2020. № 22 (4). С. 741-750.
5. Лусс Л. В. Вторичные иммунодефицитные состояния у детей. Взгляд клинициста к назначению иммуномодулирующей терапии // Аллергология и иммунология в педиатрии. 2018. № 4 (55). С. 4-18.
6. Малиев Б. М., Басиева О. З., Хетагурова С. Б., Туаллагова Э. Т. Сравнительное изучение эффективности препаратов иммунофан и тубосан у больных впервые выявленным туберкулезом легких // Туберкулез и болезни легких. 2019. № 97 (6). С. 63-64.
7. Матвеев Д. В., Михайлянц Г. С., Тутельян А. В., Абдувосидов Х. А. «и др.» Применение иммуномодулятора иммунофан при лечении венозных трофических язв у пожилых больных // Московский хирургический журнал. 2018. № 3. С. 119.
8. Мухамедеева О. Р., Хисматуллина З. Р., Медведев Ю. А. Эффективность применения иммуномодулятора «иммунофан» при комплексном лечении больных зооантропонозной трихофитией // Вестник современной клинической медицины. 2014. № 7 (1). С. 31-34.
9. Новикова И. А. Современные аспекты клинического применения иммуномодуляторов // Вопросы аттестации и повышения квалификации. 2015. № 5. С. 23-26.
10. Пухаева Е. Г., Скупневский С. В., Пуруа Ф. К., Фарниева Ж. Г. «и др.» Антимутагенный эффект иммунофана при сочетании воздействия ионов CD (II), PB (II) и антибиотика цефтриаксона // Экология человека. 2019. № 7. С. 49-58.
11. Салин М. Р. Иммунные структуры пищеварительных органов (Функциональная анатомия). М.: Медицина, 1987. 224 с.
12. Хаитов Р. М. Иммуномодуляторы: мифы и реальность // Иммунология. 2020. № 41 (2). С. 101-106.
13. Al-Salih H. A., Al-Sharafi N. M., Al-Qabi S. S., Al-Darwesh A. A. et al. The Pathological Features of Cyclophosphamide Induced Multi-Organ Toxicity in Male Wister Rats // Sys Rev Pharm. 2020. V. 11 (6). P. 45-49.
14. Balcan E., Karaçali S. Ultrastructural Dynamics of Transendothelial Migration of Lymphocytes Through High Endothelial Venules (HEVs) of the Mucosa Associated Peyer's Patches // Periodicum Biologorum. 2017. V. 119 (1). P. 1-7.
15. Directive 2010/63/EU of the European Parliament and of the Council of the European Union on the protection of animals used for scientific purposes, complying with the requirements of the European Economic Area. St. Petersburg, 2012.
16. Haley P. J. The lymphoid system: a review of species differences // J Toxicol Pathol. 2017. V. 30 (2). P. 111-123.
17. Hryn V. H., Kostylenko Y. P., Bilash V. P., Ryabushko O. B. Microscopic structure of albino rats' small intestine // Wiadomości Lekarskie. 2019. V. LXXII (5). P. 733-738.
18. Kim W. H., Lillehoj H. S. Immunity, immunomodulation, and antibiotic alternatives to maximize the genetic potential of poultry for growth and disease response // Animal Feed Science and Technology. 2019. V. 250. P. 41-50.
19. Manente F. A., Quinello C., Ferreira L. S., Andrade C. R. et al. Experimental sporotrichosis in a cyclophosphamide-induced immunosuppressed mice model // Medical Mycology. 2018. V. 56 (6). P. 711-722.
20. Reboldi A., Cyster J. G. Peyer's patches: Organizing B cell responses at the intestinal frontier // Immunol Rev. 2016. V. 271 (1). P. 230-245.
21. Reynolds E. S. The use of lead citrate at high pH as an electron-opaque stain in electron microscopy // Journal of cell biology. 1963. V. 17. P. 208-212.
22. Sawicka J., Dzierżyńska M., Wardowska A. Immunofan-RDKVYR Peptide-Stimulates Skin Cell Proliferation and Promotes Tissue Repair // Molecules. 2020. V. 25 (12). P. 2884.

Контактная информация и сведения об авторах

E-mail: morozova_en@bsu.edu.ru.

Морозова Елена Николаевна, к. м. н., доцент кафедры анатомии и гистологии человека ФГАОУ ВО «Белгородский государственный национальный исследовательский университет», г. Белгород.

Морозов Виталий Николаевич, к. м. н., доцент, доцент кафедры анатомии и гистологии человека ФГАОУ ВО «Белгородский государственный национальный исследовательский университет», г. Белгород.

Заболотная Светлана Владимировна, к. м. н., доцент, доцент кафедры анатомии и гистологии человека ФГАОУ ВО «Белгородский государственный национальный исследовательский университет», г. Белгород.

Михайлик Тамара Александровна, к. м. н., доцент, доцент кафедры анатомии и гистологии человека ФГАОУ ВО «Белгородский государственный национальный исследовательский университет», г. Белгород.