

**МОРФОМЕТРИЧЕСКИЕ ПАРАМЕТРЫ ПОДМЫШЕЧНЫХ
ЛИМФАТИЧЕСКИХ УЗЛОВ ПРИ КОРРЕКЦИИ ИМУНОФАНом
ИММУНОСУПРЕССИИ, ВЫЗВАННОЙ ВВЕДЕНИЕМ
ЦИКЛОФОСФАНА**

О.Н. Петизина¹, Е.Н. Морозова², В.Н. Морозов²

**MORPHOMETRIC PARAMETERS OF THE AXILLARY LYMPH NODES IN
THE CORRECTION OF IMMUNOSUPPRESSION CAUSED BY THE
INTRODUCTION OF CYCLOPHOSPHAMIDE WITH IMUNOFAN**

Petizina O.N., Morozova E.N., Morozov V.N.

¹Кафедра госпитальной терапии и профпатологии ГУ «Луганский государственный медицинский университет», г. Луганск; ²Кафедра анатомии и гистологии человека, ФГАОУ ВО «Белгородский государственный национальный исследовательский университет», г. Белгород.

В настоящее время актуальным остается изучение влияния иммуномодуляторов на морфофункциональное состояние периферических органов иммунной системы.

Цель исследования: установить, оказывает ли влияние введение имунофана на морфометрические параметры подмышечных лимфатических узлов у неполовозрелых крыс на фоне индуцированной циклофосфаном иммуносупрессии.

Материал и методы. Неполовозрелые крысы-самцы были распределены на две группы: 1-й группе моделировали иммуносупрессивное состояние путем введения препарата «Циклофосфан-КМП» однократно, внутримышечно, в дозе 200 мг/кг, а 2-й – на фоне созданных условий первой группы вводили иммуномодулятор имунофан один раз в сутки по 0,7 мкг/кг, пятикратно. Сроки эксперимента – 7-е, 30-е и 90-е сутки. Гистологическую обработку органа производили в соответствии со стандартным протоколом; срезы окрашивали гематоксилин-эозином. Морфометрическое исследование параметров лимфатических узлов на гистологических срезах проводили с использованием программы «Morpholog». Статистическую обработку полученных морфометрических показателей производили в программе «Statistica 5.5». Достоверность отличий средних величин определяли при помощи критерия Стьюдента-Фишера при $p < 0,05$.

Результаты исследования. На 7 и 30 сутки эксперимента ширина коркового вещества лимфатических узлов 2-й группы крыс превышала показатели группы без введения корректора на 64,07% и 62,44%; больший и меньший диаметры лимфатических узелков – на 76,04%, 64,18% и на 73,52%, 88,67% соответственно; а больший и меньший диаметры герминативных центров лимфатических узелков – в 3,52, 2,92 и 4,17, 2,93 раза соответственно. Количество ядер клеток на единице площади препарата на 7 и 30 сутки эксперимента было больше, чем в группе без введения корректора: в герминативном центре (на 31,15%, 29,31%), в короне (на 20,55%, 28,17%), в межузелковом плато (на 33,33%, 28,57%), в паракортикальной зоне (на 31,25%, 30,19%), а в мозговых тяжах – на 35,00% и 7,14%. К 90 суткам эксперимента значения изучаемых морфометрических параметров лимфатических узлов приближались к таковым группы сравнения.

Вывод. Полученные морфометрические данные подмышечных лимфатических узлов неполовозрелых крыс свидетельствуют о способности имунофан вызывать восстановление процессов пролиферации иммунокомпетентных клеток и их дифференцировку, которая изменялась под влиянием предварительно введенного циклофосфана. Наиболее выраженное восстановление наблюдалось в ранние сроки эксперимента, а концу наступала адаптация органа к условиям эксперимента.

Ключевые слова: лимфатический узел, морфометрия, циклофосфан, имунофан

Currently, the influence of immunomodulators on the morphological and functional state of the peripheral organs of the immune system remains relevant.

The purpose of the study was to determine whether the administration of imunofan has an effect on the morphometric parameters of axillary lymph nodes in immature rats against the background of cyclophosphamide-induced immunosuppression.

Material and methods. Immature male rats were divided into two groups. The Group 1 stimulated the immunosuppressive state by administering the Cyclophosphamide once, intramuscularly, at a dose of 200 mg/kg. The Group 2 against the background of the created conditions of the Group 1, the immunomodulator imunofan was administered once a day, 0.7 mcg/kg, five times. The terms of the experiment were 7, 30 and 90 days. The histological processing of the organ was performed in accordance with the standard protocol; sections were stained with hematoxylin-eosin. Morphometric study of the parameters of lymph nodes on histological sections was performed using the «Morpholog» program. Statistical processing of the obtained morphometric parameters was carried out in the program «Statistica 5.5». The significance of differences in the mean values was determined using the Student-Fisher test at $p < 0.05$.

Research results. The width of the cortex of the lymph nodes in the rats of Group 2 was more than the same parameter of the group without the introduction of the corrector by 64.07% and 62.44%; larger and smaller diameters of lymphatic nodules - by 76.04%, 64.18% and by 73.52%, 88.67%; the larger and smaller diameters of the germinal centers - by 3.52, 2.92 and 4.17, 2.93 times respectively on the 7th and 30th day of the experiment. The number of cell nuclei per unit area of the slide was more than in the Group 1: in the germinal center (by 31.15%, 29.31%), in the corona (by 20.55%, 28.17%), in the internodular zone (by 33.33%, 28.57%), in the paracortex (by 31.25%, 30.19%), and in the medullary cords - by 35.00% and 7.14% on 7th and 30th days of experiment. By the 90th day of the experiment, the values of the studied morphometric parameters of the lymph nodes approached those of the comparison group.

Conclusion. The obtained morphometric data of the axillary lymph nodes of immature rats indicate the ability of imunofan to restore the processes of proliferation of immunocompetent cells and their differentiation, which changed under the influence of previously administered cyclophosphamide. The most pronounced recovery was observed in the early stages of the experiment, and at the end, the organ adapted to the conditions of the experiment.

Key words: lymph node, morphometry, cyclophosphamide, imunofan

Общеизвестно, что гомеостаз организма, его адаптационные возможности во многом зависят от морфофункционального состояния иммунной системы [1,

2]. Лимфатические узлы как вторичные органы этой системы расположены на пути тока лимфы, очищая ее от бактерий, вирусов, погибших и измененных клеток.

Также в лимфатических узлах в лимфу выделяются антитела и иммунокомпетентные клетки. В связи с этим нарушение структуры лимфатических узлов будет неизменно приводить к нарушению механизмов клеточного и гуморального иммунитета и снижению резистентности к чужеродным агентам [3, 4].

В настоящее время актуальным является расширение и дополнение имеющейся информации о лекарственных препаратах, оказывающих модулирующее влияние на функциональное состояние иммунной системы.

Среди препаратов иммуномодулирующего действия, внедренных в клиническую практику для лечения иммунодефицитных состояний различной этиологии, определенным интересом представляет имунофан. Он оказывает иммуномодулирующее, дезинтоксикационное и гепатопротекторное действие, тормозит перекисное окисление липидов [5, 6].

Цель исследования. В эксперименте установить, оказывает ли влияние введение имунофана на морфометрические параметры подмышечных лимфатических узлов неполовозрелых крыс на фоне вызванной циклофосфаном иммуносупрессии.

Материал и методы. В эксперименте использовались неполовозрелые крысы-самцы с начальной массой 60 – 90 г, разделенные на две группы (по 6 особей в каждой). Животным первой группы моделировали иммуносупрессивное состояние путем введения препарата «Циклофосфан-КМП» (производство ВАТ «Киевмедпрепарат», серия UA/6489/01/01.) однократно, внутримышечно, в дозе 200 мг/кг.

Крысам второй группы на фоне созданных условий первой группы вводили иммуномодулятор имунофан (производство ТОВ НВП «Бионокс», г.Москва, регистрационное свидетельство UA/0318/01/01) один раз в сутки по 0,7 мг/кг, пятикратно (на 1-е, 3-и, 5-е, 7-е, 9-е сутки).

Использовали рекомендации Ю.Р. Рыболовлева и Р.С. Рыболовлева с целью расчета доз вводимых препаратов [7]:

где r – коэффициент видовой выносливости для крыс (3,62), R – коэффициент видовой выносливости для человека (0,57).

Животных выводили из эксперимента на 7, 30, 90 сутки наблюдения методом декапитации после ингаляционного воздействия хлороформа. В подмышечной

$$\text{Доза для крысы} = \frac{r \times \text{доза человека}}{R}$$

области выделяли лимфатические узлы, извлекали и помещали для фиксации в 10%-й раствор нейтрального формалина. Дальнейшую гистологическую обработку органа производили в соответствии со стандартным протоколом [8]. Срезы толщиной 5 – 6 мкм окрашивали гематоксилин-эозином. Для фотографирования гистологических срезов применяли комплекс, состоящий из микроскопа Olympus CX-41, цифрового фотоаппарата Olympus SP 500UZ, персонального компьютера, оснащенный видеотюннером. Для измерения морфометрических параметров лимфатических узлов использовалась программа «Morpholog»; измеряли ширину коркового вещества, большие и малые диаметры лимфатических узелков и их герминативных центров, подсчитывали количество ядер на единице площади (1000 мкм²): в корковом веществе (корона, герминативный центр, межзелковое плато) и мозговых тяжах, а также паракортикальной зоне не менее чем в шести полях зрения каждого среза.

Статистическую обработку морфометрических показателей лимфатических узлов крыс производили в программе «Statistica 5.5» (лицензия №AX908A 290603). Подчинение данных нормальному закону распределения проверяли при помощи критерия согласия по Шапиро-Уилка. Достоверность отличий средних величин определяли при помощи крите-

рия Стьюдента-Фишера при $p < 0,05$ [9].

Результаты исследования. На 7-е сутки после последнего введения имунофана ширина коркового вещества лимфатических узлов подопытных крыс превышала показатели группы сравнения (без введения корректора) на 64,07%. При этом наблюдалось максимальное увеличение показателей больших и меньших диаметров герминативных центров в 3,52 и 2,92 раза соответственно. Большие и меньшие диаметры лимфатических узелков коркового вещества превышали значения животных, получавших только циклофосфан, на 76,04% и 64,18%. На 30-е сутки наблюдалась сходная тенденция: ширина коркового вещества превышала аналогичные данные крыс группы сравнения на 62,44%, больший и меньший диаметры лимфатических узелков на 73,52% и 88,67%, а больший и меньший диаметры герминативных центров – в 4,17 и 2,93 раза соответственно. К 90-м суткам параметры ширины коркового вещества приближались к контрольным показателям, превышая их на 6,83%, больший и меньший диаметры лимфатических узелков и их гер-

минативных центров на 0,87%, 1,65%, 6,05%, 8,53% (табл. 1).

Максимальное превышение данных количества клеточных ядер на единице площади в лимфатических узлах крыс группы сравнения наблюдалось на 7-е сутки в герминативном центре (31,15%), короне (20,55%), межузелковом плато (33,33%), паракортикальной зоне (31,25%), мозговых тяжах (35,00%).

У животных, которых выводили из эксперимента спустя 30 суток после введения препарата, все показатели оставались на высоком уровне, но различие между данными подопытных крыс и крыс группы сравнения уменьшалось. В герминативном центре и мозговых тяжах на 30-е сутки наблюдения количество клеточных ядер на единице площади препарата превышало значения контрольных крыс на 29,31% и 33,33%, в короне – на 28,17%, в межузелковом плато – на 28,57%, а в паракортикальной зоне – на 30,19%. На 90-е сутки все показатели приближались к данным группы без введения имунофана, при этом превышали их

Таблица 1

Морфометрические показатели коркового вещества лимфатических узлов неполовозрелых крыс на 7-е, 30-е, 90-е сутки после коррекции иммунодефицитного состояния с помощью имунофана ($M \pm m$, $n=36$)

Параметры	Сроки наблюдения					
	7-е сутки	Ц	30-е сутки	Ц	90-е сутки	Ц
Ширина коркового вещества (мкм)	694,00* ±11,68	423,00 ±6,87	653,00* ±9,40	402,00 ±8,45	641,00* ±5,44	600,00 ±11,09
Большой диаметр лимфатического узелка (мкм)	551,00* ±27,50	313,00 ±3,46	439,00* ±17,50	253,00 ±8,58	466,00 ±24,00	462,00 ±20,90
Меньший диаметр лимфатического узелка (мкм)	463,00* ±23,10	282,00 ±4,69	383,00* ±9,58	203,00 ±9,70	369,00 ±20,90	363,00 ±12,60
Большой диаметр герминативного центра (мкм)	451,00* ±19,80	128,00 ±5,78	384,00* ±8,31	92,00 ±3,59	263,00 ±11,70	248,00 ±9,47
Меньший диаметр герминативного центра (мкм)	339,00* ±16,20	116,00 ±5,13	238,00* ±10,80	81,00 ±1,94	229,00 ±2,86	211,00 ±8,12

Примечания: знаком * – отмечены достоверные различия ($p < 0,05$) в сравнении с группой без использования корректора; Ц – циклофосфан

Таблица 2

Количество клеточных ядер на 1000 мкм² в разных зонах лимфатических узлов неполовозрелых крыс на 7-е, 30-е, 90-е сутки после коррекции иммунодефицитного состояния с помощью иммунофана (M±m, n=36)

Параметры	Сроки наблюдения					
	7-е сутки	Ц	30-е сутки	Ц	90-е сутки	Ц
Герминативный центр	0,80 ±0,03	0,61 ±0,1	0,75* ±0,02	0,58 ±0,02	0,61 ±0,01	0,59 ±0,01
Корона	0,88* ±0,01	0,73 ±0,03	0,91* ±0,02	0,71 ±0,02	0,80 ±0,01	0,77 ±0,02
Межузелковое плато	0,60* ±0,02	0,45 ±0,01	0,63* ±0,01	0,49 ±0,01	0,65 ±0,02	0,61 ±0,03
Паракортикальная зона	0,63* ±0,02	0,48 ±0,02	0,69* ±0,02	0,53 ±0,02	0,67 ±0,01	0,65 ±0,02
Мозговые тяжи	0,54* ±0,02	0,40 ±0,01	0,52* ±0,01	0,39 ±0,01	0,45 0,02±	0,42 ±0,01

Примечания: знаком * – отмечены достоверные различия ($p < 0,05$) в сравнении с группой без использования корректора; Ц – циклофосфан

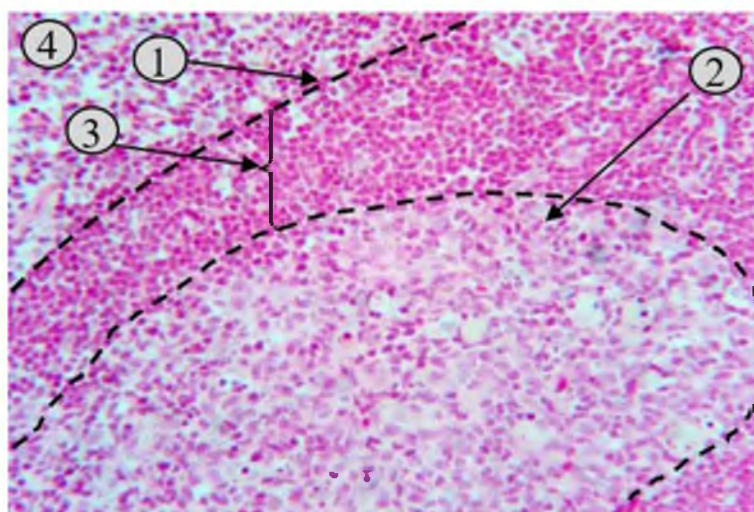


Рис. 1. Фрагмент коркового вещества подмышечного лимфатического узла неполовозрелой крысы на 30-е сутки после коррекции иммунодефицитного состояния с помощью иммунофана. 1 – лимфатический узелок, 2 – герминативный центр, 3 – корона, 4 – межузелковая зона. Окраска гематоксилин-эозин. Приближение Zoom 132/Сб. - Plan CN 40x0.25~/-/FN22.

в герминативном центре (на 3,39%), короне (на 3,90%), межузелковом плато (на 6,56%), паракортикальной зоне (на 3,08%), мозговых тяжах (на 7,14%) (табл. 2).

Таким образом, введение белым неполовозрелым крысам иммунофана на фоне индуцированной циклофосфаном иммуносупрессии сопровождается восстановлением изучаемых морфометрических

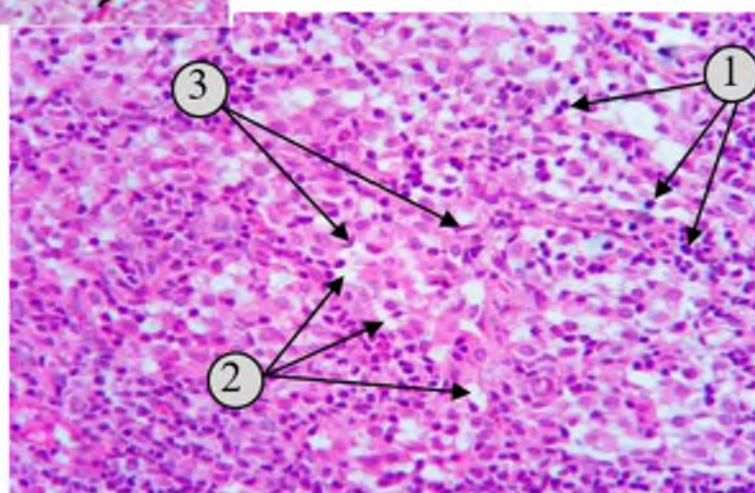


Рис. 2. Фрагмент мозгового вещества подмышечного лимфатического узла неполовозрелой крысы на 30-е сутки после коррекции иммунодефицитного состояния с помощью иммунофана. 1 – лимфоциты, 2 – мозговые синусы, 3 – литоральные клетки. Окраска гематоксилин-эозин. Приближение Zoom 132/Об. - Plan CN 40x0.25~/-/FN22.

параметров подмышечных лимфатических узлов и их приближением к аналогичным показателям группы сравнения к 90-м суткам эксперимента.

Полученные результаты соотносятся с данными, полученными другими исследователями. Так, согласно результатам М.Н. Михайловой (2004), введение циклофосфана в комбинации с имунофаном приводит к менее выраженным и более кратковременным изменениям структуры тимуса по сравнению с изолированным введением циклофосфана, что свидетельствует о способности имунофана снижать степень инволюции тимуса и ускорять восстановление его морфоструктуры [10]. С.А. Кащенко и соавт. (2011) в своих исследованиях на селезенке показали, что использование имунофана на фоне иммуносупрессии восстанавливает линейные размеры белой пульпы до контрольных параметров к концу эксперимента [11].

Выводы:

1. Полученные морфометрические данные подмышечных лимфатических узлов неполовозрелых белых крыс свидетельствуют о способности имунофана вызывать восстановление процессов пролиферации иммунокомпетентных клеток и их дифференцировку, которая изменялась под влиянием предварительно введенного циклофосфана.

2. Наиболее выраженное иммуномодулирующее действие имунофана на морфометрические параметры лимфатических узлов регистрировалось в ранние сроки эксперимента, а к 90 суткам происходила адаптация органа к экзогенному введению имунофана после коррекции иммунодефицитного состояния.

Список литературы

1. Sattler S. *The Role of the Immune System Beyond the Fight Against Infection* // *Adv. Exp. Med. Biol.* -2017. -Vol. 1003. -P. 3-14.
2. Романюха А.А. *Иммунная система: норма и адаптация* // *Иммунология.* - 2009. -Том 30, -№ 1.- С. 7-12.

3. Cakala-Jakimowicz M., Kolodziej-Wojnar P., Puzianowska-Kuznicka M. *Aging-Related Cellular, Structural and Functional Changes in the Lymph Nodes: A Significant Component of Immunosenescence? // An Overview. Cells.* -2021. -Vol.10(11). -P. 3148.

4. Zeppa P., Cozzolino I. *Lymph Nodal Structure and Cytological Patterns* // *Monogr. Clin. Cytol.* -2018. -Vol.23. -P.14-18.

5. Стручко Г.Ю., Меркулова Л.М., Михайлова М.Н., Захид М. *T-зависимые иммунорегуляторные эффекты полиоксидония и имунофана (обзор литературы)* // *Вестник Чувашского университета.* -2010. -№3. -С.140-145.

6. Zabrodski P.F., Lim V.G., Strel'tsova E.V. *Disturbances of immune status and cytokine profile caused by chronic intoxication with organophosphorus compounds and their correction by administration of imunofan* // *Eksp. Klin. Farmakol.* -2012. -Vol.75(2). -P.35-37.

7. Рыболовлев Ю.Р., Рыболовлев Р.С. *Дозирование веществ для млекопитающих по константе биологической активности* // *Доклады АН СССР.* -1979. -Том 247, -№6. -С.1513-1516.

8. Саркисов Д.С., Перов Ю.Л. *Микроскопическая техника. Руководство для врачей и лаборантов* / Под редакцией Д.С. Саркисова и Ю.Л. Перова. -М.: «Медицина», 1996.

9. Боровиков В. *STATISTICA. Искусство анализа данных на компьютере: Для профессионалов 2-е изд. (+CD)* / -Санкт-Петербург: «Питер Принт», 2003. -688 с.

10. Михайлова М.Н. *Морфофункциональные изменения тимуса и показатели крови после введения циклофосфана, имунофана и их комбинации: Автореф. дисс. ... канд. мед. наук.* -Москва, 2004. -28 с.

11. Кащенко С.А., Золотаревская М.В. *Изменения морфометрических показателей белой пульпы селезенки крыс под воздействием иммуностимулирующих препаратов* / *Український медичний альманах.* -2011. -Том 14, -№5. -С.74-77.