

UDC 612.017.1:616-092.9

## PECULIARITIES OF THE PEYER'S PATCHES STRUCTURE IN THE SMALL INTESTINE OF RATS AFTER THE CORRECTION OF CYCLOPHOSPHAMIDE-INDUCED IMMUNOSUPPRESSION WITH THE IMUNOFAN

S. Kashchenko, Doctor of Medical sciences, Full Professor  
E. Morozova, Postgraduate student  
V. Morozov, Postgraduate student  
Lugansk State Medical University, Ukraine

Peculiarities of the Peyer's patches in the small intestine of rats after correction of the cyclophosphamide-induced immunosuppression with Imunofan were studied. It was discovered that leveling of cytostatic drug takes place by 30 days. This testifies to the effectiveness of use of Imunofan as the corrector.

**Keywords:** Peyer's patches, small intestine, rats, Imunofan, cyclophosphamide.

Conference participants, National championship in scientific analytics, Open European and Asian research analytics championship

УДК 612.017.1:616-092.9

## ОСОБЕННОСТИ СТРОЕНИЯ ПЕЙЕРОВЫХ БЛЯШЕК ТОНКОЙ КИШКИ КРЫС ПОСЛЕ КОРРЕКЦИИ ЦИКЛОФОСФАН-ИНДУЦИРОВАННОЙ ИММУНОСУПРЕССИИ С ПОМОЩЬЮ ИМУНОФАНА

Кашенко С.А., д-р мед. наук, проф.  
Морозова Е.Н., аспирант  
Морозов В.Н., аспирант

Луганский государственный медицинский университет, Украина

Изучены особенности строения пейеровых бляшек тонкой кишки крыс после коррекции имунофаном циклофосфан-индукционной иммуносупрессии. Выявлено, что к 30 суткам происходит нивелирование действия цитостатического препарата, а это может свидетельствовать об эффективности использования имунофана в качестве корректора.

**Ключевые слова:** пейкеровы бляшки, тонкая кишка, крысы, имунофан, циклофосфан.

Участники конференции, Национального первенства по научной аналитике, Открытого Европейско-Азиатского первенства по научной аналитике

**Y**читывая, что органы иммунной системы достигают максимальной массы в молодом возрасте и относительно рано подвергаются возрастной инволюции, патологические процессы в них возникают преимущественно у лиц детского и трудоспособного возраста, что приводит к социальным и экономическим проблемам во всех странах мира [2, 3]. Поэтому фармацевтическая промышленность, активно разрабатывает лекарственные формы для коррекции заболеваний иммунной системы [1]. На современном этапе существуют три группы препаратов, которые используются в клинической практике: иммуносупрессоры, иммуностимуляторы и иммуномодуляторы [1, 4]. С целью безопасности для здоровья человека, применение препаратов каждой группы имеет строгие показания, а эффективность их использования должна подтверждаться изучением состояния органов-мишеней на макроскопическом, микроскопическом и ультрамикроскопическом уровнях. Среди препаратов иммунодепрессивного действия широкое распространение получил циклофосфан, который входит во многие схемы противоопухолевой терапии, используется для профилактики отторжения трансплантантов, а также для лечения аутоиммунных заболеваний [6]. Ингибирование функциональной

активности клеток иммунной системы является одной из главных причин токсического действия циклофосфана, поэтому проблема снижения его побочных действий является весьма актуальной [5].

Одним из путей повышения эффективности лечения онкологических и других заболеваний с помощью химиотерапевтических препаратов является их комбинирование с иммуномодуляторами. Тимическим препаратом последнего поколения, который широко используется с целью коррекции иммунодефицитных состояний в клинической практике, является имунофан [4]. Поэтому целью исследования явилось изучение особенности строения пейкеровых бляшек тонкой кишки крыс после коррекции циклофосфан-индукционной иммуносупрессии с помощью имунофана.

Работа является частью научно-исследовательской работы кафедры гистологии, цитологии и эмбриологии ГЗ «Луганский государственный медицинский университет»: «Особливості будови органів імунної та ендокринної систем при іммуностимуляції та іммуносупресії» (державний реєстраційний номер 0112U000096).

**Материалы и методы.** Исследование проводили на 60 белых беспородных половозрелых крысах-самцах массой 210-250 г. Животные были разделены на две группы по 36 и 24

в каждой. В I группу входили крысы, материал которых использовали для микроскопического исследования, во II – для ультрамикроскопического исследования. Всем животным вводили циклофосфан однократно внутримышечно в дозе 200 мг/кг, а затем имунофан по схеме на 2, 4, 6, 8, 10 сутки эксперимента в дозе 0,7 мкг/кг массы тела, контролем служили интактные крысы. Животных I группы выводили из эксперимента на 7, 30, 90 сутки после завершения введения препаратов под эфирным наркозом. Выделяли тонкую кишку. Фиксировали ее в 10% растворе формалина, затем подвергали стандартной гистологической проводке. Срезы толщиной 5-6 мкм окрашивали гематоксилин-эозином. При помощи автоматизированного морфометрического комплекса (световой микроскоп Olympus CX41, цифровая фотокамера и персональный компьютер с набором прикладных программ), подсчитывали количество ядер на единицу площади препарата ( $1000 \text{ мкм}^2$ ) в куполе, герминативном центре и периферической зоне лимфатических узелков, а также в межузелковой зоне пейкеровых бляшек. Животных II группы выводили из эксперимента на 7 и 30 сутки после окончания введения имунофана. Сразу после извлечения тонкой кишки выделяли кусочки пейкеровых бляшек объемом 1  $\text{мм}^3$ . Обработку материала осуществляли

по стандартной методике. Ультратонкие срезы контрастировали в растворе уранилацетата и цитратом свинца по E. Reynolds и изучали под электронным микроскопом с дальнейшим фотографированием [7]. Обработку цифровых данных проводили с помощью программы «Statistica» (определяли t-критерий Стьюдента, достоверными считали отличия с уровнем значимости при  $p < 0,05$ ).

**Результаты и их обсуждение.** У половозрелых крыс длина тонкой кишки достоверно не изменялась на 7, 30 и 90 сутки по сравнению с контрольными показателями (рис. 1). Пейеровы бляшки располагались в стенке органа на его свободном крае.

На гистологических препаратах бляшки представляли собой скопления лимфатических узелков и расположенных между ними межузелковых зон.

На 7, 30 сутки у половозрелых крыс количество ядер клеток на единицу площади препарата превышали контрольные значения (табл. 1) в области купола (12,77%, 20,59%), периферической зоны (8,86%, 5,48%), герминативного центра (10,77%, 7,35%) и межузелковой зоны (14,81%, 32,00%) (рис. 2, 3). На 90 сутки наблюдения данные разных зон пейеровых бляшек тонкой кишки приближались к контрольным параметрам.

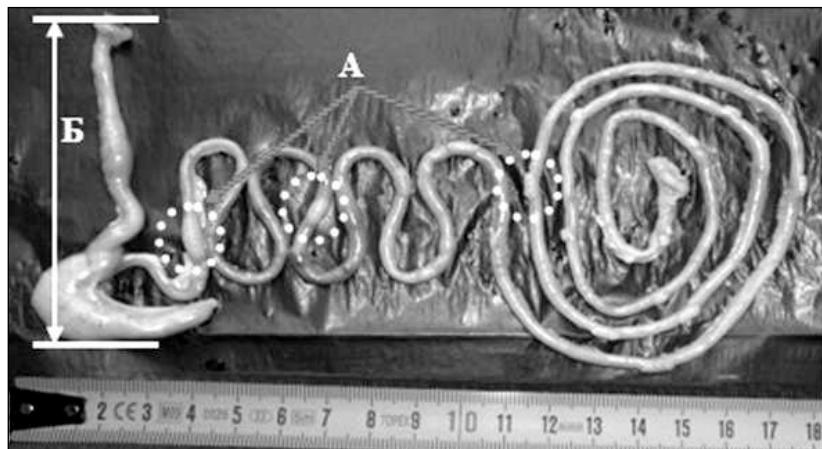


Рис. 1. Тонкая кишка с пейеровыми бляшками (А) и участок толстой (Б) кишки половозрелых крыс на 7 сутки после введения имунофана

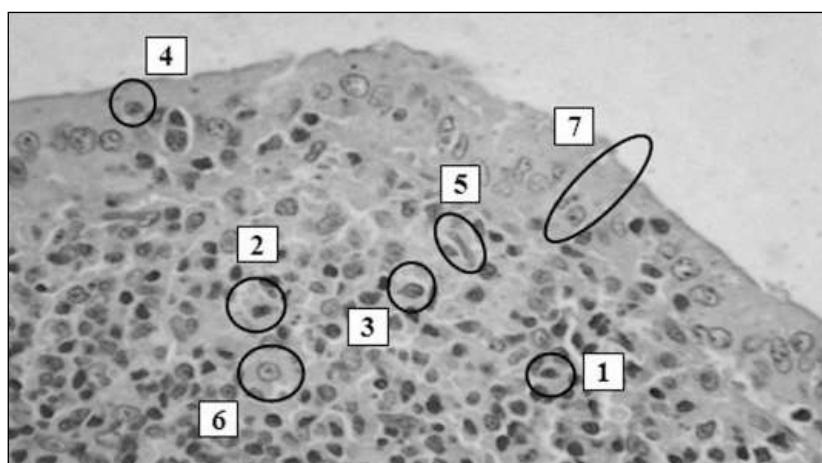


Рис. 2. Купол лимфатического узелка половозрелых крыс на 30 сутки после коррекции иммуносупрессии с помощью имунофана: 1, 2, 3 – малый, средний, большой лимфоциты, 4 – интраэпителиальный лимфоцит, 5 – ретикулоцит, 6 – макрофаг, 7 – эпителиоцит.

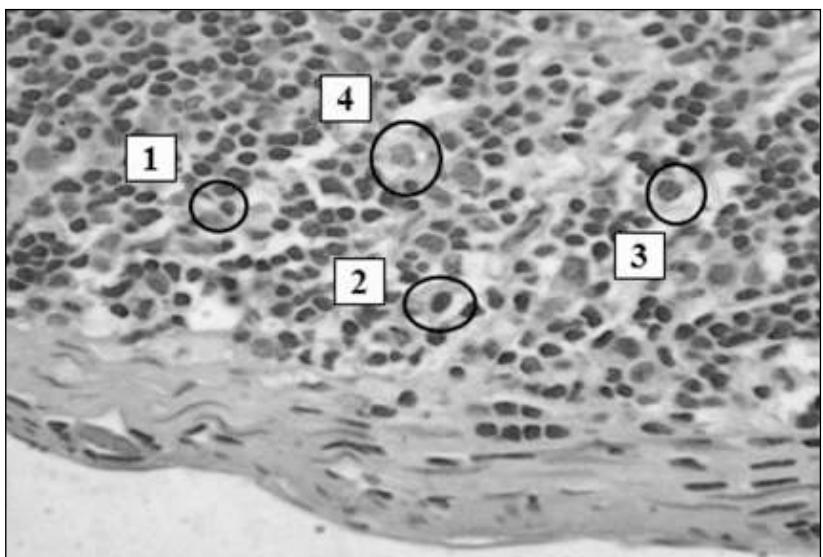
Окраска: гематоксилин-эозин. Приближение: Zoom 132.  
Объектив: Plan C N 60x/0.25∞/-FN22

Таблица 1.

Количество ядер клеток на  $1000 \text{ мкм}^2$  в разных зонах лимфатических узелков пейеровых бляшек тонкой кишки у половозрелых животных интактной и экспериментальной групп в разные сроки наблюдения после воздействия имунофаном  $M \pm m$  ( $n=24$ )

Зоны лимфатических узелков	Половозрелые крысы					
	7 сутки		30 сутки		90 сутки	
	Эксперимент	Контроль	Эксперимент	Контроль	Эксперимент	Контроль
Купол	$0,53 \pm 0,03^*$	$0,47 \pm 0,01$	$0,68 \pm 0,03^*$	$0,60 \pm 0,01$	$0,61 \pm 0,02$	$0,60 \pm 0,02$
Герминативный центр	$0,79 \pm 0,03^*$	$0,72 \pm 0,01$	$0,77 \pm 0,02$	$0,73 \pm 0,03$	$0,61 \pm 0,03$	$0,61 \pm 0,02$
Периферическая зона	$0,59 \pm 0,02$	$0,53 \pm 0,02$	$0,73 \pm 0,03^*$	$0,68 \pm 0,02$	$0,73 \pm 0,03$	$0,71 \pm 0,02$
Межузелковая зона	$0,54 \pm 0,01^*$	$0,46 \pm 0,03$	$0,66 \pm 0,02^*$	$0,50 \pm 0,02$	$0,47 \pm 0,02$	$0,45 \pm 0,02$

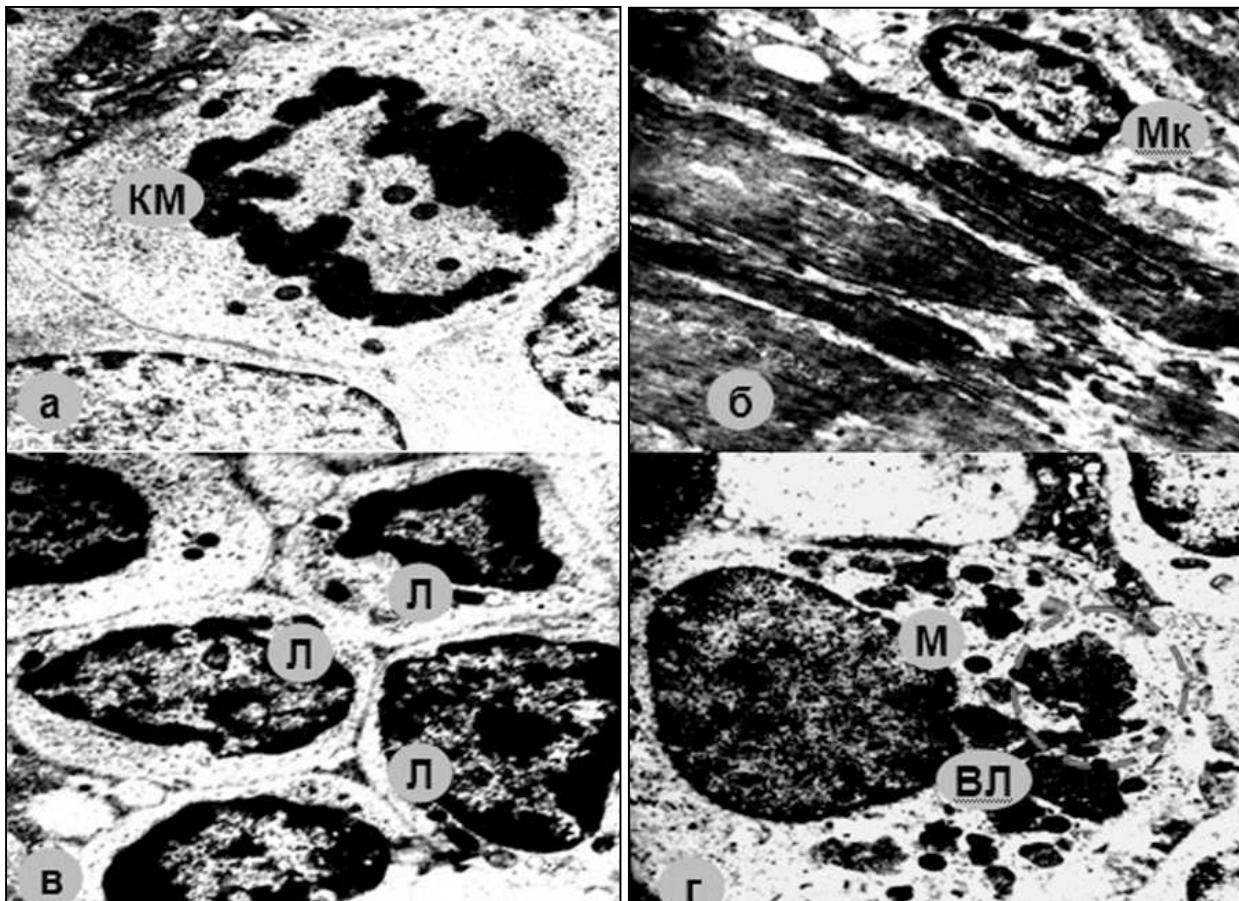
Примечание: \* - достоверные отличия от контрольных данных при  $p < 0,05$ .



**Рис. 3.** Межузелковая зона пейеровой бляшки половозрелых крыс на 30 сутки после коррекции иммуносупрессии с помощью имунофана: 1, 2, 3 – малый, средний, большой лимфоциты, 4 – макрофаг. Окраска: гематоксилин-эозин. Приближение: Zoom 132. Объектив: Plan C N 60x/0.25∞/-FN22

При ультрамикроскопическом исследовании на 7 сутки наблюдения после коррекции иммуносупрессии с помощью имунофана выявляются клетки с явлениями апоптоза, а также некроза. В макрофагах содержится умеренное количество лизосом. М-клетки имеют типичное строение. Между лимфоцитами на электронных микрофотографиях располагается соединительная ткань.

Встречаются единичные клетки с фигурами митоза (рис. 4). К 30 суткам наблюдения выявляются клетки с явлениями апоптоза, лимфоциты плотно прилежат друг к другу, макрофаги содержат большое количество лизосом. М-клетки морфологически не отличаются от таковых в контрольной группе. Увеличивается количество лимфобластов и клеток с фигурами митоза.



**Рис. 4.** Участок пейеровой бляшки тонкой кишки половозрелых крыс на 30 сутки после коррекции иммуносупрессии с помощью имунофана:  
а – клетка с картиной митоза (КМ), б – М-клетка (Мк),  
в – лимфоциты (Л), г – макрофаг (М) с вторичными лизосомами в цитоплазме (ВЛ). Увеличение Ч 12000

## Выводы.

1. После коррекции иммуносупрессии при помощи имунофана количество ядер клеток во всех зонах пейеровых бляшек половозрелых крыс на 7 и 30 сутки наблюдения превышает контрольные данные, что может свидетельствовать о способности иммуномодулятора нивелировать негативное действие циклофосфана.

2. При ультрамикроскопическом исследовании пейеровых бляшек тонкой кишки после использования имунофана на фоне введения высокой дозы циклофосфана на 7 сутки проявляется иммуносуппрессивное действие цитостатика, а к 30 суткам происходит нивелирование его действия после воздействия иммуномодулятора.

3. К 90 суткам наблюдения результаты микроскопического исследования приближаются к контрольным параметрам, что свидетельствует о способности пейеровых бляшек адаптироваться к действию имунофана и циклофосфана.

## References:

1. Bibik E.Ju. Sovremennye vozmozhnosti medikamentoznoj korrektsii morfogeneza organov imunnogo sistemy [Modern opportunities of medicamentous correction of the morphogenesis of the immune system organs]. E.Ju. Bibik, E.V. Kuckaja., Ukrains'kij medichnij al'manah [Ukrainian medical almanakh]. – 2005., Vol. 8, No 4., pp. 207–212.

2. Zakonomernosti variabel'nosti limfoidnyh struktur perifericheskogo zvena imunnogo sistemy [Patterns of variability of lymphoid structures of a peripheral link of the immune system]. V.K. Syrov, V.M. Evtushenko, S.P. Kovalev i dr., Visnik problem biologii i medicini [Digest of Biological and Medical Problems]. 2003., Issue. 3., pp. 87–88.

3. Labunec' I.F. Vikovi zmini cirkadnih i cirkanal'nih kolivan' velichini imunnoi vidpovidzi ta chisla klitin u limfoidnih organah tvarin: mozhlivij zv'язok z faktorami timusa [Age-related changes in circadian and circannual rhythms of the immunal response and the number of cells of lymphoid organs of aminals: possible

correlation with factors of thymus]. I.F. Labunec', Fiziologichnij zhurnal [Physiological Journal]. – 2001., Vol. 47, No 5., pp. 54–62.

4. Lebedev V.V. Gidrofil'nyj geksapeptid imunofan – giperaktivnyj reguljator transportnyh belkov mnozhestvennoj lekarstvennoj ustojchivosti [Hydrophilic hexapeptide immunofan – the hyperactive regulator of transport proteins of multiple medicinal stability]. V.V. Lebedev, S.A. Novikov., Bjuulleten' eksperimental'noj biologii i mediciny [Experimental Biology and Medicine Bulletin]. – 2006., Vol. 142, No 12., pp. 649–652.

5. Cyclophosphamide enhances immunity by modulating the balance of dendritic cell subsets in lymphoid organs. T. Nakahara, H. Uchi, A.M. Lesokhin et al., Blood. – 2010., Vol. 115, No 22., pp. 4384–4392.

6. High-dose cyclophosphamide for moderate to severe refractory multiple sclerosis. D.E. Gladstone, K.W. Zamkoff, L. Krupp et al., Arch. Neurol. – 2006., Vol. 63, No 10., pp. 1388–1393.

7. Reynolds E.S. The use of lead citrate at high pH as an electron-opaque stain in electron microscopy. E.S. Reynolds., Journal of cell biology. – 1963., No 17., pp. 208–212.

## Литература:

1. Бибик Е.Ю. Современные возможности медикаментозной коррекции морфогенеза органов иммунной системы / Е.Ю. Бибик, Е.В. Кущая // Український медичний альманах. – 2005. – Т. 8, № 4. – С. 207–212.

2. Закономерности вариабельности лимфоидных структур периферического звена иммунной системы / В.К. Сыров, В.М. Евтушенко, С.П. Ковалев [и др.] // Вісник проблем біології і медицини. – 2003. – Вип. 3. – С. 87–88.

3. Лабунець І.Ф. Вікові зміни циркадних і циркануальних коливань величини імунної відповіді та числа клітин у лімфоїдних органах тварин: можливий зв'язок з факторами тимуса / І.Ф. Лабунець // Фізiol. журн. – 2001. – Т. 47, № 5. – С. 54–62.

4. Лебедев В. В. Гидрофильный

гексапептид имунофан – гиперактивный регулятор транспортных белков множественной лекарственной устойчивости / В.В. Лебедев, С.А. Новиков // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. – 2006. – Т. 142, № 12. – С. 649–652.

5. Cyclophosphamide enhances immunity by modulating the balance of dendritic cell subsets in lymphoid organs/ T. Nakahara, H. Uchi, A.M. Lesokhin [et al.] // Blood. – 2010. – V. 115, № 22. – P. 4384–4392.

6. High-dose cyclophosphamide for moderate to severe refractory multiple sclerosis/D.E. Gladstone, K.W. Zamkoff, L. Krupp [et al.] // Arch. Neurol. – 2006. – V. 63, № 10. – P. 1388–1393.

7. Reynolds E.S. The use of lead citrate at high pH as an electron-opaque stain in electron microscopy / E.S. Reynolds // Journal of cell biology. – 1963. – № 17. – P. 208–212.

## Information about authors:

1. Svetlana Kashchenko - Doctor of Medical sciences, Full Professor, Lugansk State Medical University; address: Ukraine, Lugansk city; e-mail: kashchenko\_s@list.ru

2. Elena Morozova - Postgraduate student, Lugansk State Medical University; address: Ukraine, Lugansk city; e-mail: tiger2910@rambler.ru

3. Vitaliy Morozov - Postgraduate student, Lugansk State Medical University; address: Ukraine, Lugansk city; e-mail: vitaliyy-morozov@rambler.ru

## Сведения об авторах:

1. Кащенко Светлана - доктор медицинских наук, профессор, Луганский государственный медицинский университет; адрес: Украина, Луганск; электронный адрес: kashchenko\_s@list.ru

2. Морозова Елена - аспирант, Луганский государственный медицинский университет; адрес: Украина, Луганск; электронный адрес: tiger2910@rambler.ru

3. Морозов Виталий – аспирант, Луганский государственный медицинский университет; адрес: Украина, Луганск; электронный адрес: vitaliyy-morozov@rambler.ru