

**В.Л. Лимонов, А.В. Шурлыгина, М.В. Робинсон, Л.В. Вербицкая,
Н.Г. Пантелеева, М.В. Тендитник, О.П. Колесникова, В.А. Труфакин**

ВЕСОВЫЕ, МОРФОМЕТРИЧЕСКИЕ И ЦИТОЛОГИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ ЛИМФОИДНЫХ ОРГАНОВ МЫШЕЙ ПРИ ВОЗДЕЙСТВИИ ПРОИЗВОДНОГО ИНДОЛИЛТИОАЛКАНКАРБОНОВОЙ КИСЛОТЫ (СОЕДИНЕНИЯ ВЛ-11-02)

ГУ НИИ клинической и экспериментальной лимфологии СО РАМН
ГУ НИИ клинической иммунологии,
ГУ НИИ физиологии СО РАМН, Новосибирск

Проведено изучение клеточного состава и морфометрических показателей лимфоидных органов интактных мышей при действии производного индолилтиоалканкарбонической кислоты (соединения ВЛ-11-02). Обнаружено, что исследованное вещество влияет на клеточные и тканевые параметры лимфоидных органов, отражающие процессы миграции, пролиферации и дифференцировки в иммунной системе. Характер морфологических изменений позволяет предположить, что соединение ВЛ-11-02 супрессирует эти процессы на уровнях Т-, В-клеточного и моноцитарно-макрофагального звеньев иммунитета в центральных и периферических органах иммунной системы.

Ключевые слова: индолилтиоалканкарбоническая кислота, клетки и органы иммунной системы, иммуносупрессия

Синтетические средства из производных арилгетероалканкарбонических кислот [1, 2, 3] рассматривают как перспективные вещества для создания оригинальных лекарственных средств иммуностроительного действия. Одно из наиболее активных соединений этого класса — соединение ВЛ-11-02 — оказывает влияние на дифференцировку стволовой кроветворной клетки, гуморальный и клеточный иммунный ответ, а также обладает противоопухолевым действием. Соединение ВЛ-11-02 рассматривают как потенциальный иммунодепрессант по следующим позициям: выраженные миелодепрессивные свойства при использовании в максимально переносимой дозе ($1/_{2,5}$ от LD_{50}), подавление ГЗТ в дозе $1/_{25}$ и $1/_{2,5}$ от LD_{50} , резкое подавление *in vitro* пролиферации клеток селезенки интактных мышей, стимулированной Т-клеточным митогеном конканавалином А во всех использованных дозах, также подавление спонтанной и стимулированной митогеном лаконоса пролиферации клеток селезенки интактных мышей. В то же время совершенно не изучено, какие морфологические и цитологические изменения иммунокомпетентных органов и клеток лежат в основе иммуностроительных эффектов данного препарата.

В настоящее время уже осознана необходимость морфологической оценки функциональных

данных, так как структура и функция неразрывно связаны друг с другом, и понять их взаимоотношения можно только при системном подходе. Методология и методы иммуноморфологии обладают высокой информативностью при оценке действия различных биологически активных и лекарственных препаратов, влияющих на функции иммунной системы [4, 5, 6, 10, 11]. Учитывая вышесказанное, целью настоящей работы явилось изучение клеточного состава и морфометрических показателей лимфоидных органов интактных мышей при действии соединения ВЛ-11-02.

Материалы и методы

В работе использованы мыши (СВА Х С57В1) F1 самцы в возрасте 3-4 месяца, весом 18-20 г. Все эксперименты выполнены в соответствии с «Правилами проведения работ с использованием экспериментальных животных» (приказ Минздрава СССР от 12.08.77 г.).

Соединение ВЛ-11-02 вводили внутрибрюшинно в дозе 10 мг/кг ($1/_{75}$ от LD_{50}) в 0,2 мл среды RPMI в течение 7-10 дней. Контрольной группе вводили растворитель (среда RPMI) в том же объеме. После этого животных забивали дислокацией шейного отдела позвоночника под эфирным наркозом, извлекали тимус, селезенку, паховые лимфатические узлы.

Животных и лимфоидные органы взвешивали,

готовили из тимуса, селезенки и лимфатических узлов клеточную суспензию мягким раздавливанием в стеклянном гомогенизаторе. Количество клеток в суспензии подсчитывали в камере Горяева, а затем делали пересчет на целый орган. Для цитологического исследования из суспензии делали мазки на предметных стеклах методом «высушенной капли», фиксировали их в 96% этаноле и окрашивали азур-2-эозином по Романовскому-Гимза. В мазках подсчитывали относительное количество различных клеточных форм под свето-

вым микроскопом при увеличении ок.10, об.90 с использованием масляной иммерсии.

Для морфометрического анализа кусочки тимуса и селезенки фиксировали в жидкости Теле-сницкого и заливали в парафин. Приготовляли срезы толщиной 5-7 мк. Срезы окрашивали гематоксилин-эозином по общепринятой методике. Морфометрическое исследование проводили на комплексе Аxioplan-2 (Karl Zeiss) по программе Аxiovision при увеличении ок.10, об.5 для тимуса и ок.10, об.10 для селезенки. В срезах тимуса из-

Таблица 1

Цитограмма лимфоидных органов мышей после введения соединения ВЛ-11-02

Показатель	Введение среды RPMI		Введение соединения ВЛ-11-02		p
	М	м	М	м	
Тимус					
Вес, мг	36,10	5,87	46,00	7,62	
Весовой индекс, мг/кг	1,90	0,30	2,37	0,34	
Млн кл. в органе	98,62	19,14	146,07	39,50	
Лимфоциты, %	79,60	2,28	86,20	1,78	0,011
Бласты, %	13,89	1,73	6,89	1,17	0,007
Моноциты, %	3,30	0,45	2,60	0,54	
Лимфоциты (абс. млн)	80,45	17,09	129,22	41,57	
Бласты (абс. млн)	10,59	1,52	9,48	1,68	
Моноциты (абс. млн)	3,62	0,99	3,12	0,63	
Селезенка					
Вес селезенки, мг	81,40	4,89	84,20	7,57	
Весовой индекс, г/кг	4,29	0,29	3,87	0,45	
Млн кл. в органе	190,33	20,78	171,00	36,43	
Лимфоциты, %	70,20	2,44	80,90	1,15	0,000001
Бласты, %	15,40	1,75	6,33	0,78	0,000001
Макрофаги, %	3,30	0,26	2,00	0,21	0,001
Плазмоциты, %	2,90	0,38	1,70	0,21	0,006
Лимфоциты (абс. млн)	122,70	13,67	142,68	32,74	
Бласты (абс. млн)	35,22	5,27	12,39	3,36	0,006
Макрофаги (абс. млн)	5,90	0,88	3,37	0,73	0,035
Плазмоциты (абс. млн)	4,85	0,70	2,72	0,67	0,011
Паховый лимфоузел					
Вес, мг	2,60	0,40	2,90	0,48	
Весовой индекс, мг/кг	0,14	0,02	0,15	0,02	
Млн кл. в органе	4,34	0,55	7,23	1,37	
Лимфоциты, %	69,20	1,85	80,30	1,37	0,0001
Бласты, %	19,40	1,44	10,10	1,79	0,0008
Макрофаги, %	3,50	0,45	2,50	0,27	
Плазмоциты, %	2,70	0,33	1,20	0,25	0,0021
Лимфоциты (абс. млн)	2,96	0,33	5,71	1,26	0,048
Бласты (абс. млн)	0,87	0,15	0,87	0,24	
Макрофаги (абс. млн)	0,16	0,04	0,18	0,05	
Плазмоциты (абс. млн)	0,12	0,02	0,08	0,03	

меряли площади коркового и мозгового вещества долек, вычисляли относительные размеры данных структур в % к общей площади среза и корково-мозговой индекс (отношение площади коркового вещества к площади мозгового вещества). В срезах селезенки измеряли площади фолликулов белой пульпы, реактивных центров и периартериальных зон, вычисляли размеры В-зависимых зон белой пульпы (общая площадь фолликула минус площадь периартериальной зоны) и соотношение Т- и В-зависимых зон (площадь периартериальной зоны / площадь В-зависимой зоны).

Для каждой мыши проводили по 10 измерений (для тимуса и для селезенки) в случайно выбранных срезах из разных отделов органов.

Данные были статистически обработаны по программе STATISTICA 5. Достоверность оценивали с применением непараметрического критерия U Манна-Уитни.

Результаты и обсуждение

Исследование цитограммы мазков из клеточных суспензий лимфоидных органов показало, что исследуемый препарат вызывает значительные перестройки в клеточном составе лимфоидных органов. В тимусе после введения препарата повышается относительное количество малых лимфоцитов и снижается относительное количество бластов. В паховых лимфоузлах повышается относительное количество и абсолютное количество малых лимфоцитов, снижается относительное количество бластов и плазматических клеток. В селезенке достоверно повышается относительное количество малых лимфоцитов, снижается отно-

сительное количество и абсолютное количество бластных клеточных форм, макрофагов и плазматических клеток (таблица 1).

Морфометрическое исследование срезов лимфоидных органов позволило выявить следующие закономерности. В тимусе абсолютная площадь коркового вещества имеет тенденцию к увеличению у животных, которым вводили соединение ВЛ-11-02, по сравнению с контролем (введение растворителя). Абсолютная площадь мозгового вещества у контрольных и опытных животных практически не отличается. При пересчете размеров органных структур тимуса в относительных величинах (% от общей площади среза) было обнаружено, что относительная площадь коркового вещества увеличивается, а мозгового — уменьшается у мышей, получавших инъекции соединения ВЛ-11-02. Отношение площади коркового вещества к площади мозгового вещества (корково-мозговой индекс) соответственно оказалось выше у животных опытной группы (таблица 2).

В селезенке действие препарата вызывает следующие изменения. У животных, которым вводили соединение ВЛ-11-02, общая площадь фолликулов белой пульпы и площадь В-зависимых зон оказались уменьшенными по сравнению с контролем. Площади реактивных центров и периартериальных муфт, а также соотношение размеров Т- и В-зависимых зон не изменялось (таблица 3).

Таким образом, была выявлена определенная реактивность лимфоидных органов в ответ на действие соединения ВЛ-11-02. Если судить по достоверности выявленных изменений, то более

Таблица 2

Морфометрические параметры тимуса мышей при действии соединения ВЛ-11-02

Параметры	Введение среды RPMI		Введение соединения ВЛ-11-02	
	Абсолютная площадь (мкм ² ×10 ⁶ ; M±m)	Относительная площадь (% от общей площади среза M±m)	Абсолютная площадь (мкм ² ×10 ⁶ ; M±m)	Относительная площадь (% от общей площади среза M±m)
Площадь коркового вещества	1,5±0,11	72,0±1,2	2,4±0,10	79,2±2,2
Площадь мозгового вещества	0,5±0,04	28,0±0,5	0,6±0,03	19,8±0,9*
Корково-мозговой индекс	3,0±1,5		4,1±1,3*	

Примечание: * — различия между показателями контрольной и опытной групп достоверны при $p < 0,05$

Таблица 3

Морфометрические параметры селезенки мышей при действии соединения ВЛ-11-02 (мкм²×10⁵) (M±m)

Параметры	Введение среды RPMI	Введение соединения ВЛ-11-02
Площадь фолликула	1,1±0,05	0,9±0,02*
Площадь периартериальной зоны	0,09±0,003	0,08±0,002
Площадь реактивного центра	0,1±0,0004	0,1±0,004
Площадь В-зоны	1,0±0,04	0,9±0,02*
Площадь Т-зоны/площадь В-зоны	0,11±0,01	0,10±0,00

Примечание: * — различия между показателями контрольной и опытной групп достоверны при $p < 0,05$

реактивны вторичные лимфоидные органы, особенно селезенка. Менее всего достоверных изменений найдено в тимусе.

В настоящее время понятна значимость основных процессов, обеспечивающих существование клеток иммунной системы — пролиферации, дифференцировки, миграции, апоптоза для функционирования иммунной системы [5, 6, 7]. Соединение ВЛ-11-02 изменяет все эти процессы. Оно влияет на клетки лимфоидного (Т- и В- системы) и макрофагально-моноцитарного рядов. Препарат увеличивает количество клеток в тимусе и лимфатическом узле, но истощает селезенку, что может свидетельствовать об измененной миграции [8]. Возможно, что влияние исследуемого вещества ограничивает процессы миграции клеток из первичных во вторичные лимфоидные органы и/или клеточную рециркуляцию в иммунной системе. Соединение ВЛ-11-02 уменьшает количество бластных клеток во всех исследованных органах, что может говорить о его супрессирующем эффекте на пролиферацию и/или на дифференцировку как антигеннезависимую (тимус), так и антигензависимую (селезенка, лимфатические узлы). При этом действие вещества наиболее заметно в отношении В-клеточного звена иммунной системы: во вторичных лимфоидных органах примерно в два раза уменьшается количество плазматических клеток, представляющих зрелую субпопуляцию В-лимфоцитов, достоверно уменьшаются размеры В-зависимых зон селезенки, уменьшаются относительные размеры мозгового вещества дольки тимуса, где содержится рециркулирующий пул лимфоцитов и определенное количество В-клеток [9].

Заключение

Соединение ВЛ-11-02 влияет на клеточные и тканевые параметры лимфоидных органов, отражающие процессы миграции, пролиферации и дифференцировки в иммунной системе. Характер морфологических изменений позволяет предположить, что исследуемое вещество супрессирует эти процессы на уровнях Т-, В-клеточного и моноцитарно-макрофагального звеньев иммунитета в центральных и периферических органах иммунной системы.

Influence of the derivative of alkancarboxylic acid (compound VL-11-02) on weight, morphometrical and cytological characteristics of mice lymphoid organs

V.L. Limonov, A.V. Shurlygina, M.V. Robinson, L.V. Verbitskaja, N.G. Panteleeva, M.V. Tenditnik, O.P. Kolesnikova, V.A. Trufakin

Influence of the derivative of alkancarboxylic

acid (compound VL-11-02) on weight, morphometrical and cytological characteristic of mice lymphoid organs has been investigated. It has been found that this substance influenced on cellular and tissue parameters of lymphoid organs, reflecting migration, proliferation and differentiation processes of the immune system. The character of morphological changes permitted to suppose that substance № 11 suppressed these processes in Т-, В-and monocyte/macrophage links of immunity in primary and secondary lymphoid organs.

Литература

1. Гемо- и иммунопозактивные свойства трекрезна / О.П. Колесникова, О.Т. Кудяева, Т.Г. Сухенко и др. // ДАН. — 2003. — Т. 391. — № 3. — С. 1-3.
2. Изучение эффекта производных индолил-3-ацетата и германийорганических соединений на модели аутоиммунного гломерулонефрита, индуцированного РТПХ / О.П. Колесникова, М.Н. Тузова, О.Т. Кудяева и др. // Иммунология. — 1996. — № 3. — С. 43-46.
3. К вопросу о механизмах иммуномодулирующего эффекта производных алканкарбоновых кислот / О.П. Колесникова, О.Т. Кудяева, М.Н. Тузова, И.В. Сафронова // Иммунология. — 1994. — № 5. — С. 30-33.
4. Пучков В.Ф. Реакция тимуса крыс на ксенотрансплантацию и иммуносупрессию / В.Ф. Пучков, Е.Б. Смирнов, В.А. Отеллин // Морфология. — 1998. — № 4. — С. 59-64.
5. Робинсон М.В. Морфолог в иммунологическом мире / М.В. Робинсон, В.А. Труфакин // Бюлл. СО РАМН. — 1998. — № 2. — С. 20-24.
6. Труфакин В.А. Иммуноморфология — вчера, сегодня, завтра / В.А. Труфакин, М.В. Робинсон // Вестник Российской академии медицинских наук. — 1996. — № 6. — С. 38-43.
7. Труфакин В.А. Гистофизиология иммунной системы / В.А. Труфакин, А.В. Шурлыгина // Иммунология. — 2002. — № 1. — С. 4-8.
8. Циркадные биоритмы иммунной системы / Ю.И. Бородин, В.А. Труфакин, А.Ю. Летягин, А.В. Шурлыгина. — Новосибирск, 1992. — 208 с.
9. A pronounced thymic B-cell deficiency in the spontaneously diabetic BB rat / S. Tullin, P. Farris, L. Hornum, M. Jackerott, H. Markholst // J. Immunol. — 1997. — Vol. 158. — № 11. — P. 5554-5559.
10. Impairment of splenic B and T lymphocytes in the early period after severe thermal injury: immunohistochemical and electron microscopic analysis / T. Maekawa, H. Kajihara, K. Okabayashi, M. Otani, O. Yuge // Burns. — 2002. — Vol. 28. — № 4. — P. 329-339.
11. Smith K.M. T-cell activation occurs simultaneously in local and peripheral lymphoid tissue following oral administration of a range of doses of immunogenic or tolerogenic antigen although tolerized T cell display a defect in cell division / K.M. Smith, J.M. Davidson, P. Garside // Immunology. — 2002. — Vol. 106. — № 2. — P. 139-143.