

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ В БИОЛОГИИ И МЕДИЦИНЕ

УДК 616.012:612.017+576.2

С.А. Витязева, Т.П. Старовойтова, В.И. Дубровина

СРАВНИТЕЛЬНАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ИММУННОГО ОТВЕТА МАКРООРГАНИЗМА ПРИ ПЕРОРАЛЬНОМ И ПАРЕНТЕРАЛЬНОМ ВВЕДЕНИИ МЕТАЛЛОСОДЕРЖАЩЕГО НАНОБИОКОМПЗИТА

ФКУЗ «Иркутский научно-исследовательский противочумный институт Сибири и Дальнего Востока»
Роспотребнадзора (Иркутск)

Проведены исследования по изучению влияния кобальтсодержащего нанобиокомпозиата на основе арабиногалактана на морфологические изменения в иммунокомпетентных органах экспериментальных животных при пероральном и парентеральном введении с помощью компьютерной программы «Морфометрия». Дана сравнительная оценка морфологических и гистологических изменений в селезенке и регионарных лимфатических узлах беспородных белых мышей.

Ключевые слова: нанобиокомпозиат, морфометрия, иммунокомпетентные органы

COMPARATIVE CHARACTERIZATION OF THE MACROORGANISM IMMUNE RESPONSE AFTER PERORAL AND PARENTERAL INTRODUCTION OF METALLIC NANOCOMPOSITE

S.A. Vityazeva, T.P. Starovoitova, V.I. Dubrovina

Irkutsk Antiplague Research Institute of Siberia and Far East, Irkutsk

Influence of a cobalt-containing nanobiocomposite on basis of arabinogalactane on morphological changes in immunocompetent organs of the experimental animals at peroral and parenteral introduction was studied by a computer program «Morphometry». Comparative estimation of morphological and histological changes in spleen and regional lymph nodes of the outbred white mice was performed.

Key words: nanobiocomposite, morphometry, immunocompetent organ

В настоящее время приоритетными являются исследования, направленные на поиск препаратов, выполняющих роль индукторов и модуляторов иммунного ответа, способных воздействовать на Т- и В-звено иммунной системы, повышать защитные реакции организма [1, 5, 7]. Из множества выпускаемых стимуляторов иммунной системы многие могут быть рекомендованы для применения по ряду причин, в том числе связанных с тем, что синтетические препараты вызывают привыкание к искусственной стимуляции, после чего организм не может самостоятельно противостоять инфекционным агентам.

Одним из актуальных направлений для создания новых наноматериалов (содержащих биогенные металлы и микроэлементы) с заданными биологическими свойствами является использование в качестве биоактивной полисахаридной оболочки макромолекулы арабиногалактана.

Известно, что арабиногалактан является природным полисахаридом, источником пищевых волокон, пробиотиком, оказывает положительное влияние на микрофлору кишечника, обладает иммуномодулирующими и гастропротекторными свойствами. Показано, что при подкожном при-

менении экспериментальным животным арабиногалактан не токсичен и проявляет иммуностимулирующее действие [2, 3, 6].

В связи с этим изучение действия металло-содержащих нанобиокомпозиатов растительного происхождения на макроорганизм представляет интерес.

Цель работы — сравнительная оценка формирования иммунного ответа у белых мышей при пероральном и парентеральном введении кобальтсодержащего нанобиокомпозиата на основе арабиногалактана.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В качестве объекта исследования использовали кобальтсодержащий нанобиокомпозиат на основе арабиногалактана (КоАГ).

Экспериментальной моделью в опытах служили 72 беспородные, но стандартные по условиям содержания и массе (18–19 г) белые мыши обоих полов. Животные были разделены на две опытные (по 24 особи в каждой) и две контрольные группы (по 12 особей в каждой). Белым мышам I опытной группы в течение 10 дней вводили *per os* (свободное пропаивание) КоАГ в объеме 60 мкл (доза 2 мг/кг)

[7], контрольной группе – *per os* забуференный физиологический раствор (ЗФР) в том же объеме. II группе препарат вводили однократно подкожно в правую заднюю лапу в объеме 0,5 мл (доза 2 мг/кг), контрольной группе – ЗФР.

Материал для исследования (дренажные лимфатические узлы – правый паховый, брыжеечный и селезенка) забирали на 3-и, 7-е, 14-е и 21-е сутки после введения препарата. Работу с экспериментальными животными проводили в соответствии с «Правилами проведения работ с использованием экспериментальных животных» 2003 г., Приложением к приказу МЗ СССР № 775 от 12.08.1977 г.

Животных усыпляли хлороформом и немедленно проводили вскрытие, что обеспечивало близкое к прижизненному состоянию забираемых на гистологическое исследование органов.

Материал фиксировали в 10% нейтральном формалине в течение 7 – 10 суток при температуре 18 – 25 °С, после чего подвергали дальнейшей гистологической обработке: обезживали в спиртах возрастающей концентрации, заливали в парафин. Тканевые срезы толщиной 4 – 6 мкм окрашивали гематоксилин-эозином, метиловым зеленым-пиронином [4]. В работе использовали методы обзорной микроскопии. Количественную оценку объемных долей белой и красной пульпы селезенки, площади лимфатического фолликула и реактивного центра DLN проводили с использованием компьютерной программы «Motic Images Plus» (версия 2) и выражали в микрометрах (мкм). Автоматический анализ изображения производили с помощью светового микроскопа «Zeiss» (Германия) с видеокамерой «Moticam 2000», разрешение 1392 × 1040 пикселей, об. 10.

Все полученные материалы обработаны с применением стандартного пакета программ «Statistica», версия 6 (Copyright©Stat Soft, Inc 19842001, ИПЧИ 31415926535897) и пакета программ Microsoft Office Excel (2003). Для каждой выборки вычисляли *M* – среднее арифметическое, *m* – ошибка

среднего. Для сравнения средних из выборок использовали *t*-критерий Стьюдента. Результаты считали достоверными при *p* < 0,05 по отношению к контролю.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

При вскрытии животных I и II опытных групп на 3-и сутки в паренхиматозных органах видимые изменения отсутствовали. Регионарные лимфатические узлы у белых мышей, принимавших *per os* КоАГ, увеличены в 1,6 раза, у животных II опытной группы – в 2,5 раза по сравнению с контролем.

При микроскопическом исследовании органов опытных животных выявленные изменения однотипны. В селезенке – умеренная гиперплазия фолликулов с увеличением реактивных центров (табл. 1), отчетливо выражена Т-зависимая периартериальная зона. Кровеносные сосуды расширены и полнокровны. В венозных синусах – полиморфноядерные лейкоциты, инфильтрация красной пульпы миелоидными клетками и мегакариоцитами, небольшое количество эозинофилов. В реактивном центре имеет место увеличение содержания бластных и ретикулярных клеток. В мантийной и краевой зонах фолликула, в красной пульпе выявлены плазматические клетки.

В брыжеечном лимфатическом узле животных I опытной группы выражены фолликулы с развитыми реактивными центрами. В паракортикальной зоне – увеличение интердигитирующих ретикулярных клеток, гранулоцитов и лимфоцитов. Подобные изменения выявлены и у белых мышей II опытной группы в правом паховом лимфатическом узле.

Морфометрический анализ полученных данных показал, что к 3-м суткам наблюдения в селезенке экспериментальных животных I опытной группы доля белой пульпы от общей площади органа увеличена в 1,5 раза (*t* = 8,6; *df* = 7; *p* < 0,001) по сравнению с контролем. В реактивном центре фолликулов селезенки происходит усиленный процесс бласттрансформации, который приво-

Таблица 1
Площадь белой и красной пульпы и реактивного центра селезенки экспериментальных животных (*M* ± *m*, мкм)

Препарат	Зоны	Сроки наблюдения, сутки			
		3-и	7-е	14-е	21-е
Контроль	Белая пульпа	28,20 ± 1,21	28,70 ± 0,90	28,90 ± 1,27	29,10 ± 1,14
	Красная пульпа	71,80 ± 3,45**	71,30 ± 2,64	71,10 ± 1,35	70,90 ± 1,60
	Реактивный центр	5,90 ± 0,44	5,80 ± 0,61	5,30 ± 0,21	5,00 ± 0,42
КоАГ (I группа)	Белая пульпа	41,20 ± 0,90***	39,90 ± 1,18**	34,10 ± 0,71	30,60 ± 0,90
	Красная пульпа	58,80 ± 1,26	60,10 ± 2,13	65,90 ± 1,40	69,40 ± 1,53
	Реактивный центр	12,20 ± 0,54***	9,90 ± 0,75***	6,90 ± 0,81	5,10 ± 0,42
КоАГ (II группа)	Белая пульпа	36,40 ± 0,81	48,60 ± 0,68***	40,80 ± 0,35***	31,30 ± 0,48
	Красная пульпа	63,60 ± 0,90	51,40 ± 0,75*	59,20 ± 0,27	68,70 ± 0,63
	Реактивный центр	10,40 ± 0,74**	12,70 ± 0,71***	9,60 ± 0,52***	7,80 ± 0,53**

Примечание: I группа – животным вводили КоАГ перорально; II группа – животным вводили КоАГ парентерально; * – *p* < 0,05; ** – *p* < 0,01; *** – *p* < 0,001 – статистическая значимость различий по отношению к контролю.

дит к увеличению площади реактивного центра I опытной группы в 2,1 раза ($t = 9,0; df = 7; p < 0,001$) и в 1,7 раза ($t = 5,36; df = 7; p < 0,01$) II опытной группы (табл. 1).

У белых мышей, получавших препарат *per os*, площадь фолликулов брыжеечного лимфатического узла увеличена в 3,7 раза ($t = 5,4; df = 7; p < 0,001$), реактивного центра – в 8,0 раз ($t = 14,0; df = 7; p < 0,001$), в паховом лимфатическом узле животных II опытной группы – в 2,7 ($t = 16,1; df = 7; p < 0,001$) и в 10,7 раза ($t = 14,6; df = 7; p < 0,001$) соответственно по сравнению с контрольными животными (табл. 2, 3).

На 7-е сутки исследования регионарный лимфатический узел у животных опытных групп обычного вида и размера. Селезенка незначительно увеличена с тонкими неровными краями, зернистого вида.

При морфометрии селезенки экспериментальных животных I опытной группы относительно

показателей 3-х суток имеет место снижение площади реактивного центра и белой пульпы, но тем не менее эти показатели выше, чем в контроле, в 1,7 ($t = 4,5; df = 7; P < 0,01$) и 1,4 раза ($t = 7,5; df = 7; p < 0,001$) соответственно. У белых мышей II опытной группы установлено увеличение площади белой пульпы в 1,7 раза ($t = 15,3; df = 7; p < 0,001$) и реактивного центра – в 2,2 раза ($t = 7,6; df = 7; p < 0,001$) по сравнению с контрольной группой (табл. 1).

В селезенке животных опытных групп в мантийной зоне регистрируется пролиферация лимфоцитов, в краевой зоне и тяжах красной пульпы – наличие плазматических клеток.

В брыжеечном лимфатическом узле белых мышей I опытной группы, начиная с 7-х суток исследования, отмечено уменьшение площади фолликулов и реактивного центра, однако эти показатели выше, чем в контроле, в 2,4 ($t = 3,6; df = 7; p < 0,01$) и 5,0 раз ($t = 4,8; df = 7; p < 0,01$) соответственно

Таблица 2

Площадь структурных компонентов кортикальной зоны брыжеечных лимфатических узлов экспериментальных животных ($M \pm m$, мкм)

Препарат	Зоны	Сроки наблюдения, сутки			
		3-и	7-е	14-е	21-е
Контроль	Мантийная	1,50 ± 0,30	1,59 ± 0,18	1,60 ± 0,20	1,70 ± 0,10
	Реактивный центр	0,10 ± 0,01	0,12 ± 0,02	0,10 ± 0,03	0,10 ± 0,04
	Площадь фолликула	1,60 ± 0,45	1,71 ± 0,56	1,70 ± 0,41	1,80 ± 0,71
КоАГ (I группа)	Мантийная	4,10 ± 0,38**	3,10 ± 0,20**	3,20 ± 0,30**	2,03 ± 0,15
	Реактивный центр	0,80 ± 0,05***	0,60 ± 0,10**	0,40 ± 0,02**	0,11 ± 0,03
	Площадь фолликула	5,90 ± 0,70***	4,20 ± 0,42**	3,60 ± 0,11**	2,14 ± 0,23
КоАГ (II группа)	Мантийная	1,52 ± 0,21	1,70 ± 0,11	1,63 ± 0,22	1,72 ± 0,10
	Реактивный центр	0,11 ± 0,03	0,20 ± 0,03*	0,10 ± 0,04	0,10 ± 0,05
	Площадь фолликула	1,63 ± 0,46	1,86 ± 0,48	1,73 ± 0,40	1,82 ± 0,73

Примечание: I группа – животным вводили КоАГ перорально; II группа – животным вводили КоАГ парентерально; * – $p < 0,05$; ** – $p < 0,01$; *** – $p < 0,001$ – статистическая значимость различий по отношению к контролю.

Таблица 3

Площадь структурных компонентов кортикальной зоны паховых лимфатических узлов экспериментальных животных ($M \pm m$, мкм)

Препарат	Зоны	Сроки наблюдения, сутки			
		3-и	7-е	14-е	21-е
Контроль	Мантийная	1,48 ± 0,12	1,45 ± 0,12	1,42 ± 0,10	1,44 ± 0,14
	Реактивный центр	0,09 ± 0,01	0,10 ± 0,03	0,08 ± 0,01	0,09 ± 0,03
	Площадь фолликула	1,58 ± 0,13	1,55 ± 0,10	1,50 ± 0,15	1,53 ± 0,16
КоАГ (I группа)	Мантийная	1,50 ± 0,18	1,49 ± 0,14	1,49 ± 0,14	1,47 ± 0,12
	Реактивный центр	0,12 ± 0,04	0,11 ± 0,05	0,10 ± 0,01	0,08 ± 0,03
	Площадь фолликула	1,62 ± 0,17	1,60 ± 0,17	1,59 ± 0,10	1,55 ± 0,10
КоАГ (II группа)	Мантийная	4,08 ± 0,31*	3,06 ± 0,21***	2,03 ± 0,21*	2,51 ± 0,09
	Реактивный центр	0,97 ± 0,24***	2,87 ± 0,17***	2,04 ± 0,18***	0,11 ± 0,12
	Площадь фолликула	4,32 ± 0,11***	5,93 ± 0,12***	5,07 ± 0,31***	2,62 ± 0,32*

Примечание: I группа – животным вводили КоАГ перорально; II группа – животным вводили КоАГ парентерально; * – $p < 0,05$; ** – $p < 0,01$; *** – $p < 0,001$ – статистическая значимость различий по отношению к контролю.

(табл. 2). У животных, получавших КоАГ парентерально, в регионарных лимфатических узлах имеет место максимальное увеличение площади фолликулов и реактивных центров (табл. 3) по отношению к показателям интактных животных в 3,8 ($t = 29,2$; $df = 7$; $p < 0,001$) и 28,7 раза ($t = 13,8$; $df = 7$; $p < 0,001$).

На 14–21-е сутки у животных I и II опытных групп при вскрытии видимых изменений не выявлено.

При морфометрическом исследовании иммунокомпетентных органов установлено, что на 14-е сутки площадь белой пульпы селезенки белых мышей II опытной группы в 1,4 раза ($t = 9,2$; $df = 7$; $p < 0,001$), а площадь реактивного центра – в 1,8 раза ($t = 8,6$; $df = 7$; $p < 0,001$) больше, чем в контроле (табл. 1).

Площадь фолликулов регионарных лимфатических узлов у животных I опытной группы выше контрольных значений в 2,0 раза ($t = 4,7$; $df = 7$; $p < 0,01$), II опытной группы – в 3,4 раза ($t = 12,0$; $df = 7$; $p < 0,001$). Наиболее высокие показатели площади реактивного центра выявлены у животных, получавших КоАГ парентерально, которые в 25,5 раза ($t = 9,8$; $df = 7$; $p < 0,001$) превосходят значения у интактных животных (табл. 2, 3). Данные изменения связаны с перестройкой иммунокомпетентных органов при введении кобальтсодержащего нанобиокомпозиата на основе арабиногалактана и свидетельствуют об избирательном влиянии данного препарата на структурные зоны, принимающие участие в регуляции функционирования органа.

К 21-м суткам показатели снижаются, так, площадь фолликула и реактивного центра селезенки у животных I опытной группы соответствует размерам фолликулов контрольных белых мышей. Однако у животных II опытной группы площадь реактивного центра остается в 1,6 раза выше ($t = 4,6$; $df = 7$; $p < 0,01$), чем в контроле (табл. 1). В регионарных лимфатических узлах значения площади фолликула и реактивного центра у белых мышей, принимавших КоАГ *per os*, снижаются к 21-м суткам до показателей в контроле. У животных II опытной группы имеет место значительное снижение площади фолликула и реактивного центра, но при этом показатели площади фолликула оставались выше, чем у контрольных животных, в 1,7 раза ($t = 2,75$; $df = 7$; $p < 0,05$) (табл. 2, 3).

В отдаленных лимфатических узлах морфологические и гистологические изменения во все сроки наблюдения отсутствуют.

Сведения об авторах

Витязева Светлана Александровна – кандидат медицинских наук, научный сотрудник отдела микробиологии чумы ФКУЗ «Иркутский научно-исследовательский противочумный институт Сибири и Дальнего Востока» Роспотребнадзора (664047, г. Иркутск, ул. Трилиссера, 78; тел.: 8 (3952) 22-01-35, факс: 8 (3952) 22-01-40; e-mail: adm@chumin.irkutsk.ru)

Старовойтова Татьяна Пантелеевна – научный сотрудник лаборатории патофизиологии ФКУЗ «Иркутский научно-исследовательский противочумный институт Сибири и Дальнего Востока» Роспотребнадзора (664047, г. Иркутск, ул. Трилиссера, 78; тел.: 8 (3952) 22-01-35, факс: 8 (3952) 22-01-40)

Дубровина Валентина Ивановна – доктор биологических наук, старший научный сотрудник, зав. лабораторией патофизиологии ФКУЗ «Иркутский научно-исследовательский противочумный институт Сибири и Дальнего Востока» Роспотребнадзора (664047, г. Иркутск, ул. Трилиссера, 78; тел.: 8 (3952) 22-01-35, факс: 8 (3952) 22-01-40)

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

При сравнительном анализе полученных результатов установлено, что иммунологическая перестройка в иммунокомпетентных органах экспериментальных животных при введении кобальтсодержащего нанобиокомпозиата на основе арабиногалактана *per os* регистрируется на ранних сроках наблюдения (3–7-е сутки) в отличие от парентерального применения, где отмечена более выраженная ответная реакция организма на 7–14-е сутки, с последующим снижением показателей к 21-м суткам.

Изменения микроанатомической организации (увеличение площади фолликула и реактивного центра), а также появление пиронинофильных и бластных форм клеток в селезенке и регионарных лимфатических узлах экспериментальных животных также свидетельствуют о влиянии КоАГ на иммунную перестройку организма.

ЛИТЕРАТУРА

1. Витязева С.А. Закономерности формирования иммунного ответа макроорганизма на введение *Yersinia pestis* EV с иммуномодуляторами: Автореф. дис. ... канд. мед. наук: 14.00.16. – Иркутск, 2009. – 22 с.

2. Влияние арабиногалактана и его производных на функциональную активность макрофагов / В.И. Дубровина [и др.] // Ж. инфекционной патологии. – 2003. – Т. 10, № 4. – С. 42–43.

3. Медведева С.А., Александрова Г.П., Сайботалов М.Ю. Арабиногалактан лиственницы сибирской – природный иммуномодулятор // 5-й междунар. съезд «Актуальные проблемы создания новых лекарственных препаратов природного происхождения». – СПб., 2001. – С. 104–105.

4. Меркулов Г.А. Курс патогистологической техники. – Л.: Медицина, 1969. – 423 с.

5. Нанобиокомпозиаты медицинского назначения на основе арабиногалактана / Г.П. Александрова [и др.] // Фундаментальная наука в интересах развития химической и химико-фармацевтической промышленности: Матер. II конф. – Пермь, 2004. – С. 94–95.

6. Полиальдегид арабиногалактана, повышающий иммунный статус организма / Г.П. Александрова [и др.] // новые лекарственные средства: успехи и перспективы. – Уфа: Гилем, 2005. – С. 178–181.

7. Структура и иммуномодулирующее действие арабиногалактана лиственницы сибирской и его металлопроизводных / В.И. Дубровина [и др.]. – Иркутск: Аспринт, 2007. – 145 с.