

слюны и слюнных желез крыс в постнатальном онтогенезе / Р. Д. Барабаш, А. П. Левицкий // БЭБИМ. — 1973. — № 8. — С. 65-67.

10. *Гирин С. В.* Модификация метода определения активности каталазы в биохимических субстратах / С. В. Гирин // Лабораторная диагностика. — 1999. — № 4. — С. 45-46.

11. *Гаврикова Л. М.* Уреазная активность ротовой жидкости у больных

с острой одонтогенной инфекцией челюстно-лицевой области / Л. М. Гаврикова, И. Т. Сегень // Стоматология. — 1996. — Спец. вып. — С. 49-50.

12. *Левицкий А. П.* Лизоцим вместо антибиотиков / А. П. Левицкий. — Одесса : КП ОГТ, 2005. — 74 с.

13. *Protein measurement with Folin phenol reagent* / O. H. Lowry, N. J. Rosebrough, A. Z. Farr [et al.] // J. Biol. Chem. — 1951. — Vol. 193. — P. 265-275.

14. *Антиоксидантно-прооксидантный* индекс сыворотки крови щурів з експериментальним стоматитом і його корекція зубними еліксирами / А. П. Левицкий, В. М. Почтар, О. А. Макаренко [та ін.] // Одеський медичний журнал. — 2006. — № 6. — С. 22-25.

15. *Ферментативный* метод определения дисбиоза полости рта для скрининга про- и пребиотиков : метод. рекомендации / сост. : А. П. Левицкий [и др.]. — К. : ГФЦ, 2007. — 22 с.

УДК 616.36-002.12-099-06:616.438-001

О. В. Сивоконюк, А. И. Даниленко

ПАТОМОРФОЛОГИЧЕСКИЕ ОСОБЕННОСТИ ТИМУСА ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫХ ЖИВОТНЫХ ПРИ ОСТРОМ ТОКСИЧЕСКОМ ГЕПАТИТЕ

Одесский государственный медицинский университет

Признание существенной роли иммунных механизмов в патогенезе большинства заболеваний печени, стремительное развитие экспериментальной и клинической иммунологии определили необходимость формирования новой медицинской дисциплины, задача которой заключается в разработке фармакологической регуляции нарушенных функций иммунной системы с применением различных средств [1].

В связи с тем, что при патологии печени существенно изменяются иммунные процессы, немаловажным является наличие иммуномодулирующих свойств у гепатопротекторов, что приводит к лучшему лечебному эффекту [2].

Гепатопротекторы улучшают функциональное состояние печени и ее дезинтоксикационную функцию, способствуют сохранению и восстановлению структуры гепатоцитов и их высокой функциональной активности [3]. Эти препараты приобрели особое значение, поскольку сегодня заболевания печени очень распространены. И это связано не только с повреждающим действием отдельных лекарственных препаратов на гепатоциты, но и с неправильным питанием и чрез-

мерным употреблением алкоголя, а также в связи с возросшим уровнем заболеваний вирусными гепатитами [4–6].

Таким образом, фармакотерапия болезней печени требует осторожного и корректного выбора лекарственных средств, и нормализация иммунологических функций — необходимое условие для эффективного лечения данных заболеваний.

Цель настоящей работы — исследование динамики иммуногистохимических особенностей основных популяций иммунных клеток, располагающихся в тимусе, а также степень выраженности апоптоза при курсовом введении гептрала в дозе 20 мг/кг в условиях острого химического повреждения печени CCl_4 . В связи с тем, что пик морфогистохимических изменений приходится на 3-и сутки острого токсического гепатита (ОТГ), этот временной промежуток был избран нами для исследований, результаты которых изложены в данной работе.

Материалы и методы исследования

Опыты проводили на 126 белых крысах линии Вистар массой 180–250 г. Животных

содержали на стандартном рационе вивария в условиях свободного передвижения и доступа к воде. Работу с лабораторными крысами выполняли с соблюдением общепринятых нормативных и биолого-этических требований [7].

Были сформированы следующие опытные группы:

а) интактные животные (контроль);

б) крысы с ОТГ;

в) животные с курсовым введением гептрала внутрибрюшинно в дозе 20 мг/кг в условиях ОТГ.

Острый токсический гепатит вызывали однократным внутрижелудочным введением 50%-го масляного раствора CCl_4 в дозе 5 мл/1000 г. Животных выводили из эксперимента на 3-и сутки путем декапитации под легким эфирным наркозом. После фиксации в 10%-м растворе нейтрального формалина и спиртовой проводки кусочки тимуса заливали в целлоидин-парафин, изготавливали срезы толщиной 5-6 мкм. Срезы окрашивали гематоксилином и эозином, пикрофуксином по ван Гизону. Иммуногистохимическое исследование выполняли на парафиновых срезах непрямым методом Кунса по методике Brosman (1979). Им-



мунные клетки дифференцировали с помощью крысиных моноклональных антител к различным типам клеток фирмы Serotec. Применяли следующие маркеры: CD95⁺, CD8⁺, CD4⁺, CD3⁺, CD45RA⁺, ED1⁺, IgA, IgM, IgG, C3-фракцию комплемента. В качестве люминесцентной метки использовали F(ab)-2 — фрагменты кроличьих антител против иммуноглобулинов мыши, меченных ФИТЦ. Препараты изучали в люминесцентном микроскопе МЛ-2 с применением светофильтров ФС-1-2, СЗС-24, БС-8-2, УФС-6-3. Относительные объемы основных клонов иммунных клеток определяли с помощью сетки Г. Г. Автандилова [8] в люминесцентном микроскопе.

Апоптозный индекс рассчитывали по формуле:

среднее количество клеток в поле зрения $\times 400 - 100 \%$;

среднее количество клеток, экспрессирующих рецепторы CD95⁺ в поле зрения $\times 400 - X$;

$X = \text{среднее количество клеток, экспрессирующих рецепторы CD95}^+ \text{ в поле зрения} \times 400 \times 100 : \text{среднее количество клеток в поле зрения} \times 400.$

Статистическую обработку цифровых данных проводили методом дисперсионного анализа с применением непараметрического критерия Вилкоксона. Описательная статистика приведена в виде медианы и значений первого и третьего квартилей. Нулевую гипотезу принимали при $P < 0,05$.

Результаты исследований и их обсуждение

Оценка иммуногистохимических показателей местных иммунных реакций проводилась в период максимального повреждения печени. В этой группе наблюдений таким сроком являются 3-и сутки.

При ОТГ в центральном органе иммуногенеза — тимусе — развивается акцидентальная трансформация (АТ), что опре-

деляется в современной литературе как нормальная реакция тимуса в ответ на антигенное воздействие [9]. Этот процесс в органе — закономерный ответ, имеющий стереотипный фазовый характер, отражающий функциональную активность структурных элементов вилочковой железы. Акцидентальная трансформация возникает при различных стрессовых воздействиях, при голодании, рентгеновском облучении, под влиянием лекарственных, в частности гормональных и цитостатических, препаратов. Однако чаще всего она наблюдается при инфекционных заболеваниях, гемобластозах и злокачественных опухолях у детей.

Основным структурным отличием АТ от возрастной инволюции является уменьшение долек вилочковой железы, а соответственно и массы органа за счет потери лимфоцитов корковой зоны с последующим коллапсом органа. Известно, что в процессе развития АТ условно можно выделить пять основных фаз, отражающих динамику процесса [9].

Первая фаза соответствует пролиферации лимфобластов и макрофагов с появлением так называемой картины звездного неба в ответ на антигенную стимуляцию. Масса органа при этом увеличивается незначительно, что связано с быстрой сменой пролиферативного процесса, потерей лимфоцитов из корковой зоны. Вторая фаза характеризуется гнездной потерей лимфоцитов коркового слоя, налипанием их на макрофаги и последующим фагоцитозом. При этом не исключается потеря лимфоцитов вследствие их миграции в общий кровоток. Третья фаза характеризуется дальнейшей потерей лимфоцитов из коркового слоя, что приводит к начинающемуся коллапсированию ретикулярной сети долек. При этом возникает инверсия слоев — мозговое вещество окazuje богаче лимфоцитами, чем корковое, и поэтому при окраске гематоксилином и

эозином выглядит темнее. Ретикулоэпителий заметно активизируется, что выражается в новообразовании большого количества мелких тимических телец (телец Гассалы), располагающихся не только в мозговом, но и в корковом слое. В просвете некоторых телец отмечаются погибающие лимфоциты в стадии рексиса. В четвертой фазе коллапс долек нарастает, деление на корковый и мозговой слой становится неразличимым вследствие потери лимфоцитов в мозговом слое и дальнейшего коллапса коркового слоя. Тимические тельца сливаются, образуя крупные кистозно-расширенные образования, содержащие бледно окрашенный белковый секрет с чешуйчатыми сферическими включениями и ядерный детрит. Пятая фаза соответствует приобретенной атрофии органа. Дольки вилочковой железы резко коллабириваны, иногда приобретают вид узких тяжей, соединительно-тканые перегородки расширены, часто отечны. Лимфоцитов мало, дольки состоят преимущественно из ретикулоэпителия с вытянутыми гиперхромными ядрами. Часто можно наблюдать переход одной фазы в другую, так как не бывает строгих морфологических границ между отдельными фазами процесса.

В ходе эксперимента первые три фазы формируются в 1-е сутки. Уже ко 2-м суткам у большинства животных контрольной группы в тимусе отмечается четвертая фаза АТ, что свидетельствует о сильном антигенном воздействии. Общеизвестным является тот факт, что неустранение влияния антигена в дальнейшем неизбежно приведет к развитию пятой фазы АТ тимуса, проявляющейся коллапсом долек тимуса, атрофией лимфоидного компонента и склерозом [9].

У животных контрольной группы к 10-м суткам развивалась пятая фаза АТ. При использовании гепатопротектора гептрала в тимусе также развивается АТ, четвертая фаза которой регистрируется на 2-е сутки.



Согласно нашим данным, интересен тот факт, что уже с 5-х суток начинается восстановление лимфоидной популяции тимуса животных данной группы, и ни в одном из наблюдений к 10-м суткам развитие пятой фазы АТ не отмечалось. По-видимому, вышеуказанный препарат, уменьшая степень выраженности альтеративных изменений в печени, снижает уровень антигенного воздействия и модулирует иммунный ответ. Последнее подтверждается результатами иммуногистохимических исследований, позволивших в сравнении оценить основные популяции иммунных клеток тимуса животных контрольной группы, группы токсического гепатита и группы с использованием гептрала.

Обнаружено, что в тимусах здоровых животных преобладала популяция CD3⁺-лимфоцитов, представляющих собой общую популяцию преимущественно зрелых Т-лимфоцитов. При ОТГ и в группе с использованием гепатопротектора, несмотря на дефицит лимфоидной популяции, преобладающей популяцией остаются CD3⁺. Среди тимоцитов в коре и мозговом веществе тимусов всех животных, независимо от групповой принадлежности, отмечались как CD4⁺-хелперы/индукторы, так и CD8⁺-супрессоры/цитостатики. Согласно данной литературе, соотношение этих клеток (CD4⁺/CD8⁺), называемое также хелперно-супрессорным индексом, в нормальных

тимусах колеблется в пределах 1,5–2,0. В группе интактных животных нашего эксперимента это соотношение составляет 1,8, что совпадает с современными представлениями нормы.

В нормальном тимусе популяция В-лимфоцитов представлена слабо, также как и плазмобласты, продуцирующие иммуноглобулины (М, А, G и др.). Большинство авторов считают, что эти клетки гематогенного происхождения [10]. При ОТГ количество В-лимфоцитов повышается, что является гуморальным ответом на антигенную стимуляцию. При лечении их становится больше и, по-видимому, это индивидуальный ответ на антиген плюс влияние гепатопротектора.

В результате проведенных нами исследований в группе токсического гепатита обнаружено увеличение популяции клеток, экспрессирующих рецепторы к ED1⁺. Это во многом обусловлено миграцией макрофагов из крови в тимус в условиях усиленного апоптоза тимоцитов. Последнее подтверждается анализом апоптозного индекса, который составил (32,0±3,6) % и достоверно превысил контрольный показатель (апоптозный индекс тимоцитов в группе контроля составил (23,0±2,5) %).

Согласно данным экспериментальных исследований, показатель апоптозного индекса в тимусе в норме колеблется от 25 до 29 % [11; 12]. В целом резуль-

таты наших исследований соответствуют вышеприведенным.

Как и в группе токсического гепатита, в тимусе животных на фоне введения гептрала выявляется дефицит Т-лимфоцитов в обеих зонах, что приводит к стертости границы между корой и мозговым веществом. Преобладающей популяцией оказались Т-лимфоциты (CD3⁺). В коре и мозговом веществе обнаружены как CD4⁺-Т-хелперы, так и CD8⁺-Т-супрессоры. Несмотря на одну и ту же стадию АТ, а именно четвертую, иммуногистохимическое исследование выявило некоторые особенности в тимусах этой группы по сравнению с группой токсического гепатита. Анализ относительных объемов основных популяций иммунных клеток тимуса свидетельствует о том, что в этой группе среди Т-лимфоцитов относительно меньше CD8⁺-Т-супрессоров и больше CD4⁺-Т-хелперов, в связи с чем хелперно-супрессорное соотношение выше такового при токсическом гепатите (таблица).

Соотношение CD4⁺/CD8⁺ (хелперно-супрессорный индекс) составило 2,4, тогда как при токсическом гепатите оно равно 1,2 (контрольный показатель 1,8).

Как и в предыдущих группах наблюдения, кроме Т-лимфоцитов, в обеих зонах долек тимуса отмечались клетки, экспрессирующие рецепторы к ED1⁺ (макрофаги и естественные киллеры), а также В-лимфоци-

Таблица

Относительные объемы основных популяций иммунных клеток в тимусе при токсическом гепатите на фоне применения гептрала (Ме (25 %; 75 %))

Группа	Отдельные субпопуляции Т-лимфоцитов			ED1 ⁺	CD45RA ⁺	Отдельные субпопуляции клеток-продуцентов иммуноглобулинов		
	CD3 ⁺	CD4 ⁺	CD8 ⁺			IgM	IgG	С3-фракция комплемента
Контроль	82 (55,5; 100,0)	65 (46,0; 79,5)	35 (22; 47)	10 (6; 14)	4 (2,5; 6,0)	2,5 (1,5; 3,0)	1,0 (1,0; 2,0)	—
ОТГ	50 (32; 69)*	55 (41; 69)*	45 (33; 57)*	27 (22; 33)*	13 (9; 17)**	3,5 (2,5; 4,5)	4,5 (3,5; 5,0)*	1,0 (1,0; 2,0)
Гептрал	58 (52; 64)*	60 (55; 66)	24 (21; 27)*	21 (18; 24)*	18 (13; 23)**	4,0 (3,8; 4,6)	4,5 (4,0; 5,5)*	1,0 (1,0; 2,0)

Примечание. * — достоверность различий при P<0,05; ** — достоверность различий при P<0,01.



ты (CD45RA⁺) и клетки-продуценты иммуноглобулинов — IgM и IgG. Макрофаги (ED1⁺) располагались диффузно по всей паренхиме долек тимуса, а В-лимфоциты и плазмобласты располагались преимущественно в периваскулярных пространствах. По сравнению с группой токсического гепатита, несколько увеличилось количество клеток-продуцентов IgM и IgG, а также уменьшилась популяция клеток-продуцентов С3-фракции комплемента. Соотношение CD3⁺/ED1⁺/CD45RA⁺ оказалось равным 3,1 : 1,2 : 1,0 (при токсическом гепатите — 3,8 : 2,0 : 1,0 и в контроле — 20,0 : 2,5 : 1,0). Апоптотный индекс оказался достаточно высоким и составил (27,0±3,0) %.

Таким образом, если гистологическое исследование выявило преимущественно дисциркуляторные нарушения в тимусе, а также идентифицировало стадию акцидентальной трансформации, то иммуногистохимическое исследование позволило обнаружить существенные особенности отдельных популяций иммунных клеток тимуса. Показано, что при использовании гептрала в группе токсического гепатита в тимусе, несмотря на обеднение железы лимфоцитами, значительно повышается, даже по сравнению с контролем, соотношение Т-хелперов и Т-супрессоров, усиливается макрофагальная реакция и увели-

чивается популяция клеток-продуцентов иммуноглобулинов М и G, тогда как клетки, экспрессирующие рецепторы к С3-фракции комплемента, встречаются в единичных экземплярах. Локализация плазмобластов свидетельствует в пользу их гематогенного происхождения.

Выводы

Введение животным гепатопротектора гептрала на фоне острого токсического гепатита при выраженном дисбалансе основных звеньев иммунитета способствует снижению С3-фракции комплемента, увеличению количества Т-хелперов, повышению хелперно-супрессорного индекса, увеличению количества плазмоцитов и приближению апоптотного индекса к нормальному состоянию.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Клінічна імунологія* / Ю. І. Бажора, В. М. Запорожан, В. Й. Кресюн, І. М. Годзієва. — Одеса : ОДМУ, 2000. — 384 с.
2. *Иммунотомулирующие свойства гепатопротекторов растительного происхождения при комбинированном применении с преднизолоном на модели токсического гепатита* / А. И. Венгеровский, Л. М. Огородова, Т. В. Перевозчикова [и др.] // *Растительные ресурсы*. — 2004. — Т. 40, № 2. — С. 107-114.
3. *Дроговоз С. М. Гепатопротекторы — сегодня и завтра в Украине (В помощь врачу, провизору) : методические указания* / С. М. Дроговоз. — 2003. — 12 с.

4. *Ивашкин В. Т. Токсический гепатит, вызванный отравлением суррогатами алкоголя* / В. Т. Ивашкин, А. О. Буеверов // *Российский журнал гастроэнтерологии, гепатологии, колопроктологии*. — 2007. — Т. 17, № 1. — С. 4-8.

5. *Клинико-биохимические особенности токсического гепатита, вызванного отравлениями суррогатами алкоголя* / Д. И. Федосеев, И. И. Коханович, М. М. Сачек [и др.] // *Медицинская панорама*. — 2008. — № 5. — С. 44-46.

6. *Коррекция гепатотоксического действия антибиотиков мукозапротекторами на основе лекарственных растений* / Л. А. Кумышева, С. А. Коростылев, С. Д. Марченко, Р. У. Хабриев // *Фармация*. — 2008. — № 8. — С. 32-34.

7. *Лабораторные животные. Разведение, содержание, использование в эксперименте* / И. П. Западнюк, В. И. Западнюк, Е. А. Захария, Б. В. Западнюк. — К. : Вища школа, 1983. — 383 с.

8. *Автандилов Г. Г. Основы количественной патологической анатомии* / Г. Г. Автандилов. — М. : Медицина, 2002. — 238 с.

9. *Ивановская Т. Е. Структура тимуса и иммунный статус патологического процесса* / Т. Е. Ивановская, Л. П. Катоснова // *Архив патологии*. — 1986. — № 2. — С. 3-9.

10. *Хлыстова З. С. Становление системы иммуногенеза плода человека* / З. С. Хлыстова. — М. : Медицина, 1987. — 255 с.

11. *Фильченко А. А. Апоптоз и рак* / А. А. Фильченко, Р. С. Стойка. — К., 1999. — 152 с.

12. *Thymic nurse cells are sites of thymocyte apoptosis* / L. K. Aguilar, E. Aguilar-Cordova, J. Jr. Cartwright, J. W. Belmont // *Journal of immunology*. — 1994. — Vol. 152, N 6. — P. 2645-2651.

УДК 615.217.2;615.212.314

О. Є. Ядловський

ВПЛИВ КЕТОРОЛАКУ НА РІВЕНЬ МОНОАМІНІВ У ГОЛОВНОМУ МОЗКУ ЩУРІВ ПРИ БОЛЬОВОМУ СИНДРОМІ В ЕКСПЕРИМЕНТІ

ДУ «Інститут фармакології та токсикології АМН України», Київ

Лікування больових синдромів є одним із важливих завдань сучасної медицини [1; 3; 7]. Для лікування болю використовують багато методів, але

одне з центральних місць посідає фармакотерапія. При фармакотерапії болю використовується широкий спектр лікарських засобів (наркотичні

аналгетики, нестероїдні протизапальні засоби, ненаркотичні аналгетики й інші препарати, що безпосередньо не призначені для лікування болю, але

