

# ЭФФЕКТ ВЛИЯНИЯ ИМУНОФАНА НА НАДПОЧЕЧНИКИ И ЩИТОВИДНУЮ ЖЕЛЕЗУ БЕЛЫХ КРЫС ПРИ КОРРЕКЦИИ МЕТОТРЕКСАТ-ИНДУЦИРОВАННОЙ ИММУНОСУПРЕССИИ

Кащенко С.А., Семенчук С.Н., Мосин Д.В., Захаров А.А., Моисеева М.И.

Кафедра гистологии, цитологии и эмбриологии ГУ «ЛГМУ ИМ. СВЯТИТЕЛЯ ЛУКИ»,  
kashchenko\_s@list.ru

## Abstract

### EFFECT OF IMUNOFAN ON THE ADRENAL AND THYROID GLANDS OF WHITE RATS DURING CORRECTION OF METHOTREXATE-INDUCED IMMUNOSUPPRESSION

**Background:** One of the factors affecting the prevalence of endocrine disease is the immunopathological processes, in particular immunosuppression. The aim was to study the morphometric parameters of the adrenal and thyroid glands of rats at joint application of immunosuppressor "Methotrexate" and immunostimulant "Imunofan" at different periods of observation. The experiment was carried out on 60 white rats of young age (reproductive period). The width of various zones of the cortical substance and the area of adrenocorticocytes of these loci and their nuclei were determined in the adrenal glands. The height and area of thyrocytes (their cytoplasm and nuclei) of follicular epithelium were measured in the thyroid gland. Next, the nuclear-cytoplasmic ratio was calculated.

**Results:** Statistically significant deviations of the studied values were revealed mainly on the 7<sup>th</sup>, 15<sup>th</sup> and 30<sup>th</sup> days after the end of the drug administration: at the same time, in the early stages of observation signs of activation of the adrenal function and depression of the thyroid gland were detected. On the 60<sup>th</sup> day of observation the studied parameters were restored or were close to those of the control group.

**Conclusions:** The administration of imunofan as corrector of methotrexate-induced immunosuppression allows to neutralize the negative effect of cytostatic drug on morphometric parameters, which allows us to conclude about the close relationship between the endocrine and immune systems.

**Key words:** adrenal gland, thyroid gland, imunofan, methotrexate, rats.

## Введение

Доля больных с патологией эндокринной системы продолжает неуклонно увеличиваться во всех экономически развитых странах мира. Среди вредных факторов, влияющих на эндокринную систему, выделяют экзо- и эндогенные. Учитывая тесную взаимосвязь эндокринной и иммунной систем, к числу последних стоит отнести различные нарушения иммунологической резистентности организма [5].

За последние 30 лет учеными проведены широкие клинко-иммунологические исследования в условиях крупных промышленных регионов, по итогам которых установлено значительное распространение синдрома экологического иммунодефицита.

В литературе отмечено прогрессирующее ухудшение экологической ситуации нашего региона в результате деятельности угольной и металлургической промышленности [6].

По данным Лисутиной Л.А. с соавт. (2012) к концу 2011 года в Донбассе числилось 146 угрожаемых и 76 опасных по газовыделению зон, в пределах которых расположено около 9 тысяч объектов жизнедеятельности населения [7].

Поиск путей усиления защитных механизмов организма является одной из приоритетных задач современной медицины. Особое место в этом занимают иммуномодулирующие лекарственные средства.

Одним из таких препаратов является имунофан, применение которого показано при иммунодефицитных и токсических состояниях, а также при хронических воспалительных заболеваниях различной этиологии.

## Материал и методы

Эксперимент выполнен на 60 белых беспородных крысах-самцах молодого возраста репродуктивного периода массой 210-240 г.

Животные были разделены на две группы.

Первая – включала в себя животных, получавших однократно метотрексат в дозировке, приводящей к иммуносупрессии (10 мг/м<sup>2</sup> площади тела) с последующим курсовым применением имунофана в дозировке 50 мкг по схеме [4]. Расчет препарата для введения выполнялся с учетом рекомендаций Ю.Р. и Р.С. Рыболовлевых по формуле:

Доза для крысы=(г\*доза для человека)/R,

где г – коэффициент видовой устойчивости для крысы = 3,62; R – для человека = 0,57.

Во вторую группу входили животные, получавшие 0,9% раствор NaCl в эквивалентном объеме. Крыс выводили из эксперимента на 1, 7, 15, 30, 60 сутки.

Забор органов выполнялся в одно и то же время суток с учетом положений Директивы 2010/63/EU Европейского Парламента и Совета Европейского Союза от 22 сентября 2010 года по охране животных, используемых в научных целях (Статья 27) [10].

Гистологические срезы надпочечников, а также щитовидной железы толщиной 5-7 мкм окрашивали гематоксилин-эозином.

Морфометрические параметры измеряли при помощи компьютерного комплекса, включающего цифровой фотоаппарат Olympus SP 500UZ, микроскоп Olympus CX 41. Микрофотографии получали в трех режимах увеличения (10x, 40x, 60x).

Анализ цифровых изображений с последующими микроморфометрическими измерениями объектов осуществляли в компьютерной программе АСКОН «Компас 3D 17.0», используя калибровочный файл, созданный с помощью фотофиксации объект-микрометра в аналогичных режимах съемки.

В щитовидной железе измеряли площадь тироцитов и их ядер, а также высоту фолликулярного эпителия.

В надпочечниках определяли ширину различных зон коркового вещества и площадь адренкортикоцитов данных локусов и их ядер.

Для оценки функционального состояния органов эндокринной системы рассчитывали ядерно-цитоплазматическое отношение по формуле:

ЯЦО = S<sub>я</sub>/S<sub>ц</sub>,

где S<sub>я</sub> — площадь ядра клетки, S<sub>ц</sub> — площадь цитоплазмы.

Полученные цифровые данные обрабатывали с использованием лицензионной программы «StatSoftStatistica v.6.0».

Подчиненность данных нормальному закону распределения проверяли с помощью критерия согласия Шапиро-Уилки.

Достоверность различий между показателями экспериментальной и контрольной групп определяли с помощью критерия Стьюдента-Фишера (p<0,05).

## Результаты

В ходе статистической обработки цифрового материала были получены следующие данные.

**Надпочечник.** Ширина коркового вещества в экспериментальной группе на 15 сутки достоверно возрастала по отношению к контрольным значениям на 2,89%.

Это происходило за счет статистически значимого увеличения изучаемого показателя пучковой зоны на 3,54% в сравнении с этим же параметром контрольной группы.

В дальнейшем, ширина коркового вещества снижалась на 4,76% (30 сут) и 4,13% (60 сут) в сравнении с контролем.

К 30 суткам показатель клубочковой зоны снизился на 2,5%, а пучковой на 6,72%. На 60 сутки различие ширины пучковой зоны составило 5,63% от параметров контрольной группы.

Морфометрические характеристики клеток клубочковой зоны не имели статистически значимых отличий в сравнении с контрольными данными.

Площади кортикоцитов пучковой и сетчатой зон и их ядер претерпевали выраженные изменения. Было отмечено увеличение площади клеток zona fasciculata на 10,05% (15 сут) и их ядер на 10,27% (7 сут) и 11,62% (15 сут). На 30 и 60 сутки наблюдалась обратная тенденция: площадь клеток снижалась на 8,21% и 6,65%, а площади ядер уменьшались на 12,68% и 7,85% соответственно.

Линейные характеристики сетчатой зоны изменялись сходным образом.

Площадь клеток увеличивалась на 2,17% (7 сут) и 7,41% (15 сут), а затем снижалась на 5,51% (30 сут) и 3,86% (60 сут) по отношению к контрольным характеристикам.

Площадь ядер адренокортикоцитов zona reticularis на 15 сутки была достоверно выше у исследуемой группы в сравнении с контролем на 12,1%, а на 30 и 60 сутки уменьшалась на 12,58% и 7,83% соответственно.

Ядерно-цитоплазматическое отношение при изучении надпочечников во все сроки наблюдения не имело достоверных различий и составило: в клубочковой зоне – от  $0,27 \pm 0,017$  до  $0,34 \pm 0,019$ ; пучковой зоне – от  $0,13 \pm 0,005$  до  $0,19 \pm 0,006$ ; сетчатой зоне – от  $0,21 \pm 0,0007$  до  $0,24 \pm 0,003$ .

**Щитовидная железа.** Стенка фолликулов щитовидной железы животных состояла из одного слоя тироцитов кубической формы, высота которых была достоверно ниже параметра в контроле на 7 сутки на 7,10%, а на 15, 30 и 60 сутки – превышала контрольные данные на 6,70%, 10,17% и 5,59% соответственно.

Подобная динамика определялась и при вычислении площади клеток в стенке фолликулов: на 1 и 7 сутки показатель был ниже контрольного на 5,43% и 10,71%, на 15, 30 и 60 сутки изменения носили обратный характер – площадь тироцитов экспериментальной группы превышала таковую в контроле на 3,90%, 10,72% и 4,04% соответственно.

При исследовании тироцитов было установлено, что на 7 и 15 сутки после введения препаратов их ядра уплощались и локализовались в базальной части клеток, зачастую содержали по одному ядрышку.

Площадь ядер на 1 сутки наблюдения была достоверно ниже таковой в контроле на 6,35%, на 7 сутки отклонение возрастало до 15,01%, после чего тенденция изменялась – на 15 и 30 сутки показатель превышал данные в контроле на 8,44% и 17,88%, на 60 сутки различие уменьшалось до 6,15%.

Ядерно-цитоплазматическое отношение тироцитов в экспериментальной группе на 1 сутки наблюдения было ниже такового в контроле на 1,32%, на 7 сутки достоверное отличие составило 6,43%, после чего тенденция изменялась на противоположную – параметр превышал контрольные данные на 15, 30 и 60 сутки на 6,42%, 8,94% и 2,51% соответственно.

По-видимому, введение метотрексата оказывает, с одной стороны, прямой эффект на эндокринные железы за счет ингибирования дигидрофолатредуктазы (приводящей к нарушению синтеза ДНК и других продуктов в клетке).

В надпочечниках это приводит к гиперсекреции с последующим накоплением в адренокортикоцитах холестерина, выступающего в роли субстрата для синтеза глюкокортикоидов.

В щитовидной железе это приводит к снижению ее функции, что проявляется уменьшением её гистометрических параметров.

С другой стороны, выявляется опосредованный эффект, развивающийся в результате иммуносупрессии.

Угнетение иммунитета приводит к сдвигам в системе гипоталамо-гипофизарно-адреналовой и -тироидных осей, направленным на адаптацию организма к указанному воздействию.

По результатам исследования И.В. Бобрышевой [1, 2] имунофан вызывает структурную перестройку и активацию тиреотропоцитов аденогипофиза начиная с седьмых суток после введения препарата.

Автор показала наличие тесной положительной корреляционной взаимосвязи между

морфометрическими показателями тиреотропных эндокриноцитов аденогипофиза, тимуса и белой пульпы селезенки белых беспородных крыс.

Нормализация морфометрических показателей в поздние сроки наблюдения (30 и 60 суток), вероятно, связана со способностью иммунофана восстанавливать баланс окислительно-восстановительных реакций, а также в медленную фазу действия (продолжительность до 4 мес.) влиять на состояние иммунной системы.

Способность иммунофана регулировать нарушенные показатели Т-системы иммунитета была доказана клиническими исследованиями.

А.А. Свистунов с соавт. (2005) установили, что при использовании иммунофана у больных псориазом происходит нормализация содержания в крови CD3, CD4, CD8 лимфоцитов, а также ИЛ-8 и наступает снижение уровня ЦИК [9].

Выявлены положительные эффекты применения иммунофана в терапии язвенной болезни желудка: повышение содержания Т-хелперов, цитотоксических Т-лимфоцитов, уменьшение сроков купирования боли и рубцевания язвы по сравнению с больными, получавшими только базисную противоязвенную терапию [3].

А на фоне иммунодефицитного состояния иммунофан способен восстанавливать продукцию тимического гормона тимулина [8].

## Заключение

Таким образом, комплексное изучение морфологической организации надпочечников и щитовидной железы с использованием современных методик позволило установить выраженные изменения морфофункционального состояния органов после комбинированного применения метотрексата и иммунофана, на что указывает динамика изученных параметров.

## Литература

1. Бобрышева И.В. Взаимосвязь аденогипофиза с органами иммунной системы белых крыс на фоне иммуностимуляции по данным корреляционного анализа / И.В. Бобрышева // Крымский журнал экспериментальной и клинической медицины. – 2016. – Т. 6, № 4. – С. 9-12.
2. Бобрышева И.В. Особенности структурной перестройки тиротропных эндокриноцитов аденогипофиза после экспериментальной иммуностимуляции / И.В. Бобрышева // Морфология. – 2012. – Т. 6, № 4. – С. 22-28.
3. Буторов И.В. Иммунологические и патогенетические аспекты клинического применения иммунофана при язве двенадцатиперстной кишки у лиц пожилого возраста / И.В. Буторов, Ю.П. Осоян, С.И. Буторов // Терапевтический архив. – 2007. – Т. 79, № 2. – С. 18-22.
4. Кащенко С.А. Ультрамикроскопические изменения паращитовидных желез крыс после коррекции циклофосфаниндуцированной иммуносупрессии иммунофаном / С.А. Кащенко, В.В. Ерохина // Український морфологічний альманах. – 2014. – Т. 12, № 1. – С. 61-64.
5. Ланин Д.В. Нейроэндокринные механизмы регуляции функций иммунной системы / Д.В. Ланин // Успехи современной биологии. – 2011. – Т. 131, № 2. – С. 122-134.
6. Лень Д.Ф. Проблемы экологии Донбасса и пути их решения / ДФ Лень, С.В. Громов, В.А. Кириченко // Донбасс будущего глазами молодых ученых, г. Донецк, 20 ноября 2018 г.–Донецк: ДонНТУ, 2018.–264 с. – 2018. – С. 121.
7. Лисутина Л.А. Оценка состояния природных объектов Восточного Донбасса /Л.А. Лисутина, Л.З. Ганичева, А.В. Павлов // Инженерный вестник Дона. – 2012. – Т. 21, № 3. – С.833-835.
8. Меркулова Л.М. Иммунофан как корректор морфофункциональных изменений в тимусе, вызванных циклофосфаном / Л.М. Меркулова, Г.Ю. Стручко // Вестник Чувашского университета. – 2003. – № 2 – С. 93-101.
9. Свистунов А.А. О влиянии иммунофана на показатели системы иммунитета и эндотоксикоза у больных псориазом / А.А. Свистунов, С.С. Кравченя, А.Л. Бакулев // Казанский медицинский журнал. – 2005. – Т. 86, № 4. – С. 344-345.
10. Directive 2010/63/EU of the European Parliament and of the Council of 22 September 2010 on the protection of animals used for scientific purposes. Text with EEA relevance // Official Journal of the European Union. – Vol. 53 – P. 33-79.