

РОССИЙСКАЯ АКАДЕМИЯ МЕДИЦИНСКИХ НАУК
СИБИРСКОЕ ОТДЕЛЕНИЕ

УЧРЕЖДЕНИЕ РОССИЙСКОЙ АКАДЕМИИ МЕДИЦИНСКИХ НАУК
Научно-исследовательский институт
клинической и экспериментальной лимфологии

(НИИКЭЛ СО РАМН)

630117, Новосибирск, ул. Тимакова, 2
телефон (383) 333-64-09
тел./факс (383) 332-95-31, (383) 333-51-22
E-mail:lymphology@soramn.ru

ОКПО 11821929 ОГРН 1025403643550
ИНН 5408106387 КПП 540801001

От _____ № _____
На № _____ от _____

“УТВЕРЖДАЮ”

Директор Учреждения Российской
Академии Медицинских Наук Научно-
исследовательского института
клинической и экспериментальной
лимфологии НИИКЭЛ СО РАМН, академик РАМН,
профессор



В.И. Коненков
2010г.

Отчет

по договору № Н/01/482_от "21"_апреля_2010_ г. с ООО «Сибирский центр
фармакологии и биотехнологии»

по теме: «Исследование лимфоидных органов и крови в старческом периоде
онтогенеза и при геропротекции»

Новосибирск – 2010 г.

В лаборатории общей патологии и физиологии лимфатической системы Отдела профилактической и экологической лимфологии НИИКЭЛ СО РАМН проводилась экспериментальная работа, целью которой являлось – изучение биохимических параметров крови, отражающих состояние липидного и углеводного обменов организма, минерального обмена и гормонального (тестостерон) статуса, исследование структурной организации лимфоидных органов у экспериментальных животных мужского пола в старческом периоде онтогенеза (18-20 мес.) и в условиях в условиях геропротекции (энтеральное введение комплекса иммобилизованных на ПЭГ 1500 олигонуклеотидов - ОГН).

Объекты и методы исследования

А) Исследуемые животные:

Для исследования в качестве экспериментального животного были выбраны крысы-самцы популяции Wistar с массой тела 280-300 г. в возрасте 4 и 18-20 месяцев.

Исследование проводилось в осенний период, при этом учитывался ритм общебиологических процессов (Летягин А.Ю., 1984). Контрольные и опытные животные одного возраста были получены из питомника «Рассвет» г. Томск. Животные содержались в виварии в одинаковых условиях на стандартном рационе. Все эксперименты выполнены в соответствии с «Правилами проведения работ с использованием экспериментальных животных», утвержденными приказом Минздрава СССР №577 от 12.08.77 г.

Эксперименты выполнены с соблюдением принципов гуманности, изложенных в директиве Европейского Сообщества (86/609/ЕС).

В качестве объектов исследования после эвтаназии под эфирным наркозом с последующей аутопсии были взяты вилочковая железа (тимус),

брыжеечные лимфатические узлы, было проведено биохимическое исследования сыворотки периферической крови крыс.

Распределение животных по группам, а также их количество указано в табл.1.

№	Группы	Количество животных
1	Интактные животные (крысы-самцы в возрасте 4 мес.), – виварий НИИКЭЛ СО РАМН.	15
2	Интактные животные (крысы-самцы в возрасте 18-20 мес.), (контрольная группа) – виварий НИИКЭЛ СО РАМН.	15
3	Интактные животные (крысы-самцы в возрасте 18-20 мес.) с энтеральным введением комплекса иммобилизованных на ПЭГ 1500 олигонуклеотидов (курс 21 сутки), забор экспериментального материала на следующие сутки после окончания курса коррекции.	15
4	Интактные животные (крысы-самцы в возрасте 18-20 мес.) с энтеральным введением комплекса иммобилизованных на ПЭГ 1500 олигонуклеотидов (курс 21 сутки), забор экспериментального материала через 1 месяц после окончания курса коррекции.	15

Всего: 60 животных

Б) Методика забора и обработки материала для исследования

1. Материал для исследования забирали в специальной экспериментальной операционной, в которой имеется все необходимое оборудование (стол, бестеневая лампа, автоклав и др.).

2. Методика забора периферической крови и центральной лимфы.

Забор периферической крови производили по известной методике из хвостовой вены крысы прижизненно (Западнюк И.П. с соав.,1983), под эфирным наркозом. Кровь центрифугировали при 1500 об/мин. в течение 15-

20 минут. Затем с помощью пипетки с переменным объемом собирали сыворотку в эпиндорфы и замораживали ее при $t^{\circ} = -20^{\circ}\text{C}$.

4. Биохимическое исследование сыворотки крови. Анализы сыворотки крови производились с помощью лабораторной системы– фотометрического биохимического анализатора VM/Hitachi 917 Rack (Япония). Выполняли следующие исследования: определение холестерина в сыворотке крови; определение β -липопротеидов в сыворотке крови; определение содержания триглицеридов в сыворотке крови; определение содержания глюкозы в сыворотке крови; определение содержания Ca, Mg в сыворотке крови.

5. Определение содержания тестостерона в сыворотке крови

В сыворотке крови методом иммуноферментного анализа с помощью многоканального фотометра "Multiskan MCC-340" ("Labsystems", Финляндия) определяли содержание общего тестостерона.

6. Структурное исследование тимуса и брыжеечных лимфатических узлов.

Для гистологических исследований брали брыжеечные лимфатические узлы и тимус. После декапитации животных (под эфирным наркозом) материал фиксировали в растворе по Теллесницкому (100 мл - 70% этилового спирта, 5 мл - концентрированной уксусной кислоты, 5 мл - 40% раствора формальдегида). В фиксаторе забранный материал находился в течение 20 часов, затем его перекладывали в 1-й раствор 70% этилового спирта. Раствор 70% этилового спирта меняли три раза, через сутки. Далее гистологический материал проводили по общепринятой методике. Органы заливали в парафиновые блоки с 5-6% добавлением чистого воска. С помощью ротационного микротомы готовили парафиновые срезы толщиной 5-7 мкм, проведенные через длинную ось лимфатических узлов и тимуса. Срезы окрашивали гематоксилином-эозином по Майеру и азурII - эозином по Нохт-Максимову (Волкова О. В., Елецкий Ю. К., 1971; Микроскопическая

техника: руководство под ред. Саркисова Д.С., Перова Ю.Л., 1996). Окрашенные препараты заключали в пихтовый бальзам и накрывали покровным стеклом.

Для проведения морфометрических исследований использовали основной принцип стереологии, математическое обоснование и способы, используемые в гистологии и патоморфологии, предложенные рядом авторов (Автандилов Г. Г., 1973, 1990; Непомнящих Л. М. с соавт., 1981, 1986; Бородин Ю. И., Григорьев В. Н., 1986, Саркисов Д.С., Перов Ю.Л., 1996).

Для морфометрии структурно-функциональных зон лимфоидных органов готовили срезы 7 мкм, а для цитологического исследования - 5 мкм. Площадь сечения структурных компонентов измеряли: используя принципы стереометрии и метод наложения точечных морфометрических сеток (А.А.Глаголев, 1941; С.Б.Стефанов, 1985). Подсчитывали абсолютное количество клеток при помощи окулярной сетки площадью 2025 мкм². В тимусе определяли площадь всего среза и составляющих его структур: корковое и мозговое вещество, соединительнотканые перегородки и капсула. Клеточный состав зон тимуса подсчитывался (Г.Г. Аминова, 1987) в трех структурно-функциональных зонах: центральное корковое вещество, кортико-медуллярная зона, центральное мозговое вещество.

На основании данных морфометрии исследовали относительные площади структурных компонентов лимфатических узлов на гистологических срезах: капсула, краевого и мозговых синусов, первичных и вторичных лимфоидных узелков, центров размножения, паракортикальной (Т-зависимая зона) зоны и мозговых тяжей. Рассчитывали отношение относительной площади коркового вещества к абсолютной площади мозгового вещества (индекс к/м) (Бородин Ю. И., 1969).

Выделение структурных компонентов и клеточных элементов лимфоидной паренхимы в лимфатических узлах проводили согласно Международной гистологической номенклатуре под редакцией Ю. И.

Афанасьева (1987). При определении класса лимфоцитов пользовались классификацией М. Р. Сапина с соавт. (1988).

Результаты полученных морфометрических и цитологических исследований обрабатывали приемами вариационной статистики с использованием критерия Фишера - Стьюдента (Лакин Г.Ф., 1990). При сравнении средних величин учитывали вариабельность первично измеряемых объектов и индивидуальную изменчивость (Потапова И.Г. и др., 1983). Вероятность различий между группами данных считалась достоверной при значениях $P < 0,05$. Статистическая обработка данных проводилась на компьютере Pentium в среде Windows с использованием пакета статистических программ Microsoft Excel.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

1). Биохимические исследования сыворотки крови

А) Холестерин сыворотки крови.

По литературным данным у взрослых крыс холестерин сыворотки крови колеблется от 1,3 до 2,1 ммоль/л. Результаты наших исследований показали, что концентрация холестерина в сыворотке у интактных половозрелых животных (самцы 3-4 месяца) составляет $1,5 \pm 0,08$ ммоль/л, в контрольной группе (самцы в возрасте 19 месяцев) составляет $1,42 \pm 0,06$ ммоль/л. Сравнительный анализ проводили с собственным результатам (контрольная группа животных).

В группе животных старческого возраста (19 месяцев), с энтеральным введением ОГН (курс 21 сутки) содержание холестерина через 1 сутки после окончания курса коррекции по сравнению с контролем достоверно не изменялось ($1,48 \pm 0,07$ ммоль/л). В группе животных (19 месяцев), с энтеральным введением ОГН (курс 21 сутки) содержание холестерина через 30 дней после окончания курса коррекции уменьшается на 16.5% ($1,2 \pm 0,08$ ммоль/л), по сравнению с контрольными значениями.

Б) В-Липопротеиды (в-ЛП) сыворотки крови.

Липиды, как гидрофобные вещества транспортируются кровью в составе липопротеидов. Их содержание может меняться при патологических состояниях, гиперлипопротеидемия – признак нарушения липидного обмена.

Результаты наших исследований показали, что концентрация β -липопротеидов в сыворотке у животных в группе половозрелых крыс-самцов (3-4 мес.) составляет $2,0 \pm 0,12$ ммоль/л., у контрольной группы (интактные крысы-самцы 19 мес.) – $1,72 \pm 0,08$ ммоль/л. Сравнительный анализ проводили с собственным результатам (контрольная группа животных).

В группе животных, с энтеральным введением ОГН (курс 21 сутки) содержание β -липопротеидов в сыворотке крови через 1 сутки после окончания курса коррекции по сравнению с контролем уменьшается на 64% ($0,8 \pm 0,07$ ммоль/л). В группе животных с энтеральным введением ОГН (курс 21 сутки) содержание β -липопротеидов холестерина через 30 дней после окончания курса коррекции по сравнению с контролем понижено на 42% ($1,0 \pm 0,09$ ммоль/л).

Таким образом, спустя 1 месяц после окончания курса (21 сутки) употребления олигонуклеотидов выявлена тенденция к снижению холестерина и β -липопротеидов.

В). Триглицериды сыворотки крови.

Триглицериды или нейтральные жиры представляют собой сложные эфиры глицерина и трех остатков жирных кислот, чаще всего с 16 или 18 атомами углерода.

Результаты наших исследований показали, что концентрация триглицеридов в сыворотке у половозрелых животных (крысы-самцы 3-4 месяца) составляет $0,81 \pm 0,1$ ммоль/л, в контрольной группе (крысы-самцы 19 месяцев) - $0,98 \pm 0,09$ ммоль/л. Сравнительный анализ проводили с собственными результатами (контрольная группа животных).

В группе животных, с энтеральным введением ОГН (курс 21 сутки) содержание триглицеридов в сыворотке крови через 1 сутки после окончания курса коррекции составляет $1,05 \pm 0,1$ ммоль/л, что практически не отличается от контрольных значений. В группе животных, с энтеральным введением ОГН (курс 21 сутки) содержание триглицеридов через 30 дней после окончания курса коррекции составляет $1,02 \pm 0,11$ ммоль/л, по сравнению с контролем. Результаты свидетельствуют об отсутствии достоверных колебаний содержания триглицеридов при употреблении олигонуклеотидов в старческом возрасте.

Г) Глюкоза крови

По литературным данным уровень глюкозы в сыворотке крови лабораторных крыс варьирует: $6,85 \pm 0,12$ ммоль/л (А.А. Мясников, В.И. Чернов, А.Ю. Шитов с соав., 2007), $7,19 \pm 0,12$ ммоль/л (М.Л.Малинин с оав., 2008). В контрольной группе (крысы-самцы 19 месяцев) наших исследований уровень глюкозы соответствовал $5,95 \pm 0,11$ ммоль/л. Сравнительный анализ проводили с собственными результатами (контрольная группа животных).

В группе животных, с энтеральным введением ОГН (курс 21 сутки) содержание глюкозы в сыворотке крови через 1 сутки после окончания курса коррекции составляет $6,41 \pm 0,13$ ммоль/л, достоверно увеличиваясь в сравнении с контрольными значениями на 8% (при $P < 0,05$). В группе животных, с энтеральным введением ОГН (курс 21 сутки) содержание глюкозы через 30 дней после окончания курса коррекции составляет $5,49 \pm 0,11$ ммоль/л, уменьшаясь по сравнению с контролем на 8%.

Полученные результаты свидетельствуют о маятниковых колебаниях содержания глюкозы в крови при употреблении олигонуклеотидов в старческом возрасте: увеличении уровня содержания в конце курса приема, с уменьшением через 1 месяц после его окончания.

Д) Ca²⁺ и Mg²⁺ в крови

По данным литературы содержание Ca²⁺ в сыворотке крови лабораторных крыс составляет 2,36±0,015 ммоль/л, Mg²⁺ - 0,93±0,018 ммоль/л (А.А. Мясников, В.И. Чернов, А.Ю. Шитов с соав., 2007).). В контрольной группе (крысы-самцы 19 месяцев) наших исследований уровень Ca²⁺ соответствовал 1,88±0,011 ммоль/л, Mg²⁺ - 0,7±0,01 ммоль/л Сравнительный анализ проводили с собственными результатами (контрольная группа животных).

В группе животных, с энтеральным введением ОГН (курс 21 сутки) содержание Ca²⁺ в сыворотке крови через 1 сутки после окончания курса коррекции составляет 1,86±0,1 ммоль/л, Mg²⁺ - 0,71±0,07 ммоль/л, что практически не отличается от контрольных значений. В группе животных, с энтеральным введением ОГН (курс 21 сутки) содержание Ca²⁺ через 30 дней после окончания курса коррекции составляет 1,82±0,02 ммоль/л, Mg²⁺ - 0,67±0,07 ммоль/л по сравнению с контролем. Результаты свидетельствуют об отсутствии достоверных колебаний содержания Ca²⁺ и Mg²⁺ в крови при употреблении олигонуклеотидов в старческом возрасте.

2) Исследование уровня тестостерона

Тестостерон – главный мужской половой гормон, вырабатывается в основном в семенниках в пульсирующем режиме клетками Лейдига в ответ на пульсирующую секрецию ЛГ, а также в яичниках (у женщин), надпочечниках, печени и коже (внегонадный тестостерон). Как и многие гормоны стероидного происхождения, большая часть тестостерон находится в крови в связанном состоянии (только 2% тестостерона находится в свободном или несвязанном состоянии; 44% тестостерона связано с глобулином, связывающим половые гормоны - ГСПГ, а 54% с альбуминами или другими белками). ГСПГ имеет большее сродство к тестостерону, чем к эстрадиолу, таким образом, ГСПГ играет роль модулятора. Тестостерон – анаболический гормон, т.е. стимулирует синтез белка, поэтому развитие мускулатуры и скелета у мужчин больше чем у женщин.

Снижение уровня тестостерона с возрастом обусловлено рядом факторов. Показано, что у пожилых мужчин снижен выброс тестостерона в ответ на введение хорионического гонадотропина, что говорит о первичности поражения функции клеток Лейдига. Это связано как с уменьшением числа клеток Лейдига вследствие кровоснабжения тестикулярной ткани, так и со снижением на их поверхности рецепторов к лютеинизирующему гормону (ЛГ). Тем не менее, в отличие от первичного гипогонадизма у молодых лиц, секреция ЛГ часто не повышена и находится в нормальных пределах, что говорит о нарушении механизмов отрицательной обратной связи у пожилых лиц. В снижении уровня тестостерона играют роль и функциональные нарушения в секреции гонадотропин-релизинг гормона и гонадотропинов. Доказано, что при старении происходит повышение уровня ГСПГ и соответственно количество связанного с ним тестостерона. Таким образом, с возрастом уровень биологически активного тестостерона снижается в большей степени, чем уровень общего тестостерона. Установлено, что у 50% мужчин в возрасте 50-70 лет уровень биодоступного тестостерона ниже нормального уровня гормона для мужчин в возрасте 20-40 лет.

По литературным данным уровень тестостерона в сыворотке крови лабораторных крыс варьирует: от 2,49 до 8,15 ммоль/л (А.Ф. Назарова, И.В.Ермакова, 2010), $3,15 \pm 0,7$ ммоль/л (И.И.Бобынцев с соав., 2005). В контрольной группе (крысы-самцы 19 месяцев) наших исследований уровень тестостерона соответствовал $6,25 \pm 0,12$ ммоль/л. Сравнительный анализ проводили с собственными результатами (контрольная группа животных).

В группе животных, с энтеральным введением ОГН (курс 21 сутки) содержание тестостерона в сыворотке крови через 1 сутки после окончания курса коррекции составляет $3,58 \pm 0,13$ ммоль/л, достоверно уменьшаясь в сравнении с контрольными значениями на 43% (при $P < 0,05$). В группе животных, с энтеральным введением ОГН (курс 21 сутки) содержание тестостерона через 30 дней после окончания курса коррекции составляет $1,35 \pm 0,05$ ммоль/л, уменьшаясь по сравнению с контролем на 78%.

Таким образом, после окончания курса (21 сутки) употребления олигонуклеотидов выявлена устойчивая тенденция к снижению уровня тестостерона в организме экспериментальных животных. Снижение уровня общего тестостерона в условиях применения ОГН у старых животных сопряжено со снижением содержания холестерина, из которого как известно образуется тестостерон. Для более углубленного понимания выявленных результатов, необходимо проводить исследование свободного тестостерона и уровня содержания ГСПГ у животных.

3. Результаты исследования структурной организации тимуса

Морфометрическое исследование структуры тимуса в старческом периоде онтогенеза (18-20 месяцев) выявило, по сравнению с половозрелыми животными возрастом 4 месяца, уменьшение площади коркового вещества на 28,1% и увеличение площади мозгового - на 35,2% (таблица 1). Уменьшаются корково-мозговое (на 46,7%) и паренхимно-стромальное (на 51%) соотношения. Увеличивается площадь соединительно-тканых структур - на 86,2%.

По сравнению с половозрелыми животными возрастом 4 месяца в структурных компонентах тимуса выявлено (таблица 2):

- в корковом веществе тимуса уменьшается число лимфобластов – на 50%, средних лимфоцитов – на 31,8%, макрофагов – 47%, митозов – на 59,3%. Значительно (в 2,2 раза) возрастает число клеток с пикнотическими ядрами;

- в кортико-медуллярной зоне тимуса увеличивается число лимфобластов – на 40,5%, эпителиальных клеток – на 46%, уменьшается число макрофагов – на 55,4%;

- в центральной части мозгового вещества увеличивается число лимфобластов – в 3,5 раз, средних лимфоцитов – на 99%, уменьшается число макрофагов на 68,5%, митозов – на 55,4%.

Морфометрическое исследование структуры тимуса в старческом периоде онтогенеза (18-20 месяцев) показало, что в условиях перорального применения в течение 21 суток ОГН отмечается увеличение площади паренхимо-стромального соотношения (на 55,4), за счет уменьшения площади соединительнотканых структур - на 31,2% (таблица 1).

В центральной части коркового и мозгового вещества, в кортико-медуллярной или пограничной зоне тимуса, по сравнению с интактной группой, изменения клеточного состава характеризуются активацией процессов пролиферации и бласттрансформации, увеличением числа клеток с пикнотическими ядрами (см. табл. 2):

- в корковом веществе тимуса увеличивается число лимфобластов – на 88,7%, средних лимфоцитов – на 40,4%, митозов – в 2,2 раза, клеток с пикнотическими ядрами – в 2 раза;

- в кортико-медуллярной зоне тимуса увеличивается число лимфобластов – на 98,3%, средних лимфоцитов – в 2,3 раза, клеток с пикнотическими ядрами – в 5,8 раза;

- в центральной части мозгового вещества увеличивается число лимфобластов – в 2,3 раз, средних лимфоцитов – на 81,9%, митозов – в 2,9 раза.

Через 1 месяц после окончания курса коррекции ОГН в старческом периоде онтогенеза исследование структуры тимуса выявило (см. таблицу 1) аналогичное, как и сразу после коррекции ОГН, увеличение площади паренхимо-стромального соотношения (на 46,4%), за счет уменьшения площади соединительнотканых структур - на 27,6%. При этом через 1 месяц после воздействия на организм старых крыс ОГН в структурных компонентах тимуса, как и в группе, где исследования проводились сразу после коррекции ОГН, отмечается, но менее выраженная активация процессов пролиферации и бласттрансформации, уменьшается число клеток с пикнотическими ядрами. При этом по сравнению с интактной группой (таблица 2), выявлено:

- в корковом веществе тимуса увеличение числа лимфобластов – на 48,3%, средних лимфоцитов – на 54%, митозов – в 2,2 раза;
- в кортико-медуллярной зоне тимуса увеличение числа лимфобластов – на 53,4%, средних лимфоцитов – в 2,3 раза, клеток с пикнотическими ядрами – в 2,7 раза;
- в центральной части мозгового вещества увеличение числа средних лимфоцитов – на 41%.

4). Результаты исследования структурной организации брыжеечных лимфатических узлов.

Брыжеечные лимфатические узлы относят к висцеральным лимфатическим узлам, который располагается на магистральном пути транспорта лимфы от тонкой и толстой кишки, что обуславливает широкую функциональную специализацию брыжеечных лимфатических узлов, направленную не только на транспорт, но и на активную биохимическую и иммунологическую обработку лимфы, а от эффективности естественной лимфодетоксикации зависит реализация процессов пато- и саногенеза, постоянно протекающих в организме (Бородин Ю.И., 1998; 2000).

Морфометрическое исследование структуры брыжеечных лимфатических узлов в старческом периоде онтогенеза (18-20 месяцев) выявило, по сравнению с половозрелыми животными возрастом 4 месяца, уменьшение площади коркового вещества на 55% и увеличение площади мозгового - на 69,5% (таблица 3). В старческом периоде онтогенеза, по сравнению с половозрелыми животными, отмечается угнетение клеточного звена иммунитета (уменьшена площадь тимусзависимой зоны – на 50%). При этом отмечаются структурные признаки и уменьшения активности гуморального звена иммунитета: уменьшается площадь вторичных лимфоидных узелков на 62,6%, на фоне увеличения относительной площади мозговых тяжей – на 48%. Транспорт лимфы через лимфатический узел

значительно повышен (увеличена площадь мозговых синусов – в 2,1 раза, краевого синуса – на 41,6%).

Исследование цитоархитектоники брыжеечных лимфатических узлов в старческом периоде онтогенеза, по сравнению с половозрелыми животными, выявило (таблица 4):

- в герминативных центрах вторичных лимфоидных узелков увеличение числа малых лимфоцитов - на 17%, уменьшение числа лимфобластов – на 38,4%, клеток на стадии митоза – на 55%, макрофагов – на 43,8%, ретикулярных клеток – на 42,8%;

- в паракортикальной зоне увеличивается число средних лимфоцитов – на 46,3% и уменьшается количество макрофагов – на 85,8%, ретикулярных клеток – на 23%;

- в мозговых тяжах увеличивается число незрелых (в 2 раза) и зрелых (на 86,7%) плазматических клеток, уменьшается число средних (на 36,6%) и малых (на 47%) лимфоцитов, макрофагов – на 34,4%;

- в мозговых синусах брыжеечных лимфатических узлов увеличивается число малых лимфоцитов – на 22%, макрофагов (на 92,4%) и ретикулярных клеток (на 50,7%), уменьшается число незрелых плазматических клеток – 75%.

Морфометрическое исследование структуры брыжеечных лимфатических узлов в старческом периоде онтогенеза (18-20 месяцев) показало, что в условиях перорального применения в течение 21 суток ОГН отмечается (таблица 3) увеличение площади вторичных лимфоидных узелков (на 51%), коркового плато – на 29%. Увеличивается относительная площадь соединительнотканых структур на 30%.

Исследование цитоархитектоники брыжеечных лимфатических узлов в условиях применения ОГН выявило в структурных компонентах ответственных за гуморальное звено иммунитета активацию процессов пролиферации и бласттрансформации клеток лимфоидного ряда (таблица 4):

- в герминативных центрах вторичных лимфоидных узелков увеличивается число лимфобластов на 90,5%, средних лимфоцитов - на 33,9%, клеток на стадии митоза – в 2,5 раза;

- в мозговых тяжах увеличивается число малых лимфоцитов – на 25,6% и уменьшается количество плазмобластов – на 38,7%, незрелых плазматических клеток – на 29,5%;

При этом в тимусзависимой (паракортикальной) зоне брыжеечных лимфатических узлов отмечается активация макрофагальной реакции (увеличено число макрофагов в 3,5 раза), а в мозговых синусах увеличивается число средних лимфоцитов – на 49,5%, незрелых плазматических клеток – в 2,9 раза.

Через 1 месяц после окончания курса коррекции ОГН в старческом периоде онтогенеза в цитоархитектонике вторичных лимфоидных узелков брыжеечных лимфатических узлов сохраняется (см. таблицу 4) активация процессов пролиферации и бласттрансформации клеток лимфоидного ряда (увеличивается число средних лимфоцитов - на 22,8%, клеток на стадии митоза – в 5,8 раза), а в мозговых синусах увеличивается число незрелых и зрелых форм клеток плазматического ряда (плазмобластов – в 3,7 раза, незрелых плазматических клеток – в 2,4 раза, зрелых плазматических клеток – на 16,4%.

Заключение

Результаты проведенных исследований, показали, что в старческом периоде онтогенеза (18-20 месяцев) в центральном (тимус) и периферическом органах иммунитета (лимфатические узлы) экспериментальных животных, по сравнению с животными зрелого возраста (3 месяца), отмечаются выраженные структурные процессы инволюции, отражающие угнетение общего и местного иммунного ответа:

- в тимусе увеличивается число дегенерирующих клеток с пикнотическими ядрами, наблюдается гипоплазия паренхимы, выраженное

склерозирование стромы, угнетение лимфопрولیферативных процессов, макрофагальной популяции.

- в брыжеечных лимфатических узлах выражены структурные признаки угнетения местного иммунного ответа: атрофия лимфоидной паренхимы (гипоплазия паракортикальной (Т-зависимой) зоны и лимфоидных фолликулов (В-зависимая зона)), плазматизация мозгового вещества, а также признаки лимфостаза (расширение краевого и мозговых синусов, разрастание ретикулярной соединительной ткани в синусах, макрофагальная реакция).

Введение в старческом возрасте (21 сутки) ОГН способствует активации общего и местного иммунного ответа в организме, о чем свидетельствуют выявленные структурные признаки усиления лимфопоэтической функции в центральных и периферических лимфоидных органах, в сравнении с группой без коррекции:

- в тимусе увеличиваются размеры лимфоидной паренхимы, на фоне уменьшения доли соединительно-тканых структур; во всех структурно-функциональных зонах органа повышается интенсивность лимфопрولیферативных процессов (увеличивается количество иммунобластов и митотически делящихся клеток).

- в лимфатических узлах выявлена тенденция к увеличению общей площади коркового вещества, преимущественно за счет увеличения площади вторичных лимфоидных узелков, в герминативных центрах которых возрастает число лимфобластов и клеток на стадии митоза, а также тенденция к уменьшению размеров краевого и мозговых синусов.

Результаты структурного исследования лимфоидных органов (тимус, лимфатические узлы), полученные спустя 1 месяц после окончания курса введения ОГН (21 сутки) в старческом периоде онтогенеза, свидетельствуют о выраженном «следовом» коррегирующем эффекте применения ОГН, при, так называемой возрастной «регидности иммунного ответа». Об этом свидетельствуют сохраняющиеся, хотя и в менее выраженной форме, структурные изменения в тимусе и брыжеечных лимфатических узлах,

указывающие на активацию их лимфопоэтической функции. В тимусе отмечено увеличение размеров лимфоидной паренхимы (корковое и мозговое вещество), в которой сохраняется высокая активность лимфопролиферативных процессов, на фоне уменьшения доли соединительно-тканых структур в сравнении с группой без коррекции. Существенным является то, что эти изменения менее выражены в сравнении с группой, в которой исследования проводили непосредственно после окончания приема ОГН. В лимфатических узлах, спустя 30 суток после окончания введения ОГН отмечено некоторое увеличение размеров мозгового вещества в сравнении с экспериментальной группой, где материал забирали непосредственно после окончания курса коррекции, что расценивается нами как постепенный возврат к «наступлению мозгового вещества», одного из характерных признаков старения лимфатических узлов (Д.А.Жданов, 1968). В то же время, тенденция к увеличению паракортикальной зоны (Т-зависимой) в лимфатических узлах, сокращение размеров краевого синуса, мы расцениваем как благоприятные морфологические сдвиги, свидетельствующие о сохранении барьерно-детоксикационной функции лимфатических узлов.

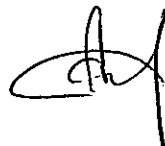
На основании выполненных морфофункциональных исследований организма экспериментальных животных можно сделать следующие выводы:

1) Выявлены мягкие метаболические изменения в организме экспериментальных животных при применении ОГН (21 сутки) в старческом возрасте: сдвиг параметров, характеризующих углеводный обмен организма (колебания содержания глюкозы) и липидный обмен (тенденция к уменьшению содержания холестерина и β -липопротеидов через 30 суток после курса коррекции ОГН).

2) Применение ОГН в старческом возрасте способствует восстановлению паренхиматозно-стромальной организации и цитоархитектоники центрального органа иммунного ответа - тимуса, активации его лимфопролиферативной функции, что свидетельствует о эффективности применения ОГН для профилактики возрастных инволютивных процессов в органе, коррекции «регидности иммунного ответа» при старении.

3) Применение ОГН в старческом возрасте способствует структурным преобразованиям в периферических иммунных органах – лимфатических узлах, свидетельствующим об активации их лимфопоэтической (иммунной) и барьерно-детоксикационной функции, стимуляции местного иммунного ответа, лимфатического дренажа тканей, и, в конечном итоге, уменьшение токсической нагрузки на организм.

Зав. отделом профилактической и
экологической лимфологии
ГУ НИИКиЭЛ СО РАМН,
д.м.н., профессор



В. В. Асташов

Таблица 2. Относительные площади структурно-функциональных зон тимуса половозрелых животных (4 месяца) и в старческом периоде онтогенеза (18-20 месяцев) в условиях нормы, через 21 день применения ОГН и через 30 суток после окончания введения ОГН ($M \pm m$) %.

Структурно-функциональные зоны	Интактные животные (4 мес.)	Интактные животные (18-20 мес.)	ОГН (21 сутки)	30 дней после курса ОГН (21 сутки)
Корковое вещество	62,5±1,0	44,92±0,73 *	46,4±1,27	46,5±2,1
Мозговое вещество	27,2±0,84	36,76±2,8 *	40,95±1,1	40,21±0,88
К/м соотношение	2,29±0,01	1,22±0,06 *	1,13±0,03	1,16±0,05
С/тк. элементы	9,8±0,47	18,25±0,9 *	12,56±0,18**	13,22±0,82**
Площадь железистых образований	0,04±0,04	0,06±0,04	0,09±0,03	0,07±0,03
Паренхимо/стромальное соотношение	9,15±0,74	4,48±0,2 *	6,96±0,1**	6,56±0,4**

* - отличия достоверны в сравнении с интактными животными возрастом 4 месяца при $P < 0,05$

** - отличия достоверны в сравнении с интактными животными возрастом 18-20 месяцев при $P < 0,05$

Таблица 3. Клеточный состав структурно-функциональных зон тимуса половозрелых животных (4 месяца) и в старческом периоде онтогенеза (18-20 месяцев) в условиях нормы, через 21 день применения ОГН и через 30 суток после окончания введения ОГН ($M \pm m$)%.

Клеточные элементы	Интактные животные (4 мес.)	Интактные животные (18-20 мес.)	ОГН (21 сутки)	30 дней после курса ОГН (21 сутки)
Центральная часть коркового вещества				
Лимфобласты	3,07±0,57	1,51±0,09*	2,85±0,15**	2,24±0,17**
Средние лимфоциты	7,38±0,26	5,03±0,39*	7,02±0,34**	7,71±0,26**
Малые лимфоциты	85,56±0,82	89,74±2,31	84,4±1,62	86,54±2,29
Макрофаги	1,13±0,07	0,6±0,14*	0,64±0,08	0,28±0,08
Клетки с фигурами митозов	1,23±0,24	0,5±0,12*	1,08±0,1**	1,08±0,17**
Клетки с пикнотическими ядрами	0,5±0,04	1,1±0,12*	2,25±0,16**	0,6±0,2
Эпителиальные клетки	1,13±0,11	1,51±0,09	1,77±0,16	1,54±0,1
Кортико-медуллярная зона				
Лимфобласты	1,68±0,11	2,36±0,16*	4,68±0,41**	3,62±0,35**
Средние лимфоциты	5,88±0,21	5,07±0,19	11,32±0,44**	12,63±0,75**
Малые лимфоциты	86,02±1,51	87,16±1,56	77,31±3,48	76,97±4,05
Макрофаги	1,84±0,21	0,82±0,14*	0,43±0,09	0,51±0,1
Клетки с фигурами митозов	1,48±0,27	0,94±0,15	1,33±0,25	1,77±0,3
Клетки с пикнотическими ядрами	0,84±0,11	0,35±0,1*	2,02±0,15**	0,95±0,13**
Эпителиальные клетки	2,26±0,21	3,3±0,26*	2,92±0,25	3,55±0,21
Центральная часть мозгового вещества				
Лимфобласты	0,72±0,05	2,51±0,31*	5,79±0,47**	2,68±0,44
Средние лимфоциты	4,34±0,43	8,63±0,77*	15,7±0,69**	12,17±1,14**
Малые лимфоциты	82,5±0,86	80,22±1,76	69,1±2,02**	78,0±2,78
Макрофаги	2,02±0,69	0,63±0,13*	0,35±0,12	0,96±0,13
Клетки с фигурами митозов	1,75±0,29	0,78±0,19*	2,3±0,21**	0,89±0,23
Клетки с пикнотическими ядрами	2,72±0,10	2,35±0,27	1,88±0,15	1,31±0,51
Эпителиальные клетки	5,95±0,68	4,87±0,34	4,88±0,27	4,0±0,17

* - отличия достоверны в сравнении с интактными животными возрастом 4 месяца при $P < 0,05$

** - отличия достоверны в сравнении с интактными животными возрастом 18-20 месяцев при $P < 0,05$

Таблица 4. Относительные площади структурно-функциональных зон брыжеечных лимфатических узлов половозрелых животных (4 месяца) и в старческом периоде онтогенеза (18-20 месяцев) в условиях нормы, через 21 день применения ОГН и через 30 суток после окончания введения ОГН ($M \pm m$) %.

Структурно-функциональные зоны	Интактные животные (4 мес.)	Интактные животные (18-20 мес.)	ОГН (21 сутки)	30 дней после курса ОГН (21 сутки)
Герминативный центр вторичных лимфоидных узелков	6,48±0,29	1,9±0,23 *	2,89±0,14	1,56±0,11
Мантий вторичных лимфоидных узелков	4,11±0,23	2,06±0,24 *	3,07±0,2 **	2,22±0,14
Вторичные лимфоидные узелки	10,59±0,44	3,96±0,58 *	5,96±0,31 **	3,78±0,33
Первичные лимфоидные узелки	1,88±0,17	0,89±0,06	1,2±0,11	1,09±0,07
Корковое плато	4,68±0,38	1,24±0,11 *	1,6±0,06	2,24±0,17 **
Паракортикальная зона	32,6±1,36	16,36±1,38 *	17,91±0,48	18,58±0,74
Мозговые тяжи	27,26±0,42	40,41±0,23 *	37,27±2,8	39,0±2,13
Мозговые синусы	15,68±0,57	32,43±0,8 *	30,97±2,6	32,08±1,3
Краевой синус	1,97±0,09	2,79±0,14 *	2,43±0,18	1,4±0,06 **
Капсула	4,82±0,3	1,84±0,1 *	2,39±0,11	1,56±0,07
Трабекулы	0,48±0,09	0,05±0,02 *	0,27±0,07 **	0,26±0,04 **
В-зона	44,41±2,15	46,5±1,9	46,03±1,13	46,1±1,91
Корковое вещество	49,75±1,83	22,46±1,9 *	26,67±1,93	25,69±1,76
Мозговое вещество	42,94±1,14	72,84±2,24 *	68,23±4,86	71,07±4,33
Корково-мозговой индекс	1,16±0,08	0,31±0,04	0,39±0,04	0,36±0,03

* - отличия достоверны в сравнении с интактными животными возрастом 4 месяца при $P < 0,05$

** - отличия достоверны в сравнении с интактными животными возрастом 18-20 месяцев при $P < 0,05$

Таблица 5. Цитоархитектоника структурно-функциональных зон брыжеечных лимфатических узлов половозрелых животных (4 месяца) и в старческом периоде онтогенеза (18-20 месяцев) в условиях нормы, через 21 день применения ОГН и через 30 суток после окончания введения ОГН ($M \pm m$) %.

Клеточные элементы	Интактные животные (4 мес.)	Интактные животные (18-20 мес.)	ОГН (21 сутки)	30 дней после курса ОГН (21 сутки)
Герминативный центр вторичных лимфоидных узелков				
Лимфобласты	13,62±0,2	8,39±0,23*	16,0±0,65**	10,14±0,79
Средние лимфоциты	15,24±0,61	17,62±0,5	23,59±0,3**	21,63±0,74**
Малые лимфоциты	56,16±1,8	65,7±2,67*	53,49±1,61**	56,41±1,33**
Макрофаги	6,34±0,26	3,56±0,16*	2,5±0,3**	3,07±0,16
Ретикулярные клетки	7,34±0,24	4,2±0,17*	2,94±0,21**	5,35±0,23**
Митозы	1,29±0,15	0,58±0,19*	1,44±0,16**	3,39±0,23**
Паракортикальная зона				
Лимфобласты	1,04±0,05	0,55±0,1	0,23±0,08	0,57±0,11
Средние лимфоциты	3,52±0,1	5,15±0,12*	2,46±0,16**	2,38±0,27**
Малые лимфоциты	88,62±0,63	91,0±0,82	91,86±1,91	93,84±3,0
Макрофаги	3,11±0,1	0,44±0,1*	1,52±0,18**	0,3±0,08
Ретикулярные клетки	3,7±0,12	2,85±0,14*	3,93±0,31**	2,91±0,14
Мозговые тяжи				
Средние лимфоциты	7,85±0,25	4,98±0,3*	4,56±0,28	5,91±0,48
Малые лимфоциты	48,58±0,7	25,77±0,62*	32,37±1,15**	24,15±1,55
Плазмобласты	3,54±0,15	2,71±0,3	1,66±0,18**	2,32±0,45
Незрелые плазмоциты	5,63±0,2	11,49±0,43*	8,11±0,39**	8,43±0,71**
Зрелые плазмоциты	24,47±0,54	45,68±0,7*	45,38±0,77	48,91±2,4
Макрофаги	3,69±0,14	2,42±0,17*	2,37±0,26	0,73±0,16**
Ретикулярные клетки	5,14±0,25	6,22±0,3	4,73±0,36**	8,1±0,6**
Митозы	1,1±0,11	0,73±0,23	0,83±0,21	0,83±0,65
Мозговые синусы				
Средние лимфоциты	5,2±0,21	6,0±0,27	8,95±0,33**	7,17±0,49
Малые лимфоциты	37,26±0,92	45,47±2,7*	39,8±1,0	40,35±3,1
Плазмобласты	2,1±0,11	0,24±0,13*	0,67±0,2	0,88±0,24**
Незрелые плазмоциты	10,38±0,5	2,59±0,34*	7,44±0,3**	6,2±0,63**
Зрелые плазмоциты	35,62±0,69	30,91±1,96	31,27±0,58	36,07±1,36**
Макрофаги	1,85±0,14	3,56±0,31*	3,1±0,51	0,81±0,18**
Ретикулярные клетки	7,3±0,22	11,0±0,41*	8,28±0,46**	8,35±0,49**
Тучные клетки	0,31±0,08	0,24±0,13	0,5±0,18	0,15±0,1

* - отличия достоверны в сравнении с интактными животными возрастом 4 месяца при $P < 0,05$

** - отличия достоверны в сравнении с интактными животными возрастом 18-20 месяцев при $P < 0,05$