

Н.О.Мельник
Ю.Б.Чайковський

Національний медичний
університет імені
О.О.Богомольця

УДК 616-003.93:612.017.12

РЕАКТИВНІ ЗМІНИ ОРГАНІВ ІМУННО-ГО ЗАХИСТУ ЗА УМОВ ДЕМІЄЛІНІЗАЦІЇ ТА РЕМІЄЛІНІЗАЦІЇ

Ключові слова: демієлінізація, ремієлінізація, тимус, селезінка, інтерферон β -1a.

Надійшла: 21.10.2006

Прийнята: 13.11.2006

Резюме. Мета роботи – вивчення морфологічних змін тимуса і селезінки при експериментальному алергічному енцефаломієліті ЕАЕ і після використання препарату «Рєбіф» (інтерферон β -1a). З цією ціллю використали тимус та селезінку зрілих щурів через 21 добу та через 39 днів після ініціації ЕАЕ. З 14 доби після індукції ЕАЕ вводили препарат «Рєбіф» підшкірно у дозах: 0,55 мкг щоденно протягом 4 днів, 1,1 мкг щоденно протягом 3 днів, 0,55 мкг через день протягом 15 днів. Було проведено вимірювання площ співвідношення кіркової та мозкової речовини часточок тимуса; білої та червоної пульпи селезінки, обчислення клітинного складу тимуса та селезінки. Дослідження показали, що при ЕАЕ у органах імунної системи виникає ряд деструктивних та реактивних змін, які корелюють із змінами в органах нервової системи. Патологічні зміни тимуса і селезінки після ініціації ЕАЕ пов'язані з демієлінізуючими змінами нервових волокон органів центральної нервової системи. Ми заключаємо, що вплив препарату «Рєбіф» при ЕАЕ має іммуносупресорний характер і прискорює відновні процеси в тимусі і селезінці.

Melnik N.O., Chaikovsky Yu.B. The reactive changes of the immune organs under demyelination and remyelination.

Summary. The purpose of work was to study the morphological changes in thymus and spleen at experimental allergic encephalomyelitis (EAE) and after «Rebif» (interferon β -1a) treatment. With this aim the thymus and spleen of adult rats in 21 and 39 days after initiation of EAE were used. After 14th day induction of EAE «Rebif» was injected subcutaneous in doses: 0,55 mcg daily during 4 days, 1,1 mg daily during 3 days, 0,55 mcg each other day during 15 days. The square of correlation of cortex and medullar parts of lobules of thymus, white and red pulpas of spleen was measured, the calculation of cellular composition of thymus and spleen. The researches showed that the destructive and reactive changes develop in the organs of the immune system at EAE which correlate with the changes in the organs of the nervous system. The pathological changes of thymus and spleen after the EAE initiation are related to the demyelination changes in the nervous fibres of organs of the central nervous system. We conclude the influence of the «Rebif» at EAE was immunosuppressive and accelerates reparation processes in thymus and spleen.

Key words: demyelination, remyelination, thymus, spleen, interferon β -1a.

Вступ

На сьогоднішній день доведено, що в основі етіології демієлінізуючих захворювань лежить взаємодія пошкоджуючих факторів зовнішнього середовища та спадкової схильності (Бутенко Г.М., 2002). До числа найбільш розповсюджених демієлінізуючих захворювань у ЦНС відноситься розсіяний склероз (РС) (Пономарев В.В., 2002). Більшість дослідників РС вважають, що ключовим механізмом патогенезу хвороби є демієлінізація, яка ініціюється аутоімунними процесами. Це призводить до реакції проти власних антигенів мієлінових оболонок нервових волокон (Дранник Г.Н., 1999). Найбільш ефективними імунокорегуючими препаратами при демієлінізуючих захворюваннях є рекомбінантні β -інтерферони (препарати «Рєбіф», «Бетаферон»), які мають високу вартість і вимагають тривалого використання для отримання бажаного ефекту (Гусев Е.И., Бойко А.И., 2000). Експериментальні дослідження з вивчення органів ЦНС та центральних і периферійних органів імунітету після використання таких препаратів у науковій літературі відсутні.

З метою пошуку ефективних методів лікування патологічного процесу – демієлінізації, важливе значення можуть мати дослідження вико-

ристання рекомбінантного β -інтерферону-1a (препарату «Рєбіф») у різних дозах.

Матеріали та методи

Експериментальне дослідження реактивних змін тимуса та селезінки при експериментальному алергічному енцефаломієліті (ЕАЕ) та після лікувальних впливів різних доз препарату «Рєбіф» було проведене на 74 дослідних тваринах, маса тіла яких була 220-250г, з них 52 дослідних, 14 контрольних та 8 інтактних щурів. Були використані 2 строки – через 21 добу та через 39 днів після ініціації ЕАЕ. З 14 доби після індукції ЕАЕ, починали вводити препарат «Рєбіф» підшкірно у ділянці спини тварини. Для дослідження цього препарату були використані 3 дози:

- по 0,55 мкг щоденно протягом 4 днів, загальна кількість отриманого препарату кожною твариною – 2,2 мкг (18 тварин);

- по 1,1 щоденно протягом 3 днів, загальна кількість отриманого препарату – 3,3 мкг (17 тварин);

- по 0,55 мкг через день протягом 15 днів, загальна кількість отриманого препарату 4,4 мкг (17 тварин).

Об'єктами світлооптичного дослідження щурів з ЕАЕ, з наступним морфометричним аналі-

зом, служили органи імунного захисту – тимус та селезінка, через 21 добу та через 39 днів після ініціації ЕАЕ. Парафінові зрізи, товщиною 4-6 мкм отримували за допомогою роторного автоматичного мікротому HM360 (Carl Zeiss Jena GmbH). Гістологічні препарати тимуса та селезінки забарвлювали азурII-еозином за А. Максимовим і гематоксиліном та еозином.

Морфометричний аналіз тимуса та селезінки проводили за допомогою двох різних методик:

- вимірювання площ співвідношення кіркової та мозкової речовини часточок тимуса проводили за допомогою програмного забезпечення UTHSCSA Image Tool ® for Windows ® (version 2.00) в інтерактивному режимі з використанням об'єктиву $\times 20$, $\times 40$ і окуляра $\times 10$;

- вимірювання площ співвідношення білої та червоної пульпи селезінки проводили за допомогою програмного забезпечення UTHSCSA Image Tool ® for Windows ® (version 2.00) в інтерактивному режимі з використанням об'єктиву $\times 20$, $\times 40$ і окуляра $\times 10$;

- обчислення клітинного складу тимуса та селезінки проводили, використовуючи програму автоматичного аналізу клітин лімфоїдної популяції, яка була запропонована колективом авторів (Абрамов А.В. та співавт., 2002).

Дослідження морфометричних та денситометричних характеристик лімфоїдної популяції проводили за допомогою комп'ютерної системи цифрового аналізу зображення VIDAS-386 (Kotron Elektronik, Німеччина). Зображення, яке отримували на мікроскопі AXIOSKOP, за допомогою високочутливої камери COHU-4722 (COHU Inc., США) були введені в комп'ютерну систему цифрового аналізу зображення VIDAS-386 (Kotron Elektronik, Німеччина) та були оцифровані по денситометричній шкалі з 256 градаціями сірого кольору.

В результаті класифікаційного аналізу було виділено 9 класів клітин лімфоїдної популяції тимуса та селезінки: 1-й клас – лімфобласти; 2-й клас – лімфобласти з ознаками деструкції; 3-й клас – великі лімфоцити; 4-й клас – великі лімфоцити з ознаками деструкції; 5-й клас – середні лімфоцити; 6-й клас – середні лімфоцити з ознаками деструкції; 7-й клас – малі лімфоцити; 8-й клас – малі лімфоцити з ознаками деструкції; 9-й клас – лімфоцити в стані апоптозу (апоптичні тільця). Окрім вищевказаних характеристик лімфоїдних клітин була розрахована загальна кількість клітинних елементів у тій чи іншій зоні тимуса та білої пульпи селезінки.

Для обчислення похідних параметрів і коефіцієнтів та статистичного аналізу використовували програму Microsoft ® Excel 2000.

Результати та їх обговорення

Дослідження клінічних ознак ЕАЕ у щурів після проведення різних лікувальних впливів дозволяють встановити, що максимальний ефект покращення стану тварин дає препарат "Ребіф" у дозі 0,55 мкг за добу протягом 2 тижнів.

На ранньому терміні дослідження у тимусі

спостерігається зростання площі мозкової речовини, а у кірковій речовині визначаються скупчення малодиференційованих клітин, які зовні нагадують "вузлики".

Через 21 добу після ініціації ЕАЕ та після проведення лікувального впливу щільність розміщення клітин лімфоїдної популяції підвищується у субкапсулярній зоні та глибокій ділянці кіркової речовини часточок тимуса, що можна пояснити підвищеною проліферацією Т-лімфоцитів та зниженням міграційних властивостей цих клітин. Через 39 днів після ініціації ЕАЕ та після введення препарату "Ребіф" у дозі 0,55 мкг у короткотривалій та пролонгованій дії спостерігали зменшення чисельності клітин лімфоїдної популяції у часточках тимуса, що можливо пов'язане зі зменшенням проліферативної активності цих клітин, оскільки відомо, що рекомбінантний β -інтерферон-1а зумовлює імуносупресивну дію (Wagstaff A., Goa K., 1998).

Через 21 добу після введення препарату "Ребіф" по 0,55 мкг щоденно протягом 4 днів та по 1,1 мкг кожного дня протягом 3 днів кількісний склад лімфобластів, великих, середніх та малих лімфоцитів подібний до вмісту цих же клітин у субкапсулярній зоні тимуса тварин з ЕАЕ. Через 39 днів у даній зоні визначається різке зменшення вмісту малих лімфоцитів, окрім експериментальної групи тварин, що отримувала препарат "Ребіф" по 0,55 мкг через день протягом 15 днів. Поряд зі зменшенням кількості малих лімфоцитів через 39 днів спостерігається збільшення кількості лімфобластів та великих лімфоцитів у групах тварин, які отримували препарат "Ребіф" по 0,55 мкг кожний день протягом 4 днів та по 1,1 мкг кожний день протягом 3 днів.

Клітинний склад субкапсулярної зони у складі часточок тимуса наближений до норми у тварин, які отримували ін'єкції препарату "Ребіф" пролонговано. Отже, препарат "Ребіф" у невеликих дозах зменшує чисельність малих лімфоцитів у субкапсулярній зоні часточок тимуса у віддалений термін дослідження, що, можливо, пов'язано з активацією міграційних процесів малих лімфоцитів та імуносупресивною дією препарату.

Через 21 добу після введення препарату "Ребіф" по 0,55 мкг кожного дня протягом 4 днів та по 1,1 мкг щоденно протягом 3 днів кількісний склад лімфобластів, великих, середніх та малих лімфоцитів у внутрішній частині кіркової речовини подібний до вмісту цих же клітин у кірковій речовині тимуса тварин з ЕАЕ у цей же термін дослідження. У складі внутрішньої частини кіркової речовини часточок тимуса спостерігається зменшення вмісту малих лімфоцитів та збільшення кількості середніх лімфоцитів, особливо відчутно через 39 днів після індукції ЕАЕ та введення препарату "Ребіф" по 0,55 мкг щоденно протягом 4 днів та по 1,1 мкг щоденно протягом 3 днів. Наближення клітинного складу внутрішньої частини кіркової речовини часточок тимуса до норми визначається у тварин, які отримували препарат "Ребіф" протягом 15 днів (група 4). Препарат "Ре-

біф” у невеликих дозах зменшує чисельність малих лімфоцитів у віддалений термін дослідження у внутрішній частині кіркової речовини часточок тимуса, що, можливо, пов’язано з активацією міграційних процесів малих лімфоцитів та імуносупресивною дією препарату.

Через 21 добу після ініціації ЕАЕ у складі мозкової речовини часточок тимуса спостерігається різке зменшення кількості малих лімфоцитів у

тварин, що отримували препарат “Ребіф” протягом тижня (групи 2, 3). У цих же групах спостерігали різке підвищення вмісту великих та середніх лімфоцитів даної досліджуваної зони. Подібні зміни клітинного складу мозкової речовини часточок тимуса були визначені і через 39 днів після індукції ЕАЕ та після проведення ін’єкцій препарату протягом 15 днів, проте вони мали менш виражений характер (рис.1).

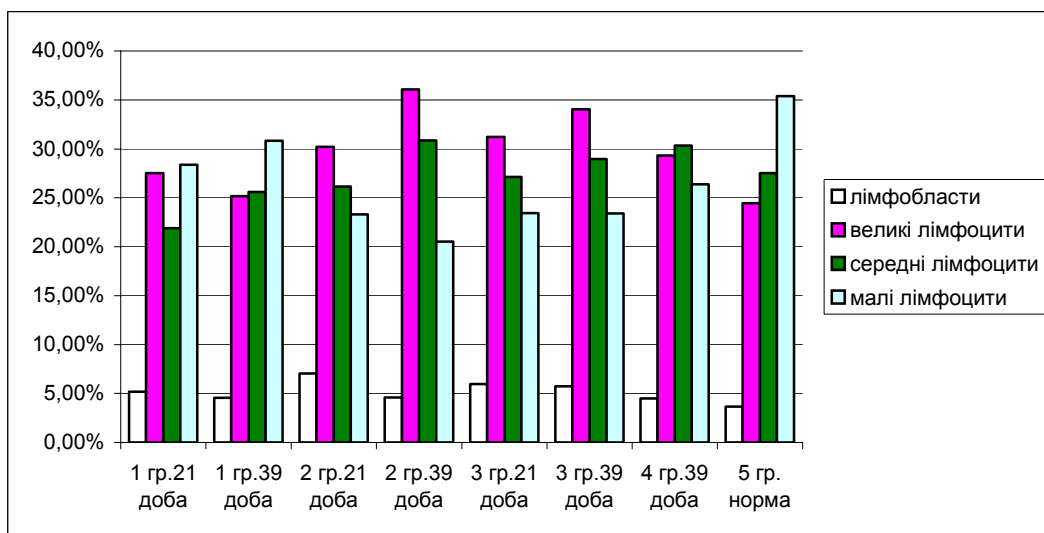


Рис. 1. Гістограма розподілення клітин лімфоїдної популяції у відсотках у складі мозкової речовини часточок тимуса після введення препарату “Ребіф”. 1 група – тварини з ЕАЕ; 2 група - тварини, яким вводили препарат “Ребіф” по 0,55 мкг щоденно протягом 4 днів; 3 група - тварини, яким вводили препарат “Ребіф” по 1,1 мкг щоденно протягом 3 днів; 4 група – тварини, які отримували препарат “Ребіф” по 0,55 мкг через день протягом 15 днів; 5 група - інтактні тварини.

При довготривалому використанні препарату “Ребіф” кількісний склад лімфоцитів у часточках тимуса наближається до норми. У науковій літературі відсутні дані щодо клітинного складу лімфоїдної популяції часточок тимуса після введення препарату “Ребіф”.

Збільшення площі білої пульпи селезінки визначається після лікувальних впливів на ранніх термінах дослідження. Пролонгована дія препарату “Ребіф” майже повністю відновлює розміри білої пульпи. У науковій літературі не висвітлені дані щодо особливостей зміни розмірів білої пульпи селезінки після введення препарату “Ребіф”.

З огляду на вищевикладені дані наукової літератури важливим є дослідження змін щільності розміщення лімфоцитів. Через 21 добу після ініціації ЕАЕ щільність розміщення лімфоїдних клітин зменшується. Використання препарату “Ребіф” у дозі 0,55 мкг щоденно протягом 4 днів призводить до збільшення кількості клітин лімфоїдної популяції, а у дозі 1,1 мкг “Ребіфу” щоденно протягом 3 днів – до зниження кількості лімфоцитів. Ці отримані результати можна пояснити імуносупресивною дією препарату “Ребіф”. Через 39 днів після ініціації ЕАЕ чисельність клітин лімфоїдної популяції залишається невеликою, що, можливо, пов’язано з міграцією лімфоцитів у зони враження у ЦНС. Використання препарату “Ребіф” у дозі

0,55 мкг “Ребіфу” щоденно протягом 4 днів та у дозі 0,55 мкг “Ребіфу” через день протягом 15 днів призводить до відчутного збільшення кількості лімфоцитів. Можливо, це можна пояснити активацією розмноження лімфоцитів, оскільки препарат “Ребіф” не викликає загального пригнічення імунної системи, а лише стимулює її супресивну ланку.

У складі періартеріальної зони білої пульпи селезінки спостерігається зменшення кількості малих лімфоцитів у тварин з ЕАЕ як у ранні, так і у відділені терміни дослідження. У цій же групі тварин визначається підвищення вмісту великих лімфоцитів і зменшення чисельності середніх лімфоцитів, особливо через 39 днів після ініціації ЕАЕ. Зменшення чисельності малих лімфоцитів та підвищення кількості великих лімфоцитів спостерігається після використання інтерферону- β -1а в дозі 0,55 мкг щоденно протягом 4 днів в усі терміни дослідження. Подібна реакція з боку періартеріальної зони білої пульпи селезінки визначається через 21 добу після ініціації ЕАЕ та введення дози інтерферону- β -1а по 1,1 мкг щоденно протягом 3 днів. Але, у віддалений термін дослідження у складі періартеріальної зони білої пульпи селезінки у таких тварин спостерігається підвищення вмісту малих та середніх лімфоцитів. Пролонговане використання препарату “Ребіф” (протягом 15 днів) призводить до наближення кількис-

них характеристик клітин лімфоїдної популяції до норми. У науковій літературі відсутні дані щодо особливостей клітинного складу білої пульпи селезінки після використання препарату “Ребіф”.

У складі реактивного центру білої пульпи селезінки у тварин з ЕАЕ спостерігається зменшення чисельності малих лімфоцитів та підвищення вмісту великих та середніх лімфоцитів у ранній термін дослідження та підвищення кількості малих лімфоцитів і зменшення чисельності великих та середніх лімфоцитів у пізній термін дослідження, що вказує на активацію імунних процесів.

Після використання інтерферону- β -1а в дозі

0,55 мкг щоденно протягом 4 днів зменшується кількість малих лімфоцитів та підвищується чисельність великих та середніх лімфоцитів у всі терміни дослідження. Введення “Ребіфу” по 1,1 мкг щоденно протягом 3 днів викликає збільшення кількості малих лімфоцитів у ранній термін дослідження та різке зменшення чисельності цих клітин у пізній термін дослідження. Пролонгована дія інтерферону- β -1а призводить до наближення до відсоткових значень лімфоцитів відповідної ділянки білої пульпи селезінки інтактних щурів (рис.2).

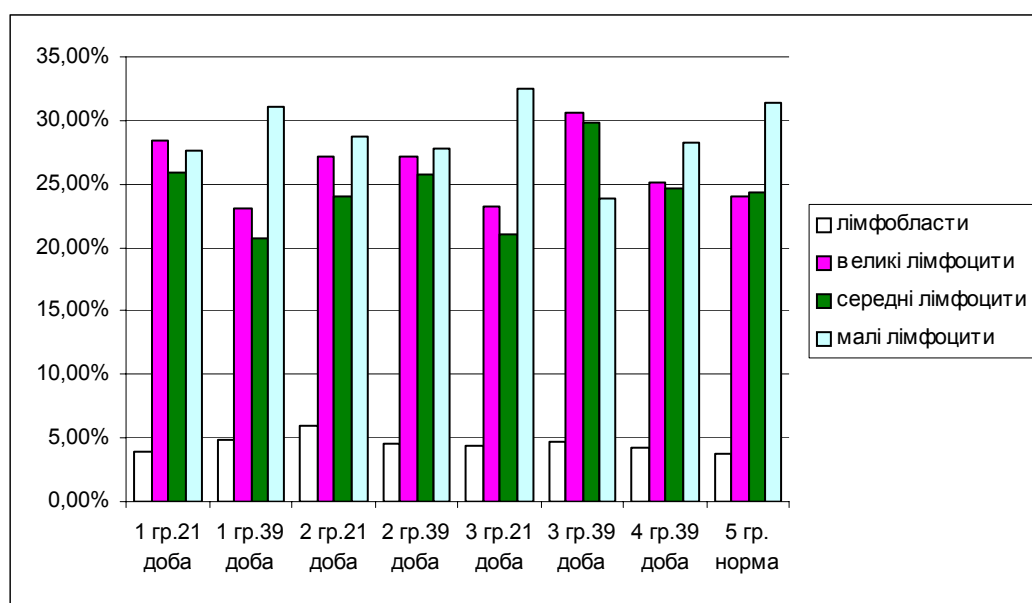


Рис.2 Гістограма розподілення клітин лімфоїдної популяції у відсотках у складі реактивного центру білої пульпи селезінки після введення препарату “Ребіф”. 1 група – тварини з ЕАЕ; 2 група - тварини, яким вводили препарат “Ребіф” по 0,55 мкг щоденно протягом 4 днів; 3 група - тварини, яким вводили препарат “Ребіф” по 1,1 мкг щоденно протягом 3 днів; 4 група – тварини, які отримували препарат “Ребіф” по 0,55 мкг через день протягом 15 днів; 5 група - інтактні тварини.

У маргінальній зоні білої пульпи селезінки у щурів з ЕАЕ спостерігали зменшення кількості малих лімфоцитів у ранній термін дослідження та підвищення вмісту цих клітин поряд зі зменшенням чисельності великих і середніх лімфоцитів через 39 днів після ініціації ЕАЕ. Після використання інтерферону- β -1а у дозі по 0,55 мкг щоденно протягом 4 днів визначається зменшення чисельності малих лімфоцитів у всі терміни дослідження. Після введення препарату “Ребіф” у дозі по 1,1 мкг щоденно протягом 3 днів значно підвищується кількість малих лімфоцитів і зменшується вміст великих та середніх лімфоцитів через 21 добу після ініціації ЕАЕ. Через 39 днів у складі маргінальної зони білої пульпи селезінки щурів після використання препарату “Ребіф” у дозі по 1,1 мкг щоденно протягом 3 днів спостерігається нормалізація чисельності малих лімфоцитів, проте виявляється високий вміст великих лімфоцитів. Пролонговане введення інтерферону- β -1а викликає наближення значень відсоткового співвідношення клітин лімфоїдної популяції у маргінальній

зоні білої пульпи селезінки до значень норми.

Таким чином, отримані дані свідчать про більш активну участь В-залежних зон білої пульпи селезінки при ЕАЕ.

Відзначені зміни в органах імунної системи корелюють з описаними нами раніше (Мельник Н.О. та співавт., 2004) змінами в пошкоджених органах нервової системи (стовбур головного мозку, мозочок, спинний мозок, сідничий нерв).

Висновки

В умовах експериментального алергічного енцефаломієліту у органах імунної системи виникає ряд деструктивних та реактивних змін, які корелюють із змінами в органах нервової системи.

Застосування препарату “Ребіф” (рекомбінантного β -інтерферону-1а) за умов експериментального алергічного енцефаломієліту нормалізує патологічні зміни в імунній системі.

Перспективи подальших розробок пов’язані з аналізом взаємодій між імунокомпетентними клітинами за умов розвитку патологічних станів, що корелюють із змінами в органах нервової сис-

Літературні джерела

Бутенко Г.М. Розсіяний склероз – захворювання багатofакторне // Нова мед.- 2002.- №2.- С.18-19.

Гусев Е.И., Бойко А.И. Современные подходы к использованию бета интерферонов в лечении рассеянного склероза // Журн. невропат. и психиатр.- 2000.- №11.- С.54-59.

Дранник Г. Н. Клиническая иммунология и аллергология.- Одесса, 1999.- 604 с.

Мельник Н.О., Чекмарьова І.В., Чайковський Ю.Б. Реактивні зміни органів імунної системи під впливом патологічних факторів // Клін. анат. та опер. хір.- 2004.- №3.- С.5-8.

Пономарев В.В. Демиелинизирующие заболе-

вания нервной системы: клиника. диагностика и современные технологии лечения // Мед. новости.- 2002.- №6.- С.3-7.

Структурно-функциональная организация лимфоидной популяции тимуса: опыт применения математического классификационного анализа / Абрамов А.В., Камышный А.М., Любомирская В.А., Колесник Ю.М. // Клін. та експер. патол.- 2002.- Т.1, №1.- С.5-7.

Wagstaff A., Goa K. Recombinant Interferon- β -1a. A review of its therapeutic efficacy in relapsing-remitting multiple sclerosis // BioDrugs.- 1998.- Vol.10, №6.- P.472-489.

Мельник Н.А., Чайковский Ю.Б. Реактивные изменения органов иммунной защиты в условиях демиелинизации и ремиелинизации.

Резюме. Цель работы – изучение морфологических изменений тимуса и селезенки при экспериментальном аллергическом энцефаломиелите ЕАЕ и после использования препарата «Ребиф» (интерферон β -1a). С этой целью использовали тимус и селезенку зрелых крыс через 21 сутки и через 39 суток после инициации ЕАЕ. С 14 суток после индукции ЕАЕ вводили препарат “Ребиф” подкожно в дозах: 0,55 мкг ежедневно на протяжении 4 дней, 1,1 мкг ежедневно на протяжении 3 дней, 0,55 мкг через день на протяжении 15 суток. Было проведено измерение площадей соотношения коркового и мозгового вещества долек тимуса; белой и красной пульпы селезенки, подсчет клеточного состава тимуса и селезенки. Исследования показали, что при ЕАЕ в органах иммунной системы возникает ряд деструктивных и реактивных изменений, которые коррелируют с изменениями в органах нервной системы. Патологические изменения тимуса и селезенки после инициации ЕАЕ связанные с демиелинизирующими изменениями нервных волокон органов центральной нервной системы. Мы сделали вывод, что влияние препарата «Ребиф» при ЕАЕ имеет иммуносупрессорный характер и ускоряет восстановительные процессы в тимусе и селезенке.

Ключевые слова: демиелинизация, ремиелинизация, тимус, селезенка, интерферон β -1a.