

Коррекция экстрактом *Gentiana algida* Pall структурных изменений в тимусе при экспериментальной азатиоприновой иммуносупрессии

В. Б. ХОБРАКОВА, *Я. Г. РАЗУВАЕВА, Е. Р. БУДАЕВА

ФГБУН «Институт общей и экспериментальной биологии» СО РАН, Улан-Удэ

Correction of Structural Changes in Thymus by *Gentiana algida* Pall Extract at Experimental Azathioprine Immunosuppression

V. B. KHOBRKOVA, *YA. G. RAZUVAEVA, E. R. BUDAeva

Institute of General and Experimental Biology of SB RAS, Ulan-Ude

Цель: определение влияния экстракта сухого горечавки холодной (*Gentiana algida* Pall) на микроанатомию тимуса мышей линии СВА в условиях азатиоприновой иммуносупрессии. **Материал и методы.** Эксперименты проведены на половозрелых мышцах-самцах линии СВА. Экспериментальную иммуносупрессию вызывали цитостатиком азатиоприном (50 мг/кг, *per os*, 5 дней). Экстракт сухой *G. algida* в дозе 50 мг/кг вводили животным в течение 15 дней на фоне азатиоприна. Морфологические исследования тимуса проводили на 21-е сутки после начала введения азатиоприна. С помощью программы для анализа изображений Axio Vision SE64 Rel.4.8.3 измеряли: площадь дольки, коркового и мозгового вещества, ширину коркового вещества, толщину и длину мозгового вещества, толщину капсулы, плотность клеток в субкапсулярной зоне и глубоких слоях коркового вещества. В субкапсулярной и центральной зоне коркового вещества определяли клеточный состав. **Результаты.** Введение мышам экстракта *G. algida* ограничивало развитие инволютивных изменений в тимусе, вызванных цитостатиком азатиоприном: площадь коркового вещества была на 16% больше, а мозгового слоя — на 17% меньше по сравнению с таковыми у животных контрольной группы. Соотношение коркового и мозгового вещества у животных, получавших экстракт *G. algida*, было в 1,4 раза выше такового в контроле. Средняя плотность тимоцитов в субкапсулярной зоне была на 30% выше контрольного показателя. Количество бластов и больших лимфоцитов в глубоких слоях коркового вещества увеличилось в среднем в 2,0 раза, в субкапсулярной зоне — в 4,3 и 2,4 раза, соответственно, по сравнению с таковыми у контрольных животных. **Выводы.** Экстракт *G. algida* ограничивает развитие выраженных инволютивных процессов в вилочковой железе, вызванных введением азатиоприна, повышая митотическую активность тимоцитов, снижая степень выраженности деструктивных процессов и предотвращая разрастание жировой ткани.

Ключевые слова: азатиоприн, иммуносупрессия, тимус, *Gentiana algida* Pall.

The purpose of the study is to evaluate the effect of *Gentiana algida* Pall dry extract on microanatomy of CBA mice thymus at azathioprine immunosuppression. **Material and Methods.** Experiments were carried out on CBA male mice. Immune deficiency was modeled by intragastrical administration of azathioprine in the dose 50 mg/kg once a day for 5 days. The *G. algida* dry extract in the dose 50 mg/kg was administered to animals for 15 days against azathioprine. Morphological studies of the thymus were carried out on day 21 after the azathioprine administration. The area of the thymic lobule, the cortex and the medulla; the width of the cortex; the thickness and length of the medulla; the thickness of the capsule; the density of cells in the subcapsular zone and the deep layers of the cortex were measured using the Axio Vision SE64 Rel.4.8.3 image analysis program. The cellular composition was determined in the subcapsular and central zone of the cortex. **Results.** The *G. algida* extract limited the development of involutive changes in the thymus caused by cytostatic azathioprine: the cortex area was 16% higher and medulla area 17% lower compared with the control group. The ratio of cortex and medulla in experimental group was 1.4 times higher than that in the control group. The *G. algida* extract increased average density of cells by 30% in the subcapsular zone. The number of blasts and large lymphocytes increased on average by 2.0 times in the deep layers of the cortex, and in the subcapsular zone — by 4.3 and 2.4 times, respectively, compared with those in control group. **Conclusions:** *G. algida* extract limited the development of pronounced involutive processes in the thymus at azathioprine immunosuppression (increased the mitotic activity of thymocytes, reduced the severity of destructive processes and prevented the growth of adipose tissue).

Keywords: azathioprine, immunosuppression, thymus, *Gentiana algida* Pall.

Введение

Цитостатическая терапия, широко применяемая для лечения злокачественных опухолей, аутоиммунных заболеваний, в трансплантологии, сопряжена с развитием осложнений, связанных с по-

вреждающим действием цитостатических препаратов на различные органы и ткани, в частности, на органы иммунной системы [1, 2]. Для коррекции иммунодефицитов преимущественно используют препараты синтетического происхождения, которые являются чужеродными для организма и обуславливают массу побочных эффектов. Альтернативой такой терапии являются иммуномодуляторы растительного происхождения, которые имеют ряд

© Коллектив авторов, 2020

*Адрес для корреспонденции: ФГБУН «Институт общей и экспериментальной биологии» СО РАН, ул. Сахьяновой, 6, Улан-Удэ, 670047. E-mail: tatur75@mail.ru

преимуществ, благодаря наличию в них комплекса биологически активных веществ, обеспечивающих мягкое действие, низкую токсичность, способность к активации не только иммунной, но и нервной, и эндокринной систем, а также возможность применения у лиц с сочетанными патологиями [3, 4].

С учётом имеющихся предпосылок, перспективным источником сырья для создания эффективных и безопасных иммуномодуляторов является горечавка холодная — *Gentiana algida* Pall. Ранее в экспериментах на животных было установлено, что экстракт *G.algida* обладает фармакотерапевтической эффективностью при азатиоприновой иммуносупрессии, восстанавливая массу и клеточность иммунных органов, показатели иммунитета в реакциях гиперчувствительности замедленного типа, антителообразования и фагоцитоза перитонеальных макрофагов [5, 6].

Цель работы — определение влияния экстракта сухого *G.algida* на микроанатомию тимуса мышей линии СВА в условиях азатиоприновой иммуносупрессии.

Материал и методы

Эксперименты проведены на 30 половозрелых мышах-самцах линии СВА массой 18–20 г, из питомника РАМН «Столбовая». Животные находились в стандартных условиях вивария в соответствии с Правилами лабораторной практики (GLP) и приказом МЗ РФ № 708Н от 23.08.2010 «Об утверждении правил лабораторной практики». Эксперименты проведены в соответствии с приказом МЗ РФ № 267 «Об утверждении правил лабораторной практики» от 19.06.2003 и Правилами Европейской конвенции по защите позвоночных животных, используемых для экспериментальных и иных научных целей. Протокол исследований согласован с этическим комитетом ИОЭБ СО РАН (протокол №7 от 12.11.2013). Из эксперимента животных выводили декапитацией под лёгким эфирным наркозом.

Животные были разделены на 3 группы: интактная, контрольная, опытная. Экспериментальную иммуносупрессию

вызывали цитостатиком азатиоприном (ОАО «Мосхимфарм-препараты» им. Н. А. Семашко, таблетки), который вводили животным контрольной и опытной групп в дозе 50 мг/кг перорально 1 раз в сутки в течение 5 дней [7]. Животным опытной группы экстракт сухой *G.algida* вводили на 6-е сутки и далее в течение 15 дней в дозе 50 мг/кг перорально. Контрольная группа животных с иммунодефицитом получала эквивалентный объём очищенной воды в аналогичном режиме. На 21-е сутки животных декапитировали под эфирным наркозом и извлекали тимус для проведения патоморфологических исследований.

Морфологические исследования тимуса проводили при помощи общепринятой методики [8]. Тимус фиксировали в 10% забуференном нейтральном формалине с последующей стандартной спиртовой проводкой и заливкой в парафин. Срезы окрашивали гематоксилином и эозином и азур-эозином. Морфологические и морфометрические исследования проводили с помощью микроскопа «Axio LAB.A1» (Германия) с цифровой камерой «AxioCam ERc5s» (Германия) с программным обеспечением для анализа изображений Axio Vision SE64 Rel.4.8.3 и ZEN 2012. На срезах тимуса измеряли: площадь дольки, коркового и мозгового вещества, ширину коркового вещества, толщину и длину мозгового вещества, толщину капсулы, плотность клеток в субкапсулярной зоне и глубоких слоях коркового вещества, а также в мозговом слое. В субкапсулярной и центральной зоне коркового вещества определяли клеточный состав, подсчитывая число эпителиоретикулярных клеток, лимфоцитов, больших, средних и малых лимфоцитов, клетки с фигурами митоза, деструктивно изменённые клетки.

Результаты исследований статистически обработаны общепринятыми методами для малой выборки с определением средней величины (M) и ошибки (m). Степень достоверности результатов исследований (p) оценивали с помощью критерия t -Стьюдента. Различия между данными контроля и опыта считали достоверным при вероятности 95% ($p \leq 0,05$).

Результаты и обсуждение

Патоморфологические исследования показали, что курсовое введение мышам азатиоприна вызывает инволютивные изменения в тимусе, характеризующиеся уменьшением размеров железы, снижением плотности тимоцитов и изменением их клеточного состава. Так, по данным морфо-

Влияние экстракта *G.algida* на морфометрические показатели тимуса мышей при азатиоприновой иммуносупрессии ($M \pm m$)

Показатели	Интактная, $n=10$	Контрольная (азатиоприн+H ₂ O), $n=10$	Опытная (азатиоприн+экстракт <i>G.algida</i>), $n=10$
Площадь дольки, мм ²	5,8±0,71	4,7±0,53	5,1±0,34
Площадь коркового вещества, мм ²	5,1±727845,9	3,7±0,42	4,3±2,9
Площадь мозгового вещества, мм ²	0,7±0,05	1,0±0,11	0,8±0,06
Ширина коркового вещества, мкм	281,0±16,07 (122–548)	220,2±5,87 (78–482)	244,3±10,86* (43–596)
Толщина мозгового вещества, мкм	228,7±4,20 (70–357)	316,8±10,26 (131–504)	257,4±11,09* (85–542)
Длина мозгового вещества, мкм	2274,3±316,90 (1498–4591)	4208,5±149,3 (3032–5118)	3706,6±308,9 (1853–5176)
Ширина коркового/ толщина мозгового вещества	1,23	0,69	0,95
Толщина капсулы, мкм	1,9±0,16 0,5–4	6,6±0,91 2–27	3,8±0,37* 2–15
Плотность тимоцитов в субкапсулярном слое коркового вещества, п/мм ²	28039,0±499,22	19948,8±822,33	25931,1±1198,05*
Плотность тимоцитов в глубоких слоях коркового вещества, п/мм ²	24851,1±1104,68	19993,2±495,98	22989,68±1041,68

Примечание. * — различия достоверны при $p \leq 0,05$ по сравнению с данными в контрольной группе; n — число животных в каждой группе.

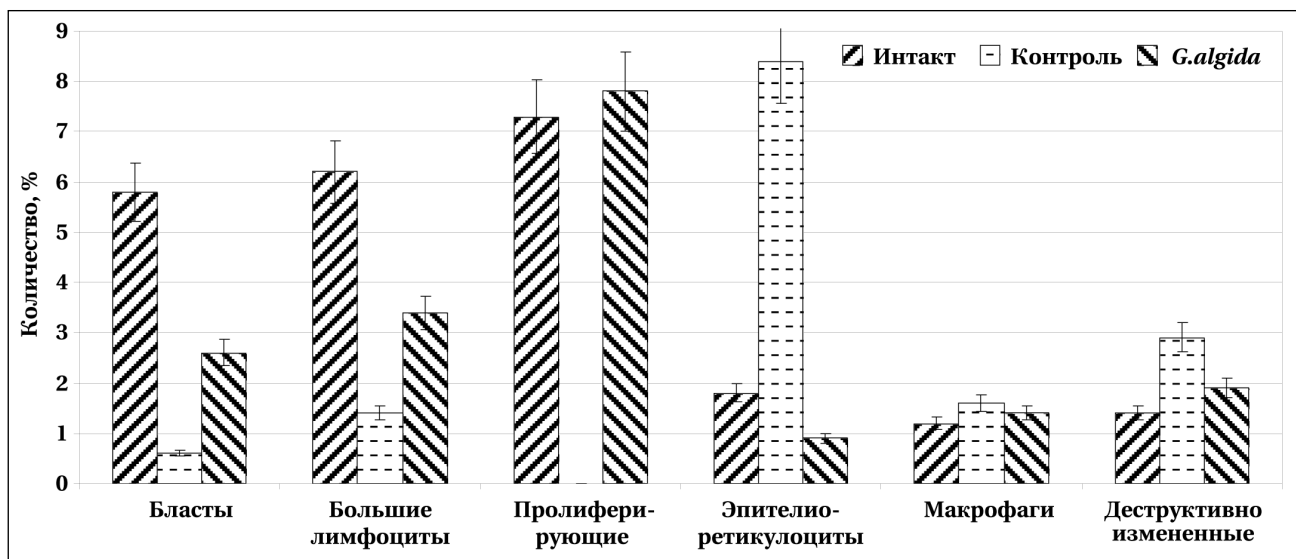


Рис. 1. Влияние экстракта *G.algida* на клеточный состав (%) субкапсулярной зоны коркового вещества тимуса белых крыс при азатиоприновой иммуносупрессии

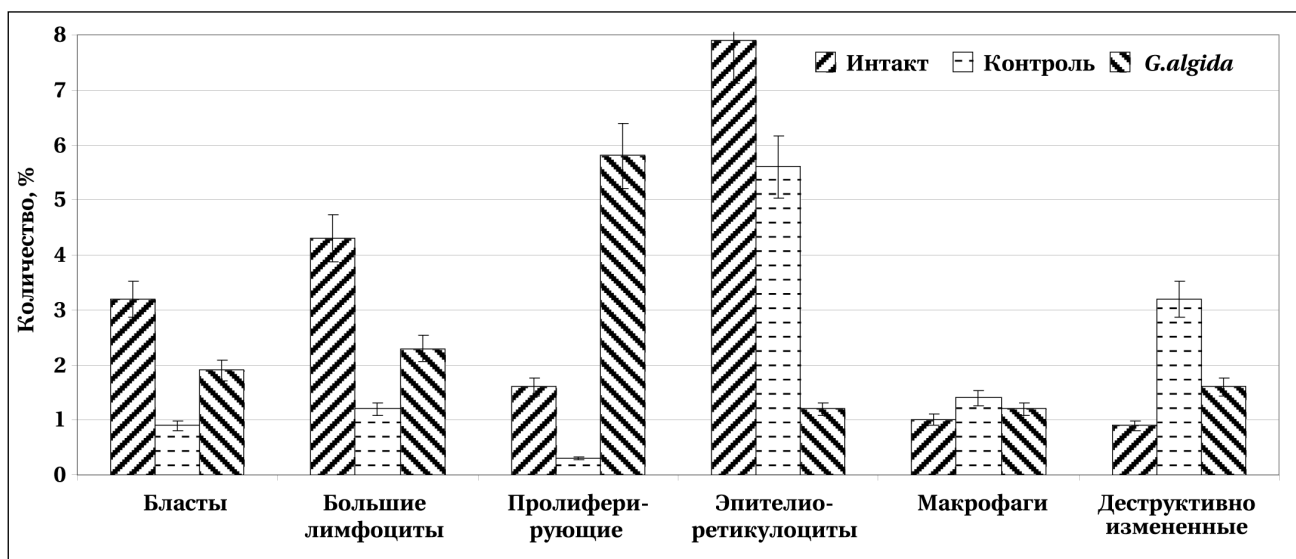


Рис. 2. Влияние экстракта *G.algida* на клеточный состав (%) центральных (глубоких) слоёв коркового вещества тимуса белых крыс при азатиоприновой иммуносупрессии

метрических исследований, площадь тимуса контрольных животных уменьшилась на 19% по сравнению с данными в интактной группе, при этом площадь коркового вещества сократилась на 27%, а площадь мозгового вещества увеличилась на 44% (см. таблицу).

В корковом веществе тимуса контрольных животных наблюдали снижение числа тимоцитов на единицу площади гистологического среза; наименее выраженное снижение плотности клеток отмечалось в субкапсулярном слое (на 20%), чем в глубоких слоях (на 29%). Уменьшение плотности лимфоцитов обусловлено несколькими причинами: во-первых, снижением пролиферативной активности тимоцитов на фоне действия азатиоприна. Так, в субкапсулярном слое коркового вещества

отсутствовали делящиеся тимоциты, в глубоких слоях их количество сократилось в 5,3 раза и составило $0,31 \pm 0,15$ против $1,6 \pm 0,17$ в интактной группе (рис. 1, 2). В субкапсулярном слое и глубоких слоях коркового вещества тимуса на фоне увеличения процентного содержания малых лимфоцитов число бластов снизилось в 3,6 и 9,7 раза, количество больших лимфоцитов — в 3,6 и 4,4 раза, соответственно. Во-вторых, наблюдался усиленный апоптоз тимоцитов: число деструктивных тимоцитов с пикнотическими ядрами в субкапсулярной и глубокой зонах коркового вещества тимуса увеличилось в 3,6 и 2,1 раза, соответственно, по сравнению с контролем. В-третьих, наблюдается повышенная миграция лимфоцитов из коркового вещества в мозговое, в результате чего чис-

ло клеток в последнем повышается. В результате изменения плотности клеток в мозговом и корковом слоях тимуса отмечалась так называемая «инверсия слоёв», когда мозговой слой на гистологических препаратах выглядит более тёмным, корковый слой — более светлым, а кортико-медуллярная граница становится размытой.

У >50% мышей контрольной группы отмечались более выраженные инволютивные изменения тимуса, характеризующиеся замещением лимфоидной ткани железы фибробластами, фиброцитами и адипоцитами. На отдельных гистологических срезах капсула была отёчна, коллагеновые структуры разволокнены, тимоциты в субкапсулярной зоне замещались фибробластами, в результате чего наблюдалось утолщение капсулы. В некоторых случаях соединительная ткань разрасталась вглубь тимуса. Так, по данным морфометрических исследований, толщина капсулы тимуса у контрольных животных варьировала от 2 до 27 мкм, против 0,5–4 мкм в интактном, что в среднем в 3,5 раза больше. У 4 из 8 животных в капсуле наблюдались скопления жировых клеток, проникающих в субкапсулярную зону коркового вещества.

Усиленный апоптоз и миграция тимоцитов из коркового вещества тимуса приводят к уменьшению ширины данного слоя на 44% и увеличению толщины и длины мозгового вещества на 39% и 85%, соответственно, по сравнению с показателями у интактных животных. Соотношение ширины коркового вещества к толщине мозгового вещества в контроле составило 0,69 против 1,23 в интактной группе (см. таблицу).

Выявленные изменения структуры тимуса у животных, получавших экстракт *G.algida* на фоне азатиоприна, в целом, были сходны с изменениями, наблюдаемыми у контрольных животных; при этом степень их выраженности была значительно ниже. Так, у животных опытной группы инволютивные изменения также характеризовались уменьшением размеров тимуса и плотности клеток в корковом веществе, при этом ни у одного животного опытной группы жировой инфильтрации капсулы и дольки тимуса не наблюдалось. Соединительнотканная капсула была менее отёчна и разволокнена, её толщина была в среднем на 42% меньше таковой у животных контрольной группы. Не наблюдалось прорастание соединительной ткани вглубь тимуса. Так же как и в контрольной группе отмечались дилатация и кровенаполнения сосудов, что является компенсаторно-приспособительной реакцией.

Несмотря на то что общая площадь тимуса значимо не отличалась от показателя контрольных животных, площадь коркового вещества была на 16% выше, а мозгового слоя — на 17% ниже по сравнению с таковыми у животных контрольной группы. Соотношение коркового и мозгово-

го вещества у животных, получавших экстракт *G.algida*, составляло 0,95, что в 1,4 раза выше такового в контроле (см. таблицу). Кортико-медуллярная граница была более чётко выражена. В центральной зоне коркового вещества отмечались небольшие опустошения, в результате чего средняя плотность тимоцитов была выше по отношению к контролю только на 15%, тогда как в субкапсулярной зоне — на 30%.

Введение мышам испытуемого фитоэкстракта на фоне азатиоприновой иммуносупрессии, помимо количественного показателя клеток, также нормализовала качественный состав клеток лимфоидного ряда. Так, у животных, получавших испытуемый экстракт, количество бластов и больших лимфоцитов в глубоких слоях коркового слоя увеличилось в среднем в 2,0 раза, в субкапсулярной зоне — в 4,3 и 2,4 раза, соответственно, по сравнению с таковыми у контрольных животных. У животных опытной группы в корковом веществе тимуса возросло число митозов и снизилось число деструктивных клеток.

Установленная нами иммунокорригирующая активность экстракта *G.algida* в отношении морфофункционального состояния тимуса в условиях иммуносупрессии подтверждается исследованиями [9], в которых установлено нормализующее влияние экстракта пятилистника кустарникового на структуру и функции данного органа при азатиоприновой иммуносупрессии. Кроме того, наши данные согласуются с результатами исследования [10], в котором показано восстановление морфофункционального состояния тимуса у животных, подвергнутых действию стресса, под влиянием полифенола розмариновой кислоты и флавонола лютеолина.

Таким образом, экстракт *G.algida* ограничивает развитие выраженных инволютивных процессов в вилочковой железе, вызванных введением азатиоприна, повышая митотическую активность тимоцитов, снижая степень выраженности деструктивных процессов и предотвращая разрастание жировой ткани. Полученные результаты по восстановлению изменений в микроанатомии тимуса и селезёнки мышей, находящихся в состоянии иммунодепрессии, с помощью морфометрического метода, согласуются с выявленными нами с помощью иммунологических методов иммунокорригирующими свойствами экстракта *G.algida* [5, 6]. Иммуномодулирующий эффект экстракта *G.algida* на фоне азатиоприновой иммуносупрессии обусловлен содержащимися в нём флавоноидами, полисахаридами, тритерпенами и иридоидами [11–13].

Исследования проведены в рамках выполнения темы госзадания № AAAA-A17-117011810037-0.

ЛИТЕРАТУРА

1. Ahlmann M., Hempel G. The effect of cyclophosphamide on the immune system: implications for clinical cancer therapy. *Cancer Chemother Pharmacol* 2016; 78 (4): 661–671.
2. Orandi A.B., Vogel T.P., Keppel M.P., Uttersen E.C., Cooper M.A. Azathioprine-Associated Complete NK Cell Deficiency. *J Clin Immunol* 2017; 37 (6): 514–516.
3. Kumar S., Gupta P., Sharma S., Kumar D. A review on immunostimulatory plants. *J. of Chinese Integrative Med* 2011; 9 (2): 117–128.
4. Sultan M.T., Butt M.S., Qayyum M.M., Suleria H.A. Immunity: plants as effective mediators *Crit Rev. Food Sci. Nutr* 2014; 54(10): 1298–1308.
5. Хобракова В.Б., Будаева Е.Р., Оленников Д.Н., Зилфикаров И.Н. Иммуномодулирующая активность экстракта *Gentiana algida* Pall. *Химико-фармацевтический журнал*. — 2017. — Т. 51. — № 5. — С. 40–93. / *Khobrakova V.B., Budaeva E.R., Olennikov D.N., Zilfikarov I.N. Immunomoduliruyushchaya aktivnost' ekstrakta Gentiana algida* Pall. *Khimiko-Farmatsevticheskij Zhurnal* 2017; 51 (5): 40–93.
6. Будаева Е.Р., Хобракова В.Б. Влияние сухого экстракта *Gentiana algida* Pall на фагоцитарную активность макрофагов при экспериментальной иммуносупрессии. *Вестник Бурятского государственного университета*. — 2015. — № 12. — С. 96–99. / *Budaeva E.R., Khobrakova V.B. Vliyanie sukhogo ekstrakta Gentiana algida* Pall na fagotsitarnuyu aktivnost' makrofagov pri eksperimental'noj immunosupressii. *Vestnik Buryatskogo Gosudarstvennogo Universiteta* 2015; 12: 96–99. [in Russian]
7. Лазарева Д.Н., Алехин Е.К. Стимуляторы иммунитета. М.: 1985. / *Lazareva D.N., Alekhin E.K. Stimulyatory immuniteta*. М.: 1985. [in Russian]
8. Коржевский О.Э., Гуляров А.В. Основы гистологической техники. СПб.: 2010. / *Korzhevskij O.E., Gilyarov A.V. Osnovy gistologicheskoy tekhniki*. SPb.: 2010. [in Russian]
9. Сапин М.Р., Хобракова В.Б., Кактурский Л.В., Григоренко Д.Е., Ерофеева Л.М., Николаев С.М. и соавт. Изменение микроанатомии тимуса мышей под влиянием сухого экстракта пятилистника кустарникового в условиях азатиоприновой иммуносупрессии. *Российский медико-биологический вестник имени академика И.П. Павлова*. — 2001. — № 1-2. — С. 120–127. / *Sapin M.R., Khobrakova V.B., Kakturskij L.V., Grigorenko D.E., Erofeeva L.M., Nikolaev S.M. i soavt. Izmenenie mikroanatomii timusa myshej pod vliyaniem sukhogo ekstrakta pyatilistnika kustarnikovogo v usloviyakh azatioprinovoy immunosupressii. Rossijskij Mediko-Biologicheskij Vestnik imeni Akademika I.P. Pavlova* 2001; 1–2: 120–127. [in Russian]
10. Цыбульский А.В., Попов А.М., Артюков А.А., Кривошапко О.Н., Козловская Э.П. Сравнительное изучение лечебного действия лютеолина, розмариновой кислоты и эхинохрома А на состояние тимуса при экспериментальном стрессе. *Российский аллергологический журнал*. — 2011. — 4 (1). — С. 411–413. / *Tsybul'skij A.V., Popov A.M., Artyukov A.A., Krivoschapko O.N., Kozlovskaya E.P. Sravnitel'noe izuchenie lechebnogo dejstviya llyuteolina, rozmarinovyj kisloty i ekhinokhroma A na sostoyanie timusa pri eksperimental'nom stresse. Rossijskij Allergologicheskij Zhurnal* 2011; 4 (1): 411–413. [in Russian]
11. Будаева Е.Р., Хобракова В.Б. Влияние фракций, полученных из надземной части *Gentiana algida* Pall., на состояние клеточного и гуморального звеньев иммунного ответа. *Бюллетень ВСНЦ СО РАМН*. — 2015. — Т. 102. — № 2. — С. 70–72. / *Budaeva E.R. Khobrakova V.B. Vliyanie fraktsij, poluchennykh iz nadzemnoj chasti Gentiana algida* Pall., na sostoyanie kletochnogo i gumoral'nogo zven'ev immunnnogo otveta. *Bjulleten' VSNTs SO RAMN* 2015; 102 (2): 70–72.
12. Будаева Е.Р., Хобракова В.Б. Иммунокорригирующее действие индивидуальных веществ из надземной части горечавки холодной. *Аллергология и иммунология*. — 2015. — Т. 16. — № 4. — С. 405–406. / *Budaeva E.R. Khobrakova V.B. Immunokorrigiruyushchee dejstvie individual'nykh veshchestv iz nadzemnoj chasti gorechavki kholodnoj. Allergologiya i immunologiya* 2015; 16 (4): 405–406. [in Russian]
13. Хобракова В.Б., Будаева Е.Р. Влияние ориентина, гентиопикрозида и олеаноловой кислоты, выделенных из *Gentiana algida* Pall, на состояние иммунной системы в эксперименте. *Патологическая физиология и экспериментальная терапия*. — 2018. — Т. 62. — № 1. — С. 54–58. / *Khobrakova V.B., Budaeva E.R. Vliyanie orientina, gentiopikrozida i oleanolovoj kisloty, vydelennykh iz Gentiana algida* Pall, na sostoyanie immunnoj sistemy v eksperimente. *Patologicheskaya Fiziologiya i Eksperimental'naya Terapiya* 2018; 62 (1): 54–58. [in Russian]

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ:

Хобракова Валентина Бимбаевна — д. б. н., зав. лабораторией экспериментальной фармакологии Федерального государственного бюджетного учреждения науки «Институт общей и экспериментальной биологии» СО РАН, Улан-Удэ. <http://orcid.org/0000-0002-4689-5706>

Разуваева Янина Геннадьевна — д. б. н., с. н. с. лаборатории безопасности биологически активных веществ Федерально-

го государственного бюджетного учреждения науки «Институт общей и экспериментальной биологии» СО РАН, Улан-Удэ. <http://orcid.org/0000-0001-7829-1424>

Будаева Евдокия Ринчиновна — к. м. н., н. с. лаборатории экспериментальной фармакологии Федерального государственного бюджетного учреждения науки «Институт общей и экспериментальной биологии» СО РАН, Улан-Удэ. <http://orcid.org/0000-0001-9348-2368>