

УДК 611.4:615.27

**М.А. Жученко, Н.В. Лобанова, А.В. Тверской,
Е.Н. Морозова, В.Н. Морозов**
**МОРФОЛОГИЧЕСКИЕ ОСОБЕННОСТИ СТРОЕНИЯ ТИМУСА И
СЕЛЕЗЕНКИ ПОД ВЛИЯНИЕМ КАРБАМИЛИРОВАННОГО
ДАРБЭПОЭТИНА В РАЗНЫХ ДОЗАХ**

Белгородский государственный национальный исследовательский университет (г. Белгород)

Жученко М.А., Лобанова Н.В., Тверской А.В., Морозова Е.Н., Морозов В.Н. Морфологические особенности строения тимуса и селезенки под влиянием карбамиллированного дарбэпоэтина в разных дозах // Морфологический альманах имени В.Г. Ковешникова. – 2018. – Том 16, №4. – С. 25-29.

Изучали морфологические особенности строения тимуса и селезенки под влиянием карбамиллированного дарбэпоэтина в разных дозах. Материалом для исследования послужили 40 белых крыс-самцов породы Вистар, которым препарат вводился 3 раза в неделю подкожно в однократной (50 мкг/кг) и двукратной (100 мкг/кг) максимальных суточных терапевтических дозах для человека 92 дня, а затем в течение 30 дней животные находились под наблюдением. В качестве контрольного вещества использовали плацебо в эквивалентном объёме. Материал обрабатывали по стандартной гистологической методике, а затем окрашивали гематоксилин-эозином. Результаты исследований препарата в разных дозах показали, что тимус и селезенка подвергаются незначительным морфологическим изменениям по сравнению с контрольными группами, что связано с механизмом действия препарата.

Ключевые слова: морфология, тимус, селезенка, дарбэпоэтин

Zhuchenko M.A., Lobanova N.V., Tverskoi A.V., Morozova E.N., Morozov V.N. Morphological features of the and spleen structure under the influence of carbamylated darbepoetin in different doses // Морфологический альманах имени В.Г. Ковешникова. – 2018. – Том 16, №4. – С. 25-29.

The morphological features of the structure of the thymus and spleen under the influence of carbamylated darbepoetin in different doses were studied. The research was carried out on 40 white Wistar male rats. The darbepoetin administered 3 times a week subcutaneously in a single (50 μ kg/kg) and twice (100 μ kg/kg) maximum daily therapeutic doses for a human for 92 days and then for 30 days the animals were under observation. As a control drug, placebo was used in an equivalent volume. The material was processed according to a standard histological procedure, and then was stained with hematoxylin-eosin. The results of drug studies in different doses showed that the thymus and spleen undergo minor morphological changes compared to the control groups, which is related to the mechanism of drug effect.

Key words: morphology, thymus, spleen, darbepoetin

Введение. В связи с научно-техническим прогрессом в фармакологической промышленности создаются и изучаются препараты, оказывающие широкий спектр действия на организм. Одним из них является карбамиллированный дарбэпоэтин. Относительно недавно было обнаружено, что помимо «классической» гемопоэтической активности данный препарат обладает цитопротекторной («неклассической») активностью, оказывающий защитное действие на клетки организма [4, 12]. Так, карбамиллированный дарбэпоэтин ингибирует экспрессию белка р53 в нейронах сетчатки и индуцирует экспрессию эндотелиальной

НО-синтазы в ее сосудах, вследствие чего наблюдается протективный эффект [11]. Существует предположение, что реализация этой активности опосредуется связыванием с гетеродимерным рецептором EPOR β CR, что, в свою очередь, приводит к снижению чувствительности клеток к гипоксии и активации антиапоптотических сигнальных путей [14]. При этом, влияние на эндокринную и иммунную системы изучено недостаточно. Таким образом, **целью исследования** явилось изучить морфологические особенности строения тимуса и селезенки под влиянием карбамиллированного дарбэпоэтина в разных дозах.

Материалы и методы исследования.

Материалом для исследования послужили 40 белых крыс-самцов породы Вистар массой 200-220 г., которые были разделены на 4 группы по 10 животных в каждой. Экспериментальным животным препарат вводился 3 раза в неделю подкожно (под кожу спины) в однократной (50 мкг/кг) и двукратной (100 мкг/кг) максимальных суточных терапевтических дозах [3] для человека 92 дня, а затем в течение 30 дней животные находились под наблюдением. В качестве контрольного вещества использовали плацебо в эквивалентном объеме.

Исследование было проведено с использованием визуального, инструментального и лабораторного контроля за состоянием животных [2, 7, 8, 9, 13, 15], современных методов оценки действия препарата в соответствии с разработанным Федеральным государственным бюджетным учреждением «Научный центр экспертизы средств медицинского применения» «Руководством по проведению доклинических исследований лекарственных средств» (2012, том I) под общей редакцией д.м.н. А.Н. Миронова. После забора материала, фрагменты тимуса и селезенки фиксировали в растворе формалина, а затем подвергали стандартной гистологической проводке с последующим изготовлением стеклопрепаратов. Последние окрашивали гематоксилином и эозином. Микроскопическое исследование проводили с

помощью анализатора изображений, состоящего из микроскопа Nikon Eclipse Ni с цифровой камерой Nikon DS-Fi3 и программным обеспечением Nis-Elements BR 4.60.00 64-bit.

Исследование выполнялось в лаборатории доклинических исследований Центра доклинических и клинических исследований НИУ «БелГУ» (308015, г. Белгород, ул. Победы, 85), в рамках выполнения Государственного контракта с Министерством образования и науки Российской Федерации № 14.N08.11.0077 от «16» июня 2016 г. Шифр «2016-14-N08-0011-001».

Результаты и их обсуждение. Изучение гистологических препаратов тимуса и селезенки крыс после введения плацебо показало, что они имеют типичное строение. После использования карбамиллированного дарбэпоэтина в дозе 50 мкг/кг визуально в дольках тимуса мозговое вещество преобладало над корковым. Четко визуализировались соединительнотканые перегородки, в которых встречались единичные скопления жировой ткани (рисунок 1).

При аналогичном воздействии в селезенке четко визуализировались лимфатические узелки белой пульпы небольшого размера, расположенные отдельно друг от друга. В ряде из них выявлялись герминативные центры. Сосуды красной пульпы были полнокровны. Краевая зона в узелках слабо визуализировалась (рисунок 2).

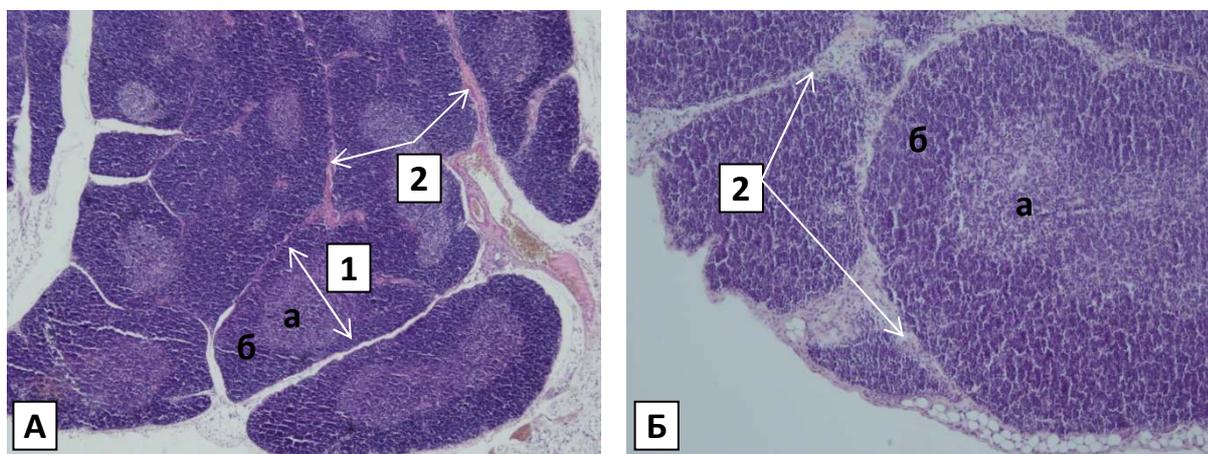


Рисунок 1. Участки тимуса крысы после воздействия карбамиллированного дарбэпоэтина в дозе 50 мкг/кг: 1 – долька тимуса (а – мозговое вещество, б – корковое вещество); 2 – соединительнотканые перегородки. Окраска: гематоксилин-эозин. Ув. *4 (А) и *10 (Б)

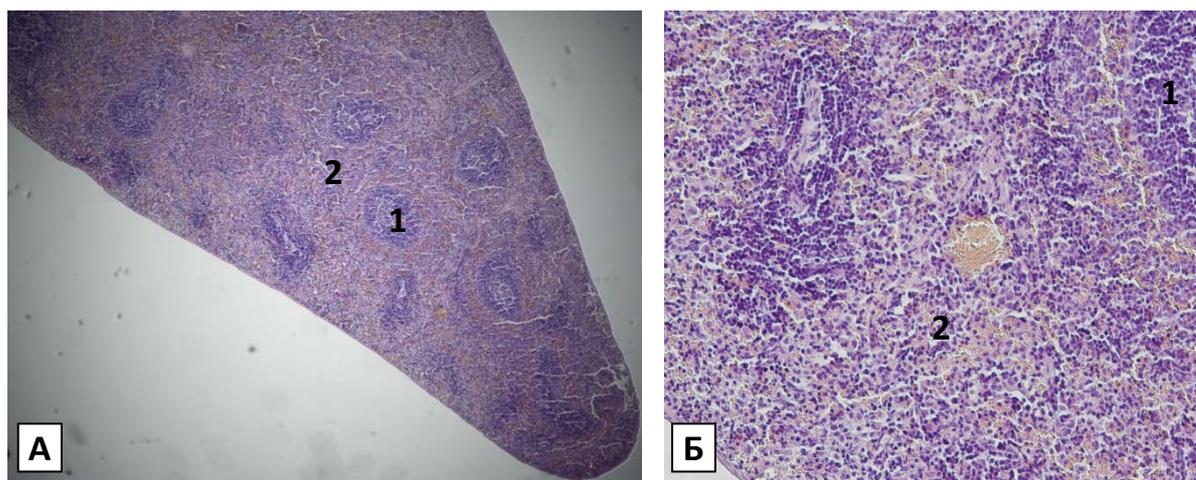


Рисунок 2. Участки селезенки крысы после воздействия карбамилрованного дарбэпоэтина в дозе 50 мкг/кг: 1 – лимфатические узелки; 2 – красная пульпа. Окраска: гематоксилин-эозин. Ув. *4 (А) и *20 (Б)

Можно предположить, что данные особенности в строении тимуса и селезенки связаны с цитопротекторным действием производного эритропоэтина, которое может отчасти реализовываться посредством его преференциального связывания с β -рецепторной субъединицей (β cR), запускающей процесс сигнальной трансдукции ростовых факторов и цитокинов [10]. А это в свою очередь позволяет активно реагировать на антигенный материал, что проявляется в наличии четко выраженных герминативных центров в лимфатических узелках белой пульпы селезенки. Данный механизм также влияет на процессы дифференцировки и выселение лимфоцитов из тимуса в кровеносное русло и как следствие проявляется увеличением в долях мозгового вещества, по сравнению с корковым.

При двукратном превышении дозы препарата на срезах тимуса корковое вещество долек визуально преобладало над мозговым. В прослойках соединительной ткани между дольками тимуса встречались единичные скопления адипоцитов. Имелись единичные полнокровные сосуды (рисунок 3).

В селезенке при этом лимфатические узелки, в большинстве случаев, содержали герминативные центры. Они располагались группами, реже поодиночке. Сосудистая сеть была хорошо выражена с диффузно-очаговым полнокровием сосудов и капилляров. Краевая зона занимала одну треть лимфатических узелков и часто сливалась с

аналогичной соседнего узелка (рисунок 4).

Данные морфологические особенности, возможно, связаны со способностью карбамилрованного дарбэпоэтина больше воздействовать на пролиферативную и анти-апоптотическую активность лимфоцитов при двукратном увеличении дозы препарата. Так в долях тимуса преобладало корковое вещество над мозговым, а в лимфатических узелках белой пульпы селезенки развита краевая зона.

Необходимо отметить, что скопление групп адипоцитов, четкие соединительнотканые перегородки в тимусе, а также развитая сосудистая сеть селезенки являются, согласно литературным данным, возрастными особенностями данных органов [1, 5, 6].

Вывод. Доклиническое исследование карбамилрованного дарбэпоэтина в разных дозах показало, что тимус и селезенка подвергаются незначительным морфологическим изменениям, по сравнению с контрольными группами, что связано с механизмом действия препарата (направлено на лечение или предупреждение состояний, ассоциированных с повреждением ткани), а также с возрастными изменениями.

Полученные результаты позволяют рекомендовать препарат Карбамилрованный дарбэпоэтин, раствор для инъекций (ООО «Фармапарк», Россия) для проведения клинического исследования с целью регистрации препарата в РФ.

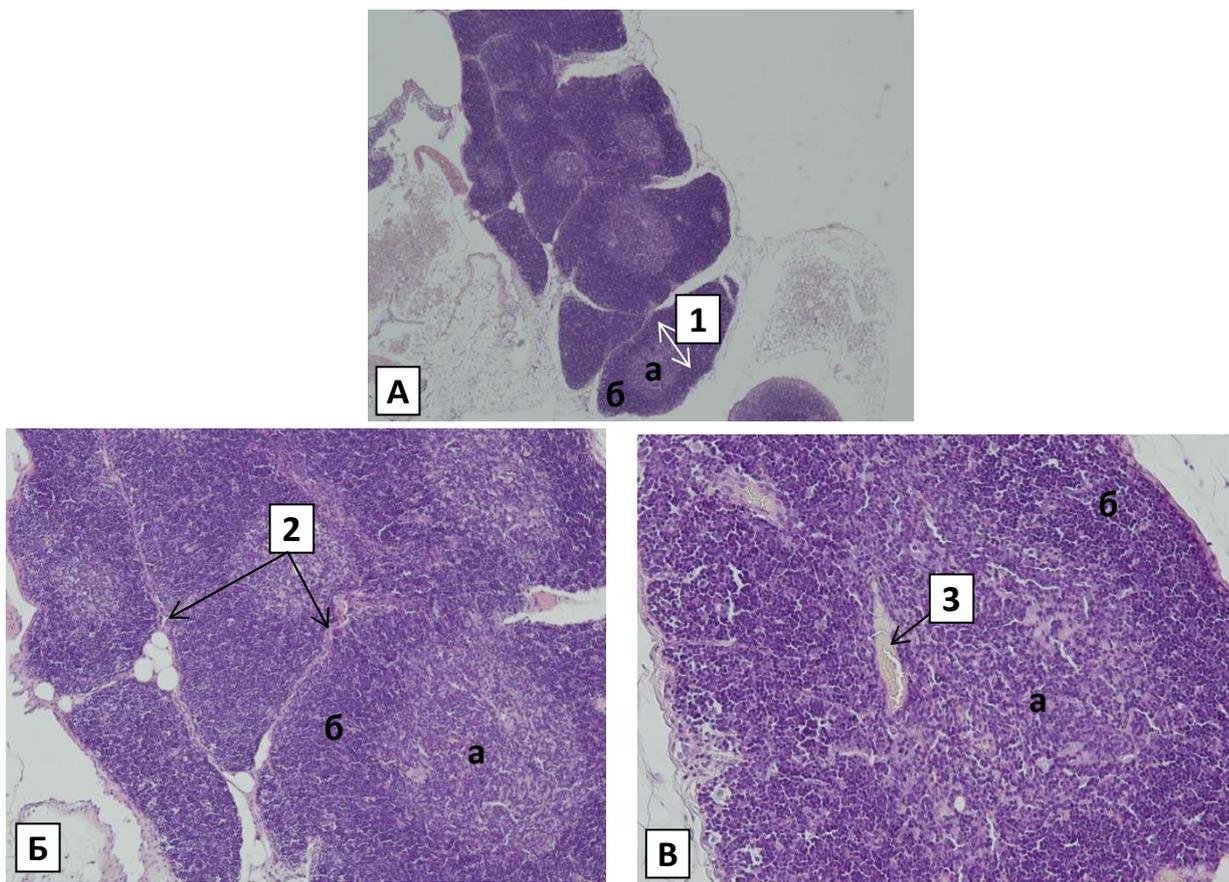


Рисунок 3. Участки тимуса крысы после воздействия карбамилрованного дарбэпоэтина в дозе 100 мкг/кг: 1 – долька тимуса (а – мозговое вещество, б – корковое вещество); 2 – соединительнотканые перегородки, 3 – сосуд. Окраска: гематоксилин-эозин. Ув. *4 (А), *10 (Б) и *20 (В)

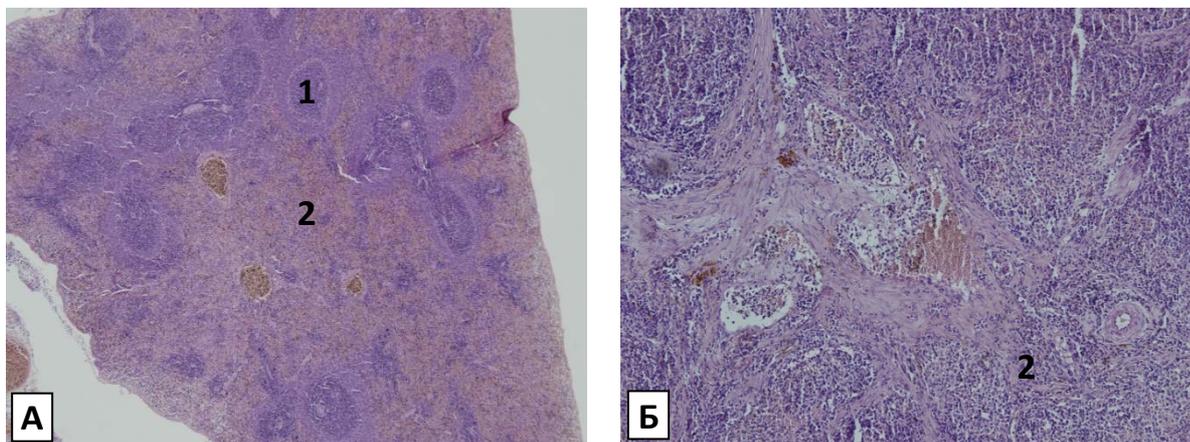


Рисунок 4. Участки селезенки крысы после воздействия карбамилрованного дарбэпоэтина в дозе 100 мкг/кг: 1 – лимфатические узелки; 2 – красная пульпа. Окраска: гематоксилин-эозин. Ув. *4 (А) и *20 (Б)

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ:

1. Буклис, Ю.В. Исследование иммунных структур селезенки в условиях хронического радиационного воздействия на организм /

Ю.В. Буклис // Морфология. - 2010. - Т. 137, № 4. - С. 42.

2. ГОСТ Р 53434 – 2009 «Принципы надлежащей лабораторной практики»

3. Гуськова, Т.А. Токсикология лекарственных средств. Изд. второе дополненное /

- Т.А. Гуськова. - М.: МДВ, 2008. - С. 154.
4. Карбамилированный дарбэпоэтин альфа: структура и свойства / М.А. Жученко, М.В. Серебрякова, Ю.А. Серегин, [и др.] // Биотехнология. - 2017. - Т. 33, № 4. - С. 28–43.
 5. Молдавская, А.А. Морфологические критерии строения селезенки в постнатальном онтогенезе / А.А. Молдавская, А.В. Долин // Успехи современного естествознания. - 2009. - № 2. - С. 15-18.
 6. Мороз, Г.А. Строение тимуса интактных крыс-самцов линии Вистар разного возраста / Г.А. Мороз // Світ медицини та біології. - 2009. - № 3. - С. 98-102.
 7. Национальный стандарт Российской Федерации ГОСТ 33044-2014 «Принципы надлежащей лабораторной практики».
 8. Приказ Министерства здравоохранения и социального развития РФ от 13 октября 2010 г. № 708н «Об утверждении Правил лабораторной практики».
 9. Приказ Министерства здравоохранения РФ от 01 апреля 2016 г. № 199н «Об утверждении Правил надлежащей лабораторной практики».
 10. Самсонова, К. И. Эффективность карбамилированного дарбэпоэтина (CdEPO) при экспериментальной ишемии головного мозга / К. И. Самсонова // Материалы III Всероссийской 14-я межрегиональной с международным участием научной сессии молодых ученых и студентов «Современное решение актуальных научных проблем медицины» 15–16 марта 2017. г. Нижний Новгород. - С. 25-28.
 11. Протективные эффекты карбамилированного дарбэпоэтина на модели ишемической нейропатии зрительного нерва / А.А. Пересыпкина, М.В. Покровский, В.О. Губарева, А.А. Должиков // Экспериментальная клиническая фармакология. - 2018. - № 81(7). - С. 8-13. DOI: 10.30906/0869-2092-2018-81-7-8-13.
 12. Пученкова, О.А. Антигипоксическое действие карбамилированного дарбэпоэтина на модели нитритной гипоксии / О.А. Пученкова, П.В. Сериков // Научный альманах. - 2018. - № 4-3(42). - С. 118-122. DOI: 10.17117/na.2018.04.03.118.
 13. Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств. Часть первая. - М.: Гриф и К, 2012. – 944 с.
 14. Cerami, A. The value of failure: the discovery of TNF and its natural inhibitor erythropoietin / A. Cerami // J. Intern. Med. - 2011. - 269(1). - P. 8–15.
 15. Guide for the care and use of laboratory animals / National Academy press; Washington, D.C., 2011.