 10.15789/1563-0625-EOA-3176

ВЛИЯНИЕ ЭКСТРАКТА ФАБРИЦИЕВОЙ БУРСЫ ПТИЦ НА КОМПЕНСАТОРНЫЕ ВОЗМОЖНОСТИ КЛЕТОК КОСТНОГО МОЗГА, СЕЛЕЗЁНКИ, ТИМУСА У ЦИКЛОФОСФАМИД-ИНДУЦИРОВАННЫХ МЫШЕЙ

Кольберг Н. А. [1, 2],
Мухлынина Е. А. [2],
Бриллиант С. А. [2, 3],
Гетте И. Ф. [2],
Черешнев В. А. [2],
Данилова И. Г. [2, 3]

[1] ФГБОУ ВО Уральский государственный экономический университет, Екатеринбург, Россия.
[2] ФГБУН Институт иммунологии и физиологии Уральского отделения РАН, Екатеринбург, Россия.
3 ГАУЗ СО Институт медицинских клеточных технологий, Екатеринбург, Россия.

 ISSN 1563-0625 (Print)
ISSN 2313-741X (Online)

 10.15789/1563-0625-EOA-3176

EFFECT OF AVIAN BURSA FABERICA EXTRACT ON THE COMPENSATORY CAPACITY OF BONE MARROW, SPLEEN AND THYMUS CELLS IN CYCLOPHOSPHAMIDINE-INDUCED MICE

Kolberg N. A. [a, b],
Mukhlynina E. A. [b],
Brilliant S. A. [b, c],
Gette I. F. [b],
Chereshnev V. A. [b],
Danilova I. G. [b, c]

[a] FGBOU VO Ural State University of Economics, Ekaterinburg, Russian Federation.
[b] FGBUN Institute of Immunology and Physiology, Ural Branch of RAS, Ekaterinburg, Russian Federation.
[c] SAUZ SO Institute of Cell Technologies in Medicine, Ekaterinburg, Russian Federation.

 ISSN 1563-0625 (Print)
ISSN 2313-741X (Online)

 10.15789/1563-0625-EOA-3176

Резюме

Злокачественные новообразования часто возникают на фоне иммунодефицита. Но и различные химиотерапевтические препараты, применяемые для лечения онкологических заболеваний, также могут вызывать развитие или усугублять иммунодефицитные состояния, чаще всего затрагивающие угнетение функции костного мозга. В предыдущих исследованиях показано, что биоорганокомплекс, полученный из Фабрициевой сумки цыплят-бройлеров, обладает антиоксидантным и иммунотропным действием. Целью данного исследования было изучение защитного механизма биоорганокомплекса «Бурсанатал», полученного из экстракта бурсы птицы против циклофосфамид-индуцированного подавления иммунитета в костном мозге, тимусе, селезенке мышей C57Bl/6. Иммунодефицит у мышей индуцировали однократной инъекцией циклофосфамида (200 мг/кг). Применяли гистологические, морфометрические, радиологические методы исследования, а также иммунногистохимическое окрашивание селезенки и тимуса с использованием антител к CD45, CD3. В ходе проведенных исследований показано, что введение циклофосфамида вызывает изменение гематологических показателей как периферической крови, так и красного костного мозга. При этом нейтрофильный, базофильный и эритроидный росток обладают меньшей чувствительностью к повреждающему действию циклофосфамида и к 8 суткам наблюдается их компенсаторная гиперплазия. Полученные результаты свидетельствуют, что после введения биоорганокомплекса в периферической крови мышей C57Bl/6 отмечается увеличение содержания лейкоцитов, эритроцитов и гемоглобина. Клеточность костного мозга возрастает на фоне активации продукции и созревания клеток эритроцитарного, нейтрофильного, базофильного и лимфоцитарного ростков. В селезенке у мышей с циклофосфамид - индуцированным иммунодефицитом после введения препарата «Бурсанатал» определяется достоверное снижение площади красной пульпы в единице площади. Также в селезенке обнаруживаются признаки активации экстрамедуллярного кроветворения в виде повышения числа колониеобразующих клеток. Также в белой пульпе мышей C57Bl/6 отмечается уменьшение площади реактивного центра по сравнению с контролем при значительном повышении количества CD3+ клеток в красной и в белой пульпе. При этом показано, что препарат «Бурсанатал» не вызывает значительных изменений морфологии тимуса.

Ключевые слова: тимус, селезёнка, костный мозг, биоорганокомплекс «Бурсанатал», циклофосфамид, Т- и В- лимфоциты.

 ISSN 1563-0625 (Print)
ISSN 2313-741X (Online)

 10.15789/1563-0625-EOA-3176

Abstract

Malignant neoplasms often arise against the background of immunodeficiency. But anticancer chemotherapeutic drugs can also cause the development or aggravate immunodeficiency, affecting the bone marrow function. Previous studies have shown that the bioorganocomplex obtained from the chickens' Fabricius bursa has an antioxidant and immunotropic effect. The aim of this research was to investigate the protective mechanism of the bioorganocomplex «Bursanatal» against cyclophosphamide-induced immunosuppression in the bone marrow, thymus, spleen of C57Bl/6 mice. Immunodeficiency was induced with single cyclophosphamide injection (200 mg/kg). Histological, morphometric, radiological methods were used, as well as immunohistochemical staining of the spleen and thymus with CD45 and CD3 antibodies. The studies showed that cyclophosphamide injection affects both peripheral blood and bone marrow. Moreover, neutrophilic, basophilic and erythroid precursor cells are less sensitive to the cyclophosphamide. So on the 8th day their compensatory hyperplasia is observed. The use of the bioorganocomplex is accompanied by the leukocytes, erythrocytes and hemoglobin increase in the peripheral blood. The cellularity of the bone marrow increases due to the dividing and maturation of erythrocyte, neutrophil, basophil and lymphocyte lineage cells. Bioorganocomplex administration causes a reliable decrease the area of the red pulp in spleen of mice with cyclophosphamide-induced immunodeficiency. The activation of extramedullary hematopoiesis are found in the spleen of treated mice – the number of colony-forming hematopoietic progenitors increases. Also it is noted that the area of the reactive center in the white pulp decreases with a significant increase the CD3+ cells in the red and white pulp under the «Bursanatal» treatment. At the same time, it does not affect thymus pathomorphology.

Keywords: thymus, spleen, bone marrow, bioorganocomplex "Bursanatal", cyclophosphamide, T- and B- lymphocytes.

 ISSN 1563-0625 (Print)
ISSN 2313-741X (Online)

1 Введение

Злокачественные новообразования являются одной из основных причин смертности и инвалидизации населения [**7**]. На сегодняшний день одним из основных способов лечения онкологических заболеваний является химиотерапия, вследствие которой развиваются иммунодефицитные состояния, вызванные угнетением функции костного мозга Циклофосфамид (ЦФА) применяется как химиотерапевтический лекарственный препарат алкилирующего типа действия, используемый при лечении различных видов онкологических и аутоиммунных заболеваний. ЦФА останавливает клеточный цикл на стадии G0/G1 и S вследствие возникновения перекрестных сшивок и повреждений ДНК [**9**]. Он является цитотоксическим агентом, вызывая апоптоз клеток.

Как противоопухолевый агент ЦФА ингибирует деление и пролиферацию клеток костного мозга, что уменьшает количество ядросодержащих клеток в костном мозге и снижает его функции [**8**]. Вызванная препаратом иммуносупрессия является основным ограничивающим фактором применения циклофосфамида в клинической химиотерапии. Недавние исследования убедительно свидетельствуют о том, что соединения, проявляющие антиоксидантную активность, оказывают защитное действие против химически индуцированной токсичности ЦФА [**8**]. В настоящее время разрабатывается и изучается механизм действия биоорганокомплексов, биологически активных пептидов, полученных из сырья животного происхождения [**1, 3**]. Данные вещества обладают выраженными преимуществами, такими как низкая токсичность, минимальное количество побочных эффектов, что определяет их перспективность в качестве терапевтических средств, предотвращающих иммуносупрессивное действие химиотерапевтических препаратов. Экспериментальный препарат «Бусанатал» был получен из Фабрициевой сумки цыплят-бройлеров в возрасте 35–42 дней. Низкомолекулярный экстракт бурсы содержит широкий спектр биологически активных пептидов, ростовых факторов, цитокинов. Показано, что введение «Бурсанатала» телятам с выявленным хламидиозным артритом способствовало увеличению Т- и В-лимфоцитов и повышению титра специфических антител, а также установлено, что препарат усиливает фагоцитарную активность полиморфноядерных лейкоцитов, вызывает усиление гуморального иммунитета при инфекционных заболеваниях птицы **[4].** Однако еще не изучены механизмы действия ферментативного гидролизата лимфоидной ткани цыплят-бройлеров на культуры клеток, на органы иммуногенеза – костный мозг, тимус, селезенку. Перспективность исследования определяется тем, что препарат «Бурсанатал» является потенциально иммуномодулирующим средством.

Цель исследования – изучение защитного механизма действия экстракта бурсы цыплят-бройлеров против циклофосфамид-индуцированного подавления иммунитета у мышей C57Bl/6.

2 Материалы и методы

Получение экстракта бурсы

Экстракт бурсы получали из фабрициевой сумки цыплят бройлеров в возрасте 35-42 дня по разработанной технологии Н.А. Кольберг [**2**]. Основные технологические этапы включают измельчение, гомогенизацию, экстрагирование, удаление термолабильной фракции. Экстракт содержит комплекс веществ с молекулярной массой от 10 до 1,0 кДА, обладающих иммуномодулирующими свойствами

Экспериментальные животные

Исследования были проведены на 24 мышах – самцах линии C57BL/6, весом 18-22 г, возраст которых на момент начала эксперимента составлял 3-3,5 месяца. Все животные содержались в одинаковых условиях вивария при контролируемой температуре (22±2°C) и влажности (50±10%) при соотношении световой и темновой фаз суток 12 часов: 12 часов и свободным доступом к воде и корму. На работу с животными было получено разрешение **Этического комитета ИИФ УрО РАН.**

Протокол эксперимента

Мыши были случайным образом разделены на 4 группы. 1. Интактные животные (n=6). 2. Контрольная группа мышей (n=6), получавших экстракт бурсы внутрибрюшинно в дозе 0,1 мл/20 г массы животного в течение 7 дней (Бурсанатал). 3. Животные (n=6), которым внутрибрюшинно однократно проводили инъекцию ЦФА в дозе 200 мг/кг массы тела, а далее в течение 7 дней вводили физиологический раствор. 4. Животные (n=6), которым вводили экстракт бурсы внутрибрюшинно в дозе 0,1 мл/20 г массы животного в течение 7 дней, начиная со дня, следующего за инъекцией ЦФА (ЦФА+Бурсанатал). В начале эксперимента и через 8 суток у всех животных проводилось измерение массы тела.

Взятие крови у мышей проводилось под изофлурановым наркозом на 8 сутки из бедренной вены в пробирку с К3-ЭДТА для проведения гематологического анализа с последующей эвтаназией путем цервикальной дислокации. Далее у мышей извлекали селезенку, тимус и костный мозг.

Исследуемые показатели

Анализ периферической крови проводили на автоматизированном гематологическом анализаторе Celly 70 (Biocode Hycel), предназначенном для исследования крови животных.

Для подсчета миелограммы проводили забор костного мозга двух бедренных костей для определения общей клеточности костного мозга в камере Горяева и изготовления мазка. Мазок костного мозга окрашивали по-Романовскому-Гимзе. В мазке проводили дифференцировку миелокариоцитов (не менее 500 миелокариоцитов в каждом препарате) с использованием микроскопа Leica DM 2500. Результаты показывают количество различных подтипов миелокариоцитов в миллионах на бедро.

Гистологические методы исследования

Образцы тимуса и селезенки фиксировали в 10% забуференном формалине 24-48 часов. Стандартную гистологическую проводку материала осуществляли при помощи автоматического тканевого процессора Leica TP1020. Заливку образцов органов в парафин проводили при помощи станции заливки Leica EG1160. Парафиновые срезы тимуса и селезенки толщиной 3 – 5 мкм окрашивали гематоксилином и эозином, а также использовали для иммуногистохимического окрашивания.

Иммуногистохимическое исследование

Иммуногистохимическое окрашивание применялось для идентификации CD45+ клеток (пан-лейкоцитарный маркер), CD3+ (маркер Т-лимфоцитов) в тимусе и селезенке экспериментальных животных. В исследовании использовались антитела, приведенные в таблице (таблица 1).

Морфометрические методы исследования

Анализ изображений проводили на микроскопе марки Leica DM2500 с видеокамерой Leica DFC420. Оценка исследуемых показателей проводилась с помощью пакета прикладных морфометрических программ ВидеоТесТ – Морфология 5.0. На гистологических препаратах определяли площадь мозгового и коркового вещества в тимусе, соотношение красной и белой пульпы в селезенке. Морфометрию зон фолликулов селезенки (площади реактивного центра, мантийной зоны, маргинальной (краевой) зоны) проводили по всей площади препарата, данные представлены в мкм^2. Оценку морфометрических показателей, подсчет количества $CD45^+$, $CD3^+$ клеток производили при увеличении объектива микроскопа 40х в 10 полях зрения. На основе полученных данных производили подсчет среднеарифметических значений, которые подвергали статистической обработке.

Оценка пролиферативного потенциала препарата «Бурсанатал» в условиях in vivo путем радиометрии в жидком сцинтилляторе

Здоровым мышам, которым был предварительно введен «Бурсанатал», производилось внутрибрюшинное введение радиоактивного препарата (РФП) в расчете 0,1 мл на животное. В состав РФП входит 2^{14}C-тимидин и U^{14}C-уридин в соотношении 1:1 (по 37 МБк каждого радионуклида в 1 мл раствора для введения). Через 120 минут животное выводили из эксперимента. Забор селезенки и костного мозга проводился в пробирки с этиловым спиртом. Экстракция нуклеиновых кислот из тканей исследуемых органов лабораторных животных проводилась по стандартной методике (McGown E.L., 2000). Расчеты производятся по следующим формулам:

$$РНК = \frac{561 \cdot (A_{260} - A_{286}) \cdot V}{W \cdot 1 \cdot 100} \cdot 10,5$$

$$ДНК = \frac{800 \cdot (A_{265} - A_{284}) \cdot V}{W \cdot 1 \cdot 100} \cdot 10,1$$

где: W – навеска сухой ткани (мг);

l – толщина кюветы (1 см);

V – объем экстракта (мл);

10,5 –коэффициент для пересчета фосфора РНК в весовое значение РНК;

10,1 –коэффициент для пересчета фосфора ДНК в весовое значение ДНК. Анализ полученных результатов производилась путем радиометрии в жидком сцинтилляторе. Эффективность счета определялась измерением стандартного образца:

$$E\% = \frac{\text{СРм (образца)} - \text{СРм (фона)}}{DPm}.$$

Истинная радиоактивность исследуемой пробы рассчитывалась по формуле:

$$P = \frac{\text{СРм (опыт)} - \text{СРм (фон)}}{E},$$

DPm – количество распадов в секунду;

CPm – количество импульсов;

E – эффективность счета.

Результаты выражаются в Беккерелях (распадах в секунду).

Статистический анализ данных выполнен с использованием программного обеспечения Origin Pro 9.0 (OriginLab Corporation, США). Для оценки значимости отличий между выборками использовали непараметрический U-критерий Манн-Уитни для множественных парных сравнений. При проверке статистических гипотез уровень значимости принимали равным 0,05. Данные представлены в виде среднего арифметического (M) ± стандартная ошибка среднего (m).

3 **Результаты**

Наиболее интересным представляется вопрос изучения иммунотропности исследуемого препарата к клеткам центральных и периферических органов иммунопоэза.

Так по данным радиометрического исследования образцов костного мозга в опытной группе с введением «Бурсанатала» выявлено статистически значимое снижение включения селективного предшественника ДНК (Бк/г сухого веса и Бк/мг ДНК) в сравнении с показателем интактной группы животных - на 68,0 % и 30,2 % соответственно (Таблица 2). Отмечается также увеличение включения селективного предшественника РНК (Бк/г сухого веса и Бк/мг) на 59,6 % и 331,6% (Таблица 2).

При исследовании образцов селезенки установлено возрастание включения селективного предшественника ДНК на грамм сухого веса (Бк/г сухого веса) на 122,3 % (таблица 3). По показателю степени включения селективного предшественника ДНК (Бк/мг ДНК) прирост составил 119,4% в сравнении с показателем интактной группы, а по включению селективного предшественника РНК (Бк/мг РНК) прирост составил 140,4 %.

Уменьшение включения меченого тимидина в ДНК костного мозга может быть связано с выходом предшественников лейкоцитов для последующей стадии их созревания в периферических органах иммунопоэза, что подтверждается увеличением включения тимидина в ДНК в селезенке.

Увеличение включения меченого уридина в РНК в обоих органах может быть связано с усилением синтеза белков и активизацией метаболических реакций.

2. **Гематологические показатели крови мышей при введении циклофосфамида и «Бурсанатала»**. Введение ЦФА способствовало уменьшению доли лимфоцитов в периферической крови, тогда как содержание общего количества лейкоцитов оставалось на уровне показателя контрольных животных (таблица 4).

В группе мышей, получавших ЦФА, количество эритроцитов стало меньше, чем у интактных животных, что повлекло за собой уменьшение содержания гемоглобина и величины гематокрита (таблица 4). Таким образом, было доказано, что модель миелосупрессии была успешно выполнена.

При введении экстрактов бурсы (группа ЦФА+Бурсанатал) отмечается достоверное увеличение общего количества лейкоцитов, вероятно, за счет возрастания количества клеток, участвующих в неспецифической врожденной иммунной реакции – гранулоцитов и средних клеток, содержащих преимущественно фракцию моноцитов, так как фракция лимфоцитов оставалась на уровне показателя нелеченых животных. Количество эритроцитов, гемоглобина и гематокрит оставались ниже значений, характерных для интактных животных.

3. **Эффекты «Бурсанатала» на ядросодержащие клетки костного мозга у мышей после введения ЦФА**

При исследовании миелограмм мышей C57Bl/6 после введения ЦФА выявлено уменьшение по сравнению с интактными животными количества клеток лимфоидного ряда. Также отмечается возрастание числа клеток базофильного и нейтрофильного ряда (Таблица 5). Изменение миелограммы соответствует изменениям гематологических показателей после введения ЦФА и подтверждает развитие лимфопении. Нейтрофильный, базофильный и эритроидный росток при этом обладают меньшей чувствительностью к повреждающему действию ЦФА и к 8 суткам уже отмечается их компенсаторная гиперплазия. После введения ЦФА обнаружено уменьшение количества ретикулярных клеток и накопление общего числа клеток эритроидного ростка. Небольшое (в 1,1 раза) увеличение общего количества клеток костного мозга у мышей после действия ЦФА происходит в основном за счет нейтрофильного ряда клеток.

Введение экстракта бурсы мышам C57Bl/6, получившим ранее ЦФА, сопровождалось достоверным повышением в костном мозге лимфоцитов и общего количества клеток лимфоидного ряда как относительно интактных, так и группы нелеченых животных (Таблица 5). Недостаточное количество лимфоцитов в крови после введения экстракта бурсы можно объяснить отсутствием сигнала для осуществления специфической иммунной реакции.

У мышей введение экстракта бурсы способствовало увеличению в костном мозге клеток нейтрофильного ряда и их предшественников по сравнению с группами интактных животных и животных, которым вводился только ЦФА (таблица 5). Также введение «Бурсанатала» увеличивало

количество всех клеток эритроидного ряда как относительно показателей интактной группы, так и группы животных, получавших только ЦФА (таблица 5).

Значительное увеличение количества предшественников лейкоцитов и эритроцитов после введения экстракта бурсы отражено в повышении в 1,5 раза клеточности костного мозга, а также в повышении количества митозов (таблица 5).

Таким образом, корректирующее действие экстракта бурсы при экспериментальном иммунодефицитном состоянии у мышей проявляется в усилении пролиферации предшественников лимфоцитов, нейтрофилов и эритроцитов в костном мозге.

4. **Эффекты «Бурсанатала» на морфофункциональное состояние периферических органов иммунопоэза у мышей после введения ЦФА**

Проведен гистологический анализ селезёнки мышей после введения ЦФА. Белая пульпа состоит из диффузно расположенных лимфоидных фолликулов без светлых центров с центральными артериолами и периартериолярными лимфоцитарными муфтами. Общая клеточность органа не изменена. При исследовании мофофункционального состояния селезенки у животных, получавших «Бурсанатал», обнаружено достоверное снижение площади красной пульпы (Рисунок 1, Таблица 6), снижение площади реактивного центра. Однако, в строме диффузно определяются участки экстрамедуллярного кроветворения в виде колонии формирующие клетки мегакариоцитарного ряда. Также значительно повышено количество $CD3^+$ клеток в красной и белой пульпе селезёнки (Таблица 8) относительно показателей интактных мышей.

Проведенная оценка морфометрических изменений в тимусе не выявила значительного изменения площади коркового и мозгового вещества тимуса у мышей с введением «Бурсанатала» по сравнению с группой ЦФА (Таблица 9). Данные иммуногистохимического исследования тимуса не выявили значимых изменений содержания CD45+ и CD3+ клеток в корковом и мозговом веществе из расчета на единицу площади (Таблица 10). Таким образом, препарат «Бурсанатал» не вызывает относительного снижения общей клеточности тимуса в корковом и мозговом веществе.

4 Обсуждение

Препарат «Бурсанатал» получен из экстракта бурсы цыплят бройлеров. Процедуры экстракции и очистки просты в эксплуатации, безопасны, экологичны и могут использоваться для получения препарата в его промышленном производстве **[2].** ЦФА в настоящее время является клиническим противоопухолевым препаратом. По механизму действия ЦФА является алкилирующим цитотоксическим агентом, иммунотропное действие которого проявляется в угнетении функций костного мозга и других органов иммунопоэза **[5, 6, 10, 11].** В ранее проведенных исследованиях было показано, что экстракт бурсы (препарат «Бурсанатал») обладает выраженными иммунотропным действием, активируя или дезактивируя нарушенные

иммунные реакции. После инъекции ЦФА мышам в миелограмме обнаружено угнетение нейтрофильного и эритроидного ростка костного мозга, что отражается на изменениях гематологических показателей крови. После лечения препаратом «Бурсанатал» отмечается увеличение миелокариоцитов, за счет роста клеток лимфоидного, нейтрофильного и эритроидного ряда в миелограмме. Особый интерес в контексте сведений, полученных при исследовании образцов костного мозга, представляет статистически значимое повышение степени включения селективного предшественника РНК (Бк/г сухого веса и Бк/мг) на 59,6 % и 331,6%. Таким образом, можно утверждать, что в костномозговой ткани под влиянием исследуемого препарата происходит рост синтетической активности в целях стимуляции пролиферации колониеобразующих и бластных клеточных элементов, в том числе предшественников лейкопоэза и эритропоэза. Результаты эксперимента показали, что препарат Бурсанатал восстанавливает гемопоэтические функции костного мозга. Обнаруженные изменения в характере миелограммы нашли свое отражение в увеличении лейкоцитов в периферической крови в основном за счет гранулоцитов и средних клеток. Наблюдается тенденция к увеличению показателей красной крови. Наиболее интересным представляется вопрос о тропности исследуемого препарата к определенному типу тканей и клеток: является ли наблюдаемая активация синтетической активности костного мозга проявлением селективности влияния «Бурсанатала» в отношении клеток лимфоидного ростка костного мозга, опосредованной специфическим взаимодействием, или можно говорить только об общестимулирующем эффекте. Для ответа на данный вопрос необходимо обратиться к результатам исследования селезенки - периферического органа иммунопоэза. Результаты исследования образцов селезенки мышей, подвергнутых влиянию «Бурсанатала», представляют наибольший научный интерес, а также являются прямым продолжением дискуссии о селективности действия исследуемого препарата. При исследовании селезенки отмечается статистически достоверное повышение степени включения селективного предшественника ДНК /мг на 119,4% относительно контроля. Данный факт свидетельствует о интенсивных процессах в органе под воздействием препарата «Бурсанатал». Повышение включения селективного предшественника РНК в расчете на грамм сухого веса (мг/г) на 47,96% и РНК/мг на 40,4 % указывает на активно протекающие процессы транскрипции в клетках. В ткани селезенки обнаружено повышение числа колоний-формирующих клеток, Хотя, количество Т-лимфоцитов в ткани увеличивается, что является косвенным подтверждением стимулирующего действия препарата на селезенку.

Можно предположить, что введенный лабораторным животным экстракт, вероятно, за счет специфического рецептор-лигандного регулирования проявляет тропность к органам иммуногенеза, в первую очередь к селезенке, и, тем самым, демонстрирует выраженные иммуномодулирующие свойства, заключающиеся, предположительно, в усилении пролиферации и дифференцировки Т- и В-лимфоцитов. Данный

 10.15789/1563-0625-EOA-3176

вывод подтверждается резким увеличением количества Т+ лимфоцитов как в белой, так и красной пульпе селезенки.

Не выявлено достоверного изменения в морфометрии и клеточности тимуса при лечении ЦФА животных после терапии «Бурсанаталом».

5 **Заключение**

Таким образом, в настоящем исследовании было установлено, что препарат «Бурсанатал» оказывает защитное действие на органы иммунопоэза - костный мозг и селезёнку при индуцированной иммуносупрессии, вызванной ЦФА, что обеспечивает фармакологическую основу для дальнейшей клинической разработки препарата «Бурсанатал».

 ISSN 1563-0625 (Print)
ISSN 2313-741X (Online)

 10.15789/1563-0625-EOA-3176

ТАБЛИЦЫ

Таблица 1. Перечень антител для исследования.
Table 1. List of antibodies to be tested.

Изучаемый антиген Antigen to be studied	Первичное антитело: клон, разведение, производитель Primary antibody: clone, dilution, manufacturer	Вторичное антитело: клон, разведение, производитель Secondary antibody: clone, dilution, manufacturer
$CD45^+$	CD45 Polyclonal Antibody, 1:100, PA5-96061, Invitrogen, Thermo Fisher Scientific, USA.	Goat anti-Rabbit IgG (H+L) Secondary Antibody, Biotin, поликлональное, 1:1000, 65-6140, Thermo Fisher Scientific, USA.
$CD3^+$	Anti-CD3, T Cell antibody produced in rabbit, polyclonal, 1:200, C7930, Sigma-Aldrich, Merck, USA	

Таблица 2. Количество нуклеиновых кислот и показатели пролиферативной активности костного мозга под влиянием препарата «бурсанатал».
Table 2. Quantity of nucleic acids and indices of proliferative activity of bone marrow under the influence of «bursanatal» preparation.

Показатели Indicators	Интактные Intact	Бурсанатал Bursanatal
Включение селективного предшественника ДНК, Бк/г сухой массы Inclusion of selective DNA precursor, Bq/g dry weight	5806,13± 721,86	1859,61± 323,69 *
Включение селективного предшественника РНК, Бк/г сухой массы Inclusion of selective RNA precursor, Bq/g dry weight	2738,08± 285,03	4370,34± 336,62 *
Включение селективного предшественника ДНК, Бк/мг ДНК Inclusion of selective DNA precursor, Bq/mg DNA	1,29± 0,16	0,90± 0,15 *
Включение селективного предшественника РНК, Бк/мг РНК Inclusion of selective RNA precursor, Bq/mg RNA	1,42± 0,15	4,71± 0,36 *

* - достоверность ($p < 0,05$) по отношению к значению показателя интактной группы.

 ISSN 1563-0625 (Print)
ISSN 2313-741X (Online)

 10.15789/1563-0625-EOA-3176

Таблица 3. Количество нуклеиновых кислот и показатели пролиферативной активности селезёнки под влиянием препарата «бурсанатал».

Table 3. Amount of nucleic acids and indicators of proliferative activity of spleen under the influence of «bursanatal» preparation.

Показатели Indicators	Интактные Intact	Бурсанатал Bursanatal
Включение селективного предшественника ДНК, Бк/г сухой массы Inclusion of selective DNA precursor, Bq/g dry weight	1478,70± 346,93	3287,28± 1082,63 *
Включение селективного предшественника РНК, Бк/г сухой массы Inclusion of selective RNA precursor, Bq/g dry weight	3727,24± 917,59	5515,02± 1519,39
Включение селективного предшественника ДНК, Бк/мг ДНК Inclusion of selective DNA precursor, Bq/mg DNA	2,53± 1,28	5,55± 0,85 *
Включение селективного предшественника РНК, Бк/мг РНК Inclusion of selective RNA precursor, Bq/mg RNA	2,03± 0,46	2,85± 0,49 *

* - достоверность ($p < 0,05$) по отношению к значению показателя интактной группы.

 ISSN 1563-0625 (Print)
ISSN 2313-741X (Online)

 10.15789/1563-0625-EOA-3176

Таблица 4. Гематологические показатели периферической крови мышей после введения циклофосфамида и экстракта бурсы.

Table 4. Hematological parameters of peripheral blood of mice after administration of cyclophosphamide and bursa extract.

Показатель/Группа Indicator/Group	Интактные Intact	ЦФА CFA	ЦФА +Бурсанатал CFA + Bursanatal
Лейкоциты, 10^3/мкл Leukocytes, 10^3/μL	4,05±0,47	4,25±1,61	6,22±0,67*
Лимфоциты, 10^3/мкл Lymphocytes, 10^3/μL	3,21±0,36	1,37±0,43*	1,48±0,26*
Средние клетки, 10^3/мкл Medium cells, 10^3/μL	0,73±0,10	2,67±1,08*	4,28±0,69*
Гранулоциты, 10^3/мкл Granulocytes, 10^3/μL	0,12±0,02	0,22±0,10	0,45±0,09*
Эритроциты, 10^6/мкл Erythrocytes, 10^6/μl	9,98±0,24	8,28±0,27*	9,01±0,25*
Гемоглобин, г/дл Hemoglobin, g/dL	14,18±0,37	11,42±0,20*	12,33±0,36*
Гематокрит, % Hematocrit, %	42,25±1,30	35,05±1,19*	37,93±1,12*

* - достоверность ($p < 0,05$) по отношению к значению показателя интактной группы.

 ISSN 1563-0625 (Print)
ISSN 2313-741X (Online)

 10.15789/1563-0625-EOA-3176

Талица 5. Миелограмма мышей линии c57bl/6 после введениея цфа и экстракта бурсы, 10*^{6} клеток/ бедро.

Table 5. Milogram c57bl/6 mice after administration of cfa and bursa extract, 10*^{6} cells/thigh.

Тип клеток Cell type	Интактные Intact	ЦФА CFA	ЦФА +Бурсанатал
Ретикулярные клетки Reticular cells	0,28±0,02	0,19±0,02*	0,47±0,03* #
Эритроидный ряд Erythroid series	5,34±0,12	6,07±0,20*	8,71±0,22* #
Нейтрофильный ряд Neutrophilic series	12,89±0,14	15,57±0,13*	20,00±0,43* #
Базофильный ряд Basophilic series	0,44±0,02	0,81±0,02*	0,66±0,03* #
Эозинофильный ряд Eosinophilic series	0,06±0,02	0,07±0,03	0,10±0,02
Лимфоциты Lymphocytes	1,21±0,04	0,81±0,06*	1,69±0,05* #
Лимфоидный ряд Lymphoid series	2,43±0,03	1,71±0,08*	3,58±0,08* #
Мегакариоцитарный ряд Megakaryocytic series	0,04±0,01	0,05±0,02	0,06±0,01
Митозы Mitosis	0,02±0,01	0,01±0,01	0,11±0,04 * #
Всего клеток Total cells	23,50±0,22	26,33±0,21*	36,83±0,77* #

* - различия с показателем интактной группы достоверны ($p<0,05$);
# - различия с группой после воздействия ЦФА достоверны ($p<0,05$).

 ISSN 1563-0625 (Print)
ISSN 2313-741X (Online)

 10.15789/1563-0625-EOA-3176

Таблица 6. Характеристика красной и белой пульпы селезёнки экспериментальных групп.

Table 6. Characterization of red and white pulp of spleen of experimental groups.

Группа Group	S белой пульпы ($мм^2$) S white pulp (mm^2)	S красной пульпы (мм2) S red pulp (mm^2)	S белой пульпы /S красной пульпы S white pulp /S red pulp	Количество лимфоидных фолликулов / 1 $мм^2$ паренхимы Number of lymphoid follicles / 1 mm^2 of parenchyma
ЦФА CFA	1,271±0,097	6,467±0,081	0,303±0,031	2,088±0,120
ЦФА+Бурсанатал CFA+Bursanatal	1,453±0,098	5,503±0,202*	0,267±0,026	2,230±0,165

* - различия с показателем интактной группы достоверны ($p<0,05$).

Таблица 7. Морфометрия зон лимфоидных узелков селезёнки.

Table 7. Morphometry of spleen lymphoid nodule zones.

Группа Group	S реактивного центра ($мкм^2$) S reaction center (μm^2)	S мантийной зоны ($мкм^2$) S mantle zone (μm^2)	S краевой зоны ($мкм^2$) S edge zone (μm^2)
ЦФА CFA	8493±1532	44478±4694	21795±2377
ЦФА+Бурсанатал CFA+Bursanatal	3475±333*	36447±2681	23768±3909

* - различия с показателем интактной группы достоверны ($p<0,05$).

 ISSN 1563-0625 (Print)
ISSN 2313-741X (Online)

Таблица 8. Плотность распределения cd45+ и $cd3^+$ клеток в белой и красной пульпе селезёнки.

Table 8. Distribution density of cd45+ and cd3+ cells in the white and red pulp of the spleen.

Группа Group	CD-45+ клетки в 1 $мм^2$ красной пульпы CD-45+ cells in 1 mm^2 of red pulp	CD-45+ клетки в 1 $мм^2$ белой пульпы CD-45+ cells in 1 mm^2 of white pulp	CD3+ клетки в 1 $мм^2$ красной пульпы CD3+ cells in 1 mm^2 of the red pulp	CD3+ клетки в 1 $мм^2$ белой пульпы CD3+ cells in 1 mm^2 of white pulp
ЦФА CFA	74978±3609	85269±4780	2667,30±398,51	2873,16±851,03
ЦФА+Бурсанатал CFA+Bursanatal	74871±8815	89391±2937	11435,77±816,86*	27924,50±3418,57*

* - различия с показателем интактной группы достоверны ($p<0,05$).

Таблица 9. Площадь мозгового и коркового вещества тимуса.
Table 9. Area of the brain and cortical substance of thymus.

Группа Group	S мозгового вещества ($мм^2$) S brain matter (mm2)	S коркового вещества ($мм^2$) S cortical substance (mm2)	S мозгового вещества /S коркового вещества S brain matter /S cortical matter
ЦФА CFA	0,612±0,128	2,701±0,584	0,381±0,186
ЦФА+Бурсанатал CFA+Bursanatal	0,626±0,124	3,514±0,524	0,175±0,017

Таблица 10. Плотность распределения cd45+ и cd3+ клеток в мозговом и корковом веществе тимуса.

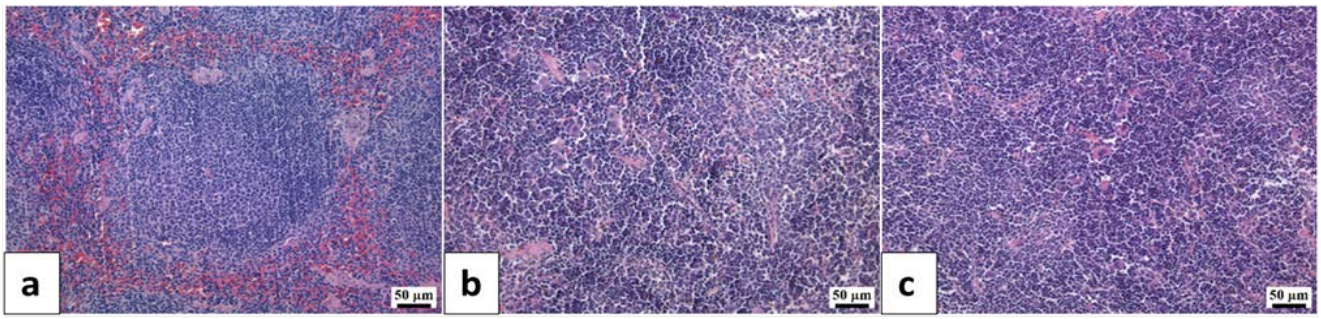
Table 10. Distribution density of cd45+ and cd3+ cells in the brain and cortex of thymus.

Группа Group	CD-45$^+$ клетки в 1 мм^2 коркового вещества CD-45+ cells in 1 mm^2 of cortical matter	CD-45$^+$ клетки в 1 мм^2 мозгового вещества CD-45+ cells in 1 mm2 of brain matter	CD-3$^+$клетки в 1 мм^2 коркового вещества CD-3+ cells in 1 mm2 of cortical matter	CD-3$^+$клетки в 1 мм^2 коркового вещества CD-3+ cells in 1 mm2 of cortical matter
ЦФА CFA	112504 ±8525	87595 ±2113	5312,83±738,60	6315,93±1504,53
ЦФА+Бурсанатал CFA+Bursanatal	129980 ±6985	83470 ±1586	4267,11±790,96	11648,75±2263,74

10.15789/1563-0625-EOA-3176

РИСУНКИ

Рисунок 1. Характеристика красной и белой пульпы селезёнки мышей C57Bl/6.
Figure 1. Characteristics red and white pulp of spleen C57Bl/6 mice.



Примечание: a – Интактные, b – ЦФА, c – ЦФА+Бурсанатал.

Note: a – Intact, b – CFA, c – CFA+Bursanatal.

ISSN 1563-0625 (Print)
ISSN 2313-741X (Online)

 10.15789/1563-0625-EOA-3176

ТИТУЛЬНЫЙ ЛИСТ_МЕТАДАННЫЕ

Блок 1. Информация об авторе ответственном за переписку

Бриллиант Светлана Александровна, канд. биол. наук, н.с. лаборатории иммунофизиологии и иммунофармакологии ФГБУН ИИФ УрО РАН, Российская Федерация, 620049, Екатеринбург, ул. Первомайская, д. 106
ФГБУН «Институт иммунологии и физиологии» Уральского отделения Российской академии наук;
адрес: 620078, Россия, г. Екатеринбург, ул. Первомайская,106;
телефон: 8(912)207-09-84;
e-mail: svetlana.brilliant@bk.ru

Brilliant Svetlana Alexandrovna, Ph.D. biol. sciences, researcher, Laboratory of Immunophysiology and Immunopharmacology, IIP UB RAS, Russian Federation, address: 620049, Yekaterinburg, Pervomajskaya st., 106;
telephone: 8(912)207-09-84;
e-mail: svetlana.brilliant@bk.ru

Блок 2. Информация об авторах

Кольберг Наталья Александровна, канд. вет. наук, директор Единого лабораторного комплекса УрГЭУ, ФГБОУ ВО Уральский государственный экономический университет, Российская Федерация, 620144, Екатеринбург, ул.8 Марта, д. 62.;

Kolberg Natalya Alexandrovna, Ph.D. vet. Sciences., Director of the Unified Laboratory Complex USUE, Ural State University of Economics, Russian Federation, 620144, Ekaterinburg, 8 Marta st., 62.;

Мухлынина Елена Артуровна, канд. биол. наук, ст.н.с лаборатории морфологии и биохимии, ФГБУН Институт иммунологии и физиологии Уральского отделения Российской академии наук (ИИФ УрО РАН), Российская Федерация, 620049, Екатеринбург, ул. Первомайская, д. 106, elena.mukhlynina@yandex.ru

Mukhlynina Elena Arturovna, Ph.D. biol. Sciences, Senior Researcher, Laboratory of Morphology and Biochemistry, Institute of Immunology and Physiology of the Ural Branch of the Russian Academy of Sciences (IIP UB RAS), Russian Federation, 620049, Yekaterinburg, Pervomajskaya st., 106.

Гетте Ирина Федоровна, канд. биол. наук, ст.н.с. лаборатории морфологии и биохимии, ИИФ УрО РАН, Российская Федерация, 620049, Екатеринбург, ул. Первомайская, д. 106, i.goette@yandex.ru

Gette Irina Fedorovna, Ph.D. biol. sciences, senior researcher, Laboratory of Morphology and Biochemistry, IIP UB RAS, Russian Federation, 620049, Yekaterinburg, Pervomajskaya st., 106.

 ISSN 1563-0625 (Print)
ISSN 2313-741X (Online)

Черешнев Валерий Александрович – д.м.н., профессор, академик РАН, научный руководитель ФГБУН «Институт иммунологии и физиологии» Уральского отделения Российской академии наук, г. Екатеринбург, Россия;
Chereshnev Valeriy Alexandrovich, PhD, MD (Medicine), Professor, Full Member, Russian Academy of Sciences, Scientific Director, Institute of Immunology and Physiology, Ekaterinburg, Russian Federation;

Данилова Ирина Георгиевна, доктор биол. наук, доцент, зам. директора по науке, зав. лабораторией морфологии и биохимии, ИИФ УрО РАН, Российская Федерация, 620049, Екатеринбург, ул. Первомайская, д. 106, ig-danilova@yandex.ru
Danilova Irina Georgievna, Doctor of Biol. Sciences, Associate Professor, Deputy science director, head of the Laboratory of Morphology and Biochemistry, IIP UB RAS, Russian Federation, 620049, Yekaterinburg, Pervomajskaya st., 106.

Блок 3. Метаданные статьи

ВЛИЯНИЕ ЭКСТРАКТА ФАБРИЦИЕВОЙ БУРСЫ ПТИЦ НА КОМПЕНСАТОРНЫЕ ВОЗМОЖНОСТИ КЛЕТОК КОСТНОГО МОЗГА, СЕЛЕЗЁНКИ, ТИМУСА У ЦИКЛОФОСФАМИД-ИНДУЦИРОВАННЫХ МЫШЕЙ

EFFECT OF AVIAN BURSA FABERICA EXTRACT ON THE COMPENSATORY CAPACITY OF BONE MARROW, SPLEEN AND THYMUS CELLS IN CYCLOPHOSPHAMIDINE-INDUCED MICE

Сокращенное название статьи для верхнего колонтитула:
ПЕПТИДЫ БУРСЫ АКТИВИРУЮТ ГЕМОПОЭЗ
BURSA PEPTIDES ACTIVATE HEMATOPOIESIS

Ключевые слова: тимус, селезёнка, костный мозг, биоорганокомплекс «Бурсанатал», циклофосфамид, Т- и В- лимфоциты.
Keywords: thymus, spleen, bone marrow, bioorganocomplex “Bursanatal”, cyclophosphamide, T- and B- lymphocytes.

Оригинальные статьи.
Количество страниц текста – 8,
Количество таблиц – 10,
Количество рисунков – 1.
16.01.2025

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

Порядковый номер ссылки	Авторы, название публикации и источника, где она опубликована, выходные данные	ФИО, название публикации и источника на английском	Полный интернет-адрес (URL) цитируемой статьи или ее doi.
1.	Кольберг Н. А. Тканевой препарат «Бурсанатал». Его влияние на резистентность и иммунитет при инфекционных заболеваниях // Инновационные технологии в сельском хозяйстве: материалы III Междунар. науч. конф. (г. Казань, 2017). - Казань: Бук, 2017. - С. 21-34.	**Kolberg N.A. Tissue preparation "Bursanatal". Its effect on resistance and immunity in infectious diseases // Innovative Technologies in Agriculture: Proceedings of the III International Scientific Conference (Kazan, 2017). - Kazan: Buk, 2017. - C. 21-34.**	**https://elibrary.ru/item.asp?id=29140011**
2.	Кольберг Н.А., Кольберг М.А., Травникова Д.А., Данилова И.Г., Мухлынина Е.А. Способ переработки Фабрициевой бурсы птиц. Патент на изобретение RU 2782347 C1, 26.10.2022.	**Kohlberg N.A., Kohlberg M.A., Travnikova D.A., Danilova I.G., Mukhlynina E.A. Method of processing of Fabricia bursa of birds. Patent for invention RU 2782347 C1, 26.10.2022.**	**https://patents.google.com/patent/RU2782347C1/ru**
3.	Кольберг Н.А., Мухлынина Е.А., Бриллиант С.А., Данилова И.Г., Гетте И.Ф., Улитко М.В. Иммунотропное действие экстракта фабрициевой бурсы цыплят-бройлеров на мышей линий	**Kolberg N.A., Mukhlynina E.A., Brilliant S.A., Danilova I.G., Gette I.F., Ulitko M.V. Immunotropic effect of the extract fabricia bursa broiler chickens on C57BL/6 and C57BL/10 mice with experimental**	10.55934/2587-8824-2022-30-2-275-283

ISSN 1563-0625 (Print)
ISSN 2313-741X (Online)

	C57BL/6 и C57BL/10 с экспериментальным синдромом иммунодефицита // АПК России. - 2023.- Т. 30, № 2.- С. 275-283.	**immunodeficiency syndrome // APK Russia.- 2023.- Vol. 30, № 2.- C. 275-283.**	
4.	Кольберг Н.А., Петрова О.Г. с соавт. Иммунные стимуляторы в птицеводстве и животноводстве. - Екатеринбург: Уральское изд-во, 2012. - 195 с.	Kolberg N.A., Petrova O.G. et al. Immune stimulants in poultry and livestock breeding. - Ekaterinburg: Ural Publishing House, 2012. - 195 c.	**https://search.rsl.ru/ru/record/01006519292**
5.	Никитюк В.В. Химиотерапия в онкологии // Стандарты медицинской помощи, 2017. - С. 673-751.	Nikityuk V.V. Chemotherapy in oncology // Standards of Medical Care, 2017. - C. 673-751.	**https://elib.amu.kz/ru/lib/document/KNIGA/404B322A-833E-403A-8321-2DFFEF165B2E/**
6.	Телес К.А., Медейрос-Соуза П., Лима Ф.К., де Араужу Б.Г., Лима Р.К. Применение циклофосфамида в рутинной практике при лечении аутоиммунных ревматических заболеваний // Нефрология. - 2018. – Т. 22, №1. - С.104-113.	Teles C.A., Medeiros-Souza P., Lima F.C., de Araújo B.G., Lima R.C. Use of cyclophosphamide in routine practice in the treatment of autoimmune rheumatic diseases // Nephrology. - 2018. - T. 22, №1. - C.104-113.	10.24884/1561-6274-2018-22-1-104-113
7.	Bray F., Ferlay J., Soerjomataram I., Siegel R.L., Torre L.A., Jemal A. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. CA Cancer J. Clin., 2018.- Vol.68(6):394-424. doi:	**Bray F., Ferlay J., Soerjomataram I., Siegel R.L., Torre L.A., Jemal A. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. CA Cancer J. Clin., 2018.- Vol.68(6):394-424. doi:**	**10.3322/caac.21492** **10.3322/caac.21609**

ISSN 1563-0625 (Print)
ISSN 2313-741X (Online)

	10.3322/caac.21492. Erratum in: CA Cancer J Clin., 2020 Vol.70(4):313. doi: 10.3322/caac.21609.	**10.3322/caac.21492. Erratum in: CA Cancer J Clin., 2020 Vol.70(4):313. doi: 10.3322/caac.21609.**	
8.	Huang L., Shen M., Wu T., Yu Y., Yu Q., Chen Y., Xie J. Mesona chinensis Benth polysaccharides protect against oxidative stress and immunosuppression in cyclophosphamide-treated mice via MAPKs signal transduction pathways. Int J Biol Macromol., 2020, Vol.1, no.152, pp.766-774.	Huang L., Shen M., Wu T., Yu Y., Yu Q., Chen Y., Xie J. Mesona chinensis Benth polysaccharides protect against oxidative stress and immunosuppression in cyclophosphamide-treated mice via MAPKs signal transduction pathways. Int J Biol Macromol., 2020, Vol.1, no.152, pp.766-774.	10.1016/j.ijbiomac.2020.02.318
9.	Suchitra Ku Panigrahy, Suresh Jatawa, Archana Tiwari Therapeutic use of cyclophosphamide and its cytotoxic action. Journal of Pharmacy Research, 2011, Vol.4, no.8, pp. 2755-2757.	Suchitra Ku Panigrahy, Suresh Jatawa, Archana Tiwari Therapeutic use of cyclophosphamide and its cytotoxic action. Journal of Pharmacy Research, 2011, Vol.4, no.8, pp. 2755-2757.	**https://www.researchgate.net/publication/230728276_Therapeutic_use_of_cyclophosphamide_and_its_cytotoxic_action_A_challenge_for_researchers**
10.	Voelcke G. The Mechanism of action of cyclophosphamide and its consequences for the development of a new generation of oxazaphosphorine cytostatics. Sci. Pharm. 2020, Vol. 88, no.4, p. 42.	Voelcke G. The Mechanism of action of cyclophosphamide and its consequences for the development of a new generation of oxazaphosphorine cytostatics. Sci. Pharm. 2020, Vol. 88, no.4, p. 42.	https://doi.org/10.3390/scipharm88040042

ISSN 1563-0625 (Print)
ISSN 2313-741X (Online)

11.	Zhu Q., Xu L.H. Analysis of related factors in myelosuppression by antitumor drugs. Pharm. Clin. Res., 2015, Vol. 23, pp. 68–70.	Zhu Q., Xu L.H. Analysis of related factors in myelosuppression by antitumor drugs. Pharm. Clin. Res., 2015, Vol. 23, pp. 68–70.	**https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21830394/**