

**КЫРГЫЗСКАЯ ГОСУДАРСТВЕННАЯ МЕДИЦИНСКАЯ АКАДЕМИЯ  
ИМ. И. К. АХУНБАЕВА**

На правах рукописи  
УДК 616-002-08:612.017.1:549.25/.28

**БАЛАБЕКОВА МАРИНА КАЗЫБАЕВНА**

**ВЛИЯНИЕ МЕТАЛЛИНДУЦИРОВАННОГО УГНЕТЕНИЯ  
РЕАКТИВНОСТИ ОРГАНИЗМА НА ТЕЧЕНИЕ  
ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОГО ВОСПАЛЕНИЯ  
И ПУТИ ЕГО КОРРЕКЦИИ**

14.03.03 – патологическая физиология

Диссертация на соискание ученой степени  
доктора медицинских наук

**Научный консультант:**  
доктор медицинских наук, профессор  
Р. Р. Тухватшин

**Бишкек - 2020**

# ОГЛАВЛЕНИЕ

|          |   |           |
|----------|---|-----------|
|          | <b>ПЕРЕЧЕНЬ УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ, СИМВОЛОВ, ЕДИНИЦ И ТЕРМИНОВ.....</b>  | <b>6</b>  |
|          | <b>ВВЕДЕНИЕ.....</b>  | <b>7</b>  |
| <b>1</b> | <b>ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ.....</b>   | <b>17</b> |
| 1.1      | Влияние металлов на неспецифическую резистентность организма.....   | 17        |
| 1.2      | Современное представление о патогенезе асептического воспаления.....  | 29        |
| 1.3      | Роль миелоидных супрессорных клеток в регуляции иммунного ответа.....   | 32        |
| 1.4      | Коррекция ванадий- и хроминдуцированных повреждений.....  | 40        |
| <b>2</b> | <b>ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ...</b>   | <b>51</b> |
| <b>3</b> | <b>ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ СОБСТВЕННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ.</b>  |           |
|          | <b>Экспериментальное обоснование металлиндуцированных нарушений иммунологических показателей крови и лимфоорганов опытных животных с асептическим воспалением и новых способов патогенетической коррекции.....</b>                            | <b>70</b> |
| 3.1      | Экспериментальное изучение показателей, характеризующих иммунологическую реактивность организма опытных крыс, в динамике течения асептического воспаления в условиях предварительной экспозиции метаванадатом аммония и дихроматом калия..... | 70        |
| 3.1.1    | Микроскопическая картина асептического воспаления, вызванного на фоне предварительной затравки крыс солями ванадия и хрома.....   | 70        |

|       |  |     |
|-------|--|-----|
| 3.1.2 | Количественная оценка компонентов врожденного и адаптивного иммунитета по результатам гематологических и иммунологических показателей крови экспериментальных крыс с асептическим воспалением.....                     | 77  |
| 3.1.3 | Количественная оценка клеточности селезенки и результаты иммунофенотипирования ее субклеточных популяций у экспериментальных крыс с асептическим воспалением.....  | 94  |
| 3.1.4 | Факторный анализ массива данных, характеризующих показатели врожденного и адаптивного иммунитета у опытных крыс с асептическим воспалением .....   | 102 |
| 3.2   | Оценка клеточности и структурных изменений лимфоорганов экспериментальных животных с асептическим воспалением по результатам микроскопических, морфометрических и цитологических исследований.....                     | 107 |
| 3.2.1 | Оценка клеточности костно-мозгового пунктата экспериментальных животных со скипидар-индуцированным воспалением.....  | 107 |
| 3.2.2 | Оценка клеточности и структурных изменений тимуса экспериментальных животных с асептическим воспалением по результатам микроскопических и морфометрических исследований .....  | 110 |
| 3.2.3 | Оценка клеточности и структурных изменений брыжеечных лимфатических узлов экспериментальных животных с асептическим воспалением по результатам цитологических и микроскопических исследований.....                     | 117 |
| 3.3   | Экспериментальная оценка регенеративного потенциала МХФ-2 и рувимина по результатам микроскопической картины асептической раны и иммунологических показателей крови крыс с асептическим воспалением, вызванным на фоне |     |

|       |   |     |
|-------|---|-----|
|       | отравления солями ванадия и хрома .....   | 124 |
| 3.3.1 | Экспериментальная оценка регенеративного потенциала МХФ-2 и рувимины по результатам микроскопической картины асептической раны крыс с асептическим воспалением, вызванным на фоне отравления солями ванадия и хрома .....           | 124 |
| 3.3.2 | Оценка эффективности патогенетической коррекции при помощи МХФ-2 и рувимины показателей врожденного и адаптивного иммунитета у экспериментальных крыс с асептическим воспалением .....  | 133 |
| 3.3.3 | Оценка эффективности патогенетической коррекции при помощи МХФ-2 и рувимины селезеночных субклеточных популяций у экспериментальных животных с асептическим воспалением.....  | 163 |
| 3.4.  | Оценка эффективности патогенетической коррекции при помощи МХФ-2 и рувимины по результатам цитологических, микроскопических и морфометрических исследований лимфоорганов экспериментальных животных с асептическим воспалением..... | 172 |
| 3.4.1 | Оценка эффективности патогенетической коррекции при помощи МХФ-2 и рувимины по результатам цитологических исследований костного мозга экспериментальных животных с асептическим воспалением в сравнении с полиоксидонием.....       | 172 |
| 3.4.2 | Экспериментальная оценка регенеративного потенциала МХФ-2 и рувимины в сравнении с полиоксидонием по результатам микро- и морфометрических исследований тимуса опытных крыс в динамике течения воспаления.....                      | 180 |
| 3.4.3 | Экспериментальная оценка регенеративного потенциала МХФ-2 и рувимины по результатам цитологических и  |     |

|       |   |            |
|-------|---|------------|
|       | микроскопических исследований брыжеечных лимфатических узлов опытных крыс в динамике течения воспаления.....  | 187        |
| 3.5   | Математический анализ массива данных с применением многомерных методов статистического анализа .....  | 194        |
| 3.5.1 | Математическое моделирование массива данных с применением метода канонической корреляции .....  | 194        |
| 3.5.2 | Математическое моделирование массива данных с применением метода дискриминантного анализа .....   | 200        |
| 3.6.  | Патогенез ванадий- и хроминуцированных повреждений и патогенетическое обоснование корригирующего влияния МХФ-2 и рувимины в сравнении с полиоксидонием..... | 214        |
|       | <b>ВЫВОДЫ.....</b>  | <b>223</b> |
|       | <b>ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ.....</b>   | <b>225</b> |
|       | <b>СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ.....</b>  | <b>226</b> |
|       | <b>ПРИЛОЖЕНИЯ.....</b>  | <b>259</b> |

## ПЕРЕЧЕНЬ УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ, СИМВОЛОВ, ЕДИНИЦ И ТЕРМИНОВ

|                  |  |
|------------------|--|
| АПК              | антигенпрезентирующая клетка                               |
| АФК              | активные формы кислорода                                   |
| ВА               | ванадат аммония  |
| ВЛК              | врожденные лимфоидные клетки                               |
| ГСК              | гемопоэтические стволовые клетки                           |
| ДК               | дихромат калия   |
| ИИР              | индекс иммунореактивности                                  |
| ИРИ              | иммунорегуляторный индекс                                  |
| К+АВ             | контроль + асептическое воспаление                         |
| КВ               | корковое вещество  |
| КМ               | костный мозг   |
| КМИ              | корково-мозговой индекс                                    |
| ЛИ               | лимфоцитарный индекс                                       |
| ЛЭК              | локальная этическая комиссия                               |
| МАРК             | митоген активированная протеин киназа                      |
| МВ               | мозговое вещество  |
| МДА              | малоновые диальдегиды                                      |
| МФ               | макрофаги  |
| МОН              | министерство образования и науки                           |
| МХФ-2            | 1-(2-этоксиэтил)-4-(диметоксифосфорил)-4-гидроксипиперидин |
| ПатАМП           | патоген-ассоциированные паттерны                           |
| ПГЕ <sub>2</sub> | простогландин Е  |
| ПМН              | полиморфноядерные нейтрофилы                               |
| ПО               | полиоксидоний  |
| ПовАМП           | повреждение-ассоциированные молекулярные паттерны          |
| Р                | рувимин  |
| СОД              | супероксиддисмутаза  |
| ФАН              | фагоцитарная активность нейтрофилов                        |
| ФНО              | фактор некроза опухоли                                     |
| ЦП               | – цветовой показатель                                      |
| ЦТЛ              | цитотоксические лимфоциты                                  |
| CD               | кластеры дифференцировки лимфоцитов                        |
| GM-CSF           | гранулоцитарно-моноцитарный колониестимулирующий фактор    |
| НО               | гидроксильные радикалы                                     |
| MDSC             | миелоидные супрессорные клетки                             |
| NK               | натуральные киллеры  |
| NO               | оксид азота  |
| TGF              | трансформирующий фактор роста                              |
| Th               | T-хелпер   |
| Treg             | T-регуляторные лимфоциты                                   |

## ВВЕДЕНИЕ

**Актуальность проблемы.** Актуальность темы исследования обусловлена продолжающимся ростом загрязнения окружающей среды, ставшего одной из мировых стратегических проблем. Основными источниками загрязнения окружающей среды являются выхлопные газы автотранспорта, горнодобывающая и горно-перерабатывающая промышленность, предприятия чёрной металлургии, нефтехимии, производства стройматериалов, лакокрасочных изделий (Азимбекова А.К., Нургалиева К.О., 2016; Бакирова С.Ф., 2016; Жакен А., 2017; Бнятова Л.Г., 2018). Эти отрасли приносят огромную прибыль экономикам стран, однако наносят непоправимый урон окружающей среде и здоровью населения (Жакен А., 2017; Айдосов А.А., Айдосов Г.А., Заурбеков Н.С., 2018; Будащ Д.С., Бабанов С.А., 2018; Васильянова Л.С., Г.А. Козбагарова, 2018). В результате антропогенной деятельности человека формируются устойчивые зоны экологического бедствия, из которых в Республике Казахстан официально признаны Аральский регион и Семипалатинский регион с прилегающими к бывшему ядерному полигону районами Павлодарской, Восточно-Казахстанской и Карагандинской областей. Между тем, в Западно-Казахстанской области на территории города Актобе и в районе Карачаганакского нефтегазоконденсатного месторождения в настоящее время сформировалась устойчивая природно-техногенная провинция с повышенным содержанием тяжелых металлов в объектах окружающей среды, в том числе хрома (Бакирова С.Ф., 2016; Газалиева М.А. с соавт., 2017). Это обусловлено наличием крупных предприятий хромперерабатывающей промышленности, в частности завода хромовых соединений и ферросплавного завода. Они поставляют в окружающую среду аэрозоли шестивалентного хрома, в среднем 9,56 тонн в год. Жители данного региона подвергаются воздействию не только хрома, но и ванадия, поскольку в Актюбинской области располагаются две крупнейшие

нефтедобывающие компании - Эмбаунайгаз и Жанажол, которые являются источником выброса в атмосферу ванадия в составе продуктов сжигания попутного газа (Жумалина А.К. с соавт., 2015; Хантурина Г.Р., 2018). Токсические проявления экотоксикантов на организм человека возникают при воздействии двух и более факторов, что и послужило обоснованием к исследованию комплексного влияния ванадия и хрома в условиях нашего эксперимента.

Мониторинг состояния здоровья населения показал, что распространенность ряда заболеваний имеет тесную связь с загрязнением окружающей среды (Tsavé O., Petanidis S., Kioseoglou E. et al, 2016; Бабанов С.А., 2018; Токтомурадова Н.С., 2018; Treviño Samuel, Díaz Alfonso, Sánchez-Lara Eduardo et al, 2019). В условиях экологического неблагополучия окружающей среды актуальной является проблема повышения устойчивости организма к воздействию патогенных факторов. Так, в районе Карачаганакского нефтегазоконденсатного месторождения у местного населения ведущим клиническим синдромом иммунологической недостаточности выделен инфекционный синдром (Газалиева М.А. с соавт., 2016).

Была установлена зависимость частоты декомпенсации различных хронических неинфекционных болезней от уровня техногенной загрязненности. Поскольку, разнообразные по характеру воздействия вредные вещества вызывают ответные реакции регуляторных систем макроорганизма, считается, что наиболее ранние реакции возникают со стороны иммунной системы благодаря многогранности ее проявлений [Kopf Manfred et al., 2015; Dong Jie, et al, 2016; Fatkhutdinova Liliya M., 2016; Bennett Jeanette M., et al, 2018). Поэтому, в последние годы особое значение приобрела проблема влияния экотоксикантов на иммунную систему, поскольку она играет ведущую роль в сохранении здоровья и признана одной из сверхчувствительных к действию неблагоприятных факторов, даже в относительно низких концентрациях.



К сожалению, комплексный и длительный характер воздействия антропогенных факторов внешней среды вызывает перенапряжение защитных механизмов, способствуя изменению иммунной реактивности организма, что нарушает процессы адаптации к постоянно меняющимся условиям среды обитания. Многогранные проявления измененной реактивности, с одной стороны, являются маркером неблагополучия условий обитания, а с другой повышают вероятность развития новой патологии, утяжеления или хронизации текущих заболеваний инфекционного и неинфекционного генеза, на выявление чего и были нацелены наши исследования (Grimm Martin et al, 2016).

В литературных источниках представлены разрозненные сведения о нарушениях отдельных звеньев иммунитета после воздействия тяжелых металлов на организм (Tsava Olga, 2016; Zwolak Iwona et al, 2020). Суть общей обеспокоенности заключается в том, что непрерывная модуляция металлами иммунорегуляторной деятельности может привести к нарушению иммунного гомеостаза, что может способствовать формированию иммунодефицитных состояний, особенно, в регионах с техногенным загрязнением окружающей среды (Bagaitkar J., 2014).

Изучение воспаления как наиболее точного критерия оценки иммунологической реактивности организма представляет особый интерес для правильного понимания роли металлиндуцированной иммунодепрессии в механизмах дизрегуляции воспалительного процесса (Газалиева М.А. с соавт., 2016; Жакыпбекова А.Т., Усенов К.Ж. , 2017; Валеева А.Р., 2018). В связи с чем, поиски путей решения возникших проблем продиктованы актуальностью выбранной темы, необходимостью изучения показателей, наиболее полно отображающих состояние иммунной системы и играющих ключевую роль в формировании иммунологической реактивности с целью выбора новых способов патогенетической коррекции нарушенных функций. Между тем, вопросы комбинированного влияния ванадия и хрома на течение и исход воспалительного процесса недостаточно изучены.

**Связь темы диссертации с приоритетными научными направлениями, крупными научными программами (проектами), основными научно-исследовательскими работами, проводимыми образовательными и научными учреждениями.** В рамках научно-технического проекта МОН РК «Молекулярно-биологические особенности течения асептического воспаления, ассоциированного с экологенной иммунодепрессией» (№ госрегистрации 0115РК00600, 2015-2017 гг., научный руководитель Балабекова М.К.) были выполнены исследования по изучению клеточных популяций селезенки при воспалении, вызванном на фоне металлиндуцированной иммунодепрессии с применением современных методов исследований. Изучение металлиндуцированных повреждений разных органов и систем организма, вызванных солями тяжелых металлов, патогенетической коррекции и способов активации защитно-приспособительных механизмов выполнено в рамках НИР на кафедре патофизиологии КГМА им. И. К. Ахунбаева.

**Цель исследования:** Изучить течение асептического воспаления у животных, подверженных комбинированному воздействию ванадия и хрома, для разработки новых способов патогенетической коррекции.

**Задачи исследования:**

1. Провести комплексную оценку ванадий- и хромассоциированных нарушений иммуноопосредованных механизмов регуляции воспаления по результатам гематологических, иммунологических и микроскопических исследований.

2. Оценить влияние соединений ванадия и хрома на течение асептического воспаления у экспериментальных животных по результатам количественной оценки селезеночных субклеточных популяций с фенотипами His48+CD11b/c+, His48HighCD11b/c+, His48lowCD11b/c+, CD3+CD4+, CD3+CD4+IFN $\gamma$ +, CD3+CD4+IL-4+, CD8+.

3. Провести микроскопическую оценку структурных изменений в костном мозге, тимусе, селезенке и брыжеечных лимфатических узлах после

двухнедельной интоксикации соединениями ванадия и хрома и вызванного на этом фоне асептического воспаления у опытных крыс.

4. Установить наиболее информативные иммунологические показатели, ассоциированные с манифестацией воспаления, и отражающие ключевые механизмы ванадий- и хроминдуцированной иммунодепрессии.

5. Оценить динамику изменений основных иммунологических показателей крови опытных крыс с асептическим воспалением после патогенетической коррекции при помощи МХФ-2 и рувимины.

6. Оценить картину репаративных изменений в очаге воспаления и лимфоорганах опытных крыс с асептическим воспалением после патогенетической коррекции МХФ-2 и рувимином.

7. Выявить иммуномодулирующие свойства препаратов и МХФ-2, позволяющие установить их отличительные особенности в группах сравнения.

**Научная новизна работы.** Данная диссертация является фактически первым комплексным научным анализом патогенетических закономерностей функционирования иммунной системы при ванадиево-хромовых интоксикациях. Впервые изучено течение асептического воспаления у интактных крыс и животных с депрессией иммунологической реактивности, вызванной соединениями ванадия и хрома. Проведена комплексная оценка показателей, характеризующих состояние иммунологической реактивности организма опытных крыс, с проведением иммунологических, гематологических, морфологических, морфометрических и цитологических методов исследований центральных и периферических органов иммуногенеза и очага воспаления (костного мозга, тимуса, селезенки, брыжеечных лимфатических узлов, ткани воспаления).

Научная новизна предпринятого автором исследования заключается в том, что комбинированное воздействие метаванадата аммония и дихромата калия замедляет пролиферативные процессы в воспаленной ткани, разрешение воспаления и приводит к разрушительным изменениям в тимусе. Воздействие метаванадата аммония и дихромата калия смещает выработку

провоспалительного IL-6 в выработку противовоспалительного IL-10 во время острой фазы воспаления, препятствует распространению нейтрофилов у крыс со стерильным воспалением. Предварительное введение метаванадата аммония и дихромата калия препятствует дифференцировке клеток His48HighCD11b/c +, значительно подавляет продукцию цитокинов IFN $\gamma$  и IL-4 CD4+ Т лимфоцитами.

Получены новые данные об иммуномодулирующем влиянии нового синтетического биологически активного вещества МХФ-2, полученного в лаборатории АО «Институт химических наук имени А.Б. Бектурова», при интоксикациях, вызванных ванадием и хромом. Впервые установлено, что МХФ-2 повышает пролиферативную активность нейтрофилов, оказывает антианемическую эффективность, восстанавливая содержание гемоглобина. МХФ-2 обладает лучшими мембранопротекторными свойствами по сравнению с другими препаратами, повышает функциональную активность нейтрофилов, модулирует провоспалительную активность IL-6 на ранних этапах эксперимента, на поздних – противовоспалительную активность IL-10. МХФ-2 как и полиоксидоний вызывает активацию костного мозга и тимуса, модулирует Th1 иммунный ответ на более ранних этапах эксперимента

Установлены новые сведения о протективной роли рувимина при иммунодепрессии, вызванной соединениями ванадия и хрома. На ранних этапах эксперимента рувимин модулирует провоспалительную активность IL-6, на поздних – противовоспалительную активность TGF- $\beta$ . Рувимин активирует костный мозг и тимус аналогично полиоксидонию и МХФ-2, повышает пролиферативную активность Th1 и эффективнее этих препаратов сдерживает накопление MDSC в селезенке крыс.

Впервые в качестве патогенетической коррекции асептического воспаления, вызванного на фоне депрессии иммунологической реактивности, развившейся вследствие двухнедельной интоксикации ванадием и хромом, применены МХФ-2 и рувимин в сравнении с полиоксидонием. Получены новые данные об избирательном иммуномодулирующем влиянии изученных

препаратов у крыс с асептическим воспалением, вызванным на фоне металлиндуцированной депрессии иммунологической реактивности.

**Практическая значимость полученных результатов.** Проведенные нами исследования внесут определенный вклад в развитие экологического подхода к исследованию здоровья и патологии человека, и, хотя мы далеки от недооценки значения других факторов, экологический принцип исследования показателей здоровья всё же служит расширению представлений о патогенезе болезней. Практическая значимость диссертационного исследования состоит в том, что результаты, полученные в ходе проведенных фундаментальных исследований, обогащают научное знание в области общих закономерностей функционирования иммунной системы в процессе адаптации к экологическим неблагоприятным условиям, способствуют формированию концепции напряжённости иммунной системы при системном подходе к оценке иммунного статуса.

Материалы и обобщения, содержащиеся в диссертации, могут быть полезны при проведении прикладных исследований, посвященных изучению медицинской проблемы в рамках актуального приоритетного направления.

Выводы настоящего исследования могут также быть полезными для государственных и коммерческих структур, задействованных в разработке и продвижении новых лекарственных брендов отечественного производства.

Полученные результаты исследований позволят расширить понимание практикующим врачом патогенетических механизмов токсического влияния ванадия и хрома на организм с целью правильного выбора способа коррекции, а также разработать принципиально новые подходы к персонифицированной диагностике, профилактике и лечению экологенных иммунопатологий.

Материалы диссертации могут быть использованы в учебно-методическом процессе на медицинских и биологических факультетах, а также на курсах последипломного образования иммунологов, терапевтов и врачей общей практики.

**Экономическая значимость полученных результатов.** Комплексное решение проблемы приведёт к существенному повышению продолжительности и качества жизни населения. Результаты будут иметь несомненный социальный и экономический эффект, т.к. превнесут новые знания и послужат существенным дополнением в современное представление о молекулярно-клеточном взаимодействии при воспалении и могут иметь прикладное значение.

Экспериментально показана иммуномодулирующая активность соединения (1-(2-этоксиэтил)-4-(диметоксифосфорил)-4-гидроксипиперидин, что позволяет рекомендовать его для дальнейших исследований с перспективой использования в качестве протекторов для предотвращения отравления тяжелыми металлами на производстве и средств, повышающих неспецифическую резистентность организма при госпитальных инфекциях, либо в качестве бактериостатических средств в медицинской практике и ветеринарии.

Получены свидетельства на полезную модель 1) «Способ оценки иммуносупрессирующей роли His48+/CD11b/c+ в условиях антропогенной нагрузки» (11) 3007 от 06.09.2017 (2) и 2) «Способ прогнозирования хронизации воспалительного процесса в условиях интоксикации солями ванадия и хрома» (11) 3006 от 06.08.2017 (2).

#### **Основные положения диссертации, выносимые на защиту:**

Предварительная интоксикация соединениями ванадия и хрома у экспериментальных крыс с асептическим воспалением оказывает гемато- и иммунотоксические эффекты, что приводит к существенной задержке репаративной фазы воспаления к концу эксперимента.

Ванадий и хром осложняют течение экспериментального воспаления нарушением дифференцировки миелоидных клеток и пролиферативной активности Th1 и Th2 в селезенке опытных крыс.

Течение экспериментального воспаления сопровождается, вызванными метаванадатом аммония и дихроматом калия, деструктивными изменениями

костного мозга и выраженными структурными изменениями лимфоорганов опытных животных на всем протяжении эксперимента.

Ключевые механизмы ванадий- и хроминдуцированной иммунодепрессии ассоциированы с дефектами Т-клеточного звена иммунитета в периферической крови и нарушением процессов дифференцировки селезеночных субклеточных популяций.

МХФ-2 и рувимиин обладают иммуномодулирующим влиянием и при применении избирательно нивелируют иммунотоксические проявления соединений ванадия и хрома, о чем свидетельствуют гематологические, иммунологические и морфологические показатели крови и лимфоорганов экспериментальных животных с асептическим воспалением.

Эффективность МХФ-2 и рувимиина в разные сроки экспериментального исследования избирательно сопоставима с полиоксидонием.

**Личный вклад соискателя.** Все материалы диссертации, включая разработку дизайна экспериментов, постановку экспериментов, забор органов и крови, подготовку гистологических срезов и окраску препаратов, статистическую обработку, интерпретацию и публикацию материалов, выполнены лично автором. Автор внес личный вклад в разработку идеи, подготовку и оформление научно-технического проекта МОН РК «Молекулярно-биологические особенности течения асептического воспаления, ассоциированного с экологенной иммундепрессией» и являлся научным руководителем данного проекта.

**Апробация результатов исследований.** Основные положения диссертации обсуждены на: Международной научно-практической конференции «Валихановские чтения-14» (Кокшетау, 2009); Международной научно-практической конференции «Актуальные вопросы патофизиологии и медицины» (Алматы, 2008); XV Международном конгрессе по реабилитации в медицине и иммунореабилитации (Дубай, ОАЭ, 2010); XIV Международной научной конференции «Здоровье семьи-XXI век» (Италия, 2010); IV Международной научно-практической конференции «Современные проблемы

гуманитарных и естественных наук» (Москва, 2010); IV world asthma & COPD forum and XVII international congress on rehabilitation in medicine and immunorehabilitation «Allergy, asthma & immunology: from genes to clinical application» (Paris (France), 2011); IV международной конференции «Innovative Ideas and Technologies-2011 (Алматы, 2011); международной конференции «Современные проблемы науки и образования» (Москва, 2012); научно-практической конференции «Здоровье жителей горных регионов в условиях изменения климата», посвященной 10-летию Горного Саммита и 20-летию КРСУ (Бишкек, Кыргызстан, 2012); международной научно-практической конференции «I Евразийский съезд патофизиологов» (Алматы, 2013); международной научно-практической конференции, посвященной 80-летию д.м.н., профессора Мануйленко Ю.И (Бишкек, 2013); международной конференции «Современные наукоемкие технологии» (Москва, 2014).

**Внедрение результатов исследований.** Результаты проведенных исследований внедрены в учебный процесс кафедры патологической физиологии КГМА им. И.К. Ахунбаева, а также в медицинском колледже «Эмили» г. Алматы. По результатам проведенных исследований получены два свидетельства на полезную модель. По материалам диссертации издана монография, которая включена в список рекомендуемой литературы для студентов 2, 3 курса общей медицины при подготовке к практическим занятиям.

**Полнота отражения результатов диссертации в публикациях.** Основные положения диссертации отражены в 44 научных статьях, опубликованных в изданиях, рекомендованных ВАК КР.

**Структура и объем диссертации.** Работа состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов исследования, главы собственных исследований, выводов, практических рекомендаций и списка использованных источников (всего 301, из них 162 - на иностранных языках).

Диссертация изложена на 262 страницах, содержит 45 таблиц и 40 рисунков.



# ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

## 1.1 Влияние металлов на неспецифическую резистентность организма

По мере роста экономического развития Республики Казахстан, проблемы экологической безопасности страны приобретают масштабный характер. Несмотря на достигнутые успехи и достижения, ситуация продолжает ухудшаться, что ведет к дальнейшему обострению экологического кризиса в стране [36,35]. Основное загрязнение окружающей среды Казахстана – результат деятельности горнодобывающей и горно-перерабатывающей промышленности, предприятий чёрной металлургии, нефтехимии, производства стройматериалов, транспорта [50]. По данным [2], из 16 регионов Казахстана степень загрязнения атмосферы 11 регионов оценивается как низкая, тогда как степень загрязнения атмосферы Западно-Казахстанской, Карагандинской Кызылординской, Южно-Казахстанской, Восточно-Казахстанской областей и г. Алматы областей оценивается как повышенная.

Весомый вклад в экологическое неблагополучие Казахстана вносят выхлопные газы более чем одного миллиарда легкового и грузового автотранспорта, сотен тысяч тепловозов и теплоходов [107]. В Казахстане скопилось более двадцати миллиардов тонн отходов, около трети из которых токсичны [85]. Так, по данным управления экологии Восточно-Казахстанской области валовый выброс вредных веществ, в т. ч. тяжелых металлов по категории опасности и в зависимости от токсичности выбрасываемых в атмосферу, а также в подземные водостоки загрязняющих веществ г. Усть-Каменогорск относится к первой категории загрязненности [92]. Вследствие этого содержание в биосредах г. Усть-Каменогорска бора, свинца, ванадия, цинка, хрома, таллия, бериллия, мышьяка превышает норму от 1,5 до

нескольких десятков раз. Содержание хрома в крови у детей из района ст. Защита превышает естественную норму в 50 раз.

Росту научно-технического прогресса способствует бурное развитие нефтедобывающей промышленности, что позволило Казахстану войти в число крупнейших нефтедобывающих стран [18, 130]. Особую опасность для экологии Казахстана представляет деятельность различных транснациональных компаний, активно осваивающих нефтяные богатства [35]. На данный момент в Казахстане насчитывается более 170 месторождений, среди которых самыми крупными являются Тенгиз, Кашаган, Карачаганак, Эмбаунайгаз, Узень, Жетыбай, Жанажол, Каламкас и др. Дело в том, что по степени негативного влияния на экосистему нефтяные загрязнения стоят на первом месте не только в Казахстане, но и практически во всех нефтедобывающих странах мира. Основной проблемой нефтедобычи является сжигание попутного нефтяного газа, поскольку сопровождается выбросами в атмосферу сероводородных продуктов, которые в результате преобразуются в продукты сгорания. Это приводит к огромному расходу кислорода и выделению избыточного тепла, что способствует усилению парникового эффекта и наносит вред здоровью людей [35].

Количество выбрасываемых в атмосферу вредных веществ крупными Актюбинскими предприятиями: Актюбинский завод ферросплавов – филиал АО ТНК «Казхром», АО «Актюбинский завод хромовых соединений», Филиал «Актобе ТЭЦ» АО «Алматы Пауэр Консолидэйтед» по сравнению с 2010 годом возросло на 167,5 тыс. тонн. Производя ценную для экономики страны продукцию, эти производственные объединения загрязняют окружающую среду комплексом токсичных элементов, среди которых шестивалентный хром, который обладает канцерогенным эффектом. Особую тревогу вызывает затопление нефтегазовых скважин и чрезмерное сжигание попутного газа Эмбенского нефтяного месторождения «Макат» [85, 164].

В Приаралье и в остальных регионах Казахстана складывается аналогичная ситуация [6, 7]. Вымывание солей из поймы реки Сырдарьи и со

дна высохшего Аральского моря приводит к формированию солевой пыли с повышенным содержанием сульфатов и хлоридов. На территории Мугоджарских гор ведется добыча хромитов, никеля, кобальта, меди, черных и редких металлов, что также сопровождается загрязнением окружающей среды [113].

Аналогичная ситуация складывается и на территории Кыргызстана. Так, к началу XXI века на территории Кыргызстана, в горнопромышленных районах образовалось значительное количество отвалов - механически раздробленных горных пород и некондиционных (забалансовых) руд. Общий объём отвалов, включая угольные, по состоянию на начало 2008 г. составил свыше 700 млн м<sup>3</sup>, а занимаемые ими площади составили 1500 га [90, 131]. По сведениям [65, 57] «...на территории Кыргызстана имеется 55 хвостохранилищ общей площадью 770 га, в которых заскладировано более 132 млн м<sup>3</sup> хвостов. Хвостохранилища представляют собой концентрированные техногенные массивы мелкодисперсных отходов переработки и обогащения, которые в зависимости от вида перерабатываемых руд и концентратов содержат радионуклиды, вредные для здоровья соединения тяжёлых металлов, а также токсичные вещества, используемые в качестве реагентов при извлечении ценных компонентов минерального сырья. В бесхозном состоянии находится 35 хвостохранилищ и 25 горных отвалов. По другим сведениям на территории страны расположено 92 хвостохранилища и горных отвалов, где захоронено 457 млн. тонн отходов горно-рудного производства [27, 81].

Главными источниками соединений тяжелых металлов в поверхностных водах рек, почв являются процессы химического выветривания горных пород, сопровождающиеся их механическим разрушением и растворением. Значительная их часть поступает с подземным стоком и со сточными водами предприятий металлургической, металлоперерабатывающей, текстильной, лакокрасочной промышленности и сельскохозяйственными стоками, таянием ледников, а также вымыванием соединений из горных пород [1, 45, 117, 133].

В Кыргызстане урановые могильники находятся в трех областях: в Чуйской области - Ак-Тюз, КараБалта, Каджи-Сай, в Нарынской - Мин-Куш и в Джалал-Абадской области - Майлуу-Суу. Растущие запасы радионуклидов и тяжелых металлов в почве оказывают давление на экосистему и на организм человека, в частности, что может привести к самым тяжелым последствиям [4]. В Майлысуйском хвостохранилище основными загрязнителями являются следующие тяжелые металлы: V, Cr, Zr. По результатам химического анализа почвенных образцов на расстоянии 50м от хвостохранилища ванадий превышает ПДК в 3 раза, Cr в 3,5 раза, Zr в 3 раза. Так, биомониторинг качества окружающей среды показал высокие концентрации тяжелых металлов в кормовых растениях, произрастающих в районах хвостохранилищ (Джалал-Абадская область, п. Сумсар). Так, в люцерне наряду с другими поллютантами содержание хрома превышало ПДК в 17 раз, в клевере в 150 раз [115, 83, 132].

Высокое содержание Cr в почве вызывает особую тревогу, поскольку является сильным канцерогеном и мутагеном. Хром вызывает рак печени и почек. Также опасность вызывает повышенное содержание ванадия, способного стать причиной отравлений и других тяжелых нарушений, поражения дыхательных путей, кожи и слизистой оболочки глаз, в некоторых случаях может возникнуть астма, анемия, а также тяжелые формы дерматита и экземы [4].

За последние годы резкая активация оползневых процессов и ежегодные влияния селей и эрозии привели к аварийному состоянию отдельных хвостохранилищ в Сумсаре, Майлуу-Суу, Мин-Куше, Каджи-Сай. В районе проживания населения отмечается рост заболеваний щитовидной железы [51].

У жителей упомянутых населенных пунктов отмечалось увеличение частоты заболеваний респираторного тракта, быстрая хронизация воспалительных процессов в бронхолегочной системе и токсическое воздействие на кроветворную и иммунную системы [102]. Как показал последующий анализ заболеваемости у жителей, проживающих в техногенно-загрязненных зонах и сопоставление его результатов с динамикой нарушений

иммунитета у обследованных, существует глубокая причинно-следственная связь экологического неблагополучия, заболеваемости и функционирования иммунной защиты. И это предопределяет пути и методы рациональной и эффективной коррекции здоровья и иммунной защиты.

В Республике Казахстан на международном и национальном уровнях предпринимаются усилия по разработке и реализации правовых, организационных и технических мер по снижению уровня загрязнения окружающей среды, предотвращению его негативного воздействия на здоровье людей. Именно поэтому 1 января 2018 года Указом Президента РК принят Экологический Кодекс Республики Казахстан (с изменениями и дополнениями). Большое значение для совершенствования охраны окружающей среды имеют законы РК «Об охране окружающей среды» и «Об экологической экспертизе». Стратегией «Казахстан-2030», а также Государственной Программой «Здоровье народа» улучшение окружающей среды определено в качестве одного из основных инструментов оздоровления населения [60, 3].

Несмотря на то, что правительство разрабатывает программы по борьбе с загрязнением воздуха, проблема экологии в Казахстане остается актуальной по сей день [110].

В результате экологического мониторинга выявлены негативные экологические последствия антропогенной деятельности на качество атмосферного воздуха, почвы, поверхностных и подземных вод, климат и озоновый слой Земли. Экологические системы, включающие животный и растительный мир, подвергаются растущему воздействию факторов окружающей среды [67, 29].

Тяжелые металлы встречаются в природе как элементы, которые находятся на всей территории земной коры. Однако загрязнение этими металлами является результатом антропогенной деятельности человека [112, 281, 284].

Известно, что такие металлы как кобальт (Co), медь (Cu), хром (Cr), железо (Fe), Магний (Mg), марганец (Mn), молибден (Mo), никель (Ni), селен (Se) и цинк (Zn), содержащиеся в питательных веществах, необходимы для различных биохимических и физиологических функций [199, 285]. Недостаточное поступление этих питательных микроэлементов приводит к различным дефицитным заболеваниям или синдромам [285]. Тяжелые металлы как микроэлементы являются важными компонентами нескольких ключевых ферментов и играют неопределимую роль в различных окислительно-восстановительных реакциях [274, 152].

Однако, избыточное количество таких металлов приводит к повреждению тканей и ряду неблагоприятных последствий и заболеваний человека. Существует очень узкий диапазон концентраций между полезными и токсическими эффектами хрома и меди [198, 170]. Так, Айдосов А. при оценке влияния атмосферного загрязнения на состояние здоровья людей заключил, что риск возникновения заболевания возрастает с ростом концентрации загрязнителя в воздухе, а также за счет присутствия в атмосферном воздухе не одного, а нескольких загрязнителей [3]

В биологических системах тяжелые металлы, как сообщает [281], влияют на клеточные органеллы и их компоненты, такие как клеточная мембрана митохондрий, лизосом, эндоплазматического ретикулума, ядра и некоторые ферменты, участвующие в метаболизме, детоксикации и репарации повреждений. Ионы металлов взаимодействуют с компонентами клеток, такими как ДНК и ядерные белки, вызывают повреждение ДНК и конформационные изменения, которые могут привести к модуляции клеточного цикла, канцерогенезу или апоптозу. Некоторые исследователи показали, что активные формы кислорода (АФК) играют ключевую роль в токсичности и канцерогенности металлов, таких как мышьяк, кадмий, хром, свинец и ртуть [297, 251, 285, 229]. Из-за высокой степени их токсичности, эти пять элементов занимают особое место среди приоритетных металлов. Все они являются

системными токсикантами, которые известны как вызывающие полиорганное повреждение, даже при более низких уровнях воздействия.

Хром, седьмой самый распространенный элемент в земной коре, является одним из наиболее распространенных загрязнителей окружающей среды, выбрасываемых в атмосферу, главным образом, из-за его промышленного использования [270]. В последние годы загрязнение окружающей среды хромом стало главным предметом озабоченности, особенно шестивалентный Cr (Cr<sup>6+</sup>), который является чрезвычайно токсичным канцерогеном [256]. Хром является естественным элементом, присутствующим в земной коре, начиная от хрома (II) до хрома (VI) [245]. Соединения хрома в трехвалентной форме встречаются в природе в рудах, таких как феррохром. Содержание шестивалентной формы хрома является второй наиболее стабильной [242].

К источникам хрома относят предприятия, занимающиеся обработкой металла, кожевенные и хромовые производства, сварка нержавеющей стали и феррохрома, огнеупорную и химическую промышленность. Соединения хрома используются в промышленной сварке, хромировании, в качестве антикоррозионных сварочных систем и котлов. Предполагается, что около 33 тонн хрома освобождается ежегодно в окружающую среду [290]. Считается, что более чем 300000 работников ежегодно подвергаются воздействию хрома и хром-содержащих соединений на рабочем месте.

В результате антропогенной деятельности человека хром выделяется в окружающую среду в виде шестивалентного [166]. Шестивалентный хром является токсичным загрязнителем и классифицируется как канцероген. Опасность для здоровья, связанная с воздействием хрома, зависит от степени его окисления и колеблется в пределах от низкой токсичности металла до высокой.

В организме человека и животных трехвалентный хром представляет собой питательное вещество, которое играет важную роль в метаболизме глюкозы, жиров и белков, усилении действия инсулина. По данным ряда исследователей [279, 181] добавление комплекса амилопектин с хромом к

сывороточному протеину значительно усиливает синтез мышечного протеина. Тем не менее, профессиональное воздействие хрома является одной из основных проблем из-за высокого риска Cr-индуцированных заболеваний [271]. Эпидемиологические исследования соединений хрома показали сильную связь между воздействием Cr (VI) и смертностью от рака легких, а также положительную связь с раком носа и полости носа [269, 162, 189]. Широкое распространение дерматита наблюдается среди рабочих-строителей, что объясняется воздействием хрома, присутствующего в цементе [246].

По сведениям [157, 201, 267 ], Cr (VI) индуцировал повреждение почек за счет окислительного стресса и апоптоза. Потребление питьевой воды в течение 4 недель с дихроматом хрома в дозе 30, 100 и 300 мг/л у крыс вызывает увеличение МДА и снижение метилирования ДНК [183]. Так, шестивалентный хром (проникает в клетки по градиенту концентрации через внутриклеточный хлорид-фосфатный анионный канал. Cr (VI) может соединяться с глутатион / глутатион-синтетазой с образованием, возможно, четырехвалентного хрома (Cr (IV)), а также некоторое количество пятивалентного хрома (Cr (V)) в плазме и мембране субклеточных органелл. Диффундируя в митохондрии и ядро, ванадий повреждает ДНК в обеих органеллах. В митохондриях и эндоплазматическом ретикулуме Cr (VI) образует свободные радикалы посредством реакций, подобных Фентону, что способствует разрыву фосфодиэфирной связи ДНК. Сигналы повреждения ДНК передаются на главный p53, который опосредует экспрессию множества генов, участвующих в остановке клеточного цикла и апоптозе [265].

Ванадий является распространенным элементом на земле (0,013% мас/мас). У человека содержание ванадия в плазме крови составляет около 200 нМ, а в тканях - около 0,3 мг/кг и в основном обнаруживается в костях, печени и почках [287].

Ванадий является естественным компонентом земной коры (в различных минералах, угле и сырой нефти) и попадает в окружающую среду в основном в результате деятельности человека. Уникальные химические и физические



свойства соединений ванадия делают его незаменимым материалом во многих отраслях промышленности. Его соединения часто используются при производстве стали и титано-алюминиевых сплавов, в качестве катализаторов при производстве серной кислоты, при производстве пигментов, красок и лаков, а также при производстве проточных окислительно-восстановительных батарей на основе ванадия, в которых можно хранить электроэнергию, произведенную из возобновляемых источников, таких как ветер или солнце [301].

Ванадий играет важную роль в метаболизме углеводов (за счет воздействия на гликолиз, гликогенолиз, гликогенез и пути глюконеогенеза), липидов (за счет стимуляции липогенеза и ингибирования липолиза), фосфолипидов и холестерина, влияет на минерализацию костей, метаболизм щитовидной железы и эритроцитов, накопление и транспорт кальция в клетке и синтез вторичных передатчиков, участвующих в передаче внутриклеточных сигналов. Ванадий также регулирует активность ключевых ферментов, участвующих в фосфорилировании и дефосфорилировании белков, киназ и фосфатаз, принимая участие не только в метаболизме углеводов и липидов, но также в пролиферации и дифференцировке клеток [289].

Соединения ванадия известны как перспективные препараты для снижения уровня глюкозы в крови у больных сахарным диабетом из-за их инсулинмиметических свойств и способности противодействовать резистентности к инсулину [218, 175, 280]. Они также могут защитить от канцерогенов [288]. В опухолевых клетках ванадий вызывает остановку клеточного цикла и апоптоз [221]. Хотя в микромолярных концентрациях ванадий увеличивает синтез ПГЕ<sub>2</sub>, действующего как проканцероген, однако при концентрации 2-5 мкМ ванадиевые соединения ингибируют рост некоторых опухолевых клеток. Тем не менее, исследования с использованием соединений ванадия для лечения опухолей все еще менее развиты, чем в лечении сахарного диабета [200, 273].

В биологических системах ванадий присутствует в +4 +5 и +3 окисленном состоянии. В физиологических условиях, ванадий в состоянии окисления +4 присутствует в форме катионов ванадила  $VO_2^+$ . В состоянии +5 окисления может быть найден как ортованадат ( $H_2VO_4^-$ ). В крови ванадий в состоянии окисления +5 проникает в клетку через анионные каналы, в то время как ванадий в степени окисления +4 достигает клетки путем пассивной диффузии [231, 240]. В цитоплазме, из-за снижения внутриклеточных антиоксидантов, ванадий присутствует в состоянии окисления +4. Эта реакция приводит к АФК, которые при высокой концентрации вызывают окислительный стресс (рис.1.1.).

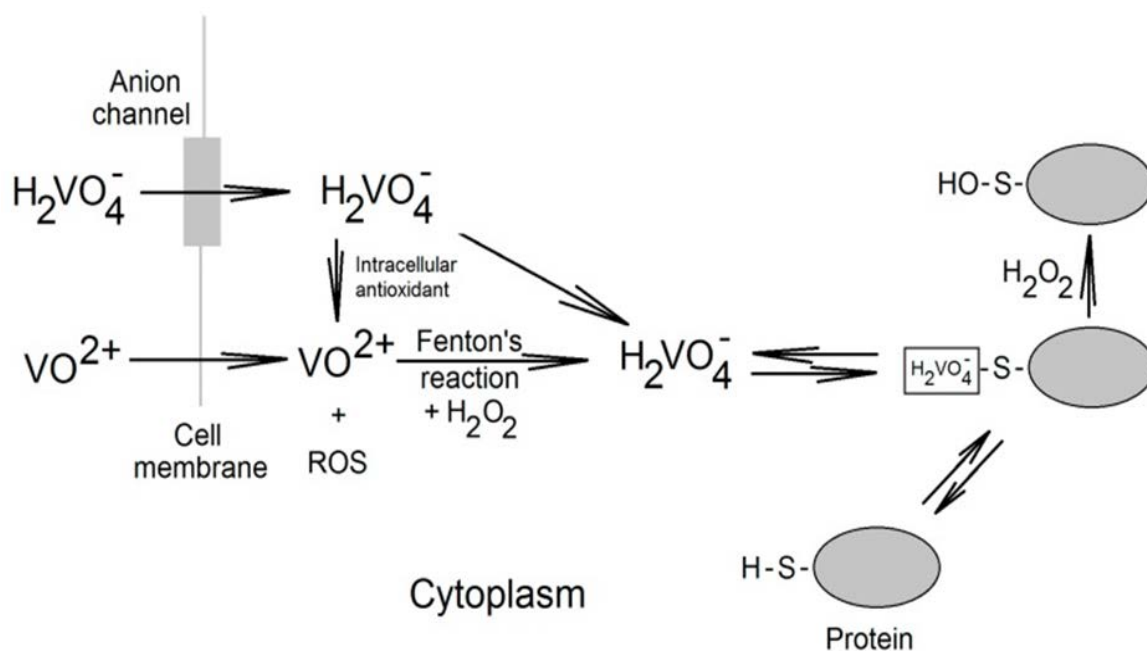


Рис.1.1. Ванадиевые соединения в клетке.

*Ванадил и ванадат проникают в клетку путем пассивной диффузии через анионные каналы. Затем, в цитоплазме ванадильные катионы могут быть подвергнуты реакции Фентона, в результате которой образуется ванадат. Ванадат снижает внутриклеточные антиоксиданты. Ванадат связывается с белками со свободными остатками цистеина. В реакции с  $H_2O_2$ , ванадат необратимо окисляет остатки цистеина.*

В цитоплазме катионы ванадия впоследствии подлежат реакции Фентона с  $H_2O_2$  с образованием ванадат-ионов и гидроксильных радикалов  $HO$  [221]. В результате этой реакции ванадат попадает в клетку и не появляется в цитоплазме, но вместо этого связывается с остатками белка цистеина [232]. Этот процесс имеет важное значение в случае одновременного воздействия соединений ванадия и веществ, вызывающих окислительный стресс [263]. Ванадат связывается с остатками цистеина в сочетании с  $H_2O_2$ , что приводит к его окислению, тогда как во многих ферментах остатки цистеина, расположенные в активных центрах, играют важные функции в катализе. Так, окисление этих остатков до перванадата и ванадат-иона приводит к инактивации ферментов, например белка тирозинфосфатазы [263].

Ванадий присутствует в сырой нефти в качестве органического металлического комплекса. Мазут содержит высокую концентрацию ванадия (от 0,2 до 0,160 мкг / г). Уголь также богат ванадием (от 14 до 56 мг / кг). Загрязнение ванадием происходит также в результате сжигания нефтепродуктов. Природные источники также могут способствовать концентрации твердых частиц ванадия в атмосфере. Континентальная пыль, извержения вулканов, морская соль и лесные пожары являются одними из наиболее продуктивных источников ванадия [186, 155].

С другой стороны, соединения ванадия за счет генерации АФК могут способствовать развитию заболеваний, связанных с производством свободных радикалов и воспалительных реакций, например, нейродегенеративных заболеваний. Так, литературные источники показали, что одним из основных механизмов действия ванадия является генерация активных форм кислорода, путем активации митоген-активированной протеин киназы (МАПК), что приводит к фосфорилированию ферментов, в результате чего нарушаются различные сигнальные пути. Ванадий также может привести к повреждению генетического материала и вызывать гематотоксические [195], иммунотоксические [266], гепатотоксические [255], нейротоксические [159] и гонадотоксические [182] эффекты. Так, длительное воздействие ванадия

приводит к значительному снижению эритроцитов у крыс, подвергшихся воздействию метаванадата аммония 1,18 мг/день с питьевой водой в течение 4 недель, а также снижение гемоглобина, которое компенсировалось увеличением ретикулоцитов в периферических тканях [287]. Установлено, что ванадий ингибирует  $\text{Na}^+\text{-K}^+$  АТФазу и открывает калиевые каналы мембраны эритроцитов [148].

Металлы способны модулировать деятельность иммунокомпетентных клеток с помощью различных механизмов. В зависимости от конкретного металла, его концентрации и биологической доступности, чистым результатом может быть иммуностимуляция или иммуносупрессия. Так, ванадий может влиять на передачу сигналов Т-лимфоцитами, изменяя количество зрелых Т-клеток, мигрирующих из вилочковой железы в селезенку. Из-за этого нарушается секреция IL-2 и IL-6. Кроме того, метаванадат аммония ингибирует пролиферативную активность  $\text{CD3}^+$ ,  $\text{CD3}^+ \text{CD4}^+$  и  $\text{CD3}^+\text{CD8}^+$  Т-клеток селезенки и подавляет их активность у бройлеров [287]. Суть общей обеспокоенности заключается в том, что непрерывная модуляция металлами иммунорегуляторной деятельности может привести к нарушению иммунного гомеостаза, что может способствовать формированию иммунодефицитных состояний, особенно, в регионах с техногенным загрязнением окружающей среды [228, 103, 42, 41].

Сложность и отсутствие четкого понимания ряда иммунологических функций, особенностей их регулирования и механизмов усиления, затрудняет понимание того, как различные токсичные металлы влияют на некоторые иммунные изменения. В то же время, исследование тяжелых металлов в биологических экспериментах открывает новые возможности для осмысления механизмов их повреждающих проявлений [180].

## 1.2 Современное представление о патогенезе асептического воспаления

Воспаление рассматривают как реакцию иммунной системы на патогены, поврежденные клетки или токсичные соединения, способствующую удалению вредных раздражителей и процессу заживления [222, 257, 197, 217]. Как защитный механизм, воспаление жизненно важно для здоровья. Обычно, межклеточные и молекулярные взаимодействия компонентов иммунной системы при острых воспалительных реакциях успешно справляются с инфекцией или последствиями травмы, способствует восстановлению гомеостаза тканей и разрешению острого воспаления. Однако неконтролируемое острое воспаление может стать хроническим в результате дезадаптации иммунной системы [145, 173, 204]. Момент времени, когда острое воспаление становится хроническим определяется истощением богатых энергетических ресурсов за счет перенаправления этих ресурсов к активированной иммунной системе. К разнообразным последствиям такого перенаправления относят болезненное поведение, истощение мышц, инсулинорезистентность, дислипидемия, гипертония, анемия и др. Авторы приходят к заключению, что увеличение разрешения острого воспаления более 19-43 дней обосновано истощением энергетических ресурсов и дезадаптацией иммунной системы.

Роль иммунной системы заключается в распознавании патоген-ассоциированных (ПатАМП) и повреждение-ассоциированных молекулярных паттернов (ПовАМП) клетками врожденного иммунного ответа, что свидетельствует о начале воспаления [103, 98, 154, 203, 219, 216]. Исход любого воспалительного ответа диктуется балансом между провоспалительными и противовоспалительными факторами. Патогены инфекционного и неинфекционного происхождения стимулируют иммунные реакции в организме за счет сложных взаимодействий между врожденными и адаптивными иммунными клетками. В результате такого взаимодействия

производятся различные медиаторы, цитокины, факторы роста и цитотоксические химические вещества, способствующие активному фагоцитозу и формированию воспалительной реакции с последующим восстановлением тканей [220, 225, 254, 299]. Фагоцитарные клетки, такие как макрофаги (МФ) и полиморфноядерные нейтрофильные гранулоциты (ПМН), представляют собой первую линию защиты от вторжения бактериальных патогенов. Эти клетки распознают микробные антигены и ПатАМП через Toll-подобные рецепторы. Иммунные клетки врожденного иммунитета инициируют воспалительные и иммунные реакции, высвобождая провоспалительные медиаторы, в качестве посредников в привлечении воспалительных и иммунных клеток к месту инфекции. При этом, полиморфноядерные нейтрофилы реализуют краткосрочные взаимодействия иммунных компонентов практически немедленно. Основная роль для моноцитов, макрофагов и лимфоцитов отведена в более поздних ответах и заключается в стимуляции разрешения воспаления и заживления ран [293, 187, 253].

Недавние исследования показывали, что острая воспалительная реакция на патогены в основном координируется иммунными клетками 1 типа, такими как М1, Тх1, и ДК.  $\text{INF-}\gamma$ ,  $\text{IL-2}$  (продуцируемые Th1) и  $\text{IL-1}\beta$  (продуцируемый М1) также называются цитокинами 1 типа. Таким образом, воспаление стимулируется  $\text{IL-1}$ ,  $\text{IL-6}$  и  $\text{TNF-}\alpha$ , тогда как ингибируется  $\text{IL-10}$  и  $\text{TGF-}\beta$  [216]. Возникая в течение нескольких часов после воздействия и достигая пика через 1-3 дня, воспалительные реакции быстро уменьшаются в течение недели, что демонстрирует самоограничивающийся характер острого воспаления 1 типа [207, 168, 206, 209]. Так, в сыворотке крови рабочих, производящих многослойные углеродные нанотрубки, обнаружено значительное увеличение  $\text{IL-1}\beta$ ,  $\text{IL6}$ ,  $\text{TNF-}\alpha$  и  $\text{TGF-}\beta 1$  [191]. Эти данные подтверждают, что в раннем остром воспалительном ответе на вдыхаемые частицы в легких преобладает воспаление 1 типа, которое регулируется в первую очередь за счет поляризации иммунных клеток 1 типа.

Инициирование воспаления 1 типа включает активацию дендритных клеток (ДК) и ВЛК (врожденные лимфоидные клетки). ВЛК - это гетерогенная популяция лимфоцитов, которые быстрее, чем адаптивные лимфоциты включают защитные реакции в ответ на вторжение патогенов. Известно, что ВЛК происходят из общего с другими лимфоцитами лимфоидного предшественника, и могут дублировать фенотип и функции CD4+ Т-лимфоцитов, однако в отличие от последних ВЛК не имеют на своей мембране антиген-распознающего рецептора, в связи с чем их относят к клеткам системы врожденного иммунитета [33]. Так вот, активированные ДК и ВЛК1 продуцируют IL-12 и IL-18, которые вызывают поляризацию лимфоцитов Th1 (CD4 + IFN- $\gamma$  +) из наивных клеток CD4 + Th0. Клетки Th1 и ВЛК1 секретируют IFN- $\gamma$  и TNF- $\alpha$ , которые стимулируют поляризацию макрофагов по направлению к фенотипу M1, главному клеточному событию в инициировании и усилении воспаления типа 1 [172].

Фагоцитарная активность удаляет патогены, а подавление воспалительного каскада приводит к заживлению. Во время разрешения инфильтрация воспалительных клеток снижается, нейтрофилы подвергаются апоптозу, а макрофаги поглощают и разлагают апоптотические нейтрофилы и клеточные остатки посредством процесса, называемого эффероцитозом. Эти процессы опосредуются медиаторами, цитокинами и клетками 2 типа, такими как макрофаги M2 и лимфоциты Th2. Вместе эти события разрешения очищают очаг воспаления и способствуют восстановлению поврежденной ткани и возвращению гомеостаза [176, 205, 264]. Воспаление 2-го типа способствует восстановлению поврежденной ткани с помощью эффекторных клеток 2-го типа M2 и секретируемых медиаторов, таких как IL-10 и TGF- $\beta$ . В условиях продолжающегося воздействия внешнего фактора имеет место продолжительное и усиленное воспаление 2 типа, которое способствует хронизации воспалительного процесса, а также онкогенезу.

К сожалению, в действительности при заболеваниях зачастую наблюдается угнетение одного или нескольких механизмов

противоинфекционной защиты, что приводит к развитию хронических процессов, а в особо тяжелых случаях и к гибели организма. Наиболее часто при инфекционных процессах нарушается функция иммунной системы, что существенно снижает эффективность антимикробной защиты [291, 211].

Нарушение регуляции воспалительного процесса приводит к существенному изменению его течения. При этом защитный потенциал организма снижается, а механизмы разрушения тканей, наоборот усиливаются, что проявляется в хронизации процесса, переходе воспаления из нормергического в гипо- или гиперергическую форму, что приводит к тяжелым клиническим осложнениям. Поэтому процессы регуляции воспаления, причины, механизмы и последствия дисрегуляции являются предметом изучения патофизиологии [211].

Последние данные подтверждают, что в регуляции воспалении 2 типа могут принимать и другие иммуноопосредованные механизмы, в том числе в результате нарушения миелопоэза.

### **1.3 Роль миелоидных супрессорных клеток в регуляции иммунного ответа**

В контроле иммунного ответа участвуют несколько популяций иммунных клеток, включая природные и индуцированные регуляторные клетки CD4 + T (Treg), CD8 + Treg, Breg, макрофаги и дендритные клетки. Для того, чтобы контролировать иммунный ответ, эти клетки используют набор основных подавляющих механизмов, главными из которых являются секреция ингибирующих цитокинов (например, IL-10, TGF- $\beta$ , и IL-35), экспрессия ингибирующих рецепторов (например, PD-L1), ингибирование антигенпрезентирующих клеток созревания и цитолиз [153, 179, 163, 233].

Кроме зрелых иммунокомпетентных клеток, предназначенных для контроля иммунного ответа, известны другие популяции клеток, причастные к



подавлению иммунитета [260]. Супрессорные клетки миелоидного происхождения (MDSCs) стали главными регуляторами иммунных реакций при раке и других патологических состояниях [173].

В начале 90-х годов, эти клетки получают повышенное внимание вследствие аномальной дифференциации миелоидных клеток. Первоначально эти патологические миелоидные клетки были описаны как миелоидные клетки-предшественники, которые могут ингибировать пролиферацию лимфоцитов и активность цитотоксических Т-лимфоцитов (ЦТЛ) [276]. В 1987 году супрессорные клетки костного мозга были впервые обнаружены у пациентов с карциномой легких [167]. При ранних исследованиях воспаления у мышей было установлено системное расширение миелоидных клеток, несущих маркеры CD11b<sup>+</sup> и Gr-1<sup>+</sup> [193, 278]. Стало очевидным, что CD11b<sup>+</sup> Gr-1<sup>+</sup> клетки были неоднородными, вызывая неопределенность в описании этих клеток между различными группами исследователей.

В течение нескольких десятилетий понимание MDSC варьировалось от "ненормальной миелоидной клетки" до "незрелых миелоидных клеток". В 1996 году эти клетки стали известны как миелоидного происхождения супрессорные клетки. Термин «Myeloid-derived suppressor cells» был придуман Габрилович Д. и др. [278], чтобы охватить гетерогенность этих клеток. Так, в попытке проанализировать характер и клиническое значение этих клеток, группа исследователей предложила использовать термин «миелоидного происхождения супрессорные клетки» (MDSC), с наличием у новой популяции миелоидных клеток иммунно-подавляющих функций и системного расширения при раке.

С момента создания этого термина, интерес к MDSC возрос. В настоящее время стало ясно, что этим клеткам не хватало мембранных маркеров, которые обнаруживаются на поверхности зрелых Т-клеток, В-клеток, естественных киллеров (NK), а также макрофагов [244].

Из недавних исследований, мы теперь знаем, что MDSC представляют собой гетерогенную популяцию клеток, которые находятся в незрелом состоянии и

имеют способность подавлять Т-клеточный ответ [139]. Они являются неотъемлемой частью миелоидно-клеточной линии, содержащей миелоидные-клеточные предшественники и предшественники миелоидных клеток. За последнее десятилетие функциональное значение MDSC в иммунной системе получило широкое внимание, и недавние исследования отнесли к роли MDSC отрицательную регуляцию иммунных реакций [186].

MDSC участвуют в различных аспектах иммунных регуляций при заболеваниях, которые включают рак, хроническое воспаление, инфекции, аутоиммунные заболевания, травмы, реакции трансплантат против хозяина и так далее.

В стационарном состоянии, миелопоэз представляет собой структурированный процесс, в котором потомки общих предшественников приобретают специфические маркеры и функции циркулирующих лейкоцитов, далее прогрессивно теряя способность к самообновлению. Оборот зрелых лейкоцитов внушительен: миллиарды клеток ежедневно образуются и сменяют друг друга.

Миелоидные клетки являются наиболее распространенными кроветворными клетками в организме человека с различными функциями [190]. Они постоянно генерируются в костном мозге здоровых лиц и дифференцируются в зрелые миелоидные клетки, не вызывая иммуносупрессии [236]. Все миелоидные клетки возникают из мультипотентных гемопоэтических стволовых клеток (ГСК), которые развиваются в зрелые клетки благодаря последовательным стадиям дифференцировки. Для нормального функционирования врожденной и адаптивной иммунной системы необходимы три группы дифференцированных миелоидных клеток - макрофаги (МФ), дендритные клетки (ДК) и гранулоциты (Г) [239] (рис.1.2.).

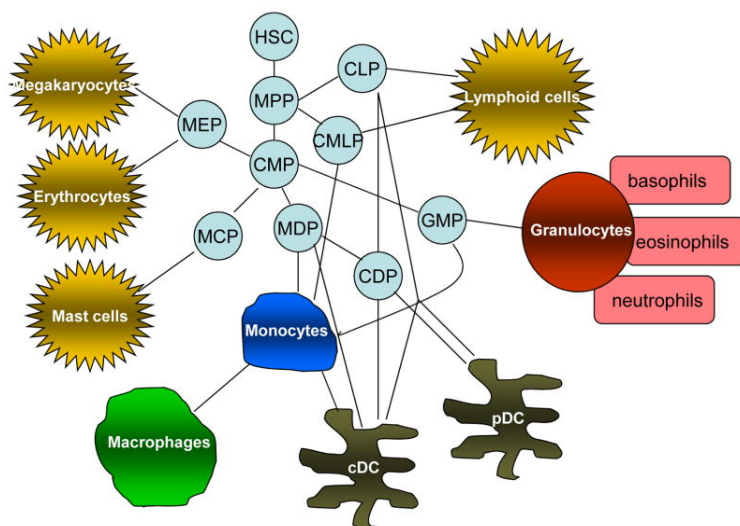


Рис.1.2. Нормальная дифференцировка миелоидных клеток в физиологических условиях (по DmitryI.Gabrilovich et al., [193])

*Миелоидные клетки являются субпопуляциями гемопоэтических клеток и происходят из сети гемопоэтических стволовых клеток (ГСК) и мульти-сильнодействующих клеток-предшественников (MPP). Сеть клеток-предшественников, которая порождает различные гемопоэтические клетки, включает в себя распространенные миелоидные клетки-предшественники (CMP); общие лимфоидные клетки-предшественники (CLP); предшественники макрофагов (MDP); общие предшественники дендритных клеток (CDP), предшественники гранулоцитов / макрофагов (GMP), предшественники мегакариоцитов / эритроцитов (MEP); - предшественники тучных клеток (MCP). CDC – обычные дендритные клетки, PDC– плазматические дендритные клетки*

Впервые MDSC были обнаружены в опухолевой ткани мышей как клетки, экспрессирующие CD11b и Gr1 [239]. MDSC являются иммуносупрессивными, незрелыми, и патологически активированными миелоидными клетками. В настоящее время выделены две основные популяции MDSC: моноцитарные MDSC (M-MDSC: CD11b + Ly6G-Ly6Chi) и полиморфноядерные MDSC (ПМЯ-MDSC: CD11b + Ly6G + Ly6Clo).

В человеческих мононуклеарных клетках периферической крови эквивалентно ПМН-MDSC определяются как CD11b + CD14-CD15 + или CD11b + CD14-CD66b + и М-MDSC как CD11b + CD14 + HLA-DR-/loCD15-. Встречаются также смешанные группы MDSC, содержащие более незрелые клетки-предшественники. Поскольку незрелость является общей чертой всех подмножеств MDSC, по мнению [184], более правильно называть их, как «MDSC на ранней стадии» с маркером дифференцировки HLA-DR-CD33+

Способность подавлять иммунные клетки является важной характеристикой MDSC. Хотя MDSC были причастны к подавлению различных клеток иммунной системы, таких как НК-клетки и В-клетки, ингибирование Т-клеток является «золотым» стандартом для оценки функции MDSC, а ингибирование Т-клеточной активности оказывается достаточным для обозначения клеток как MDSC, при условии, что они отвечают фенотипические критериям.

MDSC подавляют антиген-специфические и неспецифические иммунные реакции с помощью различных механизмов. На сегодняшний день известны 4 механизма воздействия миелоидных супрессорных клеток на врожденный и адаптивный иммунный ответ [184, 210, 249, 165, 185, 241]:

1. Истощение L-аргинина снижает регуляцию Т-клеточного рецептора, что приводит к снижению пролиферативной активности антиген-активированных Т-клеток.

2. Окислительный стресс, вызванный повышенным производством АФК и активных форм азота миелоидными супрессорными клетками.

3. MDSC истощают содержание L-селектина на поверхности мембран наивных CD4+ и CD8+ Т-клеток, тем самым, ограничивая рециркуляцию Т-клеток в лимфатические узлы.

4. MDSC активизируют и расширяют регуляторные Т-клетки (TREG), способствуя превращению наивных CD4+ Т-клеток в индуцированные TREG, которые обладают иммуносупрессивным действием.

Наиболее важной функцией MDSCs является подавление иммунного ответа посредством подавления пролиферации Т-клеток и их активности [161]. Исследованиями Dilek N., et al., 2012, было показано, что MDSC опосредуют свое влияние на Т-лимфоциты путем прямого контакта или с помощью комбинации нескольких основных медиаторов, таких как индуцибельная синтаза оксида азота (iNOS), аргиназа-1 (ARG1), активные формы кислорода (АФК), трансформирующий фактор роста-бета (TGF-бета), IL-10, регуляторные Т-клетки (Treg) и макрофаги [169]. Ниже приводится краткое изложение механизмов действия этих посредников.

Arg1 и iNOS хорошо выражены в моноцитарных-MDSC, которые используют L-аргинин для получения мочевины и NO. M-MDSCs ингибируют реакцию Т-клеток по механизму истощения L-аргинина при помощи этих двух ферментов. Активация любой из этих ферментов ингибирует пролиферацию Т-клеток путем вмешательства в трансдукцию внутриклеточных сигналов, и путем индукции Т-клеточного апоптоза [259].

Производство АФК более характерно для супрессивной активности ПМН-MDSC. В трех разных исследованиях, ингибирование производства АФК было связано с полным устранением подавляющей деятельности MDSC, которые были выделены из мышиных и человеческих раковых клеток. Кроме того, сочетание NO и ROS связывают с производством пероксинитрита. Пероксинитрит вызывает белковые дисфункции в клетках-мишенях и нитрование рецептора Т-клеток, что, в свою очередь, приводит к подавлению Т-клеточных реакций CD8 + [223].

TGF- $\beta$  является иммуносупрессивным цитокином, который прочно связан с функцией и расширением MDSC при опухолевых процессах [212]. В исследовании плоскоклеточного рака головы и шеи, в подмножестве CD14 + HLA-DR- MDSC преобладали более высокие уровни TGF-бета по сравнению с другими подмножествами MDSC [196]. Антитела к TGF- $\beta$  частично восстанавливали пролиферацию Т-клеток и продукцию IFN-gamma. Эти данные показывают, что MDSC, вероятно, являются основным источником

производства TGF-бета, который опосредует их иммуносупрессивное действие [196].

MDSC могут также ингибировать пролиферацию Т-клеток, косвенно способствуя развитию индуцибельной CD4 + CD25 + Foxp3 + Treg, что связано с производством IL-10 и TGF-бета [169]. Делано и его коллеги показали, что MDSC могут производить несколько цитокинов и хемокинов, таких как IL-10, TNF-alpha, RANTES и MIP-1 [235].

Высокий уровень экспрессии CD80 на MDSC наблюдался во многих раковых тканях. CD80 в MDSC подавлял их антиген-специфические иммунные реакции. Сам CD80 подавляет антиген-специфический иммунитет с помощью Treg [171]. Другое исследование, показало, что посредством секреции IL-10, MDSC также индуцируют поляризацию макрофагов по типу 2, которая характеризуется снижением секреции IL-12 [134].

По сведениям Vincenzo Bronte et al., 2016, в отличие от моноцитов и нейтрофилов существует 4 типа молекулярных и биохимических факторов иммуносупрессивной активности MDSC:

1. Факторы транскрипции и регуляторы апоптоза.
2. Про- и противовоспалительные цитокины и рецепторы к ним.
3. Хемоаттрактанты и рецепторы, влияющие на активацию MDSC.
4. Ферменты и побочные метаболические продукты, способствующие иммунорегуляторной функции MDSC.

Эта группировка, характеризующая молекулярные и биохимические показатели, позволяет идентифицировать MDSC. Так, иммунорегуляторная активность MDSC зависит от метаболического потребления аминокислоты L-аргинина и L-триптофана, активности таких индуцируемых ферментов как аргиназа 1 (ARG1), NO синтаза (NOS<sub>2</sub>) и индуцибельная NO синтаза (iNOS) [260]. Метаболит аргинина - орнитин является предшественником различных соединений, включая полиамины и пролин, выполняя важные функции в клеточной пролиферации, в том числе тромбоцитов [144]. Присутствие аргинина необходимо для адекватной трансляции iNOS. Вместе с тем, в

условиях активации iNOS продуцируется супероксид, который образует высокореакционный пероксинитрит, осуществляющий нитрозилирование чувствительных к нему аминокислотных остатков, особенно, тирозина, что ведет к конформационным изменениям структуры белковых молекул [144].

Несмотря на прогресс, достигнутый в последние годы в понимании молекулярных механизмов, регулирующих накопление MDSC, многие конкретные детали остаются неясными. Чтобы раскрыть биологию MDSC необходимо понять, требует ли накопление этих клеток одного или двух сигналов. По мнению Nefedova Y, et al., 2005, Lee H, et al., 2009, модель "один-сигнал" означает, что один из факторов, например, GM-CSF, может инициировать программу дифференцировки MDSC и активировать эти клетки, превращая их в иммуносупрессивные клетки [144, 247]. Тем не менее, другая модель подразумевает "два-сигнала". Эта модель предполагает, что расширение MDSC может быть разделено на два процесса, регулируемых различными путями передачи сигнала. Один путь главным образом отвечает за расширение MDSC, а второй - для приведения MDSC в активное состояние.

Первый процесс индуцируется различными цитокинами и факторами роста, продуцированными стромой костного мозга в ответ на хроническую стимуляцию. Он включает в себя такие факторы, как GM-CSF, M-CSF, G-CSF, IL-6, VEGF, и т.д. и сигналы через STAT3 и STAT5. Эта передача сигналов препятствует дифференциации MDSC и способствует пролиферации незрелых миелоидных клеток. Тем не менее, только этот путь передачи сигналов не является достаточным, чтобы генерировать накопление MDSC. MDSC требуют второго активирующего сигнала, который проявляется в регуляции аргиназы, производстве иммуносупрессивных цитокинов и т.д. Этот тип сигнализации обеспечивается провоспалительными молекулами, такими как IFN-gamma, IL-1beta, IL-13, TLR лиганды и т.д. Он использует повышающие регуляцию молекулы STAT1, NF-kB транскрипционные факторы и COX2. Эта модель может объяснить, почему в устойчивом состоянии активация STAT3 и STAT5 в ответ на различные факторы роста, которые необходимы для нормального

крововетворения, не приводит к накоплению MDSC при отсутствии сильного сигнала от провоспалительных факторов. Она также может объяснить, почему острое воспаление, связанное с выделением провоспалительных факторов при отсутствии устойчивой регуляции факторами роста, также не приводит к накоплению MDSC. Вполне вероятно, как это всегда имеет место в биологических системах, имеется перекрытие этих сигнальных путей. В стационарном состоянии крововетворения различные факторы могут уводить дифференцировку в сторону либо одного, либо другого подмножества MDSC. Кроме того, факторы транскрипции, могут модулировать активность друг друга, как это имеет место быть, например, для Stat3 и NF- $\kappa$ B. Тем не менее, эта модель предполагает, что накопление MDSC возможно только при условии наличия двух сильных сигналов [247].

#### **1.4 Коррекция ванадий- и хроминдуцированных повреждений**

Патофизиология значительно расширила границы научных познаний в области поиска эффективных способов патогенетической коррекции. Учитывая комплексные изменения иммунной системы во время интоксикации солями тяжелых металлов, необходимо отслеживать показатели, связанные с иммунными клетками и медиаторами воспаления, и разрабатывать эффективные способы иммуномодулирующей терапии.

Иммуномодулирующие препараты характеризуются нормализующим действием на иммунную систему и проявляют способность исправлять ее конкретные нарушения – повышать сниженные показатели и подавлять повышенные. Такие препараты могут быть отнесены к категориям иммуномодулирующих препаратов или иммунокорректоров [125, 126, 86, 66, 61]. Так, В.Г. Артюхов с соавт. проводили модельные эксперименты по изучению изменения функциональной активности Т-лимфоцитов крови человека после модификации УФ-светом и циклофероном. Было установлено,



что способность CD2 рецепторов взаимодействовать с эритроцитами барана не изменялась после суточной инкубации Т-лимфоцитов с циклофероном и воздействия УФ-излучения в дозах 151-906 Дж/м<sup>2</sup>. Однако инкубация с индуктором интерферона иммунокомпетентных клеток, облученных большими дозами УФ-света (906 и 1359 Дж/м<sup>2</sup>), приводила к снижению функциональной активности исследуемых антигенов, что, по мнению авторов, смогло тормозить участие CD2 рецепторов Т-лимфоцитов в процессах межклеточной адгезии при реализации иммунного ответа [61].

Елецкая О.А. с соавт. полагают, что причиной хронизации заболеваний почек и мочевых путей является развитие у больных вторичной иммунологической недостаточности на фоне интенсивного химиотерапевтического лечения. В связи с этим авторы предлагают в качестве лечения сборы, обладающие диуретическим, противовоспалительным, антимикробным и иммуномодулирующим действием. По результатам эксперимента был выбран сбор, состоящий из травы тысячелистника, травы пустырника, листьев крапивы, листьев брусники, почек березы. После курса лечения наблюдалось улучшение показателей иммунного статуса в виде нормализации процентного содержания CD16, CD25, повышения процентного содержания CD8, абсолютного содержания CD3 и CD4-лимфоцитов, снижения числа HLA-DR, CD95-клеток по сравнению с аналогичными показателями до лечения и в сравнении с традиционной схемой терапии [49].

Дисбаланс цитокинов при остром асептическом воспалении, по сведениям А.В. Кропотовой и Н.В. Степаненко, полностью корректируется экстрактом женьшеня, который при различных режимах дозирования, воздействуя на активность интерферона -  $\gamma$ , способен модулировать функции фагоцитов, определяя интенсивность и направленность воспалительного ответа [75].

Н.В. Плаксен с соавт. считают, что активное вмешательство в иммунную систему, изыскание путей ее стимуляции, исправление дефектов ее функционирования можно проводить, воздействуя на нее не только в целом, но

и на отдельные ее клеточные популяции. Так, коррекцию нарушенных показателей неспецифической резистентности и специфические реакции гуморального и клеточного типа авторы проводили с помощью препарата из асцидии пурпурной «Мобилана», который, по их мнению, улучшал качественный и количественный состав лейкоцитов периферической крови, функциональную активность нейтрофилов перитонеальной полости, усиливал адгезивную активность, количество фагоцитирующих клеток, а также нормализовал специфические реакции гуморального и клеточного иммунитета [96].

Забродский П.Ф. с соавт. (2004) в опытах на крысах линии Вистар установил, что имунофан в дозе 10 мкг/кг при применении в течение 4 сут после острого действия (0,75 ЛД<sub>50</sub>) заринном восстанавливал основные показатели иммунного статуса (Т-зависимого антителообразования, антителозависимой клеточной цитотоксичности, активности естественных клеток-киллеров, реакции гиперчувствительности замедленного типа) и прямо связанные с ними параметры перекисного окисления липидов [38].

Аналогичное действие оказывала биологически активная добавка к пище «Мелонелла», увеличивая *in vitro* фагоцитарную активность нейтрофилов крови больных с впервые выявленным туберкулезом [40].

По данным Кащенко С.А. (2006), использование иммуномодулятора тимогена при лечении заболеваний, сопровождающихся иммунодефицитом, способствовало морфологической перестройке тимуса, селезёнки и подмышечных лимфатических узлов неполовозрелых крыс, которая заключалась в активизации Т-зависимых участков этих органов и сохранялась на протяжении 30с. после введения иммуностимулятора. Так, после введения тимогена наблюдалось увеличение относительной площади коркового вещества тимических долек на 15,6% (7с.) и 14,1% (15с.) и в последующие сроки эксперимента (30-180 с.) соотношение между показателями относительных площадей коркового и мозгового вещества в тимических дольках нормализовалось. После введения иммуномодулятора увеличивалась плотность

расположения лимфатических узелков на единице площади препарата, а также они появлялись не только в корковом, но и в мозговом веществе. На 7 и 15с. после прекращения введения тимогена средние диаметры лимфатических узелков лимфатических узлов превышали контрольные показатели на 20,9% и 14,4%, в последующие сроки наблюдения существенных различий не выявлялось [82].

Иммуноткорригирующая терапия применяется практически во всех областях медицины. Однако в последнее время в стоматологии – наиболее интенсивно. Так, в комплексное лечение патологии зубочелюстной системы врачи-стоматологи стали включать иммуномодуляторы [30, 31].

Новыми тенденциями в разработке иммуномодуляторов является создание эффективных препаратов методами химического синтеза. Примером иммуномодулятора нового поколения может служить полиоксидоний, который разрешен к применению с 1996 г.

Полиоксидоний – полимерный иммуномодулятор, обладающий уникальными свойствами, отличающими его от других иммуномодуляторов, созданных методами химического синтеза. Полиоксидоний успешно применяется в различных областях медицины. Так, В.В. Иванова с соавт., 2003, исследовали эффективность полиоксидония при остром инфекционном мононуклеозе (ОИМ) у детей [138], который ускорял процесс клинического выздоровления при ОИМ. Он оказывал хороший иммуномодулирующий эффект, направленный на стимуляцию клеточного звена иммунной защиты. Терапевтический эффект был получен и при лечении хронических простатитов. Полиоксидоний был применен в комплексной терапии. С.Г. Шестаков с соавт. отмечают, что до лечения у больных было выявлено снижение в крови содержания Т-лимфоцитов, Т-хелперов, увеличение В-лимфоцитов, снижение фагоцитарной и функциональной активности нейтрофилов, повышение в сыворотке крови и секрете предстательной железы концентрации ФНО $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6 при снижении содержания IL-4. Инъекции полиоксидония по сравнению с базисным лечением нормализовало содержание в крови CD3+, CD8+, CD16+

клеток; активизировало функциональную активность нейтрофилов; снижало в сыворотке концентрацию ФНО $\alpha$ , нормализовало уровень IL-6, повышало содержание IL-4, не влияя на IL-1 $\beta$  в секрете предстательной железы. При лечении язвенной болезни и рецидивирующих эндометритов полиоксидоний оказывал аналогичное действие [56, 68, 5].

Немаловажную роль в возникновении и рецидивировании хронических процессов отводится снижению защитных сил организма, вследствие нарушения как системного, так и местного иммунитета. Детоксицирующее, антиоксидантное и мембраностабилизирующее действие полиоксидония существенно улучшало клинико-иммунологический статус больных. Успешно применяли полиоксидоний и при лечении туберкулеза [9], ишемической болезни сердца [69], стоматологической практике [137].

Полиоксидоний наряду с ярковыраженной иммуностимулирующей активностью, обладает выраженными детоксицирующими, антиоксидантными и мембраностабилизирующими свойствами. Это особенно важно для ситуаций с массивной токсикологической нагрузкой (отравления различными ядами, техногенные катастрофы и др.). Указанные свойства полиоксидония, наряду с его выраженной способностью активировать основные факторы естественной резистентности (моноциты\макрофаги, нейтрофилы, естественные киллеры), стимулировать продукцию ряда цитокинов, усиливать реакции гуморального и клеточного иммунитета и улучшать качество жизни больного, определяют этот иммуномодулятор в качестве препарата первого выбора при различного рода вторичных иммунодефицитах, при комплексной терапии и профилактике различных заболеваний, в т.ч. инфекционных, при проведении иммунореабилитационных мероприятий и др. Противопоказания для применения полиоксидония отсутствуют [95].

Успешно применяют полиоксидоний в комплексном лечении флегмон челюстно-лицевой области. В результате многочисленных исследований, проведенных М.Б. Порфириадисом с соавт. за период с 1991 по 2004 гг., выявлены особенности изменения реактивности у больных с флегмонами ЧЛЮ,

протекавших с гипергическим типом воспалительной реакции. Так, авторы наблюдали тенденцию к уменьшению общего количества Т-лимфоцитов за счет преимущественного снижения хелпероиндуктивных клеток, повышение цитотоксических CD8+-лимфоцитов; увеличение числа лимфоцитов, сниженное количество иммунокомпетентных клеток, компенсаторное усиление уровня гуморального иммунитета за счет преимущественного повышения концентрации IgG. Корректирующий эффект полиоксидония проявился в усилении фагоцитарной активности и синтезе цитокинов. Полиоксидоний повышал эффективность взаимодействия Т- и В-лимфоцитов в реакциях антителообразования. Авторы отмечают, что назначение препарата позволило уменьшить дозы антимикробных препаратов и повысить эффективность лечения за счет ускорения элиминации возбудителя заболевания, а также снизить вероятность развития гнойно-септических осложнений, что подтверждали полученные результаты исследования [97].

При изучении механизма действия полиоксидония *in vitro* показано, что ФИТЦ-меченый полиоксидоний (Ф-ПО) связывается преимущественно с нейтрофилами и моноцитами, тогда как с лимфоцитами в 7-8 раз слабее. Низкомолекулярная фракция Ф-ПО (менее 5 кД) проникает в фагоциты и лимфоциты путем эндоцитоза. При действии ПО не происходит усиления выброса Ca<sup>2+</sup> из внутриклеточных депо. Другой маркер активации лейкоцитов, внутриклеточная H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, повышается под влиянием ПО. При анализе иммуномодулирующего эффекта ПО выявлено усиление продукции интерлейкинов 1β и 6; модулирующее действие – на синтез ФНО-α; отсутствие влияния на интерфероны α и γ; повышение киллинга бактерий; снижение хемилюминесценции, проявляющее антиоксидантные свойства [48].

Государственная программа развития фармацевтической промышленности Республики Казахстан ставит главной целью обеспечение населения республики собственными отечественными лекарственными препаратами в необходимом объеме. Важное место в программе уделяется

научным исследованиям, направленным на поиск и создание новых оригинальных эффективных лекарственных средств [101, 99].

В последние годы в отечественной практике предложено новое оригинальное высокоэффективное и малотоксичное фармакологическое средство - производное пиперидина с местноанестезирующей и антиаритмической активностью - [1-(2-этоксиэтил)-4-этинил-бензоилоксипиперидина гидрохлорид, названное казкаином, который создан совместными усилиями ученых и специалистов Института химических наук, Казахского государственного медицинского университета и Новокузнецкого научно-исследовательского химико-фармацевтического института [54, 108]. В последнее время хорошо изучены его местноанестезирующие и антиаритмические свойства [62, 46, 73].

Казкаин проходил клинические испытания на базе Московских клиник. Так, в Центральном военно-морском госпитале и Московском областном научно-исследовательском клиническом институте была исследована местноанестезирующая активность казкаина, а в Научном Центре сердечно-сосудистой хирургии им. А.Н. Бакулева и Факультетской терапевтической клинике ММА им. И.М. Сеченова была испытана антиаритмическая активность казкаина [252]. Так, установлено, что казкаин оказывал купирующий и профилактический эффект при желудочковых нарушениях ритма сердца, пароксизмальном мерцании предсердий, пароксизмальной атрио-вентрикулярной тахикардии [133].

В работе Имашовой Ш.О. (2008) была исследована местноанестезирующая активность казкаина на модели проводниковой анестезии. Результаты исследований показали, что казкаин среди исследованных форм местных анестетиков оказался наиболее активным [55].

В литературе появляются сведения о мембраностабилизирующем действии казкаина [28].

Использование высокоэффективных, безопасных и доступных лекарственных препаратов растительного происхождения является весьма

актуальным направлением современной медицины. Флора Казахстана привлекательна богатейшими сырьевыми запасами уникального лекарственного растения – солодки, известной своими целебными свойствами со времен глубокой древности. Долгие годы Казахстан являлся крупным поставщиком корня солодки во многие страны мира: США, Японию, Италию, Германию, Данию, Болгарию и др. [93].

Исследованиями сотрудников Военно-медицинской академии (Санкт-Петербург) и Дальневосточного научного центра РАН установлено, что в настоящее время среди фитопрепаратов солодка вышла на первое место по числу предлагаемых и используемых лечебных препаратов [34].

По литературным данным [72] стало известно, что солодка содержит целый ряд биологически активных веществ, что обеспечивает ей широкий спектр фармакологического действия. Благодаря основному действующему веществу солодкового корня – глицирризину и входящей в его состав глицирретовой кислоте, солодка отличается структурной схожестью к эндогенным глюко- и минералокортикостероидам. Сапонины корня солодки обладают свойством потенцировать эффекты кортикостероидов, усиливать их синтез, проявлять синергизм и ингибировать энзимы клеток печени, разрушающих как эндогенные, так и вводимые извне кортикостероидные гормоны.

Гормоноподобное действие солодкового корня происходит за счет способности его производных предотвращать инактивацию гормонов коры надпочечников и других эндокринных желез, участвующих в повышении устойчивости организма к стрессорным воздействиям [13].

Аналогичные данные в своих экспериментальных исследованиях приводит Журабекова Г.А. (2008). Так, введение «Масла солодки» в первый месяц затравки животных формальдегидом в концентрации 0,6-0,8 мг/м<sup>3</sup> предотвращало токсическое воздействие формальдегида, а с 3-го месяца воздействия – фитопрепарат снижал функциональные нарушения коры

надпочечников, повышая уровень кортизола в крови, ингибируя процессы перекисного окисления липидов и активизируя антиоксидантную систему [52].

Антиоксидантные свойства корня солодки голой предотвращали повреждающее влияние продолжительной вибрации на организм [39]. На кафедре фармакологии Актюбинской государственной медицинской академии изучены антиоксидантные свойства масла солодки на интактных животных. Результаты исследований показали, что масло солодки значительно повышало в крови активность каталазы и СОД по сравнению с животными, которым внутрижелудочно зондом вводили подсолнечное масло [74].

Эффективность экстракта солодки доказана и при влиянии малых доз ионизирующей радиации. Так, при ингаляции пылью урановой руды экстракт солодки оказывал корректирующее действие, повышая активность АсАТ и АлАТ в ткани печени экспериментальных животных [43]. Аналогичные данные получены и в исследованиях Р.Т. Джумашевой (2010). Так, применение экстракта корня солодки у животных приводило к снижению повреждающего действия пыли урановой руды на структуру легкого и положительным сдвигам морфометрических показателей легких [47].

Исследования последних лет показали, что любой патологический процесс в организме сопровождается изменениями в иммунной системе, течение, тяжесть и исход которых зависят, в том числе, и от интенсивности воздействия. Для коррекции сдвигов иммунной системы часто используются гормоны коры надпочечников и их синтетические аналоги. Однако некоторые отрицательные последствия гормонотерапии заставляют ограничивать ее широкое применение. И в этом отношении интересными являются препараты корня солодки, которые сопоставимы по эффективности действия с глюкокортикоидными препаратами и имеют менее выраженное отрицательное влияние на организм [135].

Шукирбекова А.Б. (2006) видит механизм противовоспалительного действия корня солодки в том, что глицирризиновая кислота, входящая в ее состав, влияет на каскад арахидоновой кислоты, ингибирует активность



фосфолипазы А и образование простагландина Е2 в активированных и перитонеальных макрофагах, усиливает процесс движения лейкоцитов в зону воспаления, потенцирует кислородзависимые механизмы фагоцитоза, что существенно снижает воспалительный отек, нормализует показатели крови, увеличивает количество иммунокомпетентных клеток в органах иммуногенеза [135].

По мнению Арыстановой А.Ж. и соавт. (2004) противовоспалительное свойство препаратов корня солодки неразрывно связано с их иммуномодулирующими эффектами. Основные биологически активные соединения, входящие в состав корня солодки, стимулируют выработку антител, повышают титр комплемента, интерферона, лимфоцитов, пролиферацию Т- и В-лимфоцитов, усиливают фагоцитоз макрофагов и повышают активность лизоцима, что делает возможным их использование в качестве стимуляторов неспецифического иммунитета [13].

Байкадамовой Л.И (2009) впервые было изучено влияние сочетанного введения масляных экстрактов листьев крапивы и корней солодки на показатели периферической картины крови и обмен железа. Проведенными исследованиями установлено, что применение этих препаратов в течение двух месяцев повышало показатели периферической «красной» крови и ферропротеидов, а комбинированная терапия с препаратом железа «Сорбифер дурулес» - к нормализации картины крови и обмена железа [16]. Таким образом, изученные препараты показали высокую противоанемическую активность.

Благодаря уникальным биологическим свойствам в медицине используют противовоспалительную [11, 124], противовирусную [12], противомикробную [121], антиоксидантную [37, 71, 84], антиаллергенную [84] активность препаратов корня солодки и это далеко не полный список, который продолжает расширяться.

На основе глицирризиновой кислоты, входящей в состав корня солодки, разработан лекарственный препарат рувимин в таблетках, содержащий 0,1 г

биосластилина, и зарегистрирован в Государственном реестре лекарственных средств Республики Казахстан как гепатопротектор (РК-ЛС-3-№004956).

Ценность этого уникального природного продукта заключается в том, что он содержит около 80% действующего начала корня солодки – глицирризиновой кислоты, тогда как в известных лекарственных препаратах солодкового корня – в сухом экстракте ее содержится около 20%, в густом экстракте – около 12%, а в самом корне – около 6-8% [14, 10].

В ряде работ показано, что наряду с гепатопротекторным и мембраностабилизирующим действием, у больных с хроническим бронхитом и гепатитом рувимин оказывает отчетливый антиоксидантный эффект [17].

На кафедре патофизиологии КазНМУ им. С.Д. Асфендиярова изучали гемо- и нейротоксическое действие ванадия, путем введения последнего в дозе 10 мг/кг м.т. С целью коррекции вызванных ванадием нарушений наряду с другими препаратами использовали рувимин в дозе 50 мг/кг м.т. Результаты проведенных исследований показали, что рувимин, не оказывая корригирующего влияния на ванадат-зависимую анемию, заметно снижал гиперкалиемию, свертываемость крови и улучшал процессы консолидации и последующего воспроизведения энграмм памяти оборонительных условных рефлексов активного и пассивного избеганий [76].

Кроме того, антиоксидантные свойства рувимина успешно применялись при лечении фосфорных интоксикаций. Так, под влиянием рувимина снижался уровень катаболитов окислительной модификации белков [44].

Таким образом, экологический прессинг окружающей среды на организм человека и животных провоцирует развитие вторичных иммунодефицитных состояний, тогда как правильно подобранная корригирующая терапия во многом предопределяет положительный исход заболеваний.

## ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

**Объект исследования.** Приступая к исследованию, мы исходили из предположения о том, что *если* основу изучения механизмов повреждающего действия соединений ванадия и хрома составят: комплексный подход, позволяющий установить количественный и качественный профиль основных иммунокомпетентных клеток в центральных и периферических органах иммуногенеза и крови; установление причинно-следственных связей между воздействием солей ванадия и хрома и изменением активации отдельных звеньев иммунитета; выявление совокупных механизмов нарушения регуляторного влияния важных звеньев этих механизмов на течение воспалительного процесса, *то*, в свете открывшихся новых сведений, позволит сформировать представление о роли металлиндуцированной иммунодепрессии в патогенезе хронизации воспалительного процесса и позволит разработать принципиально новые подходы патогенетической коррекции.

С этой целью при выполнении диссертационной работы использовался комплексный подход, включающий в себя исследование негативной роли соединений металлов на функциональное состояние организма экспериментальных животных. Загрязнение тяжелыми металлами быстро увеличивается в окружающей среде. В результате антропогенной деятельности человека, многие металлы присутствуют в окружающей среде в концентрациях, превышающих предельно допустимые нормы. Было показано, что воздействие ванадия и хрома вызывает искаженные иммунные реакции. Тем не менее, механизмы, с помощью которых опосредуются их иммуномодулирующие эффекты, не полностью поняты. Следовательно, в качестве объекта исследования в настоящей диссертационной работе были проведены экспериментальные исследования с целью изучения иммунологической реактивности организма лабораторных животных с асептическим воспалением в условиях интоксикации ванадием и хромом.

Некоторые химические элементы, являются рассеянными микроэлементами и относятся к жизненно необходимым. Большинство из них входят в часть физиологических потребностей человека. Ванадий и хром широко распространены в природе и часто используются в различных отраслях тяжелой промышленности. Они также входят в микроэлементный состав организма и принимают участие в обмене веществ. Так, установленная суточная потребность в хrome составляет 50-200 мкг, в ванадии – 2 мг. Являясь неспецифическими активаторами ферментных систем, многие микроэлементы поддерживают нормальную жизнедеятельность организма, в том числе в формировании и функционировании иммунной системы [274, 152, 285]. Между тем, при превышении допустимых норм все микроэлементы токсичны [170, 198]. Следует полагать, что как их снижение, так и увеличение может приводить к негативным последствиям. Так, в наших исследованиях токсические проявления ванадата аммония (ВА) и дихромата калия (ДК) изучались при двухнедельной пероральной заправке опытных крыс в дозе по 5 мг/кг м.т.

Количественную оценку содержания ДК проводили в тимусе, костном мозге, селезенке, лимфоузлах и крови экспериментальных животных. Содержание хрома в сырой ткани лимфоорганов опытных крыс определяли по ГОСТу 33425-2015 «Определение никеля, хрома и кобальта методом электротермической атомно-абсорбционной спектрометрии» на базе лаборатории Алматинского технологического университета.

Пероральная двухнедельная заправка крыс дихроматом калия приводила к его накоплению в крови у опытных крыс, содержание которого колебалось в пределах значений 0,0724 – 0,0749 мг/кг. В последующие сроки исследований (через 7 и 14 суток) хром в крови не обнаружен. Содержание хрома в селезенке опытных крыс повышалось через 1 и 7 суток, в 8,3 раза превышая контрольные показатели (0,0464 мг/кг). К 14 суткам содержание хрома снижалось. В группе опытных животных с асептическим воспалением наблюдалась нарастающая тенденция к накоплению хрома в селезенке во все сроки исследования (0,644; 0,475; 1,181). В тимусе обеих групп опытных крыс

отмечалось увеличение содержания хрома по отношению к контролю (0,0662 мг/кг). Через 1 сутки - в 4,3 раза, через 7 суток в 6,3 раза.

В брыжеечных лимфатических узлах опытных крыс с асептическим воспалением отмечалась аналогичная картина с повышением накопления хрома к последнему сроку исследования. В костном мозге через 1 сутки установленное содержание хрома в 16,6 раз для «ВА+ДК» (Ме) и 6,2 раза для «Ме+АВ» превышало показатели контроля (0,119 мг/кг). В остальные сроки исследования эти показатели колебались практически в тех же пределах.

Из вышеизложенного сделано заключение, что содержание хрома в лимфоорганах опытных крыс имело тенденцию к постепенному накоплению в исследованные сроки. Между тем, в крови хром обнаруживается лишь в первый срок, тогда как в последующие сроки не выявляется.

На кафедре патофизиологии Толепбергеновой М.Ж. (2010 г.) и Мырзагуловой С.Е. (2010 г.) проводилось масс-спектрическое определение тяжелых металлов (ICP-MS) в крови, головном мозге и печени крыс при комбинированном введении солей ванадия и хрома в течение 30 суток. Так, после комбинированного введения металлов в течение одного месяца содержание ванадия и хрома в крови в 2 и 1,4 раза соответственно превышало контрольный уровень. Содержание ванадия и хрома в головном мозге имело тенденцию к увеличению [118]. Полученные сотрудниками кафедры патофизиологии результаты исследований согласуются с данными Казимова М.А., который установил, что совместное поступление ванадия и хрома в дозах, наиболее часто встречающихся в производственных условиях (0,1-0,2 мг/кг), сопровождалось взаимовлиянием на их токсикокинетику, что дает основание предполагать об их аддитивном токсическом эффекте [63].

Токсическими проявлениями ВА и ДК в установленной дозировке явилась летальность животных, составившая 20% от общего количества животных.

**Предмет исследования.** Изменения структуры и функций разных компонентов врожденного и адаптивного иммунитета, обусловленного

развитием вторичного иммунодефицитного состояния, могут быть не только следствием заболеваний, но и неблагоприятного воздействия химических экотоксикантов. Примером может служить течение воспалительного процесса на фоне дисрегуляции иммунной системы, вызванной интоксикацией соединениями металлов. Для установления причинно-следственных связей между изменением активации отдельных звеньев иммунитета в условиях асептического воспаления, вызванного на фоне интоксикации организма солями ванадия и хрома, нам было важно установить количественную и качественную характеристику основных иммунокомпетентных клеток; для понимания механизмов формирования клеточного (Th1) либо гуморального (Th2) иммунного ответа важно определить степень дифференцировки CD4<sup>+</sup> Т-лимфоцитов на Th1 и Th2. Установление соотношения про- и противовоспалительных цитокинов позволило установить интенсивность течения воспалительного процесса по преобладанию провоспалительных или противовоспалительных цитокинов, т.к. баланс между этими цитокинами является важным моментом в регуляции иммунного ответа организма и от него во многом зависит характер течения патологического процесса и ее исход, а цитокиновый дисбаланс является причиной хронизации воспалительных заболеваний.

Поскольку поставленные цель и задачи диссертационной работы были направлены на лучшее понимание патогенеза воспаления с целью разработки новых патогенетических способов коррекции мы для их реализации применили комплексный подход, существенным дополнением к которому сочли изучение функциональной активности и структурных изменений центральных и периферических лимфоорганов опытных крыс. Эти сведения могут помочь в обнаружении патогенетических механизмов дисрегуляции воспалительного процесса, вызванного интоксикацией соединениями тяжелых металлов, и новых способов патогенетической коррекции выявленных нарушений.

**Характер исследований: подострый эксперимент.**

**Детальное описание выбранной модели исследования. Медико-**

биологические эксперименты и доклинические исследования на животных будут проводиться согласно «Правилам проведения доклинических исследований, медико-биологических экспериментов и клинических испытаний в Республике Казахстан» утвержденным приказом Министра здравоохранения Республики Казахстан от 25 июля 2007 года №442 в соответствии с Госстандартом Республики Казахстан «Надлежащая лабораторная практика. Основные положения», утвержденным приказом Министра индустрии и торговли РК. При проведении экспериментов руководствовались рекомендациями, изложенными в «Европейской конвенции о защите позвоночных животных, используемых в экспериментальных и научных целях», Страсбург 18 марта 1986 г. Все процедуры, связанные с забором крови и изъятием органов осуществляли под хлороформовым наркозом, путем помещения крысы в небольшую закрытую посуду.

Все исследования проводились после процедуры рассмотрения и заключения ЛЭК КазНМУ (заявка, регистрационный №166, протокол № 3 от 01.04.2015).

Экспериментальные животные подвергались комбинированной затравке ванадатом аммония (ВА) и дихроматом калия (ДК) ежедневно в течение двух недель из расчета по 5 мг/кг м.т. перорально при помощи металлического зонда. Пример расчета: 25,0 мг металла растворяли в 50,0 мл физиологического раствора. В 1,0 мл раствора содержалось 0,5 мг металла для крысы массой 100 г, соответственно крысе массой 195 г вводили 1,95 мл раствора. Содержание ванадия в 5 мг  $\text{NH}_4\text{VO}_3$  составляло 2,2 мг, хрома в 5 мг  $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$  - 1,75 мг. Крыса средней массой 195 г в сутки получала 0,43 мг ванадия и 0,34 мг хрома, что в течение двух недель составило 6,02 мг и 4,76 мг соответственно [19, 149, 8, 286, 215]. Исследованиями, проведенными [300], установлена LD50 для  $\text{NaVO}_3$  при 14-дневном пероральном введении крысам в дозе 98,0 мг / кг.

Моделирование асептического воспаления путем подкожного введения 0,3 мл скипидара на вазелиновом масле в межлопаточную область осуществляли сразу после двухнедельной затравки ВА и БК, предварительно

выстригая у крыс шерсть в межлопаточной области и вводя подкожно 0,5 мл воздуха (Руководство к практическим занятиям по патологической физиологии. /Под редакцией Лосева Н.И., Москва, «Медицина», 1985) [80, 213].

На соответствующих этапах эксперимента у крыс забирали органы: тимус, костный мозг, брыжеечные лимфатические узлы, селезенку и кровь для проведения гематологических, иммуно-гистохимических, микроскопических, цитологических исследований. Животных содержали в стандартных пластиковых клетках при комнатной температуре, двухразовом питании натуральным кормом в количестве, соответствующем суточным нормам. За 24 часа до опыта животным прекращали подачу пищи при неограниченном доступе к воде.

**Дизайн эксперимента.** К половозрелым крысам (репродуктивного периода) относят белых беспородных крыс двух возрастных категорий: молодых (возраст 5-10 мес.) и зрелых (возраст 11-18 мес.) [78]. Руководствуясь вышеприведенными сведениями, для постановки экспериментов брали белых беспородных половозрелых крыс-самцов возрастом 8-12 мес.

Проведено 13 серий эксперимента (в каждой серии по 30-35 белых беспородных крыс-самцов, интактных – 10; масса 200 г  $\pm$  10 %, возраст – 8-12 мес.):

- 1 серия – половозрелые крысы (интактные);
- 2 серия – половозрелые крысы + Me (металлы: ванадат аммония (ВА) и дихромат калия (ДК));
- 3 серия – половозрелые крысы + АВ (асептическое воспаление);
- 4 серия - половозрелые крысы + Me + АВ (опыт);
- 5 серия - половозрелые крысы + Me + МХФ-2;
- 6 серия - половозрелые крысы + Me + Рувимин;
- 7 серия - половозрелые крысы + Me + ПО (полиоксидоний);
- 8 серия – половозрелые крысы + АВ + МХФ-2;
- 9 серия – половозрелые крысы + АВ + Рувимин;
- 10 серия – половозрелые крысы + АВ + ПО;



11 серия – половозрелые крысы + Опыт + МХФ-2;

12 серия – половозрелые крысы + Опыт + Рувимин;

13 серия – половозрелые крысы + Опыт + ПО.

Забор органов и крови опытных животных для проведения запланированных исследований осуществляли следующим образом:

1. Интактные:

- однократно;

2. ВА+ДК:

- через 1 сутки после завершения затравки;
- через 7 суток после завершения затравки;
- через 14 суток после завершения затравки;

3. Асептическое воспаление:

- через 1 сутки после моделирования асептического воспаления;
- через 7 суток после моделирования асептического воспаления;
- через 14 суток после моделирования асептического воспаления;

4. Асептическое воспаление + ВА и ДК:

- через 1 сутки после завершения затравки и моделирования асептического воспаления;
- через 7 суток после завершения затравки и моделирования асептического воспаления;
- через 14 суток после завершения затравки и моделирования асептического воспаления;

5. Асептическое воспаление + ВА и ДК + Препараты:

- через 1 сутки после завершения затравки, моделирования асептического воспаления и начала коррекции;
- через 7 суток после завершения затравки, моделирования асептического воспаления и начала коррекции;
- через 14 суток после завершения затравки, моделирования асептического воспаления и начала коррекции.

Коррекцию металлиндуцированных повреждений проводили МХФ-2 и

рувимином. Полиоксидоний служил в качестве препарата сравнения. Препараты и МХФ-2 вводили в течение недели: для групп Ме+Препараты сразу после затравки соединениями ванадия и хрома, для групп АВ+Препараты, Опыт+Препараты сразу после моделирования асептического воспаления.

Биологически активное химическое соединение под лабораторным шифром МХФ-2 (не является препаратом: здесь и далее название «препарат» используется для удобства) (1-(2-этоксиэтил)-4-(диметоксифосфорил)-4-гидроксипиперидин синтезирован в АО «Институт химических наук имени А.Б. Бектурова» под руководством академика НАН РК, д.х.н., профессора К.Д. Пралиева и д.х.н., профессора В.К. Ю\* [100, 227]. Препараты вводили подкожно в дозе 50 мг/кг м.т. Доза препарата в перерасчете на 100 г массы крысы составляла 5 мг. По расчетам 200 г половозрелая крыса в сутки должна получать 10 мг препарата. Для этого 100 мг препарата растворяли в 5 мл 0,9 % NaCl, где 0,5 мл раствора содержит 10 мг препарата. Если крыса весила 230 г, то ей вводили 0,58 мл раствора подкожно.

Препарат рувимин выпускается в форме таблеток. Его промышленное производство освоено на Шымкентском ОАО «Химфарм» [89]. Таблетку рувимины вводили через металлический зонд перорально в дозе 50 мг/кг м.т. Для этого ее тщательно перемалывали в ступке и растворяли в дистиллированной воде в той же дозировке, как и предыдущие препараты.

Использовали полиоксидоний, широко применяемый в практической медицине как иммуномодулирующее лекарственное средство. Согласно инструкции по применению разовая доза полиоксидония для взрослого человека весом 75 кг составляет 6 мг. Согласно произведенным расчетам половозрелая крыса весом 200 г в сутки должна получать 0,016 мг препарата. Расчет препарата производили на 100 г массы животного. Далее 0,8 мг препарата растворяли в 10 мл физиологического раствора, где в 0,1 мл раствора содержалось 0,008 мг препарата для крысы весом 100 г. Затем производили перерасчет на вес крысы. Если крыса весила 230 г, то ей вводили 0,23 мл раствора подкожно.

## Методы исследования

### Иммунологические исследования

Постановка теста восстановления нитросинего тетразолия (НСТ-тест). Оценка состояния фагоцитарной активности нейтрофилов производится по результатам постановки спонтанного и стимулированного теста с нитросиним тетразолием (НСТ-тест). В качестве стимуляторов использовались пирогенал (25-50 МПД /мл) и латекс (1,5 мкм).

Постановка теста осуществляется следующим образом. На поверхности стерильных предметных стекол смешивают равные объемы (по 20 мкл) гепаринизированной венозной или капиллярной крови (10-15 ЕД/мл) и 0,1%-го раствора на фосфатном буфере тетранитросинего тетразолия. В случаях стимулированных вариантов добавляется равный объем стимулятора. Стекла инкубируют во влажной камере в течение 30 минут при 37<sup>o</sup>C. Условия инкубации можно создать путем помещения стекол в чашки Петри, дно которых покрывается увлажненной фильтровальной бумагой, после чего чашки помещают в термостат. По окончании инкубации на поверхности предметных стекол кончиком пастеровской пипетки создается мазок, который после фиксации метиловым спиртом и окрашивания 0,2%-ным водным раствором нейтрального красного микрокопируется в световом микроскопе под масляной иммерсией. Подсчитывается процент полиморфнонуклеарных лейкоцитов, содержащих в цитоплазме темно-фиолетового цвета включения диформаза: нитросиний тетразолий поглощается нейтрофилами и под влиянием их дегидрогеназной системы бесцветный НСТ восстанавливается в темно-фиолетовые гранулы диформаза. Цитоплазма окрашивается в розовый цвет. С помощью светового микроскопа исследуют каждую клетку. Для оценки результатов в 100 клетках подсчитывают долю активированных нейтрофилов, содержащих включения диформаза [122, 119, 59].

Тест ППН (показатель повреждения нейтрофилов). Кровь смешивают с 5% раствором цитрата натрия в соотношении 1: 4 или гепарином (10 МЕ на 1 мл крови). Взятую кровь вносят в количестве 0,4 мл в центрифужные пробирки.

В каждую пробирку, кроме контрольной, добавляют 0,2 мл испытуемого вещества (ванадий или хром). В контрольную пробирку вместо испытуемого вещества добавляют 0,2 мл физиологического раствора.

Содержимое пробирок тщательно перемешивают и ставят в термостат при температуре 370 С на 1 час. После этого делают тонкие мазки крови на предметных стеклах (по три из каждой пробирки).

Мазки окрашивают по методу Паппенгейма-Крюкова: на нефиксированный мазок наливают пипеткой 10-15 капель готового красителя-фиксатора Май-Грюнвальда, через три минуты по каплям прибавляют столько дистиллированной воды, сколько было налито краски, и продолжают окрашивание еще одну минуту, после чего краску смывают водой и мазок высушивают на воздухе. Затем на высушенный мазок наливают свежеприготовленный водный раствор краски Романовского-Гимзе (1-2 капли на 1 мл воды), на 8-15 минут в зависимости от температуры помещения. Смывают краску водой и мазок высушивают.

Процент деформированных лейкоцитов вычисляется при подсчете 300 клеток в трех мазках (в каждом мазке считается 100 клеток). В контрольных пробах имеет место спонтанное разрушение клеток, число которых обычно не превышает 10%. Для определения степени повреждения клеток применяется люминесцентная микроскопия [58].

*Определение лимфоцитов, экспрессирующих CD3-, CD4-, CD8-, осуществляли с помощью набора моноклональных антител фирмы GALTAGTM Laboratories invitrogen immunodeflection.* В полипропиленовую центрифужную пробирку или лунки 96-луночного круглодонного планшета отбирают 0,5 мл хорошо перемешанной суспензии лимфоцитов. Осаждают клетки центрифугированием при 200 g в течение 5 минут. Пастеровской пипеткой осторожно удаляют супернатант, оставляя осадок клеток как можно сухим. Добавляют 50 мкл PBS (физраствор, забуференный фосфатами) и 5 мл моноклональных неконъюгированных антител фирмы GALTAGTM Laboratories, перемешивают и инкубируют в течение 20 мин при 40С в темноте.

Промывают дважды PBS, содержащим 0,2% BSA и 0,1% азид натрия (центрифугирование при 200 g 5 минут). После последней промывки удаляют супернатант с помощью пастеровской пипетки, оставляя осадок клеток как можно сухим. Добавляют 50 мкл разбавленных PBS козьих поликлональных антител к F(ab)<sub>2</sub> фрагменту иммуноглобулина мыши IgG (H+L)+IgM+IgA, конъюгированных с FITC, перемешивают и инкубируют 20 мин на льду. Дважды промывают клетки PBS, содержащим 0,2% BSA и 0,1% азид натрия (центрифугирование при 200 g 5 минут). После последней промывки удаляют супернатант с помощью пастеровской пипетки, оставляя осадок клеток как можно сухим. Ресуспендируют клетки в 100 мкл смеси PBS : глицерин (1:1), помещают 25 мкл суспензии клеток на охлажденное предметное стекло и закрывают покровным стеклом. Анализируют образец с помощью люминесцентного микроскопа. Под люминесцентным микроскопом NOVEL (Австрия) считают количество светящихся лимфоцитов и несветящихся лимфоцитов в 100 клетках. Дают % светящихся клеток.

Для оценки степени эндогенной интоксикации организма и эффективности проведенной терапии по полученным результатам исследований нами производились подсчеты индексов клеточной реактивности, характеризующих функциональное состояние изучаемых параметров:

1. ИИР (индекс иммунореактивности): (лимфоциты + эозинофилы)/ моноциты. Предложенный Н.П. Шабаловым [129] метод, позволяет судить о состоянии иммунологической реактивности организма

2. ЛИ (лимфоцитарный индекс): лимфоциты / нейтрофилы (%). Является одним из критериев функционального состояния лимфоцитарной системы и показателей реактивности организма, отражает взаимоотношение гуморального и клеточного звеньев иммунной системы [70].

3. ИРИ (иммунорегуляторный индекс): CD4/CD8. Позволяет судить о хелперно-супрессорной активности лимфоцитов [114].

***Проведение оценки влияния солей тяжелых металлов, асептического воспаления и их сочетанного действия на клеточность лимфоорганов***

*лабораторных крыс (тимус, селезенка, лимфатические узлы, костный мозг) в динамике наблюдения.* Исследования выполнены в лаборатории молекулярной иммунологии и иммунобиотехнологии РГП «Институт молекулярной биологии и биохимии им. М.А. Айтхожина» под руководством д.б.н., профессора Беляева Н.Н. в рамках грантового финансирования НТП МОН РК «Молекулярно-биологические особенности течения асептического воспаления, ассоциированного с экологенной иммунодепрессией» (№ госрегистрации 0115РК00600, 2015-2017 гг., научный руководитель Балабекова М.К.). В ходе постановки экспериментов использовали следующие реактивы: трипановый синий (Trypan Blue) (Sigma-Aldrich, США), фосфатно-солевой буферный раствор (Phosphate Buffer Saline, PBS), этилендиаминотетраацетат (ЭДТА) (Serva, Германия), NaCl, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·H<sub>2</sub>O, NaOH, KHCO<sub>3</sub>, NH<sub>4</sub>Cl (Россия).

Оборудование: Инвертированный микроскоп (Leica, Германия), центрифуга SIGMA 3k30, рН-метр (Sartorius, Германия), аквадистиллятор 2008 (GFL, Германия), магнитная мешалка MM2A (Чехия), сушильный шкаф КС-65 (Германия), электронные весы TE601 (Sartorius, Германия), автоматические пипетки (Eppendorf, Германия), стеклянный гомогенизатор тканей, гемоцитометр «Камера Горяева» (Россия), фильтры для отделения стромальных тканевых элементов MACS PreseparationFilters (MiltenyiBiotec, Германия).

Приготовление буферных растворов: для получения PBS готовили 0,005 М раствор NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> в дистиллированной воде, содержащий 0,15 М NaCl, доводя рН раствора до 7,4 с помощью 0,1 N NaOH. Буферный раствор для лизиса эритроцитов готовили, растворяя в 100 мл дистиллированной воды 83 мг NH<sub>4</sub>Cl, 100 мг KHCO<sub>3</sub>, 3 мг ЭДТА.

Получение суспензии клеток из лимфоорганов и их подсчет: суспензию клеток селезенки, тимуса, брыжеечных лимфоузлов получали, гомогенизируя данные органы с помощью стеклянного гомогенизатора, используя для ресуспендирования PBS. Клетки костного мозга получали из бедренной кости после отделения мышц и отрезания дистальных отделов эпифизов, вымывая

буферным раствором PBS содержащее диафилов с помощью 10-миллилитрового шприца. Для освобождения от стромы полученную суспензию клеток пропускали через фильтры с диаметром пор 30 мкм.

Суспензии клеток селезенки и костного мозга подвергали обработке буферным раствором, лизирующим эритроциты. Для этого клетки осаждали центрифугированием при 160 g в течение 10 мин. Затем осадки встряхивали, добавляли по 1 мл лизирующего буферного раствора и инкубировали 7-10 мин при комнатной температуре, после чего добавляли 10 мл PBS и осаждали центрифугированием при том же режиме. Клеточный осадок ресуспендировали в 3-5 мл PBS и проводили подсчет ядерных клеток в камере Горяева с помощью микроскопа.

Вычисление клеточности лимфоорганов. Для вычисления клеточности лимфооргана (селезенка, тимус, лимфоузел) концентрацию клеток, подсчитанную с помощью камеры Горяева, умножали на объем клеточной суспензии и делили на массу лимфооргана, измеренную на электронных весах в мг, получая удельную величину в млн. кл./мг. Клеточность костного мозга оценивали по общему содержанию клеток, выделенных из одной бедренной кости.

Получение сыворотки крови. Сыворотку крови отделяли с помощью пипетки от фибринового сгустка, образовавшегося после 1-часовой инкубации пробирок с кровью животных при 37°C, путем центрифугирования пробирок при 300 g в течение 10 мин. Образцы сывороток переносили в пробирки типа «эппендорф» в аликвотах и замораживали при -20°C до использования.

Иммунофенотипирование клеток селезенки. В ходе постановки экспериментов использовали следующие реактивы: культуральная среда (culture medium) RPMI-1640 (Sigma-Aldrich), L-глутамин (L-glutamine) (Sigma-Aldrich), стрептомицин/пенициллин (Streptomycin/penicillin) (Sigma-Aldrich), фетальная бычья сыворотка (Fetal Bovine Serum, FBS) (Sigma-Aldrich), фосфатно-солевой буферный раствор (Phosphate Buffer Saline, PBS), фобол-12-меристат-13-ацетат (PMA) и иономицин (ionomycin) (Sigma-Aldrich), BrefeldinA

(Biolegend), флуоресцентно-меченные моноклональные антитела к CD3-APC, CD4-PE-Cy5, CD8a-PerCP, His48-FITC, CD11bc-PE, IL-4-PE и IFN- $\gamma$ -FITC (BD Pharmingen), реагент для лизиса эритроцитов FACS Lysing Solution (BD Biosciences), набор реагентов для пермеабиллизации клеток CytoFix/CytoPerm (BD Biosciences), реагент для фиксации клеток CytoFix Fixation Buffer (BD Biosciences), а также Permeabilization/Wash Buffer (RnD Systems) .

Оборудование: ламинарный стерильный бокс Airstream AC2-3EI (ESCO, Сингапур), CO<sub>2</sub>-инкубатор (Binder, Германия), центрифуга SIGMA 3k30, центрифуга SIGMA 2-16k; (Sigma, Германия), деионизатор воды (Elgastat, Англия), pH-метр (Sartorius, Германия), аквадистиллятор 2008 (GFL, Германия), магнитная мешалка MM2A (Чехия), сушильный шкаф КС-65 (Германия), стерилизатор воздушный ГП-80 (Россия), водяная баня Multitemp 2209 (LKB, Швеция), электронные весы TE601 (Sartorius, Германия), электронные аналитические весы Libor AEL-160, (Shimadzu, Япония), перистальтический насос (Millipore, США), термостат воздушный (Binder, Германия), шейкер для встряхивания пробирок micro-shaker 327m (Польша), микроцентрифуга MiniSpin (Eppendorf, Германия), морозильный шкаф на -80°C MDF (Sanyo, Япония), проточный цитофлуориметр FACS Calibur (BD, США).

Приготовление культуральной среды. Жидкую культуральную среду RPMI-1640 готовили из сухого препарата, растворяя его в деионизированной воде и доводя pH до 7,4, согласно прописи фирмы-производителя (Sigma-Aldrich, Германия), стерилизуя конечный продукт путем ультрафильтрации через мембранный фильтр с диаметром пор 0,22 мкм.

Приготовление фосфатно-солевого буферного раствора (PBS). PBS, используемый для приготовления отмывочного и колоночного буферного растворов, готовили, растворяя 0,005M NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> в дистиллированной воде, доводя pH раствора до 7,4 с помощью 0,1N NaOH и добавляя в него 0,15 M NaCl. В отмывочный буферный раствор добавляли 10 % фетальной бычьей сыворотки (FBS). Для приготовления колоночного буферного раствора в PBS добавляли 0,5% бычьего сывороточного альбумина (BSA) и 0,002M EDTA. Все



полученные растворы стерилизовали, пропуская через стерильный мембранный фильтр с диаметром пор 0,22 мкм и хранили в холодильнике при +4-8°C до использования

Получение спленоцитов. После эвтаназии, у крыс хирургически извлекали селезенку, гомогенизировали с помощью стеклянного гомогенизатора в среде RPMI-1640. Суспензию спленоцитов получали, пропуская гомогенат через фильтр с диаметром пор 35 мкм (Miltenyi Biotech), затем отмывали однократно центрифугированием в среде RPMI-1640 при 300 g в течение 10 мин. Осадок ресуспендировали в среде RPMI-1640

Культивирование клеток. Для стимуляции продукции IL-4 и IFN- $\gamma$ , спленоциты инкубировали в культуральной среде RPMI-1640, содержащей 10% FBS, 4 mM L-глутамин, 100 мг/мл стрептомицин и 100 ME/мл пенициллина. Культивирование клеток осуществляли в CO<sub>2</sub>-инкубаторе при температуре 37°C, 5% CO<sub>2</sub> и 95% влажности. В качестве активаторов использовали PMA (10ng/ml) и иономицин (500ng/ml). Для предотвращения эксфлюкса цитокинов в среду, через 3 ч после инкубации в среду вносили BrefeldinA (1 $\mu$ l/ml) и инкубировали дополнительно 1ч.

Проточная иммуноцитофлуориметрия. Определения маркеров проводили с помощью проточной иммуноцитофлуориметрии. Для этого суспензию клеток обрабатывали моноклональными антителами к поверхностным маркерам, согласно протоколам фирм-производителей. Неспецифическую флуоресценцию контролировали с помощью моноклональных мышиных IgG соответствующих изотипов. Полученные препараты клеток пропускали через проточный цитометр FACS Calibur и оценивали процент меченых клеток.

Общую популяцию МСК определяли по фенотипу His48<sup>+</sup>/CD11b/c<sup>+</sup>, субпопуляцию G-МСК – по фенотипу His48<sup>High</sup>/CD11b/c<sup>+</sup>, субпопуляцию M-МСК – по фенотипу His48<sup>low</sup>/CD11b/c<sup>+</sup>, популяцию моноцитов – по фенотипу His48<sup>-</sup>/CD11b<sup>+</sup>, популяцию Т-хелперов (Th) – по фенотипу CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>, Th1 – по фенотипу CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>IFN $\gamma$ <sup>+</sup>/IL-4<sup>-</sup>, Th2 по фенотипу CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>IFN $\gamma$ <sup>-</sup>/IL-4<sup>+</sup>.

Определение цитокинов. В ходе постановки экспериментов использовали коммерческие наборы для иммуноферментного анализа цитокинов, выпускаемые фирмой R&D Systems (Англия): для интерлейкина-1 $\beta$  - Rat IL-1 $\beta$ /IL-F2 Quantikine ELISA kit, для интерлейкина-6 - Rat IL-6 Quantikine ELISA kit, для фактора, трансформирующего рост- $\beta$  - Mouse/Rat/Porcine/Canine TGF- $\beta$  Quantikine ELISA kit, для интерлейкина-10 - Rat IL-10 Quantikine ELISA kit.

Оборудование: автоматические пипетки (Eppendorf, Германия), иммуноферментный анализатор Stat-Fax 2100 (Awareness Technology Inc., США).

Иммуноферментный анализ. Определение про- и противовоспалительных цитокинов в сыворотке крови опытных животных проводили с помощью иммуноферментного анализа, используя коммерческие наборы и иммуноферментный анализатор согласно инструкции фирмы-производителя наборов. Перед проведением анализа сыворотки размораживали и вносили в подготовленные для ИФА иммунологические планшеты. После проведения анализа с помощью калибровочных кривых рассчитывали концентрации цитокинов.

### **Морфологические исследования**

Для морфологических исследований при забое проводили забор тимуса, брыжеечных лимфоузлов, ткани воспаления, который фиксировали в 10% нейтральном формалине или фиксаторе Карнуа. После фиксации ткани отмывали от фиксатора, обезвоживали и заливали в парафин. После стандартной проводки материала парафиновые срезы толщиной 7-8 мкм окрашивали гематоксилин-эозином, для выявления соединительной ткани использовали окраску по Ван Гизону. Изучение и фотографирование ультратонких срезов проводилось на микроскопе ЭВМ-100л.

Морфометрию тимуса проводили в патоморфологической лаборатории ТОО «КОНСУЛЬТАНТ БИОТЕХ» при непосредственном участии научного сотрудника лаборатории, МНС Н.В. Жаркова. Статистическую обработку и анализ морфометрических данных тимуса осуществляли в программном пакете

SPSS. С помощью этого пакета вычисляли описательные статистики и проводили дисперсионный анализ для оценки достоверности влияния ВА и ДК на исследуемые показатели.

Подготовка гистологических срезов и их окраска проводилась в лаборатории кафедры патологической анатомии КазНМУ. Изучение и фотографирование ультратонких срезов проводилось на электронном микроскопе ЭВМ-100л. Микропрепараты тимуса, брыжеечных лимфоузлов, ткани воспаления были проконсультированы профессором кафедры патологической анатомии КазНМУ Ж.Б. Ахметовым.

Цитология костного мозга и лимфоузлов. Окрашивание мазков-отпечатков костного мозга и лимфоузлов производилось по Романовскому-Гимза и Папаниколау. Мазки-отпечатки костного мозга и лимфоузлов перед окраской по Папаниколау фиксировали в 960 этиловом спирте. Перед окрашиванием по Романовскому-Гимза высушивали на открытом воздухе. Мазки костного мозга и лимфоузлов были проконсультированы врачом морфологом-цитологом высшей категории Научного центра педиатрии и детской хирургии МЗ РК К.Т. Нургалиевой.

#### **Методы статистического анализа наблюдений.**

Статистический анализ данных выполнен в Центре БИОСТАТИСТИКА под руководством доцента факультета информатики Томского государственного университета, к.т.н., Леонова В.П. Процедуры статистического анализа выполнялись с помощью статистических пакетов SAS 9.2, STATISTICA 10 и SPSS-20. Критическое значение уровня статистической значимости при проверке нулевых гипотез принималось равным 0,05, либо 0,1. В случае превышения достигнутого уровня значимости статистического критерия этой величины, принималась нулевая гипотеза.

Проверка нормальности распределения количественных признаков в отдельных группах сравнения проводилась с использованием критериев Колмогорова-Смирнова Шапиро-Уилка, Крамера-фон-Мизеса и Андерсона-Дарлинга. Для сравнения центральных параметров групп использовались

параметрические и непараметрические методы: дисперсионный анализ, в т.ч. с критерием Краскела-Уоллиса и ранговыми метками Вилкоксона, медианный критерий, и критерий Ван дер Вардена.

Для всех количественных признаков в сравниваемых группах производилась оценка средних арифметических и среднеквадратических (стандартных) ошибок среднего, а также коэффициента вариации. Дискриптивные статистики в тексте представлены как  $M (CO)$ , где  $M$  – среднее, а  $CO$  – стандартное отклонение [79].

Учитывая наличие высоких корреляционных связей между количественными переменными, с целью концентрации анализируемой информации в исследовании использовались различные методы многомерной статистики.

Выделение группировок взаимосвязанных количественных переменных проводилось с использованием факторного анализа. Предварительно использовался метод главных компонент, после чего применялась процедура вращения осей варимакс. В дальнейшем анализе использовали факторные оси, имеющие собственные значения не менее 1.

Анализ взаимосвязи между двумя подмножествами количественных признаков, отражающими различные аспекты анализируемого массива данных, использовался метод канонических корреляций. В том случае, когда коэффициент канонической корреляции оказывался статистически значимым, массив данных пополнялся двумя каноническими осями первого решения, и в них строились двумерные диаграммы рассеяния анализируемых наблюдений. При этом для идентификации отдельных наблюдений использовались основные качественные признаки, отражающие основные анализируемые группировки.

Для анализа взаимосвязи между одним качественным признаком, выступающим в роли зависимого, результирующего показателя, и подмножеством количественных и качественных признаков, использовалась модель логистической регрессии с пошаговым алгоритмом включения и исключения предикторов. Результаты оценки уравнений логистической

регрессии представлены набором коэффициентов регрессии, достигнутыми уровнями значимости для каждого коэффициента, а также оценкой показателя согласия (Concordant) фактической принадлежности пациента к той или иной из групп, и теоретической принадлежности, полученной по уравнению логит-регрессии. Всего было получено порядка ста уравнений логит-регрессии, из которых производился отбор уравнений имеющих самые высокие значения (более 80-90%) этого показателя. Ранжирование выделенных предикторов по степени связи с зависимой переменной производилось путём сортировки предикторов по модулю стандартизованных коэффициентов регрессии [79] Для интерпретации структуры уравнений использовались результаты анализа таблиц сопряжённости и результаты сравнения центральных мер для групп зависимого признака.

## **ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ СОБСТВЕННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ**

### **ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЕ ОБОСНОВАНИЕ МЕТАЛЛИНДУЦИРОВАННЫХ НАРУШЕНИЙ ИММУНОЛОГИЧЕСКИХ ПОКАЗАТЕЛЕЙ КРОВИ И ЛИМФООРГАНОВ ОПЫТНЫХ ЖИВОТНЫХ С АСЕПТИЧЕСКИМ ВОСПАЛЕНИЕМ И НОВЫХ СПОСОБОВ ПАТОГЕНЕТИЧЕСКОЙ КОРРЕКЦИИ**

**3.1. Экспериментальное изучение показателей, характеризующих иммунологическую реактивность организма опытных крыс, в динамике течения асептического воспаления в условиях предварительной экспозиции метаванадатом аммония и дихроматом калия**

**3.1.1. Микроскопическая картина асептического воспаления, вызванного на фоне предварительной затравки крыс солями ванадия и хрома**

Воспаление является ключевым критерием оценки защитного потенциала иммунной системы. Течение воспалительного процесса информативно отражает состояние иммунологической реактивности организма, от которой зависит исход патологического процесса [120, 24, 111, 218, 147, 224]. Неблагоприятное течение патологического процесса, вызванного как инфекционными, так и неинфекционными агентами, осложняет заживление послеоперационной раны, приводит к хронизации воспалительных заболеваний легких, почек, желудочно-кишечного тракта и т.д. [24, 224].

Напряжение механизмов, обеспечивающих устойчивость организма к воздействию чрезвычайных раздражителей, возможно в условиях повышенной подверженности организма воздействию внешних факторов окружающей среды [24, 224]. Механизмы противодействия воздействию внешним факторам поддерживается своевременным взаимодействием клеточных и гуморальных компонентов иммунной системы [258]. Исход воспаления зависит не только от степени деструкции ткани, вызванной повреждающим фактором. Многие ксенобиотики способны нарушать упорядоченные процессы иммунологического развития, что является основным проявлением иммунодефицитов. Регуляция течения острого воспалительного процесса посредством искаженных иммунных реакций может привести к его хронизации с последующим развитием хронической органной недостаточности, снижением качества жизни и, в конечном итоге, сокращением продолжительности жизни [272]. Между тем, роль тяжелых металлов в механизмах хронизации воспалительных процессов до сих пор не выяснена [24].

В связи с вышеизложенным, интересы нашего научного исследования были направлены на изучение наиболее тонких механизмов течения воспалительного процесса с учетом комплексного воздействия агрессивных факторов окружающей среды и последних достижений медицинской науки [24], что создало предпосылку для поиска новых способов патогенетической коррекции повреждений разноуровневых компонентов иммунитета, обеспечивающих качественное состояние иммунологической реактивности.

В данном разделе работы на модели скипидар-индуцированного воспаления проведена микроскопическая оценка структурных изменений в очаге воспаления у экспериментальных крыс в условиях предварительной интоксикации метаванадатом аммония и дихроматом калия. Группой сравнения служили крысы с асептическим воспалением (АВ) без экспозиции металлов.

Микроскопическая картина здоровой ткани контрольной крысы представлена на рис. 3.1.

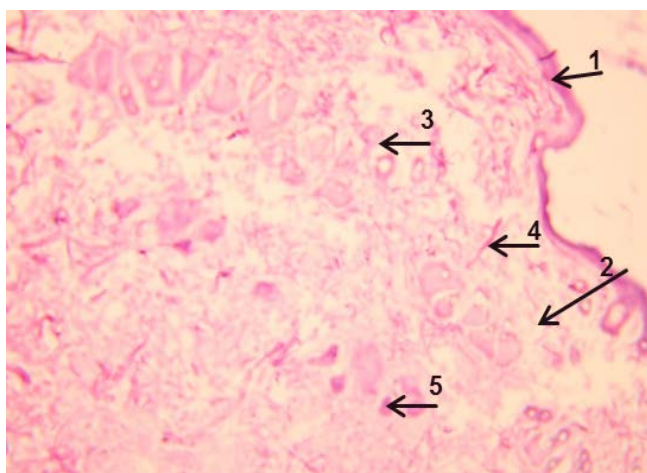


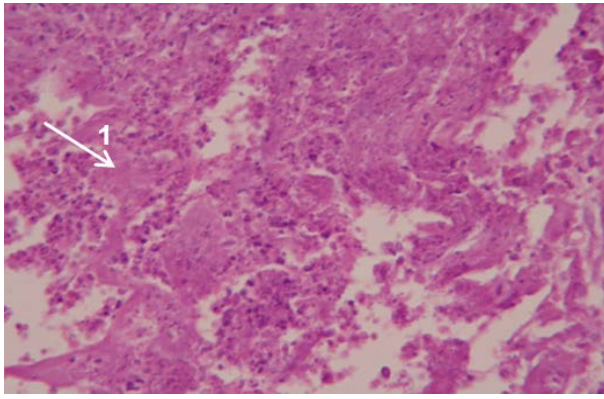
Рис. 3.1. Микроскопическая картина здоровой ткани контрольных животных. Ткань воспаления фиксировали в парафине и окрашивали по Ван Гизону и гематоксилин-эозином. Увеличение  $\times 200$ . Показан гистологический слайд для группы **Контроль** (здоровая ткань): 1 – эпидермис, 2 – дерма, 3 – волосяной фолликул, 4 – мелкие капилляры, 5 – сальные железы;

При микроскопическом исследовании ткани воспаления у крыс группы АВ через 1 сутки был обнаружен некротический очаг с полной деструкцией в центре и отеком мягких тканей подкожной области с кариорексисом, кариолизисом и распадом сегментоядерных лейкоцитов в центре (рис. 3.2.-А) [24].

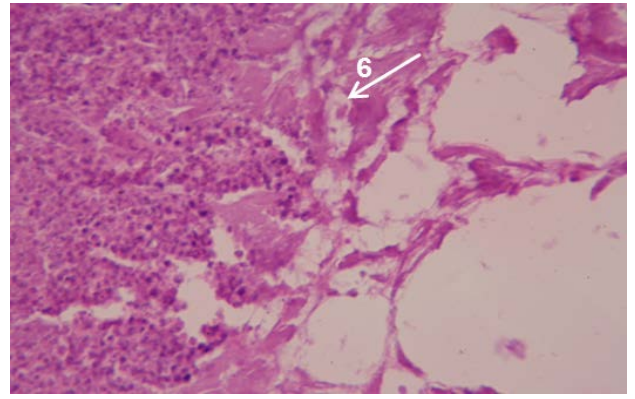
У крыс группы Me+AB обнаружены аналогичные изменения, но с преобладающим отеком и слабой лейкоцитарной инфильтрацией в очаге некроза. Гиперемия в зоне некроза оказалась слабовыраженной, границы некроза нечеткие, гистио-моноцитарные инфильтраты умеренны (рис. 3.2.-Г).

У животных группы АВ через 7 суток микроскопическая картина воспаления была представлена четкими границами некротической зоны, окруженной широкой зоной грануляции (рис. 3.2.-Б). Подкожная клетчатка с фиброзной и жировой тканью граничила с множеством пролиферирующих капилляров, фибробластов, гистиоцитов и моноцитов. Ближе к нормальной неизменной ткани встречались единичные эозинофилы и тучные клетки.

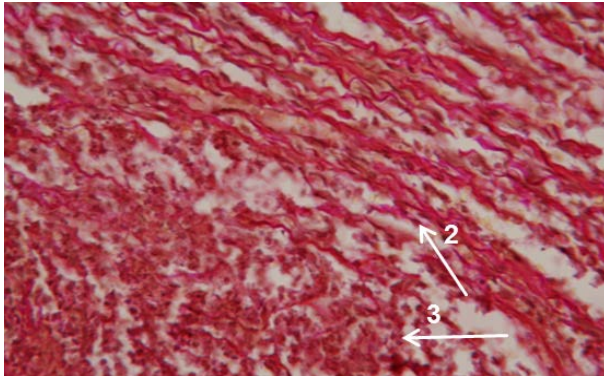




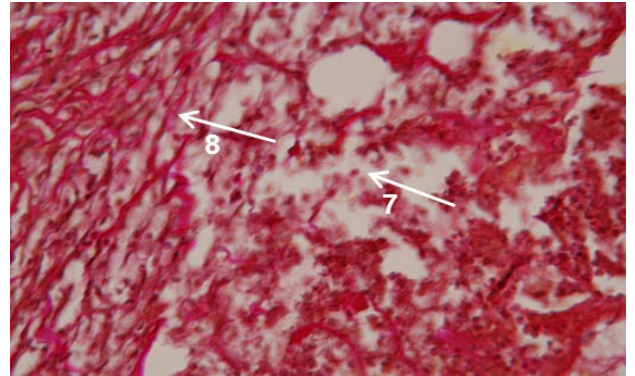
А



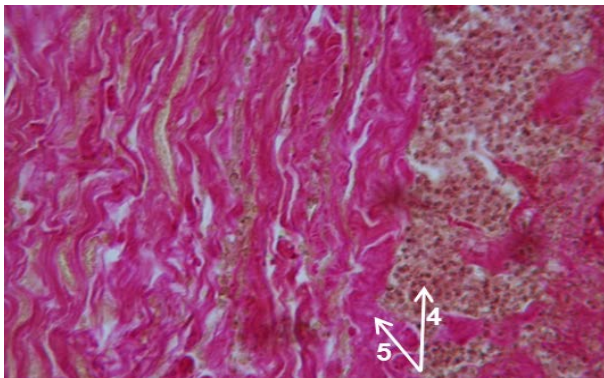
Г



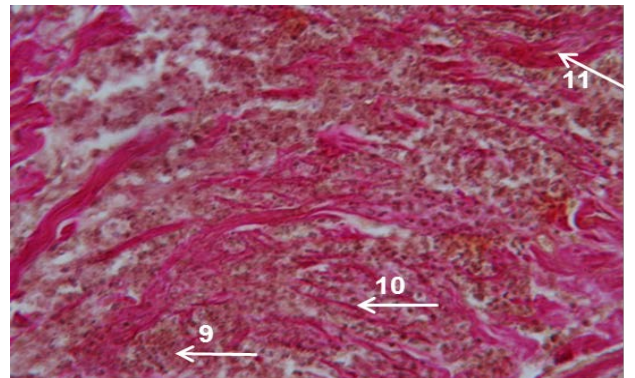
Б



Д



В



Е

Рис. 3.2. Микроскопическая картина скипидар-индуцированного воспаления у экспериментальных животных

Ткань воспаления фиксировали в парафине и окрашивали по Ван Гизону и гематоксилин-эозином. Увеличение  $\times 200$ . Показаны гистологические слайды для группы АВ: А - через 1 сутки после начала эксперимента: микроскопическая картина представлена некротическим очагом с деструкцией лейкоцитов (1 - распад лейкоцитов в зоне некроза); Б - через 7 суток после начала эксперимента: микроскопическая картина представлена широкой зоной грануляции (2 – широкая зона грануляционной ткани; 3 – распад и рассасывание экссудата); В - через 14 суток после начала эксперимента: на микроскопической картине прослеживается четкая зональность морфологических изменений, уменьшение некротической зоны (4 – зона некроза; 5 – зона фиброза); для группы Me+AB: Г - через 1

*сутки после начала эксперимента: микроскопическая картина представлена зоной некроза с выраженным отеком ткани (6 – зона некроза (распад лейкоцитов)); Д - через 7 суток после начала эксперимента: микроскопическая картина представлена очагом некроза, вокруг которого сформировалось реактивное воспаление (7 – слабое рассасывание очага некроза; 8 – отечная грануляционная ткань); Е - через 14 суток после начала эксперимента: микроскопическая картина представлена сохранившимся очагом некроза и формирующейся фиброзной тканью (9 –очаг некроза; 10 – зона грануляционной ткани, 11 – зона фиброза)*

Между тем, у животных группы Me+AB в данный период наблюдения очаг воспаления характеризовался широкой зоной очага некроза (рис. 3.2.-Д). Некротический очаг был окружен зоной реактивного воспаления, граничащей с зоной выраженного отека и инфильтрированными лейкоцитами. Периферию зоны воспаления заполняли фибробласты, тонкие коллагеновые волокна, капилляры, а также клетки, представленные в большей степени гистиоцитами и эозинофилами, в меньшей – моноцитами.

Микроскопически через 14 суток в группе AB зона некроза заметно уменьшалась, отечная жидкость не обнаруживалась (рис. 3.2.-В). На фоне прослеживаемой зональности морфологических изменений хорошо определялась зона грануляционной ткани с множеством фибробластов, лимфоцитов и фиброцитов, с последующей за ней зоной фиброза. Напротив, у опытных крыс под влиянием Me очаг некроза оставался крупным (рис. 3.2.-Е). Границу некроза окружали лейкоциты, преимущественно моноциты. Вокруг некроза сформировалась тонкая соединительно-тканная капсула, состоящая из зрелой грануляционной ткани.

Таким образом, результаты микроскопических исследований гистологических срезов ткани воспаления двух сравниваемых групп показывают, что классическая картина воспаления после подкожного введения скипидара у крыс группы AB завершается на 14 сутки рассасыванием экссудата и формированием соединительно-тканной капсулы. Между тем, в группе Me+AB восстановление раны после воздействия скипидара существенно задерживается. Мы полагаем, что задержка регенеративных процессов в

поврежденной ткани, по-видимому, связана с дисфункцией иммунной системы, поскольку регулируются ее клеточными и гуморальными компонентами. Активированные неспецифические факторы, высвобождаемые из поврежденных и апоптозных клеток стимулируют активацию макрофагов, фибробластов, мезенхимальных и различных эпителиальных клеток, которые вместе организуют восстановление тканей [238, 262]. Поскольку, решающее значение на ранних этапах заживления ран отводят компонентам врожденного иммунитета [127, 109], в первую воспалительную фазу следует ожидать инфильтрацию очага лейкоцитами, преимущественно моноцитами и нейтрофилами, которые разворачивают антимикробную деятельность и расчищают зону повреждения для последующей регенерации ткани. Так, активированные фибробласты присутствовали на 7-е сутки исследования в гистологических препаратах практически всех серий эксперимента, тогда как количество активированных макрофагов оказалось умеренным в группе Me+AB, что, по-видимому, ослабляло развитие воспалительной реакции. О последовавшей (через 14 суток) задержке репаративной фазы воспаления свидетельствовало формирование тонкой грануляционной ткани на широкой границе некроза. Следовательно, Me существенно замедляет пролиферативные процессы в ткани, резолюцию воспаления, остаются крупные зоны некротической ткани без формирования четко выраженной капсулы.

Для более объективной характеристики степени тяжести стерильного воспаления у животных групп AB и Me+AB проводили полуколичественную оценку морфогенеза асептической раны по размерам некротического очага, интенсивности отека мягких тканей, лейкоцитарной инфильтрации, формированию грануляционной ткани (табл.3.1).

Оценку указанных показателей проводили по слепой 4-балльной шкале, согласно которой 0 – отсутствие признака; 1 – слабо выраженный признак; 2 – умеренно выраженный признак; 3 – выраженный признак [154, 157, 277].

Патологические изменения в тканях кожного покрова со стерильным воспалением в группах AB и Me+AB во все сроки исследования были

Таблица 3.1 - Ключевые морфологические признаки воспаления в тканях кожного покрова контрольных животных и животных со стерильным воспалением, предварительно в течение двух недель получавших соединения ванадия и хрома

| Группы,<br>n = 6   | Ключевые морфологические признаки воспаления |                          |                               |   |
|--|--|--------------------------|-------------------------------|---|
|  | Некротический<br>очаг                        | Отек<br>мягких<br>тканей | Лейкоцитарная<br>инфильтрация | Формирование<br>грануляционной<br>ткани |
| (min-max)  |  |                          |                               |   |
| через 1 сутки*   |  |                          |                               |   |
| Контроль   | (0-0)  | (0-0)                    | (0-0)                         | (0-0)                                   |
| AB   | (2-3)**                                      | (2-3)**                  | (2-3)**                       | (0-0)                                   |
| Me+AB  | (3-3)**                                      | (3-3)**                  | (0-1)** ++                    | (0-0)                                   |
| через 7 суток  |  |                          |                               |   |
| Контроль   | (0-0)  | (0-0)                    | (0-0)                         | (0-0)                                   |
| AB   | (2-3)**                                      | (1-2)**                  | (2-3)**                       | (1-2)**                                 |
| Me+AB  | (2-3)**                                      | (2-3)** ++               | (1-2)** ++                    | (0-1)**                                 |
| через 14 суток   |  |                          |                               |   |
| Контроль   | (0-0)  | (0-0)                    | (0-0)                         | (0-0)                                   |
| AB   | (0-1)**                                      | (0-1)**                  | (3-3)**                       | (2-3)**                                 |
| Me+AB  | (2-3)**                                      | (1-2)** ++               | (2-3)**                       | (1-2)** ++                              |
| Примечание: * - статистические различия между контролем и остальными группами: **, p < 0,05. Статистические различия между группой Me+AB против группы AB: ++, p < 0,05. В скобках помещены минимально-максимальные патологические значения каждой группы. |  |                          |                               |   |

значительно выше контрольной группы ( $p < 0,05$ ). Первые сутки исследования для группы Me+AB охарактеризовались более низкой лейкоцитарной инфильтрацией очага воспаления по сравнению с группой AB ( $p < 0,05$ ). К 7 суткам исследования в группе Me+AB данный показатель пополнился существенным отеком мягких тканей ( $p < 0,05$ ).

14-й срок исследования для группы Me+AB характеризовался сохранением значительных очагов некроза и наличием отека ткани, тогда как

степень формирования грануляционной ткани значительно отставала от группы АВ ( $p < 0,05$ ).

Таким образом, воздействие метаванадата аммония и дихромата калия замедляет регенерацию ткани при асептическом воспалении, что подтверждается:

1. Наличием крупного очага некроза, отеком и инфильтратом с умеренным содержанием лейкоцитов в начальные сроки исследования, что свидетельствует о слабовыраженной воспалительной фазе.

2. Низкой степенью формирования зрелой грануляционной ткани вокруг широкой зоны некроза в последний срок исследования, что свидетельствует о задержке репаративной фазы воспаления.

### **3.1.2. Количественная оценка компонентов врожденного и адаптивного иммунитета по результатам гематологических и иммунологических показателей крови экспериментальных крыс с асептическим воспалением**

По сведениям [127], усугубление течения инфекционного процесса у людей, вдыхающих твердые частицы металлов на производстве, связано с нарушением у них врожденного и адаптивного иммунитета.

Проведенными нами исследованиями было установлено, что течение воспаления у крыс группы Me+AB сопровождалось слабым лейкоцитарным реагированием на скипидар-индуцированное повреждение. Токсическое действие исследованных соединений ванадия и хрома зависит от их общего биологического эффекта. Система крови одной из первых *in vivo* сталкивается с их повреждающим действием. Результатами многочисленных фундаментальных исследований показано, что клеточные компоненты крови служат индикаторами состояния организма. Лейкоциты относят к ключевым регуляторам воспаления, поскольку исход воспалительного процесса зависит от

степени их вовлеченности в развертывание начальных событий [98, 103, 211, 203, 219]. Так, нейтрофилы несут на своих мембранах рецепторы, распознающие молекулярные компоненты асептического повреждения тканей, первичный контакт с которыми служит сигналом для активации иммунной системы [211].

Между тем, соли тяжелых металлов, в том числе хром и ванадий, способны вызывать искаженные иммунные реакции. Тем не менее, механизмы, с помощью которых эти металлы опосредуют иммуномодулирующие эффекты, не полностью понятны [112]. В то же время, для патогенетической коррекции металлиндуцированной иммунодепрессии необходимо четкое понимание механизмов ослабления активности иммунитета. В связи с этим, необходимо получить количественную и качественную характеристику основных иммунокомпетентных клеток у половозрелых крыс с асептическим воспалением, вызванным на фоне интоксикации солями хрома и ванадия в сравнении с контрольными животными [202, 103].

В свете того, что клетки крови в основном представлены иммунокомпетентными клетками, функциональное состояние которых характеризует иммунологическую реактивность организма, в данном разделе работы исследовали клеточные компоненты периферической крови опытных животных со скипидар-индуцированным воспалением.

Результаты исследованных параметров крови всех групп, проведенных через 1, 7 и 14 суток после окончания затравки соединениями металлов и моделирования скипидар-индуцированного воспаления, представлены в табл. 3.2. Токсические эффекты изолированного двухнедельного воздействия солей ванадия и хрома на показатели крови крыс, полученные из массива данных группы Me (через 1 сутки после прекращения воздействия), сопровождались статистически значимым снижением в 1,8 раза лимфоцитов<sub>abc</sub> ( $p=0,002$ ) по сравнению с контролем, тогда как значения общих лейкоцитов и абсолютного содержания нейтрофилов колебались на уровне контроля.

Таблица 3.2 - Показатели крови опытных крыс, затравленных ВА и ДК

| Показатели*      | Ед. изм.             | Серии, М (СО), (n=10)** |                          |                            |                              |
|------------------|----------------------|-------------------------|--------------------------|----------------------------|------------------------------|
|                  |                      | Контроль                | Ме                       | АВ                         | Ме+АВ                        |
| Через 1 сутки*** |                      |                         |                          |                            |                              |
| Лейкоциты        | x10 <sup>3</sup> /μL | 8,9 (1,3)               | 6,8 (2,9)                | 2,7 (0,5) <sup>a</sup>     | 1,5 (0,3) <sup>a,b</sup>     |
| Эритроциты       | x10 <sup>6</sup> /μL | 8,3 (0,9)               | 7,8 (0,5)                | 6,8 (0,7) <sup>a</sup>     | 5,8 (0,5) <sup>a,b</sup>     |
| Гемоглобин       | g/L                  | 143,9 (8,7)             | 125,7 (7,3) <sup>a</sup> | 140,0 (15,0)               | 127,0(6,0) <sup>a,b</sup>    |
| Нейтрофилы       | x10 <sup>3</sup> /μL | 1,5 (0,3)               | 2,5 (1,4)                | 0,8 (0,2) <sup>a</sup>     | 0,6 (0,3) <sup>a,b</sup>     |
|                  | %                    | 16,5 (2,8)              | 35,5 (13,5) <sup>a</sup> | 29,1 (6,0) <sup>a</sup>    | 31,4 (7,3) <sup>a</sup>      |
| Лимфоциты        | x10 <sup>3</sup> /μL | 6,6 (1,0)               | 3,7 (1,6) <sup>a</sup>   | 1,8 (0,4) <sup>a</sup>     | 0,9 (0,2) <sup>a,b</sup>     |
|                  | %                    | 74,7 (2,9)              | 55,9 (12,9) <sup>a</sup> | 65,8 (6,5) <sup>a</sup>    | 61,6 (7,1) <sup>a</sup>      |
| Моноциты         | x10 <sup>3</sup> /μL | 0,6 (0,1)               | 0,5 (0,3)                | 0,06 (0,03) <sup>a</sup>   | 0,05 (0,02) <sup>a</sup>     |
|                  | %                    | 6,8 (0,8)               | 7,0 (2,8)                | 2,4 (1,1)                  | 3,1 (1,2)                    |
| Эозинофилы       | x10 <sup>3</sup> /μL | 0,2 (0,1)               | 0,1 (0,1)                | 0,02 (0,01) <sup>a</sup>   | 0,02 (0,01) <sup>a</sup>     |
|                  | %                    | 1,8 (0,8)               | 1,6 (1,1)                | 0,6 (0,7)                  | 1,0 (0,9)                    |
| ИИР              | у.е.                 | 11,2                    | 8,2                      | 27,7                       | 20,1                         |
| ЛИ               | у.е.                 | 4,5                     | 1,6                      | 2,1                        | 1,9                          |
| Через 7 суток    |                      |                         |                          |                            |                              |
| Лейкоциты        | x10 <sup>3</sup> /μL | 8,9 (1,3)               | 6,5 (1,9)                | 5,7 (1,1)                  | 3,8 (0,6)                    |
| Эритроциты       | x10 <sup>6</sup> /μL | 8,3 (0,9)               | 8,0 (0,5)                | 7,7 (0,6)                  | 6,2 (0,5)                    |
| Гемоглобин       | g/L                  | 143,9 (8,7)             | 122,4 (8,8)              | 139,0 (12,0)               | 130,0 (0,7)                  |
| Нейтрофилы       | x10 <sup>3</sup> /μL | 1,5 (0,3)               | 1,8 (0,9)                | 1,44 (0,34)                | 1,01 (0,32)                  |
|                  | %                    | 16,5 (2,8)              | 26,8 (8,4) <sup>a</sup>  | 25,0 (3,3) <sup>a</sup>    | 26,6 (6,8) <sup>a</sup>      |
| Лимфоциты        | x10 <sup>3</sup> /μL | 6,6 (1,0)               | 4,1 (1,1) <sup>a</sup>   | 3,9 (0,7) <sup>a,d</sup>   | 2,4 (0,4) <sup>a,d,b</sup>   |
|                  | %                    | 74,7 (2,9)              | 64,3 (7,6) <sup>a</sup>  | 68,7 (3,2) <sup>a</sup>    | 65,0 (6,2) <sup>a</sup>      |
| Моноциты         | x10 <sup>3</sup> /μL | 0,6 (0,1)               | 0,4 (0,2) <sup>a</sup>   | 0,13 (0,05) <sup>a,d</sup> | 0,1 (0,04) <sup>a,d</sup>    |
|                  | %                    | 6,8 (0,8)               | 6,6 (1,9)                | 2,3 (0,8)                  | 2,6 (1,2) <sup>d</sup>       |
| Эозинофилы       | x10 <sup>3</sup> /μL | 0,2 (0,1)               | 0,1 (0,1)                | 0,06 (0,05)                | 0,09 (0,06) <sup>d</sup>     |
|                  | %                    | 1,8 (0,8)               | 2,3 (1,3)                | 1,0 (0,8)                  | 2,4 (1,3) <sup>a</sup>       |
| ИИР              | у.е.                 | 11,2                    | 10,1                     | 30,3                       | 31,6 (14,4)                  |
| ЛИ               | у.е.                 | 4,5                     | 2,4                      | 2,7                        | 2,3 (0,6)                    |
| Через 14 суток   |                      |                         |                          |                            |                              |
| Лейкоциты        | x10 <sup>3</sup> /μL | 8,9 (1,3)               | 7,0 (3,2) <sup>a</sup>   | 7,7 (1,7) <sup>a,d,e</sup> | 5,7 (0,9) <sup>a,b,d,e</sup> |
| Эритроциты       | x10 <sup>6</sup> /μL | 8,3 (0,9)               | 8,2 (0,3)                | 8,1 (0,5) <sup>d</sup>     | 6,4 (0,7) <sup>a,b,d</sup>   |
| Гемоглобин       | g/L                  | 143,9 (8,7)             | 122,6(4,8)               | 140,0 (9,0)                | 134,0 (0,6) <sup>a,d</sup>   |
| Нейтрофилы       | x10 <sup>3</sup> /μL | 1,5 (0,3)               | 1,5 (0,6)                | 1,7 (0,35) <sup>d</sup>    | 1,45 (0,4) <sup>d,e</sup>    |
|                  | %                    | 16,5 (2,8)              | 22,6 (3,9)               | 22,0 (3,0)                 | 26,3 (6,9) <sup>a</sup>      |
| Лимфоциты        | x10 <sup>3</sup> /μL | 6,6 (1,0)               | 4,7 (2,3)                | 5,4 (1,3)                  | 3,8 (0,8) <sup>a,b,d,e</sup> |
|                  | %                    | 74,7 (2,9)              | 66,9 (4,6)               | 69,7 (3,2) <sup>a</sup>    | 66,1 (6,9) <sup>a</sup>      |
| Моноциты         | x10 <sup>3</sup> /μL | 0,6 (0,1)               | 0,5 (0,2)                | 0,2 (0,05) <sup>a,d</sup>  | 0,13 (0,03) <sup>a,d</sup>   |
|                  | %                    | 6,8 (0,8)               | 7,3 (0,5)                | 2,1 (0,7)                  | 2,5 (0,7)                    |
| Эозинофилы       | x10 <sup>3</sup> /μL | 0,2 (0,1)               | 0,2 (0,1)                | 0,1 (0,06) <sup>d</sup>    | 0,07 (0,05) <sup>d</sup>     |
|                  | %                    | 1,8 (0,8)               | 3,1 (1,9)                | 1,3 (0,9)                  | 1,5 (0,9)                    |
| ЛИ               | у.е.                 | 4,5                     | 3,0                      | 2,6                        | 2,4                          |

Примечание: \* - ИИР – индекс иммунореактивности ЛИ – лимфоцитарный индекс; \*\*М – среднее; СО – стандартное отклонение; \*\*\* - по Mann-Whitney U-test, достигнутый уровень статистической значимости по отношению: а–к контролю; б – к АВ; с – к Ме; d– к 1 сут.; е – к 7 сут.

Состояние иммунологической реактивности определяют путем подсчета индекса иммунологической реактивности (ИИР) и лимфоцитарного индекса (ЛИ), характеризующего степень вовлеченности лейкоцитарных фракций крови (см. в разделе «Материалы и методы», стр.). Показатели ИИР и ЛИ оказались ниже контрольных значений на 26,1% и 64,4% соответственно.

Интересно, что воспалительная реакция в острой фазе у крыс, предварительно затравленных солями ванадия и хрома, характеризовалась более слабым лейкоцитарным реагированием со стороны крови (см. табл. 3.2). Так, через 1 сутки после моделирования воспаления обнаружено двукратное статистически значимое снижение общего содержания лейкоцитов ( $p=0,001$ ), моноцитов<sub>abc</sub> ( $p=0,015$ ) и лимфоцитов<sub>abc</sub> ( $p=0,008$ ) по сравнению с контролем [106, 194]. При этом, расчеты показателей ИИР и ЛИ оказались в 2 раза ниже показателей контроля и АВ.

Примечательно, что для группы АВ в первый срок исследования также было установлено резкое снижение ключевых показателей лейкоцитарной фракции крови, однако, ИИР и ЛИ оставались на уровне контроля. Это, по-видимому, является проявлением стресс-реакции организма на воздействие скипидара (см. табл. 3.2).

Течение воспаления осложнялось развитием анемии, что продемонстрировано снижением содержания гемоглобина в группах Me и Me+AB соответственно на 12,6% ( $p=0,001$ ) и 15,3% ( $p=0,001$ ) не только в этот, но и в последующие сроки исследования. Таким образом, картина красной крови крыс, затравленных соединениями тяжелых металлов, соответствовала картине микроцитарной анемии. Литературные данные свидетельствуют, что в патогенезе анемии, вызванной солями тяжелых металлов, ключевую роль играют чрезмерная пероксидация липидов мембран, вытеснение металлами железа в эритроцитах, а также нарушение его связывания с гемом [131, 118, 259]. Не исключено, что металлы могут вызвать и гемолиз эритроцитов.



Через 7 суток, под влиянием изолированного воздействия металлов в группе Me картина крови предстала продолжающимся прогрессированием лейкопении в результате лимфо-, моноцитопении, анемии и снижением ЛИ.

Период разгара воспалительного процесса крови у крыс группы АВ сопровождался динамическим приростом общего содержания лейкоцитов на 33,7%, нейтрофилов<sub>abc</sub> на 140% ( $p=0,008$ ), моноцитов<sub>abc</sub> на 83,3% ( $p=0,030$ ) и лимфоцитов<sub>abc</sub> на 12,1% по сравнению с контролем. Между тем, в группе Me+AB, подвергнутых воздействию солей ванадия и хрома, исследованные показатели крови оказались в 2 раза статистически значимо ниже сопоставляемых показателей группы АВ. Содержание гемоглобина и показатель НСТ, как по сравнению с предыдущим сроком, так и с АВ снижались на 8,6% ( $p=0,036$ ), 10,9% ( $p=0,027$ ) и 19,4% ( $p=0,007$ ), 13,0% ( $p=0,027$ ) соответственно (см. табл. 3.2).

В последний (через 14 суток) срок исследования в группе Me общее содержание лейкоцитов и моноцитов<sub>abc</sub> вернулись к исходному контрольному уровню, тогда как абсолютное содержание лимфоцитов и эозинофилов оставались ниже контроля на 24,2% ( $p=0,035$ ) и 50,0% ( $p=0,033$ ) соответственно.

К этому сроку исследования группа АВ продемонстрировала показатели, характеризующие классическую завершающую фазу воспаления, поскольку все исследованные показатели вернулись к норме. Исключение составили нейтрофилы, абсолютное содержание которых оставалось выше контроля в 1,7 раза ( $p=0,053$ ). Напротив, в группе Me+AB под влиянием ингибирующего воздействия солей ванадия и хрома общее содержание лейкоцитов, абсолютное содержание лимфоцитов и гемоглобина не достигали контрольного уровня. Поскольку моноцитам отводят главную роль в инициации воспалительного процесса, следует указать, что абсолютное содержание моноцитов в группе Me+AB лишь к 14 суткам исследования достигало контрольного уровня.

В этот срок исследования динамический прирост отмечался лишь со стороны нейтрофилов<sub>abc</sub>, в 1,5 раза превысивший показатели предыдущего

срока исследования. Между тем, относительно низкие значения лейкоцитов приводили к снижению ИИР и ЛИ (8,8 и 1,4 против 10,8 и 2,4 АВ).

Одним из токсических проявлений повреждающего действия тяжелых металлов является повреждение клеток в результате как их прямого, так и опосредованного действия. Первостепенную роль в механизмах токсического действия тяжелых металлов на клеточном уровне отводят окислительному стрессу. Окислительный стресс при этом ассоциируют с генерацией активных форм кислорода и высокоактивного гидроксильного радикала  $H_2O_2$ . Производство окислительных молекул кислорода связано не с прямым, а опосредованным действием тяжелых металлов. Они вытесняют ионы железа из белков, которые вступают в реакцию Фентона с генерацией токсичных кислородных и гидроксильных радикалов. Вследствие таких взаимопревращений повышается проницаемость биомембран с повреждением внутриклеточных структур [159].

В наших исследованиях, проведенных через 1 сутки, мы установили, что в контрольных пробах без добавления ванадия и хрома имело место спонтанное разрушение клеток, число которых составляло 5,5% (норма - до 10%) (рис.3.3.) [19].

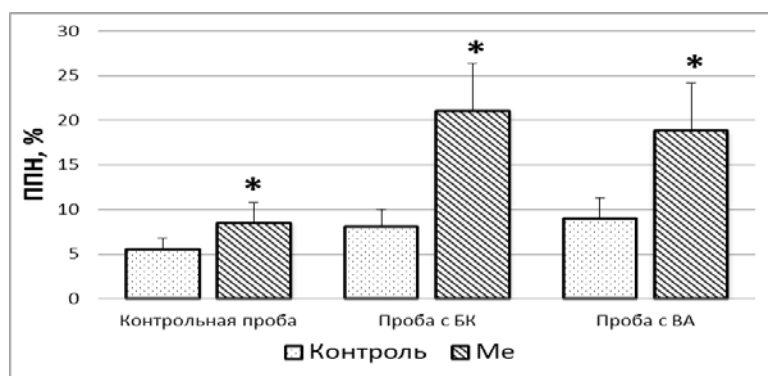


Рис. 3.3. Показатели прямого повреждения нейтрофилов в результате воздействия ванадия и хрома у контрольных и опытных животных в тесте ППН. Показаны результаты теста ППН у животных групп **Контроль**, **Me**. Значительные отличия между столбцами оценены по Mann-Whitney U-test с уровнем значимости  $p < 0,001$  по отношению: \* - к контролю

Добавление *in vitro* к контрольным пробам солей ванадия и хрома не вызывало дополнительных повреждений и также не превышало допустимых норм. В то же время в опытной серии эксперимента (животные в течение двух недель получавшие ВА и ДК) количество поврежденных нейтрофилов при добавлении в опытные пробы ванадия (18,8 (5,4)) и хрома (21 (5,4)) превышало контрольные значения (8,5 (2,2)) более чем в 2 раза ( $p < 0,0001$ ) [19].

Аналогичные результаты были получены при исследованиях, проведенных через 7 и 14 суток, из чего сделан вывод, что повреждающее воздействие ванадия и хрома имеет пролонгированный характер.

Учитывая выявленные цитотоксические эффекты солей ванадия и хрома на клетки первого уровня иммунологической защиты, нами в тесте ППН было подсчитано количество нейтрофилов, разрушенных при контакте с ванадием и хромом у животных групп АВ и Me+AB (табл. 3.3).

Результаты проведенных исследований показали, что в контрольных пробах опытных крыс имело место практически одинаковое спонтанное разрушение нейтрофилов, однако, в 1-е и 14-е сутки эксперимента, превышавшее предельно допустимые нормы (10%) [22].

Повреждения нейтрофилов, вызванные добавлением в пробы крови опытных животных солей металлов, в 2 и более раза превышали данные предыдущих серий, но при этом, хромовые повреждения оказались более выраженными, чем ванадиевые [22].

НСТ-тест, проводимый *in vitro*, позволяет изучить функциональную активность нейтрофилов крови, по спонтанным и индуцированным пирогеналом и латексом вариантам теста.

Снижение изучаемых параметров НСТ-теста и фагоцитоза (ФГ), априори, можно отнести к последствиям нарушения их целостности, что продемонстрировано предыдущими результатами.

Двухнедельная интоксикация соединениями металлов оказала существенное влияние на функции нейтрофилов крыс. Так, у животных

Таблица 3.3 – Показатели повреждения нейтрофилов у крыс с асептическим воспалением, подвергавшихся воздействию солей ванадия и хрома

| Пробы                    | Ед. изм. | Контроль  | Серии, М (СО), (n=10) |                      |              |   |
|--------------------------|----------|-----------|-----------------------|----------------------|--------------|---|
|                          |          |           | АВ                    | p*                   | Me+AB (опыт) | p   |
| Через 1сутки             |          |           |                       |                      |              |   |
| Контроль (спонт.разруш.) | %        | 5,5 (1,3) | 7,2 (1,5)             | 0,0059 <sup>a</sup>  | 10,5 (2,7)   | <0,0001 <sup>a</sup><br>0,0073 <sup>b</sup>   |
| Опыт + Хром              | %        | 8,1 (1,9) | 9,8 (1,9)             | 0,0285 <sup>a</sup>  | 25,0 (2,5)   | <0,0001 <sup>a</sup><br>0,0002 <sup>b</sup>   |
| Инд. ППН                 | абс.     | 0,7 (0,1) | 0,7 (0,1)             | -                    | 0,4 (0,1)    | <0,0001 <sup>a</sup><br>0,0002 <sup>b</sup>   |
| Опыт+Ванадий             | %        | 9,0 (2,3) | 9,6 (2,3)             | -                    | 22,0 (3,6)   | <0,0001 <sup>a</sup><br>0,0002 <sup>b</sup>   |
| Инд. ППН                 | абс.     | 0,6 (0,1) | 0,8 (0,1)             | 0,0081 <sup>a</sup>  | 0,5 (0,2)    | 0,0058 <sup>b</sup>   |
| Через 7суток             |          |           |                       |                      |              |   |
| Контроль (спонт.разруш.) | %        | 5,5 (1,3) | 8,3 (0,9)             | <0,0001 <sup>a</sup> | 9,7 (2,4)    | <0,0001 <sup>a</sup>  |
| Опыт + Хром              | %        | 8,1 (1,9) | 12,0 (2,3)            | 0,0002 <sup>a</sup>  | 27,5 (3,7)   | <0,0001 <sup>a</sup><br>0,0002 <sup>b</sup>   |
| Инд. ППН                 | абс.     | 0,7 (0,1) | 0,7 (0,1)             | -                    | 0,4 (0,1)    | <0,0001 <sup>a</sup><br>0,0002 <sup>b</sup>   |
| Опыт+Ванадий             | %        | 9,0 (2,3) | 10,9 (2,6)            | -                    | 23,1 (3,4)   | <0,0001 <sup>a</sup><br>0,0002 <sup>b</sup>   |
| Инд. ППН                 | абс.     | 0,6 (0,1) | 0,8 (0,2)             | 0,0217 <sup>a</sup>  | 0,5 (0,1)    | 0,0038 <sup>a</sup><br>0,0017 <sup>b</sup>  |
| Через 14суток            |          |           |                       |                      |              |   |
| Контроль (спонт.разруш.) | %        | 5,5 (1,3) | 9,0 (1,6)             | <0,0001 <sup>a</sup> | 10,1 (2,2)   | <0,0001 <sup>a</sup>  |
| Опыт + Хром              | %        | 8,1 (1,9) | 12,5 (2,2)            | <0,0001 <sup>a</sup> | 30,7 (6,3)   | <0,0001 <sup>a</sup><br>0,0001 <sup>b</sup><br>0,0376 <sup>c</sup>                        |
| Инд. ППН                 | абс.     | 0,7 (0,1) | 0,7 (0,1)             | -                    | 0,3 (0,1)    | <0,0001 <sup>a</sup><br>0,0001 <sup>b</sup>   |
| Опыт+Ванадий             | %        | 9,0 (2,3) | 9,9 (3,2)             | -                    | 28,3 (4,6)   | <0,0001 <sup>a</sup><br>0,0001 <sup>b</sup><br>0,0058 <sup>c</sup><br>0,0137 <sup>d</sup> |
| Инд. ППН                 | абс.     | 0,6 (0,1) | 1,0 (0,4)             | 0,011 <sup>a</sup>   | 0,4 (0,1)    | <0,0001 <sup>a</sup><br>0,0002 <sup>b</sup>   |

Примечание: \* p – по Mann-Whitney U-test достигнутый уровень статистической значимости по отношению: a – к контролю; b – к АВ; c – к 1 суткам; d – к 7 суткам

группы Me показатель индуцированного НСТ-теста составил 39,6 (6,03), на 9% статистически значимо превышая аналогичный показатель контроля (36,3 (4,86), p=0,029) (рис.3.4.-А). Было установлено, что ФГ как в спонтанном,

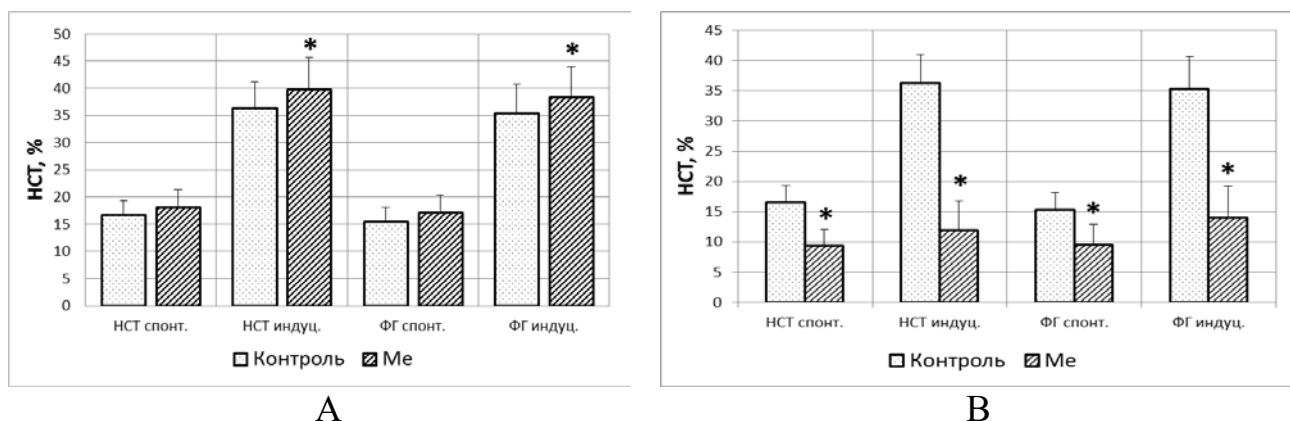


Рис. 3.4. Влияние ванадия и хрома на показатели метаболической и поглотительной активности нейтрофилов в спонтанном и индуцированном вариантах НСТ-теста и ФГ экспериментальных животных

Показаны результаты НСТ-теста у животных групп **Контроль**, **Me**: **А** – через 1 сутки; **Б** – через 14 суток. Значительные отличия между столбцами оценены по Mann-Whitney U-test с уровнем значимости  $p < 0,05$  по отношению: \* - к контролю

так и в индуцированном тесте статистически значимо увеличивался лишь на 11% (17,0 (3,3)) и 8,5% (38,3 (5,6)) против контроля (15,3 (2,8)); (35,3 (5,6)) соответственно.

На 7 сутки исследования эта тенденция сохранялась, тогда как 14 сутки охарактеризовались прогрессирующим снижением индуцированной активности НСТ и ФГ (рис.3.4.-Б).

На 7 сутки исследования эта тенденция сохранялась, тогда как 14 сутки охарактеризовались прогрессирующим снижением индуцированной активности НСТ и ФГ (рис.3.4.-Б).

После того, как дисфункция нейтрофилов была ассоциирована с повышенной подверженностью к повреждению и нарушением метаболической и поглотительной активности сочетания этих тестов были предъявлены опытным животным с асептическим воспалением (рис. 3.5.) [25].

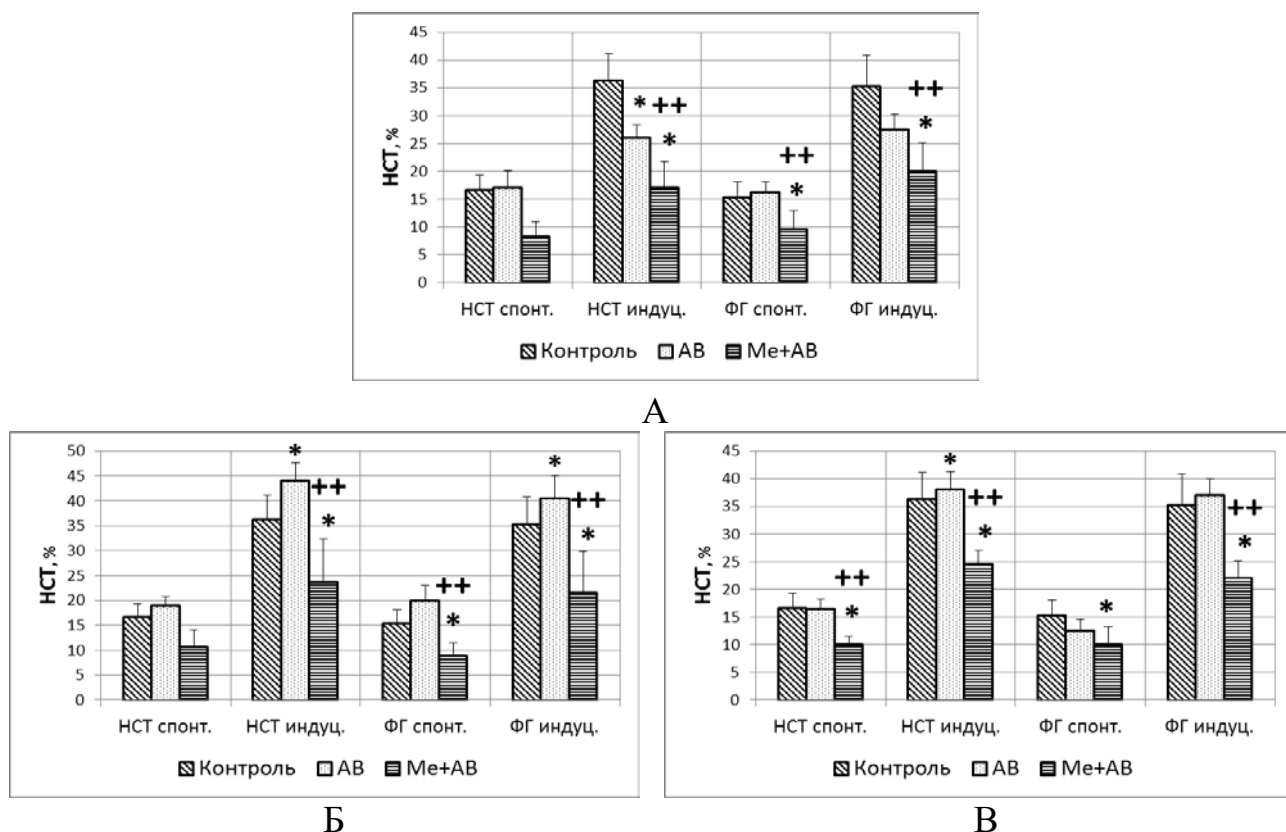


Рис. 3.5. Влияние ванадия и хрома на показатели метаболической и поглотительной активности нейтрофилов в спонтанном и индуцированном вариантах НСТ-теста и ФГ у крыс с асептическим воспалением

Показаны результаты НСТ-теста у животных групп **Контроль**, **AB**, **Me+BA**: **A** – через 1 сутки; **Б** – через 7 суток; **В** – через 14 суток. Значительные отличия между столбцами оценены по Mann-Whitney U-test с уровнем значимости  $p < 0,05$  по отношению: \* - к контролю; ++ - к AB

Уже через 1 сутки показатели спонтанных НСТ и ФГ в 2 и 1,6 раза статистически значимо ( $p < 0,05$ ) отставали от контроля и AB (рис. 3.5.-А). Индуцированные латексом варианты НСТ и ФГ статистически значимо отставали от AB соответственно на 34,6% и 27%, от контроля соответственно на 53,2% и 43,3%.

Через 7 суток наблюдали незначительное нарастание исследованных показателей (рис. 3.5.-Б). Однако двукратный разрыв между показателями групп красноречиво свидетельствовал о несостоятельности функциональных и резервных возможностей нейтрофилов у животных группы Me+AB.

Исследования, проведенные через 14 суток, не выявили изменений в динамике течения воспаления.

Одним из неблагоприятных прогнозов течения воспаления является снижение эффективности передачи сигналов нейтрофилами [128, 116]. Причиной тому служат цитотоксические эффекты ванадия и хрома. В наших экспериментах установлен высокий процент разрушенных нейтрофилов при контакте с ванадием и хромом. Также воспаление у опытных животных сопровождалось снижением функциональной активности нейтрофилов.

Таким образом, по исследованным показателям неспецифической резистентности можно заключить, что весь период эксперимента воспалительный процесс у опытных животных сопровождался низкой активностью нейтрофилов, что являлось характерной картиной депрессии иммунологической реактивности, вызванной солями ванадия и хрома.

CD4+, CD8+ Т-лимфоциты играют центральную роль в регуляции иммунного ответа. Они способствуют выработке антител В-клетками, активируют макрофаги, направляют нейтрофилы и эозинофилы к местам инфекции. Иммунофенотипирование лимфоцитов, особенно CD4 + Т-клеток из периферической крови используется для оценки степени дисфункции иммунной системы при первичных и вторичных иммунодефицитах, хронических инфекционных заболеваниях и различных видах рака. В клинической практике иммунофенотипирование CD4+Т-клеток служит для мониторинга прогрессирования заболевания, оценки иммуноопосредованных заболеваний, а также оценки восстановления иммунной системы после трансплантации стволовых клеток [296, 298, 187].

Для реализации данной цели в крови экспериментальных животных с асептическим воспалением была проведена количественная оценка лимфоцитов с кластерами дифференцировки CD3+, CD4+ CD8+, результаты которой представлены на рис. 3.6.

Следует отметить, что во все сроки исследования абсолютное количество исследуемых CD3+, CD4+, CD8+ Т-лимфоцитов в периферической крови всех экспериментальных групп существенно отставало от контрольного уровня.

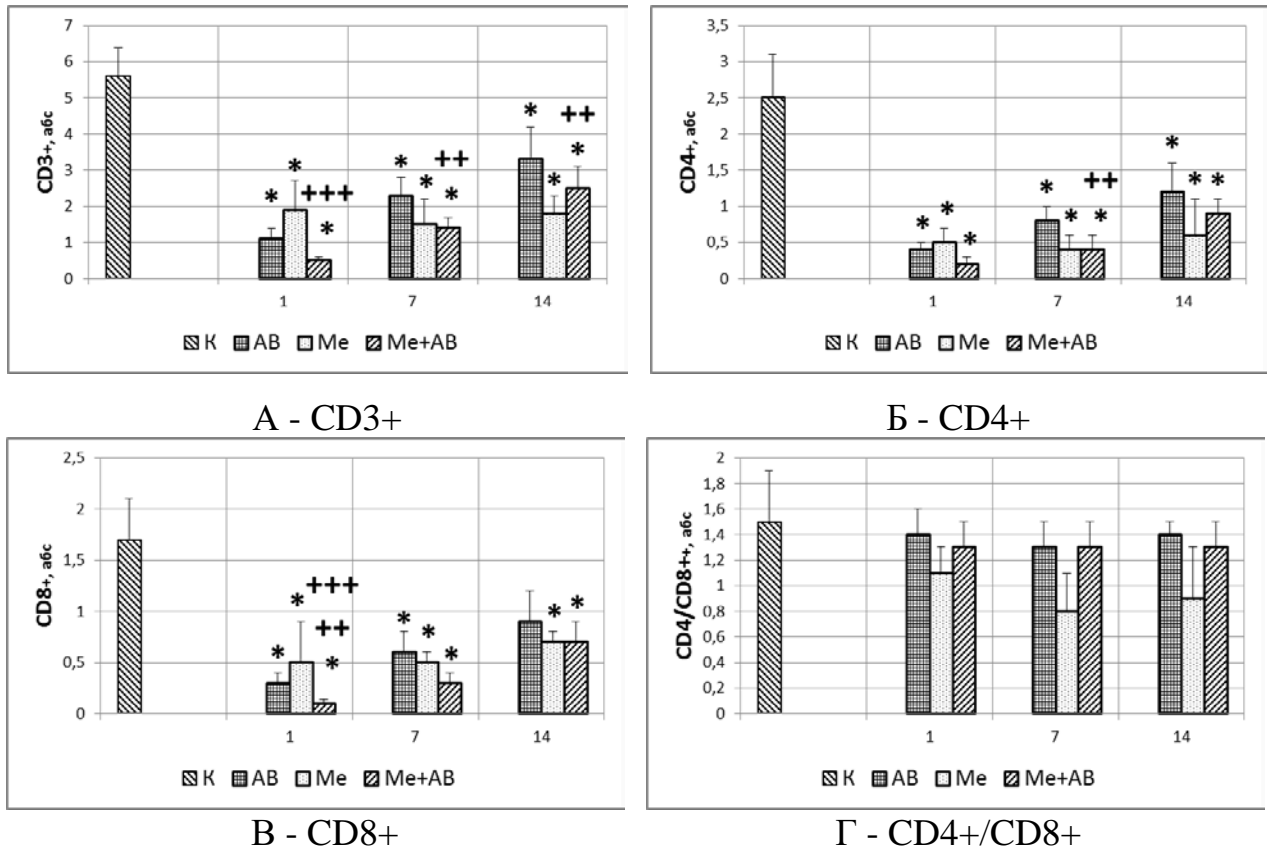


Рис. 3.6. Влияние ванадия и хрома на показатели пролиферативной активности лимфоцитов, экспрессирующих CD3+, CD4+, CD8+ рецепторы,

у контрольных и опытных крыс со скипидар-индуцированным воспалением

Показаны результаты количественного определения субпопуляций лимфоцитов крови экспериментальных животных с использованием моноклональных антител для групп **Контроль, AB, Me, Me+AB**: **А** – CD3+; **Б** – CD4+; **В** – CD8+; **Г** – CD4+/CD8+. Значительные отличия между столбцами оценены по Mann-Whitney U-test с уровнем значимости  $p \leq 0,001$  по отношению: \* - к контролю; ++ - к AB; +++ - к Me

Содержание CD3+ лимфоцитов в группе Me статистически значимо снижалось на 195% ( $p < 0,0001$ ) [24, 106] по сравнению с контролем (рис. 3.15.-А), тогда как содержание CD4+ и CD8+ лимфоцитов соответственно в 4,6 ( $p = 0,035$ ) и 3,4 раза ( $p < 0,0001$ ) (рис. 3.6.-Б, В). Причем, абсолютное содержание CD4+



лимфоцитов снижалось в 1,2 раза больше по сравнению с CD8+ лимфоцитами. О преимущественном нарушении хелперной активности лимфоцитов свидетельствовало снижение на 30% ( $p < 0,0001$ ) ИРИ (иммунорегуляторный индекс, CD4+/CD8+) по сравнению с контролем (рис. 3.6.-Г) [140, 25]. Через 7 и 14 суток динамика угнетения пролиферативной активности лимфоцитов у опытных крыс сохранилась.

Аналогичные колебания количественных характеристик CD3+ Т-лимфоцитов наблюдались и в группе Me+AB, когда в первый срок исследования их значения оказались в 11,2 раза ( $p \leq 0,05$ ) ниже контрольного уровня, а через 7 и 14 суток, несмотря на прирост, не достигали уровня AB соответственно на 39,1% ( $p \leq 0,001$ ) и 22,2% ( $p \leq 0,001$ ) (рис. 3.6.-А) [26, 202].

Исследование активности хелперных CD4+ Т-лимфоцитов в группе Me+AB через 1 сутки после моделирования асептического воспаления показало падение их абсолютного количества в периферической крови до 0,2 против 2,5 контроля ( $p \leq 0,001$ ) (рис. 3.6.-Б).

7-е сутки исследования отмечались двукратным приростом пролиферативной активности CD4+ Т-лимфоцитов у опытных крыс группы Me+AB, но практически таким же статистически значимым отставанием от уровня AB. Аналогичные изменения установлены и через 14 суток.

Содержание цитотоксических CD8+ Т-лимфоцитов в 1-е сутки исследования упало до уровня 0,1 против контроля 1,7 ( $p \leq 0,001$ ), которое двукратно нарастало в каждом последующем сроке (через 7 и 14 суток), но на 82,4% ( $p \leq 0,001$ ) и 59% ( $p \leq 0,001$ ) соответственно отставало от контроля (рис. 3.15.-В). ИРИ, рассчитанный соотношением CD4+ Т-лимфоцитов к CD8+ Т-лимфоцитам, значимых различий между группами не выявил, что свидетельствовало о сопоставимом их снижении (рис. 3.6.-Г)

По сведениям Калинина Н.М. и соавт., 2005, первые сутки посттравматического периода должны сопровождаться увеличением содержания клеток лимфоидного ряда и даже появлением лимфобластов [64].

По мнению этих авторов, снижение в первые сутки после травмы содержания лимфоцитов указывает на развитие в дальнейшем инфекционных осложнений.

Существует мнение, что одной из причин лимфопении на ранних этапах воспаления является апоптоз, направленный на ограничение системной воспалительной реакции [64]. Так, в периферической крови крыс группы АВ мы констатировали снижение хелперной и цитотоксической активности лимфоцитов. Согласно сведениям литературы, клетки-предшественники лимфоцитов мигрируют из костного мозга в тимус, где после селективного отбора наивные лимфоциты мигрируют во вторичные лимфоидные органы [156]. В периферических лимфатических узлах наивные Т-лимфоциты контактируют с антигенпрезентирующими клетками и дифференцируются в эффекторные Т-клетки - CD4<sup>+</sup> и CD8<sup>+</sup>. Они регулируют воспалительный процесс, воздействуя на источник антигенов, после чего у большинства эффекторных клеток активируются процессы клеточной гибели. По-видимому, течение асептического воспаления у крыс группы АВ требует постоянного обновления лимфоцитов, поскольку сопровождается апоптозом CD4<sup>+</sup> и CD8<sup>+</sup>-лимфоцитов. Это позволило предположить, что воспалительный процесс у интактных крыс регулируется эффекторными клетками, снижение которых сопровождается их постоянным обновлением.

Между тем, исследованиями субпопуляционного состава лимфоцитов у опытных крыс с асептическим воспалением также установлено снижение содержания как CD4<sup>+</sup>, так и CD8<sup>+</sup>-лимфоцитов. Активации лимфопоэза не происходило вследствие снижения костномозгового лимфопоэза, что подтверждено результатами цитологических исследований костного мозга. При этом количество полноценных лимфоцитов не восстанавливалось на протяжении всего эксперимента.

Резюмируя вышесказанное, сделано заключение, что асептическое воспаление в обеих группах животных сопровождалось количественным снижением CD4<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup> лимфоцитов. Однако, в группе АВ динамика восстановления этих лимфоцитов оказалась более выраженной, чем в опытной

группе, снижение которой, возможно, было следствием иммунотоксических эффектов солей ванадия и хрома.

Таким образом, соли ванадия и хрома нарушают воспалительные реакции путем ингибирования эффекторных Т-клеток, что, вследствие нарушения их взаимодействия с макрофагами, может привести к срыву сигнальных цитокиновых каскадов.

В патогенезе воспаления любого генеза ключевую роль в развертывании каскада воспалительных реакций отводят цитокинам. Именно цитокины запускают механизмы клеточной активации врожденного иммунитета [197]. В свете вышеизложенного, нами были исследованы концентрации сывороточных цитокинов у экспериментальных крыс с асептическим воспалением в условиях предварительной интоксикации метаванадатом аммония и дихроматом калия.

С целью изучения влияния метаванадата аммония и дихромата калия на баланс про- и противовоспалительных цитокинов при развитии воспаления, мы определили уровни цитокинов IL-1 $\beta$ , IL-6, TGF- $\beta$  и IL-10 в сыворотках крыс групп АВ, Me и Me+AB через 1, 7 и 14 суток после моделирования асептического воспаления. Группы Контроль и АВ использовали в качестве кгррупп сравнения. Результаты иммуноферментного анализа этих цитокинов представлены на рис. 3.7.

Воспаление, индуцированное скипидаром, способствовало высвобождению IL-6 в группе АВ, тогда как предварительная интоксикация металлами препятствовала их высвобождению. Так, через 1 сутки после моделирования асептического воспаления мы обнаружили повышенный уровень сывороточного IL-6 в группе АВ по сравнению с группами Me и Me+AB (рис. 3.7.-Б).

Между тем, у крыс, предварительно затравленных метаванадатом аммония и дихроматом калия, воспалительная реакция в острой фазе характеризовалась более слабой продукцией IL-6 по сравнению с АВ.

Несмотря на то, что интерлейкин-1 $\beta$  является ярко выраженным провоспалительным цитокином, участвующим в патогенезе острого

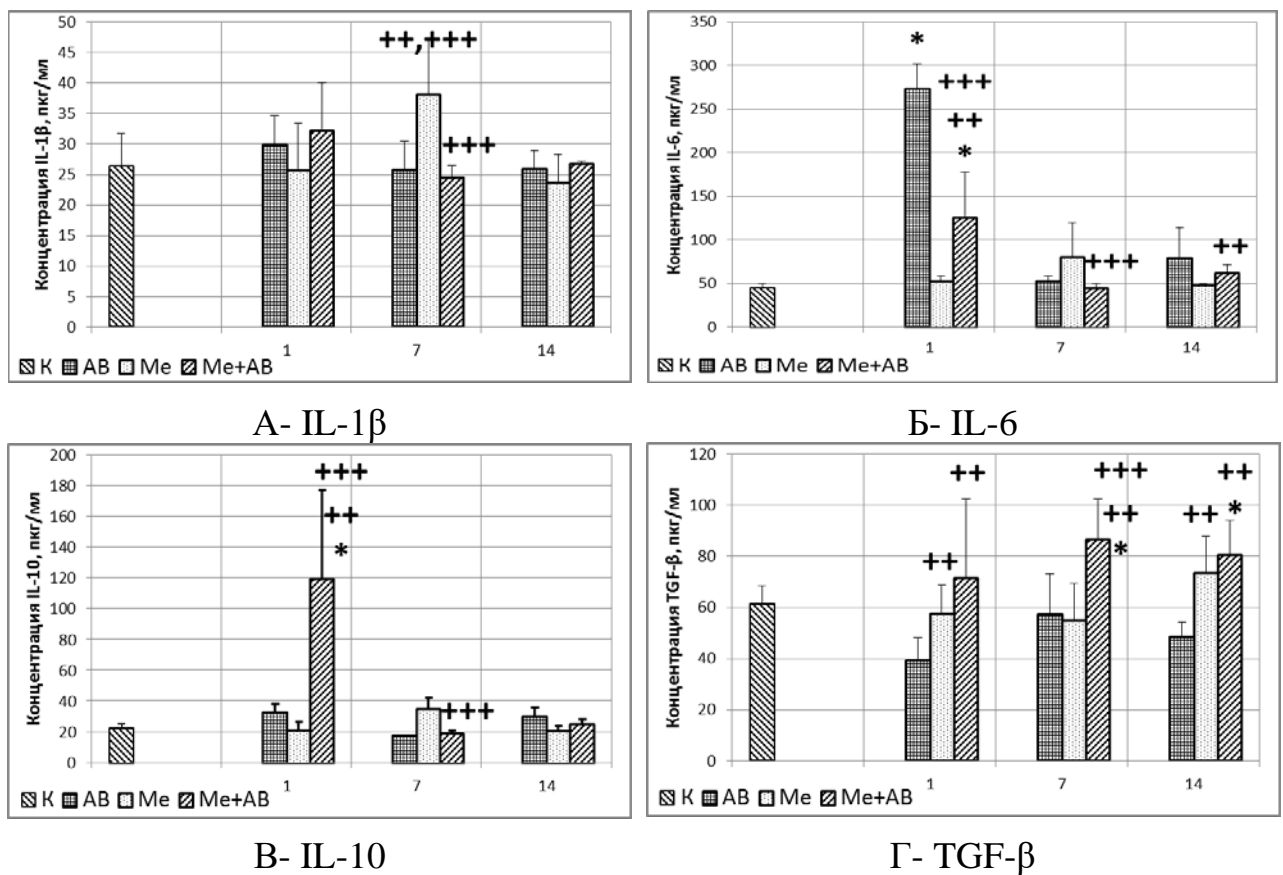


Рис. 3.7. Содержание цитокинов в сыворотке периферической крови опытных крыс с асептическим воспалением

Показаны результаты исследований сывороточных цитокинов у животных групп **Контроль, АВ, Ме, Ме+АВ**: **А** – IL-1β; **Б** – IL-6; **В** – IL-10, **Г** - TGF-β. Значительные отличия между столбцами оценены по Mann-Whitney U-test с уровнем значимости  $p < 0,05$  по отношению: \* - к контролю, ++ - к АВ, +++ - к 1-м суткам

воспаления, на всем протяжении эксперимента показывал слабую активность, уровень которого колебался в пределах контрольных величин (рис. 3.7.-А). Более того, через 1 сутки после моделирования асептического воспаления мы наблюдали увеличение уровня сывороточного IL-10 у крыс Ме+АВ по сравнению с группами Контроль, АВ и Ме (рис. 3.7.-В). Также было установлено повышение противовоспалительной активности TGF-β, концентрация которого на 58% статистически значимо превышала показатели группы Ме ( $p \leq 0,05$ ) и сохранялась до конца эксперимента (рис. 3.7.-Г). Следует полагать, что ранняя активация противовоспалительной активности цитокинов

препятствовала развертыванию воспалительных реакций в асептической ране опытных крыс.

Вместе эти данные демонстрируют, что воздействие метаванадата аммония и дихромата калия смещает выработку провоспалительного ИЛ-6 в выработку противовоспалительного ИЛ-10 во время острой фазы воспаления и TGF- $\beta$  в весь период воспаления.

По сведениям Mounira T. et al, 2015, у крыс, вдыхавших метаванадат аммония снижалась экспрессия провоспалительных цитокинов ИЛ-1 $\alpha$ , TNF- $\alpha$  и существенно уменьшался приток как альвеолярных макрофагов, так и полиморфноядерных нейтрофилов [248].

По литературным данным [243] соли тяжелых металлов, продукты повреждения тканей, АФК способны вызывать подобную незначительную провоспалительную цитокиновую реакцию. По-видимому, она является результатом высокой подверженности лейкоцитов к апоптозу и, как следствие, слабовыраженным лейкоцитарным реагированием на белковые и небелковые модификаторы иммунного ответа. К тому же, высокие концентрации сывороточных ИЛ-10 и TGF- $\beta$  способны блокировать функции макрофагов и Т-лимфоцитов.

Из вышеизложенного следует заключить, что течение асептического воспаления, вызванного на фоне интоксикации метаванадатом аммония и дихроматом калия, сопровождалось незначительной провоспалительной активностью ИЛ-6 в первый и последний сроки эксперимента. Вместе с тем, течение экспериментального воспаления усугублялось вмешательством противовоспалительной активности ИЛ-10 в первый срок и TGF- $\beta$  во все сроки исследования, что существенно повлияло на развитие и исход воспалительного процесса у опытных крыс.

### **3.1.3 Количественная оценка клеточности селезенки и результаты иммунофенотипирования ее субклеточных популяций у экспериментальных крыс с асептическим воспалением**

Селезенка играет важную роль в модуляции иммунной системы. В последние годы, после углубленных исследований организации и структуры селезенки, функции клеток, секреции и иннервации, было установлено, что селезенка не только фильтрует кровь, но и является важным центром регуляции иммунной системы, обмена веществ и эндокринной системы [208].

Воздействие тяжелых металлов вызывает целый комплекс процессов, изменяющих иммунную резистентность организма. От особенностей функционирования селезенки при интоксикации организма солями тяжелых металлов зависит фенотипический характер формирования иммунного ответа. С этой целью была проведена количественная и качественная оценка клеточных популяций селезенки животных с асептическим воспалением, вызванным после двухнедельной интоксикации соединениями ванадия и хрома.

Результаты оценки клеточности селезенки экспериментальных крыс представлены на рис. 3.8.

Течение асептического воспаления, вызванного на фоне интоксикации солями ванадия и хрома, сопровождалось резким увеличением клеточности селезенки опытных крыс. Так, первые два срока эксперимента сопровождалось более чем двукратным статистически значимым увеличением клеточности селезенки крыс групп Me и Me+AB по отношению к контролю и AB, также как и к 14 суткам исследования этот показатель превышал значения контроля и AB в группе Me+AB в 1,8 и 2,2 раза соответственно.

Воспаление приводит к увеличению мобилизации зрелых миелоидных клеток, которые создают нишевые пространства в резервуаре костного мозга. Чрезмерное производство воспалительных медиаторов способно вызвать расширение миелоидных клеток.

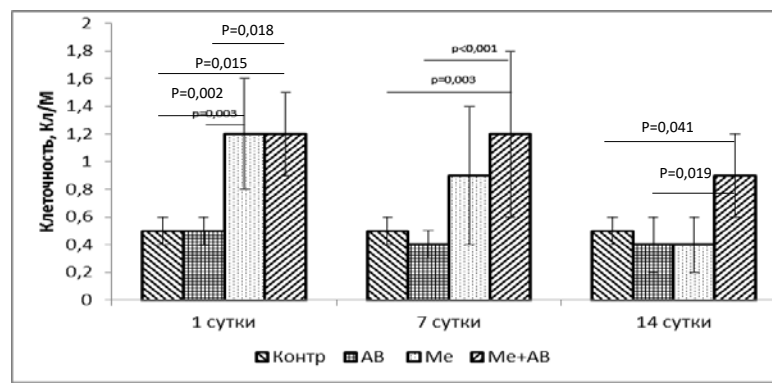


Рис. 3.8. Клеточность селезенки экспериментальных крыс групп Me и Me+AB в сравнении с контролем и АВ

Показаны результаты расчета клеточности (отношение количества клеток к массе) селезенки у животных групп **Контроль**, **АВ**, **Me**, **Me+AB** через 1, 7 и 14 суток: **А** – IL-1 $\beta$ ; **Б** – IL-6; **В** – IL-10, **Г** - TGF- $\beta$ . Значительные отличия между столбцами оценены по T-критерию Стьюдента с уровнем значимости  $p < 0,05$ .

Кроме того, определение дифференцировки CD4<sup>+</sup> Т-лимфоцитов на Th-1 и Th-2 важно для понимания механизмов формирования клеточного (Th-1) либо гуморального (Th-2) иммунного ответа, т.к. в основе патогенеза расстройств иммунитета лежит дисбаланс про- и противовоспалительных цитокинов, продуцируемых Th1 и Th2 лимфоцитами. С этой целью, на следующем этапе наших исследований были определены фенотипические особенности клеточных популяций селезенки. Для этого мы проанализировали количественное содержание Т-клеток в селезенке и их способность продукции IFN $\gamma$  и IL-4 после стимуляции *in vitro*.

Инъекция скипидарного масла вызывала накопление CD8<sup>+</sup> (CTL) у крыс с АВ на 14 сутки после начала эксперимента (рис.3.9.-А).

В острой фазе воспаления (через 1 сутки после индукции скипидара) наблюдали увеличение доли CD4<sup>+</sup> (Th1) клеток с последующим их повышением на 7 и 14 сутки. По сведениям литературы, повышение пролиферативной активности CD4<sup>+</sup>лимфоцитов сопровождается избыточной продукцией провоспалительных цитокинов [226].

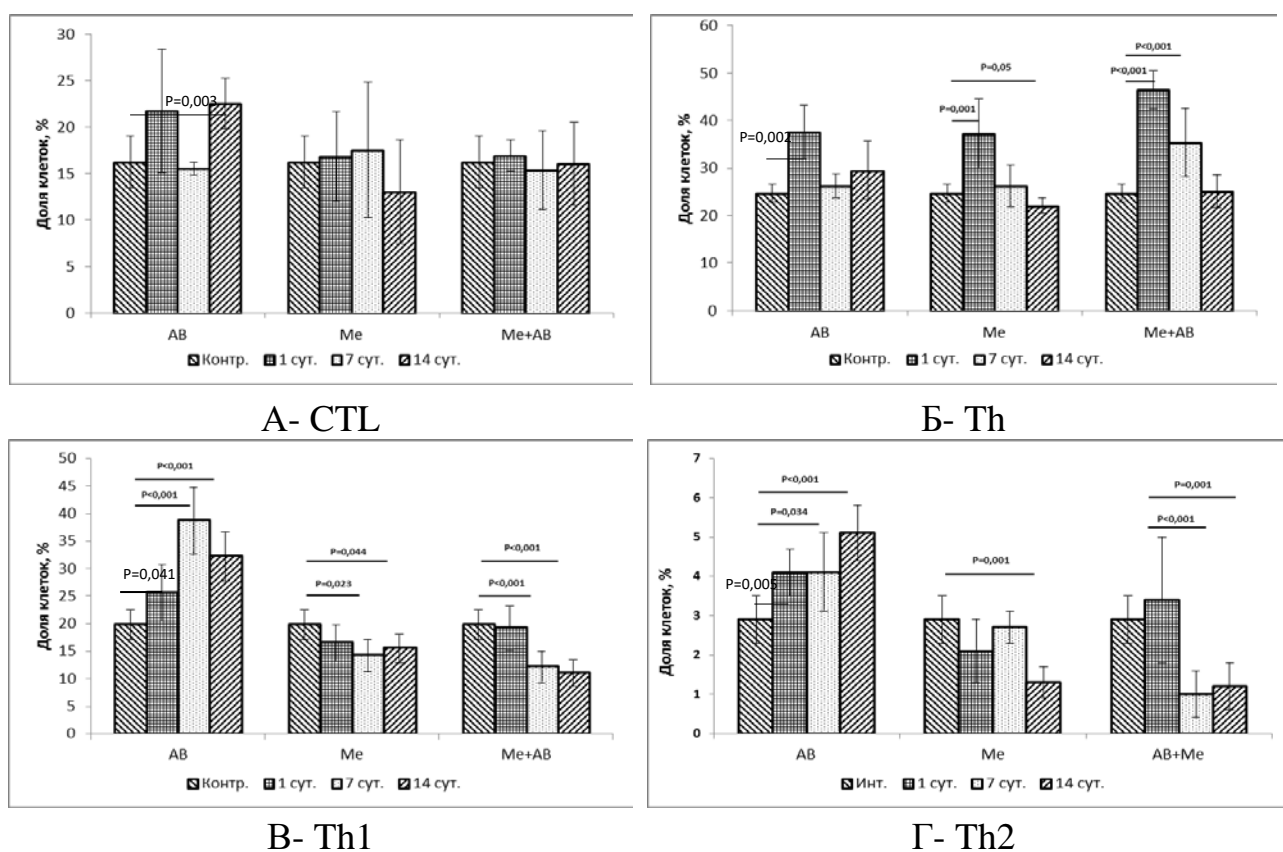


Рис. 3.9. Клеточность селезенки экспериментальных крыс групп Ме и Ме+АВ в сравнении с контролем и АВ

Показаны результаты расчета клеточности (отношение количества клеток к массе) селезенки у животных групп **Контроль, АВ, Ме, Ме+АВ** через 1, 7 и 14 суток: **А** – IL-1 $\beta$ ; **Б** – IL-6; **В** – IL-10, **Г** - TGF- $\beta$ . Значительные отличия между столбцами оценены по T-критерию Стьюдента с уровнем значимости  $p < 0,05$ .

По результатам наших исследований первые сутки эксперимента характеризовались ранней продукцией IL-6 и снижением TGF- $\beta$ , что соответствовало началу воспалительного процесса. Через неделю последовал спад концентрации провоспалительных цитокинов в плазме крови с последующим нарастанием противовоспалительных цитокинов на последнем этапе эксперимента. Однако предварительное введение солей металлов в группе Ме до введения скипидарного масла устраняло накопление CD8 + (CTL) в селезенке, что может быть связано с регрессом тимуса (рис.3.9.-А). Между тем, металлы ингибировали пролиферативную активность Т лимфоцитов, на

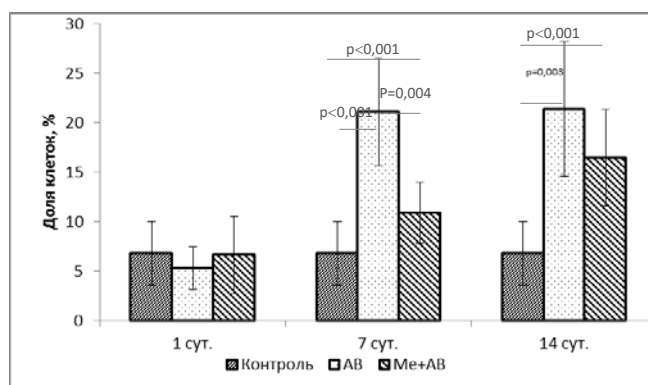


что указывала низкая продукция ими IFN- $\gamma$  (Th1) и IL-4 (Th2) на всех этапах эксперимента (рис.3.9.-В,Г). В совокупности эти данные указывают на то, что метаванадат аммония и дихромат калия способны изменять течение воспаления посредством модуляции экспансии Т-клеток и подавления иммунных ответов как Th1, так и Th2 посредством ингибирования продукции IFN- $\gamma$  и IL-4 соответственно.

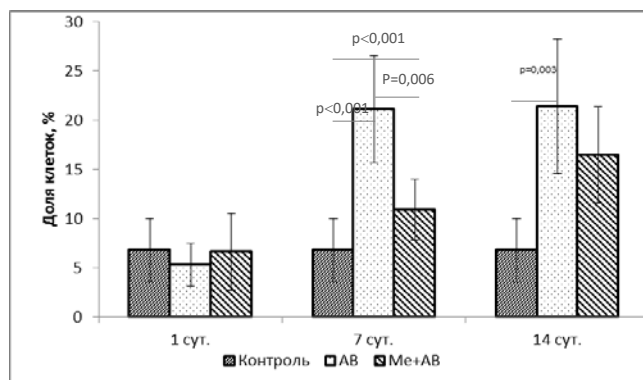
Нейтрофилы и моноциты / макрофаги являются ключевыми участниками воспалительных реакций [142, 187]. Поэтому мы проверили влияние метаванадата аммония и дихромата калия на расширение гранулоцитов, определенных как His48HighCD11b/c+, и моноцитов, определенных как His48lowCD11b / c +, при асептическом воспалении [237].

Результаты цитофлуориметрического анализа спленоцитов представлены на рис. 3.10. Через 1 сутки после моделирования воспаления в селезенке крыс с АВ количественное соотношение клеток с фенотипом His48+/CD11b/c+ (общие) оказалось аналогично контрольной группе животных (рис. 3.10.-А). Через 7 и 14 суток их количество статистически значимо повышалось в 3 раза по сравнению с контролем. Исследование гранулоцитарных подмножеств с фенотипом His48High/CD11b/c+ в группе АВ показало их превышение от контрольного уровня в 4,5 раза ( $p \leq 0,05$ ), также начиная с 7 и 14 суток эксперимента. Аналогичные изменения установлены и со стороны His48low/CD11b/c+ (моноциты). Результаты наших исследований согласуются с [237], где, по мнению авторов, на ранних стадиях полимикробного сепсиса увеличение миелоидных предшественников (МП) в селезенке экспериментальных мышей почти до 70 раз по сравнению с контролем служит частью механизма врожденной иммунной защиты из-за мобилизации миелоидных предшественников для замены потребляемых зрелых миелоидных клеток.

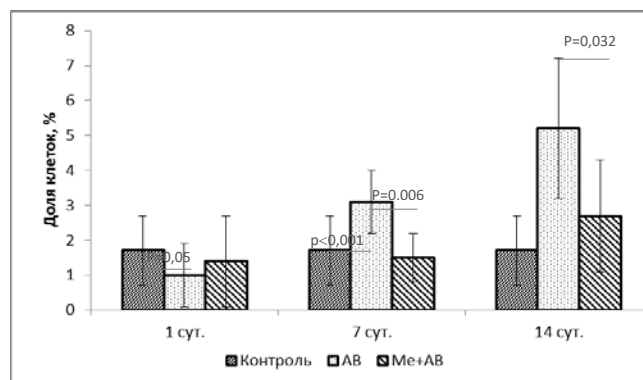
По результатам вышеприведенных исследований нами выявлено, что в периферической крови животных группы АВ через 7 и 14 суток мы наблюдали прогрессивный прирост нейтрофилов и моноцитов и значительную



А - His48+/CD11b/c+



Б – His48HighCD11b/c+



В – His48lowCD11b/c+

Рис. 3.10. Влияние металлов на показатели накопления в селезенке экспериментальных крыс клеточных компонентов с фенотипами

His48+/CD11b/c+ (МП)\*, His48HighCD11b/c+ (МП-Г) и

His48lowCD11b/c+ (МП-М) (pg/ml (M (CO), n=10)

Показаны результаты иммунофенотипирования клеток селезенки у животных **групп** **Контроль**, **AB**, **Me**, **Me+BA** через **1, 7 и 14 суток**: **А** – **AB**; **Б** – **Me**; **В** – **Me+AB**. Значительные отличия между столбцами оценены по T-критерию Стьюдента с уровнем значимости  $p < 0,001$ ;  $p < 0,05$ . Примечание: \* - МП – миелоидные предшественники - общие; МП-Г – миелоидные предшественники – гранулоцитарные; МП-М – миелоидные предшественники-моноцитарные

инфильтрацию асептической раны макрофагами.

Проведенным корреляционным анализом было установлено, что накопление клеток с фенотипами His48+/CD11b/c+, His48HighCD11b/c+ и His48lowCD11b/c+ не приводило к угнетению пролиферативной активности Т клеток. Так, в селезенке группы AB накопление этих клеток на 7 и 14 сутки

исследования ( $p \leq 0,05$ ) (см. рис. 3.10-А,Б,В) сопровождалось более чем двукратным статистически значимым повышением пролиферативной активности Th1 и Th2 по сравнению с контрольным уровнем соответственно (см. рис. 3.10.-В, Г). Из вышеизложенного сделан вывод, что эти клетки имели фенотипический спектр зрелых клеток.

Неоднозначная картина наблюдалась в подгруппе Me+AB. Несмотря на то, что значения исследованных клеточных популяций селезенки статистически значимо превышали контрольный уровень через 1 и 7 суток исследования (см. рис. 3.10.- В), однако эти данные отличались от показателей подгруппы АВ. Так, постепенное системное накопление МП, отмечавшееся преимущественно за счет их гранулоцитарных подмножеств, через 7 и 14 суток эксперимента статистически значимо отставало от показателей АВ в 2 и 1,3 раза соответственно (см. рис. 3.10.-В). Эти данные показывают, что введение ванадия и хрома, возможно, препятствует накоплению нейтрофилов и моноцитов у животных с асептической воспалительной реакцией, вызванной скипидаром.

Согласно литературным сведениям, His48+/CD11b/c+, His48High/CD11b/c+ и His48 low/CD11b/c+ относятся к фенотипам клеток, не утративших способность к дифференцировке в зрелые гранулоциты и моноциты. Морфология и функция этих клеток различаются в разных тканях и при разных воспалительных состояниях. Даже в рамках одного и того же воспалительного процесса они функционально и фенотипически меняются в зависимости от многих факторов и обычно имеют фенотипический спектр зрелых миелоидных клеток. Между тем, расширение миелоидных предшественников связывают и с ослаблением противоопухолевых и противоинфекционных иммунных реакций. В основном, за счет способности этих клеток вызывать Т-клеточную анергию. Так, у животных группы Me+AB металлы подавляли пролиферативную активность как Th1, так и Th2 посредством ингибирования продукции IFN- $\gamma$  и IL-4. Проведенным корреляционным анализом с массивом данных, полученных через 7 суток,

установлена сильная обратная коррелятивная связь между накоплением гранулоцитарных миелоидных предшественников с фенотипом His48High/CD11b/c+ и угнетением пролиферативной активности Th и Th2 (коэффициент корреляции Спирмана -1,0,  $p \leq 0,01$ ) (табл. 3.4.).

Таблица 3.4 – Показатели коррелятивных связей между исследованными показателями субклеточных компонентов спленоцитов у экспериментальных крыс группы Me+AB по методу Спирмана (через 7 суток) (Viewer IBM SPSS Statistics, version 22)

| Корреляция Спирмана                                   |                 | МП            | МП-Г          | МП-М         | Th            | Th1             | Th2           | СД8            |
|---|-----------------|---------------|---------------|--------------|---------------|-----------------|---------------|----------------|
| Через 7 суток   |                 |               |               |              |               |                 |               |                |
| МП  | Коэф.коррел-и   | <b>1,0**</b>  | <b>1,0**</b>  | 0,5          | <b>-1,0**</b> | <b>1,0**</b>    | <b>-1,0**</b> | 0,5            |
|   | Знач.(2-х стор) |               |               | 0,667        |               |                 |               | 0,667          |
| МП-Г  | Коэф.коррел-и   | <b>1,0**</b>  | 1,0           | 0,5          | <b>-1,0**</b> | <b>1,0**</b>    | <b>-1,0**</b> | 0,5            |
|   | Знач.(2-х стор) |               |               | 0,667        |               |                 |               | 0,667          |
| МП-М  | Коэф.коррел-и   | 0,5           | 0,5           | 1,0          | -0,5          | 0,5             | -0,5          | <b>1,0**</b>   |
|   | Знач.(2-х стор) | 0,667         | 0,667         |              | 0,667         | 0,667           | 0,667         |                |
| Th  | Коэф.коррел-и   | <b>-1,0**</b> | <b>-1,0**</b> | -0,5         | 1,0           | 0,524           | 0,555         | -0,382         |
|   | Знач.(2-х стор) |               |               | 0,667        |               | 0,080           | 0,061         | 0,221          |
| Th1   | Коэф.коррел-и   | <b>1,0**</b>  | <b>1,0**</b>  | 0,5          | 0,524         | 1,0             | <b>0,641*</b> | <b>-0,813*</b> |
|   | Знач.(2-х стор) |               |               | 0,667        | 0,080         |                 | 0,025         | 0,001          |
| Th2   | Коэф.коррел-и   | <b>-1,0**</b> | <b>-1,0**</b> | -0,5         | 0,555         | 0,641           | 1,0           | -0,572         |
|   | Знач.(2-х стор) |               |               | 0,667        | 0,061         | 0,025           |               | 0,052          |
| СД8+  | Коэф.коррел-и   | 0,5           | 0,5           | <b>1,0**</b> | -0,382        | <b>-0,813**</b> | -0,572        | 1,0            |
|   | Знач.(2-х стор) | 0,667         | 0,667         |              | 0,221         | 0,001           | 0,052         |                |
| **- корреляция значима на уровне 0,01 (двухсторонняя) |                 |               |               |              |               |                 |               |                |
| *- корреляция значима на уровне 0,05 (двухсторонняя)  |                 |               |               |              |               |                 |               |                |

Через 14 суток у этих животных установлена сильная обратная коррелятивная связь между накоплением общих His48+/CD11b/c+ и угнетением CD3+CD4+ (коэффициент корреляции Спирмана -1,0,  $p \leq 0,01$ ) (табл. 3.5.).

Поскольку постепенное системное накопление клеток с фенотипами His48+/CD11b/c+, His48High/CD11b/c+ и His48 low/CD11b/c+ одновременно сопровождалось Т-клеточной анергией в селезенке опытных крыс с экспериментальным воспалением, мы предполагаем, что соли ванадия и хрома

Таблица 3.5 – Показатели коррелятивных связей между исследованными показателями субклеточных компонентов спленоцитов у экспериментальных крыс группы Me+AB по методу Спирмана (через 14 суток) (Viewer IBM SPSS Statistics, version 22)

| Корреляция Спирмана   |                 | МП             | МП-Г  | МП-М  | Th            | Th1        | Th2        | CD8        |
|---|-----------------|----------------|-------|-------|---------------|------------|------------|------------|
|   |                 | Через 14 суток |       |       |               |            |            |            |
| МП  | Коэф.коррел-и   | <b>1,0</b>     | 0,4   | 0,8   | <b>-1,0**</b> | 0,8        | -0,4       | -0,8       |
|   | Знач.(2-х стор) |                | 0,600 | 0,200 |               | 0,200      | 0,600      | 0,200      |
| МП-Г  | Коэф.коррел-и   | 0,4            | 1,0   | -0,2  | -0,4          | 0,8        | -0,4       | -0,8       |
|   | Знач.(2-х стор) | 0,600          |       | 0,800 | 0,600         | 0,200      | 0,600      | 0,200      |
| МП-М  | Коэф.коррел-и   | 0,8            | -0,2  | 1,0   | -0,8          | 0,4        | 0          | -0,4       |
|   | Знач.(2-х стор) | 0,200          | 0,800 |       | 0,200         | 0,600      | 1,000      | 0,600      |
| Th  | Коэф.коррел-и   | <b>-1,0**</b>  | -0,4  | -0,8  | <b>1,0</b>    | -0,8       | 0,1        | 0,3        |
|   | Знач.(2-х стор) |                | 0,600 | 0,200 |               | 0,104      | 0,873      | 0,624      |
| Th1   | Коэф.коррел-и   | 0,8            | 0,8   | 0,4   | -0,8          | <b>1,0</b> | -0,1       | 0          |
|   | Знач.(2-х стор) | 0,200          | 0,200 | 0,600 | 0,104         |            | 0,873      | 1,000      |
| Th2   | Коэф.коррел-и   | -0,4           | -0,4  | 0     | 0,1           | -0,1       | <b>1,0</b> | 0,1        |
|   | Знач.(2-х стор) | 0,600          | 0,600 | 1,000 | 0,873         | 0,873      |            | 0,873      |
| CD8+  | Коэф.коррел-и   | -0,8           | -0,8  | -0,4  | 0,3           | 0          | 0,1        | <b>1,0</b> |
|   | Знач.(2-х стор) | 0,200          | 0,200 | 0,600 | 0,624         | 1,000      | 0,873      |            |
| **- корреляция значима на уровне 0,01 (двухсторонняя)<br>*- корреляция значима на уровне 0,05 (двухсторонняя) |                 |                |       |       |               |            |            |            |

способны ингибировать у этих клеток способность к дифференцировке в зрелые гранулоциты и моноциты, тем самым, индуцируя их иммуносупрессорные свойства.

Поскольку постепенное системное накопление клеток с фенотипами His48+/CD11b/c+, His48High/CD11b/c+ и His48 low/CD11b/c+ одновременно сопровождалось Т-клеточной анергией в селезенке опытных крыс с экспериментальным воспалением, мы предполагаем, что соли ванадия и хрома способны ингибировать у этих клеток способность к дифференцировке в зрелые гранулоциты и моноциты, тем самым, индуцируя их иммуносупрессорные свойства.

Таким образом, проведенными исследованиями установлено, что под влиянием ванадия и хрома течение асептического воспаления у экспериментальных крыс имеет затяжной характер, обусловленный наличием широких зон некроза, слабой инфильтрации очага воспаления нейтрофилами и

задержки формирования грануляционной ткани. Установлено, что ванадий и хром способны искажать нормальный ход острого воспаления путем смещения провоспалительных сигналов от компонентов врожденного звена иммунитета (нейтрофилы, макрофаги) на активацию противовоспалительных цитокинов IL-10 и TGF- $\beta$ , ингибирования эффекторного Т-клеточного звена иммунитета и расширения миелоидных предшественников (His48<sup>+</sup>/CD11b/c<sup>+</sup>, His48<sup>High</sup>/CD11b/c<sup>+</sup> и His48<sup>low</sup>/CD11b/c<sup>+</sup>), которые вместе могут препятствовать разрешению воспаления и, следовательно, способствовать патогенезу хронических воспалительных процессов.

### **3.1.4 Факторный анализ массива данных, характеризующих показатели врожденного и адаптивного иммунитета у опытных крыс с асептическим воспалением**

Цель исследования: прогнозировать течение и исход воспалительного процесса с помощью выявленных, методом факторного анализа, однородных интегральных показателей для группы животных с ванадиево-хромовой интоксикацией. Этот метод позволит установить наиболее значимые обобщающие характеристики металлиндуцированной иммунодепрессии.

Для проведения факторного анализа были использованы 28 признаков. Структура зависимости показателей врожденного и адаптивного звеньев иммунитета, отражающая скрытую (латентную) связь между исследуемыми переменными, представлена корреляционной матрицей в таблице собственных значений. По ее результатам была получена матрица 7 неповернутых компонентов, каждая из которых была представлена переменными с наибольшими векторными нагрузками.

С целью максимизации изменчивости переменных и минимизации разброса вокруг нее была проведена процедура вращения факторов (Варимакс). В результате был получен новый факторный комплекс с улучшенной векторной

нагрузкой прежних переменных и появлением новых переменных в матрице компонентов. Каждому собственному значению отвечала одна главная компонента (фактор), которая представляла собой сжатое описание структуры зависимости исходных переменных, несущих значительную часть информации. В табл. 3.6 приведены только те собственные значения, величина которых оказалась более 1. Каждый компонент объединил переменные, имевшие сильные корреляционные связи между собой.

Таблица 3.6 – Таблица собственных значений (полная объясненная дисперсия компонентов)

| <b>Компоненты</b> | <b>Собственные значения (факторный анализ)</b><br><b>Метод выделения: Главные компоненты</b> |                                   |                       |
|-------------------|--|-----------------------------------|-----------------------|
|                   | <b>Собственные значения</b>  | <b>% Дисперсии (изменчивости)</b> | <b>Кумулятивный %</b> |
| 1                 | 8,737  | 30,1                              | 30,1                  |
| 2                 | 7,437  | 25,6                              | 55,8                  |
| 3                 | 4,270  | 14,7                              | 70,5                  |
| 4                 | 3,072  | 10,4                              | 81,1                  |
| 5                 | 2,144  | 7,4                               | 88,5                  |
| 6                 | 1,615  | 5,6                               | 94,0                  |
| 7                 | 1,042  | 3,6                               | 97,6                  |

Как видно из таблицы 3.5. первые 4 компонента имели накопленную информативность более 80%. У остальных компонентов (с 5-го по 7-й) % дисперсии ниже 10, что, по-нашему мнению, означало, что изменчивость переменных в этих компонентах для интерпретации менее значима (рис. 3.11).

Между тем, значение суммарной вариации выделенных компонентов оказалось близко к 100% (97,6%), что свидетельствовало о качестве проведенного факторного анализа. В табл. 3.7. представлены результаты 4 выделенных факторных моделей.

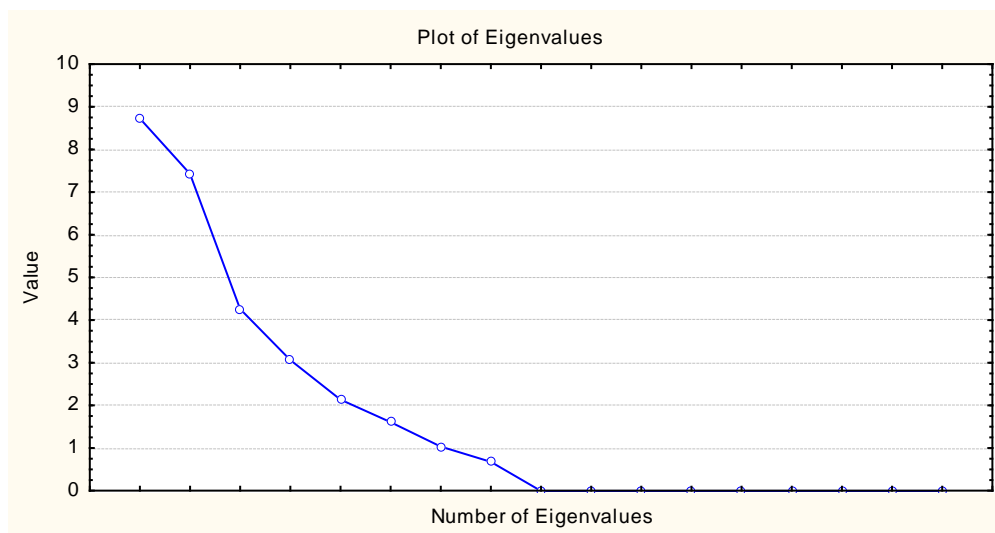


Рис. – 3.11. Точечная диаграмма значимости факторных моделей

Матрица повернутых компонентов в 1-ом наиболее значимом компоненте с факторной нагрузкой 8,737 показывала сильную прямую ассоциацию с Т-клеточной дисфункцией CD3+, CD4+, CD8+, Th1 и Th2 (векторные нагрузки переменных соответственно +0,905827, +0,943645, +0,922694, +0,721482 и +0,871847) и гипоксическим состоянием, как следствие снижения содержания эритроцитов и гемоглобина с векторными нагрузками +0,723919 и +0,791493. Признаки, вошедшие в первый, наиболее значимый фактор, можно охарактеризовать как дисфункцию хелперно-супрессорной активности лимфоцитов, Т-клеточного и гуморального иммунитета и тяжелое гипоксическое повреждение тканей для животных группы Me+AB.

Во втором компоненте (факторная нагрузка 7,437) с большей силой ассоциированы снижение дифференцировки миелоидзависимых общих и гранулоцитарных клеток (векторные нагрузки -0,910653 и -0,890283) со снижением абсолютного содержания лимфоцитов крови (векторная нагрузка -0,759531).

Таким образом, второй главный компонент выделяет иммуносупрессорное влияние миелоидзависимых общих и гранулоцитарных клеток на активность Т-клеточного иммунитета.



Таблица 3.7 – Распределение факторных нагрузок для переменных группы «Me+AB», характеризующих иммунологические показатели крови и клеточные популяции селезенки, после процедуры вращения Варимакс

| Переменные*         | Факторные нагрузки (метод вращения Варимакс)<br>Выделение: Главные компоненты (Отмечены нагрузки >,700000) |                  |                  |                  |
|---------------------|--|------------------|------------------|------------------|
|                     | Фактор 1   | Фактор 2         | Фактор 3         | Фактор 4         |
| Лейкоциты           | 0,052212   | 0,049305         | 0,330835         | <b>-0,737099</b> |
| Эритроциты          | <b>0,723919</b>  | 0,439000         | 0,405430         | -0,011302        |
| Гемоглобин          | <b>0,791493</b>  | 0,171935         | -0,052048        | 0,365578         |
| Нейтрофилы, абс     | 0,159941   | 0,043198         | 0,660408         | 0,547975         |
| Лимфоциты, абс      | -0,145208  | <b>-0,759531</b> | 0,340751         | 0,221576         |
| Моноциты, абс       | -0,032901  | -0,257963        | 0,010937         | -0,506110        |
| Эозинофилы, абс     | 0,653507   | -0,076469        | 0,125497         | -0,417086        |
| ИЛ 1                | -0,082851  | 0,080284         | 0,264651         | <b>0,910179</b>  |
| ИЛ 6                | 0,088658   | 0,311124         | 0,002054         | <b>0,882503</b>  |
| TGF-β               | -0,025594  | -0,440081        | 0,693415         | 0,353784         |
| ИЛ 10               | 0,139642   | 0,380140         | -0,027274        | <b>0,873825</b>  |
| CD3+                | <b>0,905827</b>  | 0,036766         | 0,223254         | -0,051809        |
| CD4+                | <b>0,943645</b>  | 0,030605         | -0,034024        | 0,064842         |
| CD8+                | <b>0,922694</b>  | -0,061258        | 0,248514         | 0,011828         |
| CD4+/ CD8+          | 0,039241   | 0,051773         | <b>-0,741466</b> | 0,097205         |
| НСТ спонтанный      | -0,086884  | 0,006558         | <b>-0,921481</b> | -0,048649        |
| НСТ индуцированный  | -0,318416  | -0,107602        | <b>-0,903648</b> | 0,007417         |
| ФГ спонтанный       | -0,285260  | 0,160939         | <b>-0,823669</b> | 0,037067         |
| ФГ индуцированный   | -0,369118  | 0,249880         | <b>-0,887589</b> | 0,050738         |
| Контрольная проба   | 0,329710   | <b>-0,800445</b> | 0,318159         | -0,305495        |
| Опыт+Хром           | -0,295524  | 0,597424         | 0,380060         | 0,255528         |
| Опыт+Ванадий        | -0,001854  | 0,562089         | -0,431697        | 0,351305         |
| His48+/CD11b/c+     | -0,298786  | <b>-0,910653</b> | 0,063932         | -0,163417        |
| His48 High/CD11b/c+ | -0,371851  | <b>-0,890283</b> | 0,066927         | -0,223254        |
| His48 low/CD11b/c+  | 0,361425   | -0,684479        | 0,121058         | 0,280342         |
| CD3+ CD4+           | 0,008891   | 0,680245         | 0,172069         | 0,338023         |
| Th1                 | <b>0,721482</b>  | -0,030389        | 0,088300         | 0,602168         |
| Th2                 | <b>0,871847</b>  | 0,223361         | 0,374425         | 0,165063         |
| CD8+                | 0,211899   | 0,484743         | -0,054039        | 0,382997         |
| Expl.Var            | 6,734654   | 5,890561         | 5,826523         | 5,063363         |
| Prp.Totl            | 0,232229   | 0,203123         | 0,200915         | 0,174599         |

Примечание: \* His48+/CD11b/c+ - миелоидзависимые общие клетки; His48 High/CD11b/c+ - миелоидзависимые гранулоцитарные клетки; His48 low/CD11b/c+ - миелоидзависимые моноцитарные клетки; Th1 - (IFN $\gamma$ +/ИЛ-4-); Th2 - (IFN $\gamma$ -/ИЛ-4+)

В третьем факторе с менее значимой факторной нагрузкой 4,270 были установлены сильные отрицательные корреляционные связи между угнетением иммунорегуляторного индекса (векторная нагрузка – 0,741466) и ингибированием метаболической и фагоцитарной активности нейтрофилов (векторные нагрузки – 0,921481, -0,903648, -0,823669 и -0,887589), что свидетельствовало об угнетении врожденного иммунитета.

С четвертым фактором наглядно ассоциирована дисфункция про- и противовоспалительной активности цитокинов (векторные нагрузки +0,910179, +0,882503, +0,873825) со снижением общего содержания лейкоцитов (векторная нагрузка – 0,737099), что характеризует смещение провоспалительных сигналов.

На основании проведенного факторного анализа, последовательность, в которой переменные вносят наибольший вклад в выделенные главные факторы и отражают их информативность для характеристики иммунной дисфункции, выглядит следующим образом:

- Дисфункция адаптивного иммунитета и гипоксия (снижение лимфоцитов с кластерами дифференцировки CD3+, CD4+, CD8+, угнетение Th1 и Th2 иммунных ответов, снижение содержания эритроцитов и гемоглобина);
- Иммуносупрессия (нарушение дифференцировки в селезенке His48+/CD11b/c+, His48 High/CD11b/c+, снижение пролиферативной активности Т-лимфоцитов);
- Угнетение врожденного иммунитета (угнетение метаболической и поглотительной активности нейтрофилов в спонтанных и индуцированных вариантах НСТ-теста и ФГ);
- Цитокиновая дисфункция (снижение провоспалительной активности IL 1 и IL 6, увеличение противовоспалительной активности IL 10).

Очевидно, что в оценке картины разбалансировки иммунологической защиты на первый план выходит угнетение Т-клеточного звена иммунитета.

## **3.2. Оценка клеточности и структурных изменений лимфоорганов экспериментальных животных с асептическим воспалением по результатам микроскопических, морфометрических и цитологических исследований**

### **3.2.1. Оценка клеточности костно-мозгового пунктата экспериментальных животных со скипидар-индуцированным воспалением**

Стоит отметить, что напряжение иммунного гомеостаза, вызванного отравлением солями ванадия и хрома, не может ограничиваться лишь пределами Т-клеточного дефекта иммунной системы. Следовательно, наши дальнейшие исследования были направлены на выявление возможных функциональных и структурных дефектов со стороны лимфоорганов, обеспечивающих иммуноопосредованные механизмы регуляции воспалительного процесса. Серия данных экспериментов была направлена на исследование общей клеточности костного мозга (КМ) и состава костно-мозгового пунктата (КМП) у животных контрольной (АВ) и опытной (Ме+АВ) групп.

Через 1 сутки в динамике асептического воспаления в группах Ме+АВ и АВ установлено снижение от контроля общей клеточности костного мозга на 35,8% ( $p=0,0084$ ) и 41,7% ( $p=0,0454$ ) соответственно (табл. 3.8).

Через 7 суток у контрольных крыс с асептическим воспалением отмечалась тенденция к повышению клеточности костного мозга, а через 14 суток была полностью восстановлена. В группе Ме+АВ общая клеточность костного мозга в эти сроки исследования оставалось на прежнем низком уровне.

На следующем этапе была проведена оценка клеточного состава костномозгового пунктата (КМП) экспериментальных животных. КМП у

контрольных крыс был представлен умеренным количеством нейтрофильных (полинуклеарных) и эозинофильных гранулоцитов (рис. 3.12.).

Таблица 3.8 – Оценка общей клеточности костного мозга экспериментальных крыс со скипидар-индуцированным воспалением (общее содержание клеток в бедренной кости)

| Группы           | Ед.изм.       | Общая клеточность костного мозга |                     |               |                    |                |                     |
|------------------|---------------|----------------------------------|---------------------|---------------|--------------------|----------------|---------------------|
|                  |               | Через 1 сутки                    |                     | Через 7 суток |                    | Через 14 суток |                     |
|                  |               | М (СО)                           | p*                  | М (СО)        | p                  | М (СО)         | p                   |
| Контр.<br>(n=21) | млн.<br>кл/мг | 67,8 (15,5)                      | -                   | 67,8 (15,5)   | -                  | 67,8 (15,5)    | -                   |
| АВ<br>(n=10)     | млн.<br>кл/мг | 39,5 (24,9)                      | 0,0454 <sup>a</sup> | 53,7 (27,4)   | -                  | 72,6 (19,8)    | 0,0105 <sup>b</sup> |
| Ме+АВ<br>(n=10)  | млн.<br>кл/мг | 43,5 (20,8)                      | 0,0084 <sup>a</sup> | 43,6 (12,6)   | 0,004 <sup>a</sup> | 49,6 (11,2)    | 0,0006 <sup>a</sup> |

Примечание: \* p – по Mann-Whitney U-test достигнутый уровень статистической значимости по отношению: а – к контролю; b – к 7 суткам

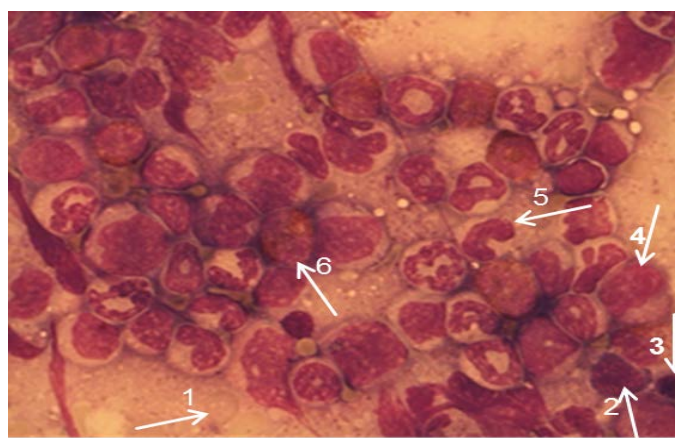


Рис. 3.12. Клеточный состав КМП контрольных животных

Пунктат костного мозга бедренной кости крысы окрашивали по Романовскому-Гимза. Увеличение  $\times 1000$ . Показан цитологический слайд из группы **Контроль**: 1 – эритроцит, 2 – лимфоцит, 3 – нормобласт, 4 – моноцит, 5 – нейтрофил палочкоядерный, 6 – эозинофил

У животных группы АВ в 1-е сутки исследования воспаление сопровождалось умеренным расширением гранулоцитарного и сужением эритроцитарного ростков кроветворения (рис. 3.13.-А).

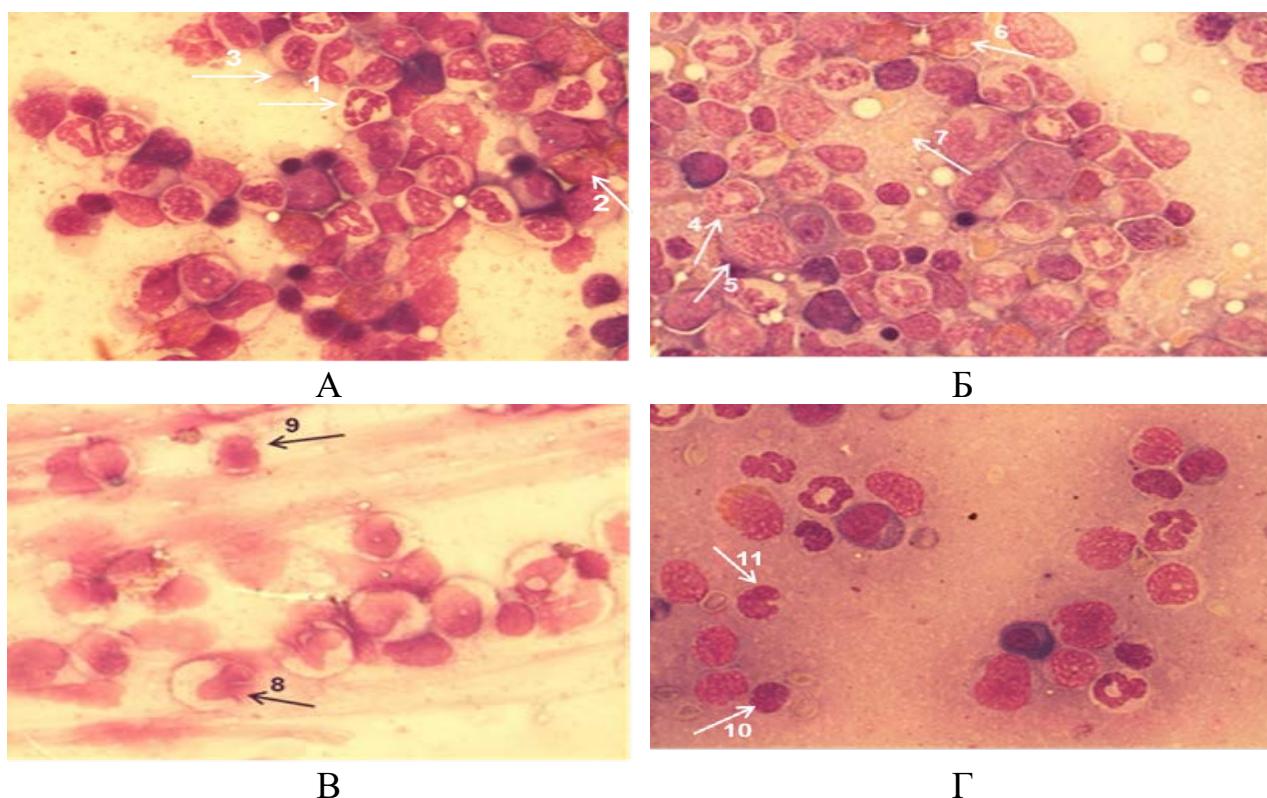


Рис. 3.13. Клеточный состав костного мозга экспериментальных животных со скипидар-индуцированным воспалением

Пунктат костного мозга бедренной кости крысы окрашивали по Романовскому-Гимза. Увеличение  $\times 1000$ . Показаны цитологические слайды для группы АВ: А - через 1 сутки после моделирования скипидар-индуцированного воспаления: клеточно-полиморфный КМП: 1 – гранулоцит (представлены умеренно), 2 – эозинофил (составляют 23,9% от гранулоцитарного состава), 3 - эритроцит (представлены умеренно); Б - через 14 суток после моделирования скипидар-индуцированного воспаления: КМП клеточный, полиморфный, расширение гранулоцитарно-моноцитарного ряда, умеренное расширение эритроидного: 4 - нейтрофил, 5 – моноцит, 6 – эозинофил, 7 – эритроцит; для группы Ме+АВ: В - через 1 сутки после моделирования скипидар-индуцированного воспаления: - КМП представлен дегенеративно измененными клетками: 8 – предположительно гранулоцит, 9 – предположительно лимфоцит; Г - через 14 суток после моделирования скипидар-индуцированного воспаления: скудный КМП, единичные зрелые и апоптотические клетки, остатки голых ядер: 10 - лимфоцит с признаками апоптоза, 11 - гранулоцит с признаками апоптоза.

В то же время, к этому сроку исследования в КМП животных группы Ме+АВ на фоне дегенеративно измененных клеток удалось

идентифицировать предположительно клетки миелоидного и лимфоидного происхождения. Эритроциты и мегакариоциты не встречались (рис. 3.13.-В).

В течение 7 суток изменений в клеточном составе КМП у крыс группы Me+AB не отмечалось. КМ крыс группы AB к этому сроку исследования пополнился сегментоядерными нейтрофилами, тогда как эритробластический росток - полихроматофильными нормоцитами.

К 14 суткам исследования в пунктате костного мозга у крыс группы AB отмечалась митотическая активность нейтрофилов и моноцитов (рис. 3.13.-Б). Однако, обращает на себя внимание тот факт, что за счет гематотоксического действия металлов в скудном пунктате костного мозга крыс группы Me+AB к этому сроку исследования встречались лишь единичные зрелые гранулоциты (рис. 3.13.-Г). В основном были идентифицированы лимфоциты и гранулоциты с признаками апоптоза и голые ядра.

На основании проведенных цитологических исследований костного мозга экспериментальных крыс группы Me+AB со скипидар-индуцированным воспалением заключено: после двухнедельной интоксикации метаванадатом аммония и дихроматом калия снижается клеточность костного мозга, встречаются дегенеративные изменения клеток миелоидного и лимфоидного происхождения с признаками апоптоза.

### **3.2.2. Оценка клеточности и структурных изменений тимуса экспериментальных животных с асептическим воспалением по результатам микроскопических и морфометрических исследований**

Инициация и поддержка иммунных реакций осуществляется в первичных лимфоидных органах и вторичных лимфоидных тканях. Функциональные отсеки первичных лимфоидных органов и Т-клеточные области вторичных имеют уникальную архитектуру и клеточный состав, который, как полагают [157], является необходимым условием для пролиферации Т-клеток костного

мозга. Так, молекулярные и клеточные ниши, коими являются пазухи костного мозга, фолликулы селезенки и лимфатических узлов, окружающие иммунные клетки, играют ключевую роль в регулировании Т-клеточного иммунитета.

К последствиям длительной интоксикации тяжелыми металлами относят их кумуляцию во внутренних органах, приводящую к функциональным и структурным нарушениям последних.

В литературе имеются сведения о структурно-функциональных нарушениях в органах иммунитета при токсических воздействиях на организм. М. Р. Сапин и соавт., изучая структурные компоненты лимфоорганов крыс в ответ на воздействие токсических веществ, установили, что они существенно изменяют их клеточный состав [106]. Патогенез такого рода повреждений предусматривает несколько возможных путей. Как сообщает [292], тяжелые металлы, индуцируя пероксидацию липидов мембран, в том числе внутриклеточных органелл, взаимодействуют с компонентами клеток и вызывают повреждения ДНК. Подобного рода конформационные изменения способны модулировать клеточный цикл, приводя к канцерогенезу или апоптозу [281]. По другим сведениям активные формы кислорода (гидроксильные, пероксидные, супероксидные радикалы) играют ключевую роль в канцерогенности металлов и активации апоптоза [250, 245, 200, 285].

В нашем эксперименте была проведена оценка клеточности тимуса крыс экспериментальных групп Контроль, Me, AB и Me+AB (табл. 3.9).

Исследование клеточности тимуса через 1 сутки в группе Me выявило снижение массы тимуса на 34,6% ( $p=0,0001$ ) по сравнению с контрольной группой. 7-е сутки эксперимента в тимусе этих крыс сопровождались статистически значимым снижением клеточности на 18,2% ( $p=0,054$ ) от контрольного уровня. К 14-м суткам эксперимента масса и клеточность тимуса крыс группы Me возвращались к норме. Как через 1, так и 7 суток исследования в группе AB по показателям, оценивающим общую клеточность тимуса, статистически значимых отличий от контрольных значений не обнаружено. Напротив, в группе Me+AB по сравнению с группой AB через 1 сутки после

моделирования скипидар-индуцированного воспаления установлено статистически значимое снижение соотношения клеток тимуса к его массе на 36,4% ( $p=0,0062$ ).

Таблица 3.9 – Оценка общей клеточности тимуса экспериментальных крыс со скипидар-индуцированным воспалением, млн. кл./мг

| Показатели  | Серии, М (СО), (n=10)* |                           |                           |                             |
|---|------------------------|---------------------------|---------------------------|-----------------------------|
|   | Контроль               | Ме                        | АВ                        | Ме+АВ                       |
| Через 1 сутки**   |                        |                           |                           |                             |
| Масса   | 193,8 (42,9)           | 126,7 (16,6) <sup>a</sup> | 140,0 (40,0)              | 145,0 (88,9)                |
| Клетки  | 194,6 (65,3)           | 186,2 (52,1)              | 152,2 (47,6)              | 106,6 (73,8)                |
| Кл/М  | 1,0 (0,3)              | 1,5 (0,4)                 | 1,1 (0,1)                 | 0,7 (0,3) <sup>b</sup>      |
| Через 7 суток   |                        |                           |                           |                             |
| Масса   | 193,8 (42,9)           | 138,3 (52,7) <sup>a</sup> | 161,7 (32,5)              | 151,0 (34,1) <sup>a</sup>   |
| Клетки  | 194,6 (65,3)           | 159,1 (57,2) <sup>a</sup> | 219,1 (68,4)              | 132,8 (57,6) <sup>a,b</sup> |
| Кл/М  | 1,0 (0,3)              | 1,2 (0,4)                 | 1,4 (0,4)                 | 0,9 (0,4)                   |
| Через 14 суток  |                        |                           |                           |                             |
| Масса   | 193,8 (42,9)           | 173,3 (33,9)              | 148,3 (16,0) <sup>a</sup> | 176,7 (50,0)                |
| Клетки  | 194,6 (65,3)           | 191,8 (46,6)              | 249,1 (65,4) <sup>c</sup> | 203,0 (76,4) <sup>c</sup>   |
| Кл/М  | 1,0 (0,3)              | 1,1 (0,3)                 | 1,7 (0,3) <sup>a,c</sup>  | 1,2 (0,3) <sup>b,c</sup>    |
| Примечание: * М – среднее; СО – стандартное отклонение; p – по Манн-Whitney U-test достигнутый уровень статистической значимости по отношению: a – к контролю; b – к АВ; c – к 1 суткам |                        |                           |                           |                             |

Исследованиями, проведенными через 7 суток после моделирования скипидар-индуцированного воспаления в группе Ме+АВ, установлено снижение более чем на 30% ( $p \leq 0,05$ ) численности клеток тимуса от уровней Контроля и АВ.

Микроскопически (рис. 3.14.-А) в тимусе крыс группы АВ в этот срок исследования обнаружено утолщение коркового вещества, выявлена четкая граница с мозговым слоем.

Корковый слой представлен большим количеством лимфоцитов, мозговой слой более светлый, поскольку лимфоциты представлены меньшим количеством.



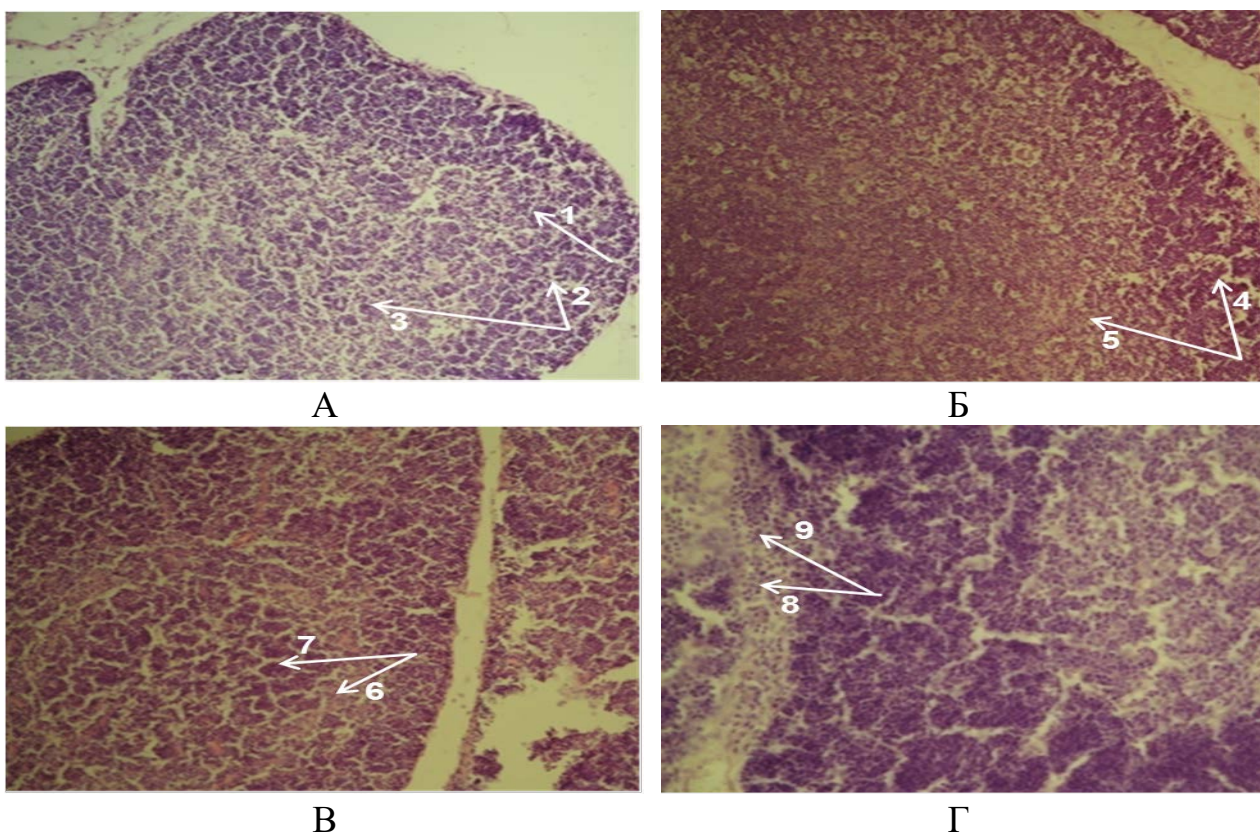


Рис. 3.14. Микроскопическая картина тимуса экспериментальных животных со скипидар-индуцированным воспалением

Ткань тимуса фиксировали в парафине и окрашивали по Ван Гизону и гематоксилин-эозином. Увеличение  $\times 100$ . Показаны гистологические слайды для группы АВ: А - через 7 суток после моделирования скипидар-индуцированного воспаления: широкое корковое вещество тимуса, четкая граница с мозговым слоем (1 – лимфоциты, 2 – корковый слой, 3 – мозговой слой); Б - через 14 суток после моделирования скипидар-индуцированного воспаления: расширение коркового вещества за счет мелких лимфоцитов. Мозговой слой неравномерной толщины (4 – корковый слой, 5 – мозговой слой); для группы Me+AB: В - через 7 суток после моделирования скипидар-индуцированного воспаления: мозговой слой темнее, чем корковый (инверсия окрашивания) 6 – корковый слой, 7 – мозговой слой (темнее); Г - через 14 суток после моделирования скипидар-индуцированного воспаления: количество лимфоцитов в мозговом слое больше, чем в корковом (инверсия слоев) (8 – мозговой слой, 9 – множество лимфоцитов)

Встречались единичные и мелкие тельца вилочковой железы, напротив, ретикуло-эпителиоциты увеличены. Значение корково-мозгового индекса по результатам морфометрии тимуса крыс с АВ в этот срок исследования (7-е сутки) составило 1,64 (табл. 3.10).

Таблица 3.10 – Морфометрические параметры тимуса крыс с экспериментальным воспалением, вызванным на фоне интоксикации ВА и ДК, (M±m)

| Серии  | Ширина, мкм <sup>2</sup> |                         | Площадь, мкм <sup>2</sup> |              | КМИ (y.e.) |
|--|--------------------------|-------------------------|---------------------------|--------------|------------|
|  | КВ*                      | МВ                      | КВ                        | МВ           |            |
| Через 7 суток  |                          |                         |                           |              |            |
| АВ   | 82,6±6,1                 | 137,1±7,47              | 126912±42716              | 74925±23429  | 1,64±0,2   |
| Ме+АВ  | 102,5±8,2 <sup>a</sup>   | 205,3±13,6 <sup>a</sup> | 236631±55535              | 159331±49970 | 1,59±0,2   |
| Через 14 суток   |                          |                         |                           |              |            |
| АВ   | 83,6±7,96                | 106,3±13,4 <sup>b</sup> | 122556±44418              | 77287±38464  | 2,1±0,6    |
| Ме+АВ  | 81,4±3,8 <sup>b</sup>    | 187,0±9,1 <sup>a</sup>  | 176071±42087              | 131447±37659 | 1,57±0,3   |
| Примечание: а - $p \leq 0,05$ по отношению к АВ; b- к предыдущему сроку;<br>* КВ – корковое вещество; МВ – мозговое вещество |                          |                         |                           |              |            |

Микроскопически в тимусе крыс группы Ме+АВ через 7 суток по сравнению с АВ, напротив, выявлено истончение коркового вещества, за счет уменьшения лимфоцитов, что подтверждается меньшей интенсивностью его окрашивания по сравнению с мозговым (инверсия окрашивания) (см. рис. 3.14.-В) [26].

Между тем, морфометрическими исследованиями тимуса опытных крыс группы Ме+АВ было выявлено утолщение не только коркового, но и мозгового вещества на 24% и 50% соответственно по сравнению с группой АВ, а их площадь увеличивалась приблизительно в 2 раза (см. табл. 3.10). Но, при этом, КМИ оставался на уровне АВ.

Течение асептического воспаления в группе АВ (через 14 суток) сопровождалось статистически значимым нарастанием клеточности тимуса на 13,7% ( $p=0,0285$ ) по сравнению с 7 сутками, тогда как соотношение клеток к массе тимуса превышало контрольные значения на 70% ( $p=0,0047$ ) (см. табл. 3.9).

Микроскопически в этот срок исследования в группе АВ установлено умеренное расширение коркового вещества тимуса вследствие увеличения в нем мелких лимфоцитов (рис. 3.14.-Б). Несмотря на неравномерность толщины мозгового слоя, в нем обнаружено много лимфоцитов средней величины,

митотически делящиеся лимфоциты в основном в подкапсульной зоне и несколько слоев крупных телец вилочковой железы.

Морфометрически подтверждалось незначительное увеличение ширины коркового вещества тимуса. Между тем, по сравнению с предыдущим сроком исследования отмечалось статистически значимое уменьшение ширины мозгового вещества на 22,5%, что приводило к увеличению КМИ на 28% (см. табл. 3.10). Площадь коркового и мозгового вещества изменялась незначительно.

Таким образом, асептическое воспаление у крыс группы АВ сопровождалось нарастающим увеличением общей клеточности тимуса. В ответ на развитие асептического воспаления происходило расширение коркового вещества тимуса с увеличением содержания в них мелких и средних лимфоцитов, сужение мозгового вещества и увеличение КМИ. По мере угасания воспалительного процесса отмечались делимфатизация коркового вещества, в результате чего оно истончалось, расширение мозгового вещества за счет стромы и уменьшение КМИ [238, 22].

Для группы Me+AB 14 сутки исследования сопровождались статистически значимым повышением на 52,9% ( $p=0,0451$ ) общего количества клеток тимуса (см. табл. 3.9). Между тем, индекс «Кл/М», рассчитанный соотношением общей численности клеток тимуса к его массе, отставал от группы АВ на 29,4% ( $p=0,0184$ ).

Морфологически в тимусе крыс группы Me+AB обнаружено неравномерное утолщение коркового вещества по сравнению с предыдущим сроком (см. рис. 3.14.-Г). Мозговой слой расширен, за счет чего КМИ несколько снижался. Встречались дистрофически измененные тельца вилочковой железы и эпителиальные клетки. В кистозно измененных эпителиальных клетках отмечалось накопление макрофагов.

Морфометрическими исследованиями, проведенными через 14 суток, установлено уменьшение ширины и площади коркового вещества

ответственно на 20,6% и 25,6% (см. табл. 3.9). По сравнению с предыдущим сроком исследования корково-медуллярный индекс незначительно снижался.

Таким образом, комплексом проведенных морфологических и морфометрических исследований лимфоорганов экспериментальных животных установлены структурные изменения тимуса крыс с асептическим воспалением, вызванным на фоне предварительной интоксикации солями ванадия и хрома [22, 103]. В динамике течения асептического воспаления отмечались прогрессирующее снижение клеточности тимуса, делимфатизация коркового слоя, расширение мозгового вещества с преобладанием в нем телец Гассалья с кистозными формами, дистрофически измененных малодифференцированных лимфоцитов и истонченных эпителиоцитов.

Следует отметить, что функциональная активность тимуса зависит от ширины и площади коркового вещества тимуса, значение которого заключается в дифференцировке незрелых лимфоцитов. Исследованиями [87] показана ключевая роль эпителиоцитов тимуса, принимающих непосредственное участие в процессах дифференцировки Т-лимфоцитов. Поэтому, в экспериментальных работах по установлению особенностей формирования эпителиальных фолликулов и телец Гассалья в тимусе крыс, подвергавшихся воздействию различных токсикантов, была установлена тесная зависимость функции тимуса от скорости формирования эпителиальных фолликулов и их секреторной активности, процесс восстановления которых становится возможным только спустя несколько суток напряженной функции органа.

Ключевую роль в патогенезе иммунотоксического действия комплекса солей тяжелых металлов Мирзоев Э.Б. с соавт. (2005) [91] отводят повышению проницаемости плазматической мембраны тимоцитов за счет гиперпероксидации липидных мембран тимоцитов и внутриклеточному накоплению ионов  $Ca^{2+}$ , что, по сведениям Куценко [77] может способствовать активации эндонуклеаз и разрушению ДНК. Следствием таких разрушений в тимусе молодняка крупного рогатого скота являются уменьшение его

клеточности за счет снижения пролиферативной активности двойных позитивных тимоцитов и их последующей избыточной гибели [234].

### **3.2.3. Оценка клеточности и структурных изменений брыжеечных лимфатических узлов экспериментальных животных с асептическим воспалением по результатам цитологических и микроскопических исследований**

Лимфатические узлы относятся к периферическим органам иммуногенеза, которые выполняют в основном антигенраспознающую функцию. Результаты исследований по изучению общей клеточности брыжеечного лимфатического узла крыс с АВ, представлены в табл. 3.11.

Проведенными через 1 сутки после моделирования скипидар-индуцированного воспаления исследованиями установлено, что индекс Кл/М у крыс с АВ статистически значимо снижался на 30%, поскольку общая клеточность лимфатического узла у этих животных отставала от показателей контроля на 39%. Через 7 суток предстала совсем иная картина. Так, численность клеток лимфатического узла возрастала по сравнению с предыдущим сроком исследования в 2,1 раза ( $p=0,0039$ ), а индекс Кл/М, соответственно, возростал не только по отношению к 1 суткам, но и к контролю соответственно на 114,3% ( $p=0,0039$ ) и 50% ( $p=0,0015$ ).

Исследованиями, проведенными через 1 сутки после моделирования скипидар-индуцированного воспаления в группе Ме+АВ, установлены аналогичные группе АВ изменения в составе и массе лимфатического узла.

Однако через неделю индекс соотношения общей численности клеток к массе отставал от группы АВ на 33,3% ( $p=0,0023$ ), что явилось следствием снижения общей клеточности на 20,6% по сравнению со сравниваемой группой.

Таблица 3.11 – Оценка общей клеточности брыжеечных лимфатических узлов экспериментальных крыс со скипидар-индуцированным воспалением, млн. кл./мг

| Показ.   | Серии, М (СО), (n=10)* |              |     |              |   |             |                     |
|--|------------------------|--------------|-----|--------------|---|-------------|---------------------|
|  | Контроль               | Ме           | р** | АВ           | р   | Ме+АВ       | р                   |
| Через 1 сутки  |                        |              |     |              |   |             |                     |
| Масса  | 81,8 (34,1)            | 83,8 (24,5)  | -   | 73,2 (18,6)  | -   | 82,5 (51,2) | -                   |
| Клетки   | 83,3 (36,6)            | 99,0 (47,6)  | -   | 50,8 (14,3)  | -   | 62,0 (25,7) | -                   |
| Кл/М   | 1,0 (0,2)              | 1,1 (0,3)    | -   | 0,7 (0,2)    | 0,0113 <sup>a</sup>   | 0,8 (0,2)   | -                   |
| Через 7 суток  |                        |              |     |              |   |             |                     |
| Масса  | 81,8 (34,1)            | 66,7 (32,1)  | -   | 71,7 (21,4)  | -   | 85,4 (19,5) | -                   |
| Клетки   | 83,3 (36,6)            | 76,6 (38,9)  | -   | 105,0 (22,5) | 0,0039 <sup>c</sup>   | 83,4 (24,6) | -                   |
| Кл/М   | 1,0 (0,2)              | 1,1 (0,1)    | -   | 1,5 (0,2)    | 0,0015 <sup>a</sup><br>0,0039 <sup>c</sup>                        | 1,0 (0,3)   | 0,0023 <sup>b</sup> |
| Через 14 суток   |                        |              |     |              |   |             |                     |
| Масса  | 81,8 (34,1)            | 87,5 (17,1)  | -   | 66,7 (15,1)  | -   | 92,0 (16,4) | 0,0285 <sup>b</sup> |
| Клетки   | 83,3 (36,6)            | 108,4 (37,2) | -   | 79,6 (15,0)  | 0,0163 <sup>c</sup><br>0,0374 <sup>d</sup>                        | 90,0 (22,2) | -                   |
| Кл/М   | 1,0 (0,2)              | 1,2 (0,2)    | -   | 1,2 (0,1)    | 0,0392 <sup>a</sup><br>0,0039 <sup>c</sup><br>0,0104 <sup>d</sup> | 1,0 (0,3)   | -                   |
| Примечание: * М – среднее; СО – стандартное отклонение; ** р – по Mann-Whitney U-test достигнутый уровень статистической значимости по отношению: а – к контролю; b – к АВ; с – к 1 суткам |                        |              |     |              |   |             |                     |

С целью определения исходного клеточного состава нами были проведены цитологические исследования пунктатов лимфатических узлов контрольных крыс (рис. 3.15.). В пунктате брыжеечного лимфатического узла контрольных крыс основная масса клеток (97%) была представлена лимфоцитами. Пролимфоциты представляли 3%, остальные единичные клетки идентифицированы как гистиоциты, плазматические и ретикулярные клетки.

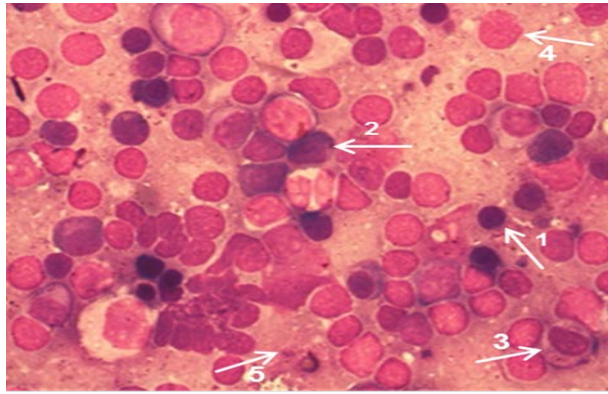


Рис. 3.15. Клеточный состав брыжеечного лимфатического узла контрольных ЖИВОТНЫХ

Пунктат лимфатического узла окрашивали по Романовскому-Гимза. Увеличение  $\times 1000$ . Показан цитологический слайд из группы **Контроль**: в пунктате в основном зрелые лимфоциты (1 – лимфоцит, 2 – пролимфоцит, 3 – плазматическая клетка, 4 – гистиоцит, 5 – ретикулярная клетка)

У крыс с АВ через 7 суток в пунктате брыжеечного лимфатического узла установлено увеличение молодых форм лимфоцитов на фоне незначительного снижения зрелых (рис. 3.16.-А) [23].

Напротив, в группе Me+AB через 7 суток в пунктате брыжеечных лимфатических узлов подсчитано лишь около 50% зрелых клеток, тогда как у остальных клеток (до 60%) – голые ядра, встречались лишь единичные клетки, идентифицированные как гистиоциты и эозинофилы (рис. 3.16.-В).

Подсчет численности клеток лимфатического узла у крыс с АВ, проведенный через 14 суток, показал снижение клеточности лимфатического узла по отношению к его массе, что приводило к снижению индекса Кл/М на 20% ( $p=0,0039$ ) (см. табл. 3.10). Однако значение этого индекса на столько же превышало показатели контроля ( $p=0,0392$ ).

Цитологически в этот срок исследования было установлено снижение зрелых лимфоцитов на 40-50% , тогда как остальная масса клеток на 50-60% была представлена голыми ядрами (рис. 3.16.-Б). В пунктате появились единичные гистиоциты и эозинофилы.

При оценке клеточности лимфатических узлов крыс группы Me+AB через 14 суток было установлено нарастание их массы на 40% ( $p=0,0285$ ). Однако индекс Кл/М оставался на прежнем уровне (см. табл. 3.11).

Цитологическая картина пунктата брыжеечного лимфатического узла оказалась аналогичной предыдущим исследованиям (рис. 3.16.-Г). Через 14 суток в паракортикальной зоне количество лимфоцитов уменьшалось.

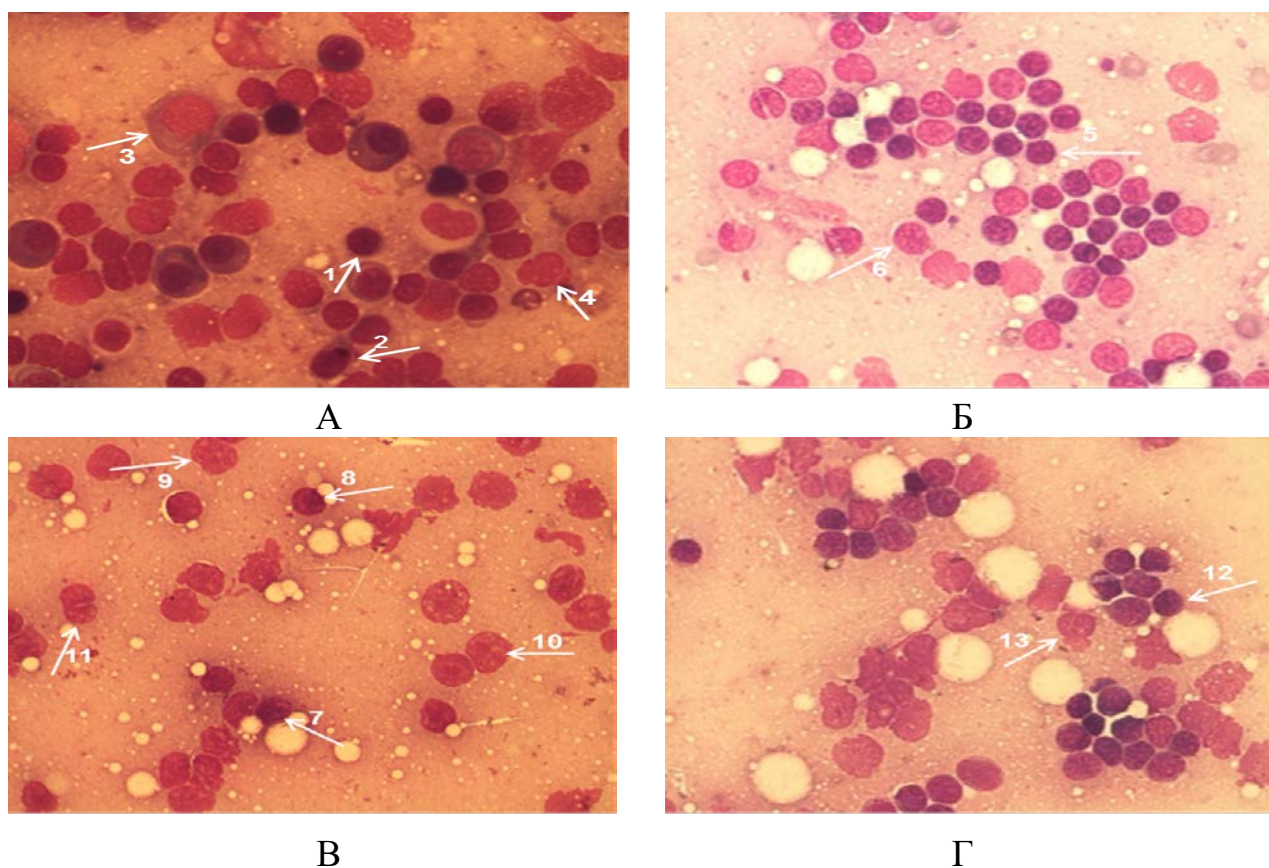


Рис. 3.16. Клеточный состав брыжеечного лимфатического узла у экспериментальных крыс со скипидар-индуцированным воспалением

Пунктат лимфатического узла окрашивали по Романовскому-Гимза. Увеличение  $\times 1000$ . Показаны цитологические слайды для группы AB: А - через 7 суток после моделирования скипидар-индуцированного воспаления: в пунктате незначительное снижение зрелых лимфоцитов, увеличение плазматических клеток (1 – лимфоцит, 2 – пролимфоцит, 3 – плазматическая клетка, 4 - гистиоцит); Б - через 14 суток после моделирования скипидар-индуцированного воспаления: в пунктате лимфатического узла встречаются как лимфоциты, так и их голые ядра (5 – лимфоцит, 6 – голое ядро); для группы Me+AB: В - через 7 суток после моделирования скипидар-индуцированного воспаления: в пунктате в



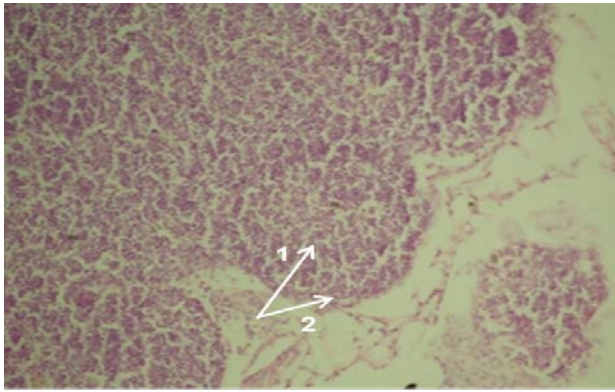
*основном голые ядра лимфоцитов (7– лимфоцит, 8– пролимфоцит, 9 – эозинофил, 10 – гистиоцит, 11 - голые ядра); Г - через 14 суток после моделирования скипидар-индуцированного воспаления: в пунктате лимфатического узла встречаются как лимфоциты, так и их голые ядра (12 – лимфоцит, 13 – голое ядро)*

Аналогичные изменения обнаружены в работе [209], где у молодняка крупного рогатого скота под влиянием экотоксикантов установлено уменьшение клеточности лимфатических узлов за счет апоптоза Т- и В-лимфоцитов.

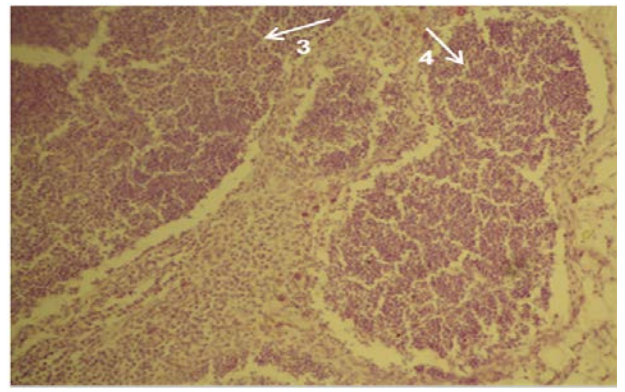
Микроскопическими исследованиями брыжеечного лимфатического узла крыс группы АВ, проведенными через 7 суток после введения скипидара, установлено, полнокровие сосудов, утолщение коркового слоя в брыжеечных лимфатических узлах. Субкапсулярная и паракортикальная зоны были гиперплазированы. Крупные фолликулы с герминативными центрами появлялись в субкапсулярной зоне. В паракортикальной зоне обнаружено много средних размеров лимфоцитов.

Микроскопически через 7 суток в лимфатических узлах крыс группы Me+AB обнаруживалась выраженная гиперплазия лимфоидной ткани (рис. 3.17.-Б).

В В-зависимой субкапсулярной зоне образовывались крупные лимфоидные фолликулы с герминативными центрами. Общая площадь коркового слоя была увеличена, сосуды мозгового слоя оказались расширены и полнокровны. Через 14 суток у крыс с АВ отмечались гиперплазия лимфатических узлов и формирование вторичных фолликул в субкапсулярной зоне (рис. 3.17.-А). Сосуды полнокровны, мозговой слой отечен. Большие скопления лимфобластов и плазмобластов обнаружены в медуллярных тяжах лимфатического узла, что свидетельствовало об активации В-лимфоцитарных зон. В то же время, паракортикальная зона оставалась без изменений, за счет чего снижался корково-медуллярный индекс [22].



А



Б

Рис. 3.17. Микроскопическая картина брыжеечного лимфатического узла у экспериментальных крыс со скипидар-индуцированным воспалением

Ткань лимфатического узла фиксировали в парафине и окрашивали по Ван Гизону и гематоксилин-эозином. Увеличение  $\times 100$ . Показаны гистологические слайды для группы АВ: А - через 14 суток после моделирования скипидар-индуцированного воспаления: микроскопическая картина представлена образованием вторичных фолликулов в субкапсулярной зоне (1 – фолликул, 2 – субкапсулярная зона); для группы Me+AB: Б - через 7 суток после моделирования скипидар-индуцированного воспаления: в субкапсулярной зоне образовывались крупные лимфоидные фолликулы. Площадь коркового слоя увеличена (3 – корковый слой, 4 - лимфоидный фолликул)

Резюмируя полученные результаты исследований, следует отметить, что вследствие сильного антигенного раздражения, исходившего из очага воспаления, изменения в брыжеечных лимфатических узлах крыс группы АВ проявлялись утолщением паракортикальной (тимусзависимой) зоны, увеличением в медуллярных тяжах лимфоцитов, лимфобластов, плазмобластов и эозинофилов. Общая численность клеток лимфатического узла максимально повышалась через 7 суток, тогда как к 14 суткам исследования имела тенденцию к снижению. Аналогичные изменения наблюдались и при цитологическом исследовании пунктатов брыжеечных лимфатических узлов, где в клеточном составе в эти сроки исследования отмечалось преобладание молодых форм лимфоцитов. К концу эксперимента в брыжеечных лимфатических узлах на фоне преобладающего числа зрелых лимфоцитов в медуллярных тяжах увеличивалось количество макрофагов [22].

Таким образом, течение асептического воспаления у крыс группы АВ имело тенденцию классического развития соответственно срокам исследования.

В результате воздействия скипидара в брыжеечных лимфатических узлах крыс группы Me+AB в начале эксперимента отмечалось снижение кортико-медуллярного индекса за счет гиперплазии субкапсулярной (тимуснезависимой) зоны. Гиперплазия паракортикальной (тимусзависимой) зоны впоследствии сменялась истощением и снижением кортико-медуллярного индекса, хотя признаки гиперплазии еще сохранялись. При этом установлено увеличение массы лимфатических узлов к клеточному содержанию, вследствие апоптоза почти половины лимфоцитов.

Резюмируя исследования, приведенные в данном разделе диссертации, мы пришли к выводу, что под влиянием солей ванадия и хрома снижается клеточность костного мозга, встречаются дегенеративные изменения клеток миелоидного и лимфоидного происхождения с признаками апоптоза. В тимусе отмечается прогрессирующее снижение клеточности тимуса, делимфатизация коркового слоя, расширение мозгового вещества с преобладанием в нем дистрофически измененных малодифференцированных лимфоцитов, истонченных эпителиоцитов и телец Гассалья с кистозными формами. В брыжеечных лимфатических узлах отмечаются гиперплазия субкапсулярной (тимуснезависимой) зоны и снижение кортико-медуллярного индекса паракортикальной (тимусзависимой) зоны с сохранением признаков гиперплазии, увеличение массы лимфатических узлов к клеточному содержанию вследствие разрушения почти половины всех лимфоцитов.

### **3.3. Экспериментальная оценка регенеративного потенциала МХФ-2 и рувимины по результатам микроскопической картины асептической раны и иммунологических показателей крови крыс с асептическим воспалением, вызванным на фоне отравления солями ванадия и хрома**

#### **3.3.1. Экспериментальная оценка регенеративного потенциала МХФ-2 и рувимины по результатам микроскопической картины асептической раны крыс с асептическим воспалением, вызванным на фоне отравления солями ванадия и хрома**

Выявленные в ходе экспериментального исследования иммунологические нарушения представляли собой прототипы хронического воспаления. Ключевым моментом в патогенезе воспаления, вызванного на фоне предварительной интоксикации ванадием и хромом, установлен дефект Т-клеточного звена иммунитета, а также нерегулируемое взаимодействие между клеточными системами врожденного и адаптивного звеньев иммунитета. Поэтому необходимо вести поиск новых способов патогенетической коррекции, нацеленных на устранение ванадий- и хроминдуцированных повреждений иммуноопосредованных механизмов регуляции воспаления и способных модулировать как врожденные, так и адаптивные иммунные ответы. [140].

В свете вышеизложенного, для патогенетической коррекции повреждений, выявленных после введения ВА и ДК и индукции скипидаром воспаления, в серии наших экспериментов крысам были применены в установленных дозировках (см. в разд. «Материалы и методы») вновь синтезированное химическое соединение МХФ-2, химический адаптоген рувимин и синтетический препарат полиоксидоний (ПО) в качестве препарата сравнения.

После моделирования у экспериментальных животных скипидар-индуцированного воспаления и начала введения препаратов в установленные сроки наблюдали течение воспаления с визуальной и микроскопической оценкой асептической раны. Через сутки в группе АВ+ МХФ-2 после коррекции МХФ-2 визуально наблюдали припухлость в зоне введения скипидара без четких границ. При вскрытии в области введения скипидара был обнаружен дефект ткани с нечеткими границами с явлениями гиперемии и отека на границе со здоровой тканью. Гиперемированный участок размягченной ткани наблюдали и в группе сравнения (АВ+ПО).

Микроскопическая картина воспаления после коррекции МХФ-2 представлена на рис. 3.18. Так, на месте введения скипидара обнаружен некротический очаг с полной деструкцией и отеком мягких тканей. Через 7 суток при вскрытии обнаружена ткань плотной консистенции с четкими границами и с явлениями умеренной гиперемии. Микроскопическими исследованиями установлено, что воспалительный очаг частично замещался молодой соединительной тканью, с образованием зрелой коллагеновой ткани на месте очага воспаления (рис. 3.18.-А). Через 14 суток наблюдали картину заживления асептической раны. Место введения скипидара покрывалось корочкой без отделяемого. Микроскопически наблюдали формирование зрелой грануляционной ткани и сохранившиеся небольшие участки некроза (рис. 3.18.-Б).

Через 1 сутки после подкожного введения скипидара и коррекции рувином визуально наблюдали небольшую припухлость мягкой консистенции и нечеткими границами. Микроскопически обнаружены изменения в ткани с очагом воспаления, аналогичные группам животных без коррекции. Через 7 суток в группе АВ+Р наблюдали ограниченный очаг воспаления, с явлениями отека и гиперемии. Микроскопически установлено начало организации очага воспаления с рассасыванием экссудата и формированием тонкой соединительной ткани (рис. 3.18.-В). Через 14 суток) на месте введения скипидара пальпировалось небольшое уплотнение.

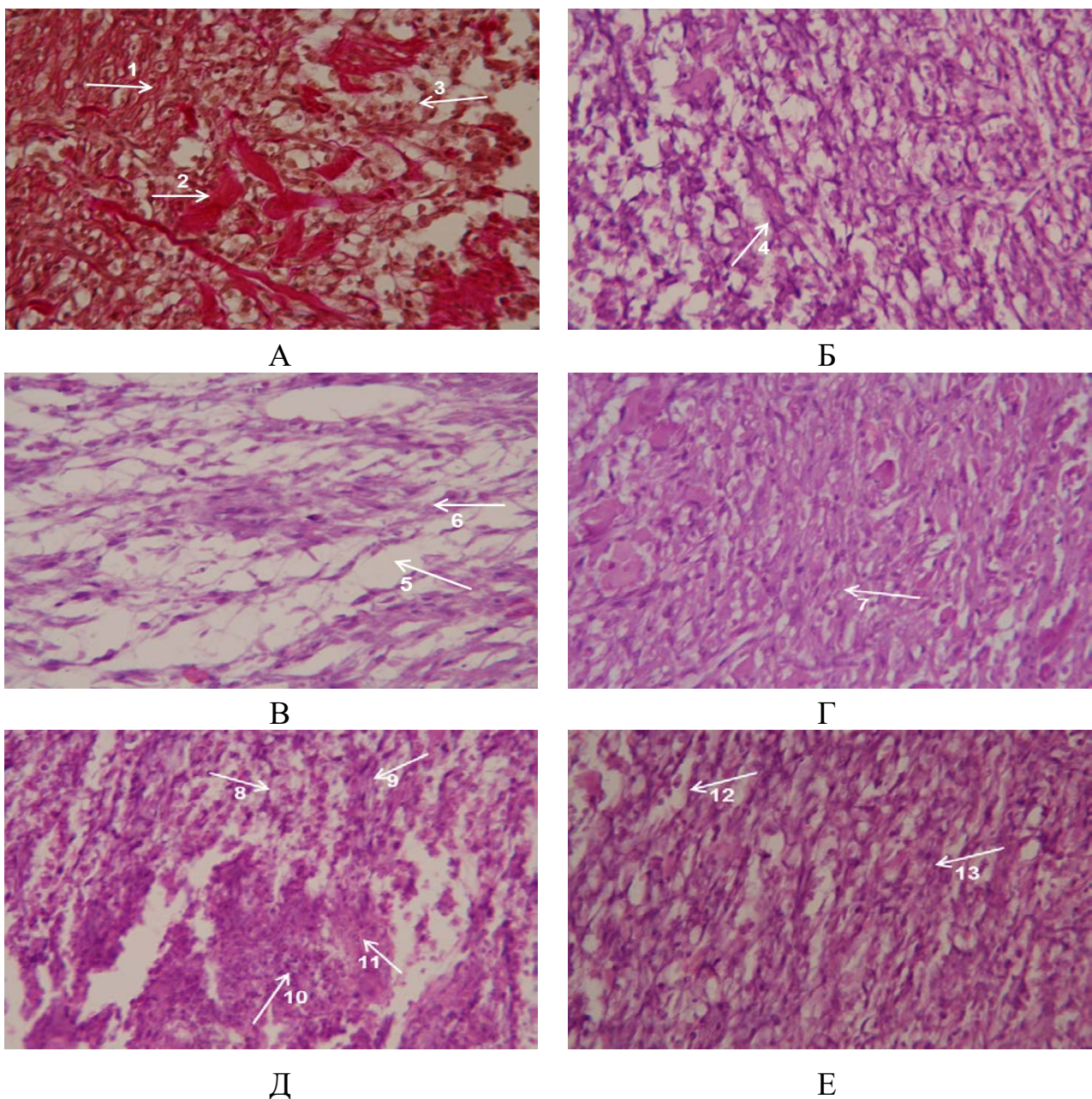


Рис. 3.18. Микроскопическая оценка течения воспаления после введения скипидара и коррекции МХФ-2, Рувимином в сравнении с ПО

Ткань воспаления фиксировали в парафине и окрашивали по Ван Гизону и гематоксилин-эозином. Увеличение  $\times 100$ ,  $\times 200$ . Показаны гистологические слайды для группы АВ+ МХФ-2: А - через 7 суток после начала эксперимента: вокруг очага некроза созревание грануляционной ткани (1 - созревание тонкой грануляционной ткани, 2 – грубая коллагеновая ткань, 3 – участки некроза); Б - через 14 суток после начала эксперимента: широкая зона грануляционной ткани (4 – сформировавшаяся грануляционная ткань); для группы АВ+Р: В - через 7 суток после начала эксперимента: начало организации очага воспаления (5 – рассасывание экссудата, 6 – созревание тонкой грануляционной ткани); Г - через 14 суток после начала эксперимента: широкая зона грануляционной ткани (7–

*формирование грануляционной ткани); для группы АВ+ПО: Д - через 7 суток после начала эксперимента: созревание грануляционной и фиброзной ткани (8 – созревание грануляционной ткани, 9 – фиброзная ткань, 10 – некроз, 11 – инфильтрация моноцитов ); Е - через 14 суток после начала эксперимента: остатки некротического очага замещены фиброзной тканью (12 –остатки некротической ткани, 13 – зрелая фиброзная ткань)*

При вскрытии обнаружена ткань бледно-розового цвета с небольшим участком уплотнения в центре, без отделяемого. Микроскопическими исследованиями установлено формирование соединительной ткани и зрелых коллагеновых волокон (рис. 3.18.-Г).

Через 1 сутки в группе АВ+ПО визуально наблюдалась небольшая четко ограниченная припухлость. Визуально под кожей определялся гиперемированный участок размягченной ткани. Микроскопически на границе с неизменными тканями отмечались участки деструкции ткани и экссудации, аналогичные изменениям в группах АВ и Me+AB.

Через 7 суток картина асептического воспаления полностью изменилась. При пальпации ощущалась незначительная припухлость с четкими границами. При вскрытии обнаружен плотной консистенции и умеренно гиперемированный участок ткани. Граничащая здоровая ткань имела бледно-розовый оттенок. Микроскопически отмечалось созревание грануляционной ткани с преобладанием фиброзной. В глубине раны оставались мелкие очаги некроза с распадом мягких тканей и лейкоцитарной инфильтрацией (рис. 3.18.-Д) [22].

Исследованиями, проведенными через 14 суток, установлено полное заживление раны без видимых признаков воспаления. При вскрытии обнаружено небольшое уплотнение мягкой консистенции и бледно-розового цвета, при надавливании без выделений. Микроскопически у крыс группы АВ+ПО на 14 сутки вокруг зоны некроза формировалась зрелая грануляционная и фиброзная ткань. (рис. 3.18.-Е).

Таким образом, под влиянием МХФ-2 и рувимина, также, как и ПО, с первых суток исследования существенно уменьшалась зона реактивного воспаления, вызванного скипидаром. В последующие сроки исследования очаги деструкции полностью замещались соединительной и фиброзной тканью. Вывод: эффективность МХФ-2 и рувимина сопоставима с ПО.

Предыдущими исследованиями установлено, что предварительная заправка металлами ухудшает течение скипидар-индуцированного воспаления у крыс группы Me+AB (опыт) по сравнению с животными группы AB. Клинически у опытных животных группы Опыт+МХФ-2 через 1 сутки на месте введения скипидара наблюдали появление припухлости без четких границ. Через 7 суток очаг воспаления заметно локализовался, отечность в зоне воспаления стала более выраженной, отмечалось местное повышение температуры и гиперемия. Клинические наблюдения за развитием очага воспаления у опытных крыс, проведенные в течение двух недель, показали, что к концу указанного периода в центре очага появлялся воспалительный экссудат. Прежние границы очага сохранялись.

Морфологическими исследованиями, проведенными через 1 сутки, выявлено отсутствие большого очага некроза и грануляционной ткани. Через 7 суток на гистологическом срезе отмечалось формирование очага воспаления с выраженным некрозом в центре (рис. 3.19.-А). Вокруг очага некроза развивалась грануляционная ткань, состоящая из мелких сосудов капиллярного типа, молодых элементов соединительной ткани, лимфоцитов, макрофагов. Через 14 суток очаг некроза также сохранялся, капсула вокруг некроза тонкая, организация очага воспаления только начиналась (рис. 3.19.-Б).

Таким образом, под влиянием МХФ-2 к концу 14 суток исследования установлена задержка созревания грануляционной ткани с сохранением незначительных воспалительных инфильтратов.

У животных группы Опыт+P, через 1 сутки после коррекции рувином гистологическая картина очага воспаления не имела существенных различий с



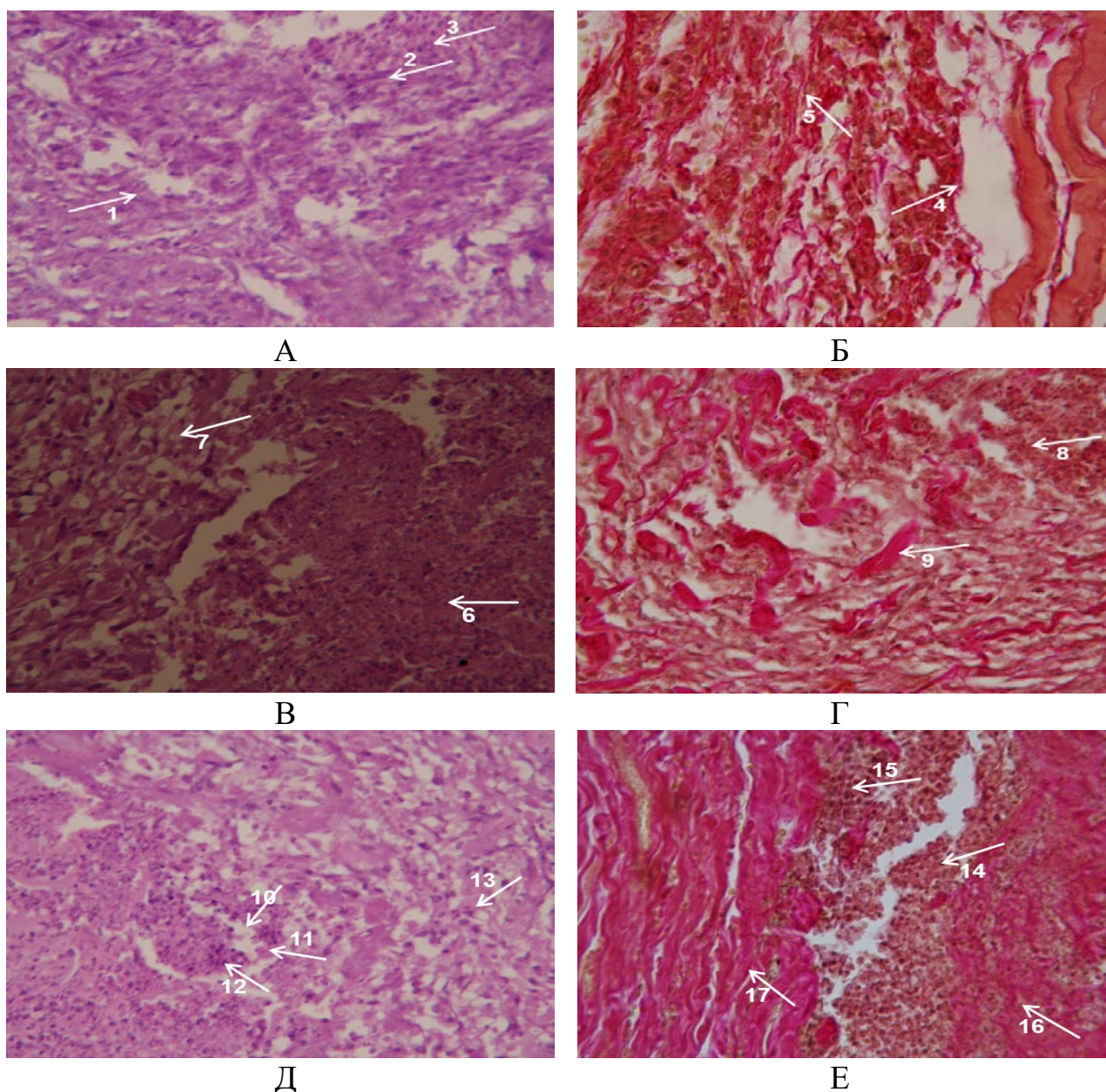


Рис. 3.19. Микроскопическая оценка течения воспаления, вызванного на фоне интоксикации ВА и ДК и коррекции МХФ-2, Рувимином в сравнении с ПО

Ткань воспаления фиксировали в парафине и окрашивали по Ван Гизону и гематоксилин-эозином. Увеличение  $\times 100$ ,  $\times 200$ . Показаны гистологические слайды для группы **Опыт+МХФ-2**: А - через 7 суток после начала эксперимента: начало организации очага воспаления с выраженным некрозом в центре (1 – очаг некроза, 2 – молодая соединительная ткань, 3 - лимфоциты); Б - через 14 суток после начала эксперимента: замещение очага некроза грануляционной тканью. Воспалительные инфильтраты сохранены (4 – капсула вокруг некроза, 5 – организация очага воспаления); для группы **Опыт+Р**: В - через 7 суток после начала эксперимента: широкая зона некроза, окруженная формирующейся грануляционной тканью (6 – очаг некроза, 7 – молодая соединительная ткань); Г - через 14

*суток после начала эксперимента: замещение очага некроза коллагеновой тканью (8 – участки некроза, 9 – коллагеновые волокна); для группы Опыт+ПО: Д - через 7 суток после начала эксперимента: накопление экссудата с примесью лейкоцитов в полости с некротическим детритом (10 – отек, 11 – распад ткани, 12 – лейкоциты, 13 – фибробласты); Е - через 14 суток после начала эксперимента: активное созревание грануляционной ткани (14 – очаг некроза, 15 – лимфо-гистиоциты, 16 – грануляционная ткань в фазе созревания, 17 – коллагеновые волокна)*

группами опытных животных, получавших ПО и МХФ-2. Через 7 суток клиническая картина воспаления представляла собой ограниченный участок уплотнения ткани мягкой консистенции. При вскрытии ткани воспаления обнаружен гиперемизированный участок ткани с отеком. Микроскопически обнаружена широкая зона некроза, по краям которой отмечалось формирование нежной грануляционной ткани (рис. 3.19.-В). Через 14 суток после коррекции рувимином рана покрывалась сухой корочкой, при пальпации без отделяемого, границы очага воспаления заметно сократились. Микроскопически установлено наличие очагов некроза, окруженного грубой коллагеновой тканью (рис. 3.19.-Г).

В группе Опыт+ПО через 1 сутки клинически на месте введения скипидара отмечалась небольшая припухлость. При микроскопическом исследовании материала в очаге введения скипидара обнаружена рана небольшого диаметра, зона некроза не имела четкой границы, без формирования очага воспаления. После недельной коррекции ПО развитие воспалительного процесса на месте введения скипидара заметно ускорилось.

Отмечалась четкая локализация воспалительного процесса с явлениями экссудации. Микроскопически в этот срок исследования в центре раны формировалась полость с накоплением экссудата с примесью лейкоцитов, вокруг которой имелся некротический детрит, состоящий из распавшихся тканевых масс, из осколков клеток с участками кариолизиса, кариорексиса, зона последнего была шире, чем в группе без коррекции (рис. 3.19.-Д). На границе с некрозом было обнаружено мало клеточной инфильтрации,

превалировали фибробласты и гистиоциты. Вал грануляционной ткани вокруг раны был уже, чем у нелеченных животных. В составе грануляционной ткани было много тонкостенных сосудов капиллярного типа, между капиллярами обнаружены молодые фибробласты, гистиоцитарные и моноцитарные клетки. Окружающая фиброзно-мышечная зона была инфильтрирована эозинофильными лейкоцитами.

Клинически через 14 суток при пальпации отмечалась незначительная припухлость. В области введения скипидара отмечались небольшие очаги некроза. Вокруг некроза грануляционная ткань находилась в фазе созревания. Среди грануляционной ткани было много фибробластов и фиброцитов, плавно переходящих в тонкие коллагеновые волокна. Вокруг очага созревающего воспаления имелись лимфо-гистиоцитарные инфильтраты. (рис. 3.19.-Е).

Из вышеизложенного заключено, что под влиянием МХФ-2 и рувирина к 14 сроку исследования отмечается формирование начальных элементов организации грануляционной ткани с сохранением мелких очагов некроза, тогда как под влиянием полиоксидония по сравнению с нелечеными животными улучшается локализация воспалительного процесса, ускоряется заживление раны за счет быстрого замещения зоны некроза грануляционной тканью, из чего сделан вывод: регенеративная эффективность МХФ-2 и рувирина по сравнению с полиоксидонием менее интенсивна.

Полуколичественную оценку морфогенеза асептической раны проводили с целью характеристики степени тяжести стерильного воспаления у опытных животных групп после коррекции препаратами. Оценка проводили по размерам некротического очага, интенсивности отека мягких тканей, лейкоцитарной инфильтрации, формированию грануляционной ткани (табл.3.12).

Таблица 3.12 - Патологические показатели в тканях кожного покрова животных со стерильным воспалением на фоне воздействия ванадия и хрома и коррекции МХФ-2, рувимином и полиоксидонием

| Группы,<br>n = 6 | Патологические показатели |                          |                               |   |
|------------------|---------------------------|--------------------------|-------------------------------|---|
|                  | Некротич.<br>очаг         | Отек<br>мягких<br>тканей | Лейкоцитарная<br>инфильтрация | Формирование<br>грануляционной<br>ткани |
| (min-max)        |                           |                          |                               |   |
| через 1 сутки*   |                           |                          |                               |   |
| Me+AB (опыт)     | (3-3)                     | (3-3)                    | (0-1)                         | (0-0)                                   |
| Опыт+ПО          | (2-3)                     | (2-3)                    | (1-2)                         | (0-0)                                   |
| Опыт +МХФ-2      | (2-3)                     | (2-3)                    | (1-2)                         | (0-0)                                   |
| Опыт +P          | (2-3)                     | (2-3)                    | (1-2)                         | (0-0)                                   |
| через 7 суток    |                           |                          |                               |   |
| Me+AB            | (2-3)                     | (2-3)                    | (1-2)                         | (0-1)                                   |
| Опыт +ПО         | (1-2)+++                  | (1-2)+++                 | (2-3)+++                      | (2-3)+++                                |
| Опыт +МХФ-2      | (1-2)+++                  | (1-2)+++                 | (2-3)+++                      | (2-2)+++                                |
| Опыт +P          | (1-2)+++                  | (1-2)+++                 | (2-3)+++                      | (1-2)+++**                              |
| через 14 суток   |                           |                          |                               |   |
| Me+AB            | (2-3)                     | (1-2)                    | (2-3)                         | (1-2)                                   |
| Опыт +ПО         | (0-1)+++                  | (0-1)+++                 | (2-3)                         | (2-3)+++                                |
| Опыт +МХФ-2      | (1-2)+++**                | (0-1)+++                 | (2-3)                         | (2-3)+++                                |
| Опыт +P          | (1-2)+++**                | (0-1)+++                 | (2-3)                         | (2-3)+++                                |

Примечание: \* - статистические различия между Me+AB и остальными группами: +++, p <0,05; между Me+AB+ПО и остальными группами: \*\*, p <0,05. В скобках помещены минимально-максимальные патологические значения каждой группы.

Проведенная полуколичественная оценка морфогенеза асептической раны показала улучшение морфологических характеристик асептической раны под влиянием препаратов уже через 7 суток коррекции. Предварительная инкубация металлами значительно расширяла зону повреждения, вызванного скипидаром. Под влиянием препаратов размеры некротического очага и отек снижались по сравнению с группой Me+AB, тогда как в очаге воспаления усиливались лейкоцитарная инфильтрация и процессы формирования грануляционной ткани (p<0,05).

Сравнение регенераторной эффективности препаратов показало, что рувимин менее эффективно, чем МХФ-2 и полиоксидоний стимулировал

формирование грануляционной ткани на 7 сутки коррекции ( $p < 0,05$ ). Через 14 суток МХФ-2 и рувимин менее интенсивно, чем полиоксидоний уменьшали размеры воспалительных инфильтратов ( $p < 0,05$ ).

Таким образом, регенераторную эффективность препаратов можно представить в следующей последовательности: полиоксидоний → МХФ-2 → рувимин.

### **3.3.2. Оценка эффективности патогенетической коррекции при помощи МХФ-2 и рувимина показателей врожденного и адаптивного иммунитета у экспериментальных крыс с асептическим воспалением**

Табл. 3.13 содержит результаты основных гематологических показателей крови крыс с асептическим воспалением, получавшим препараты и МХФ-2. Коррекция препаратами и МХФ-2 в течение суток не приводила к восстановлению клеточного состава крови. Содержание общих лейкоцитов и всех фракций оставалось на статистически значимо низком уровне по сравнению с нелеченной группой животных.

Через 7 суток под влиянием препаратов и МХФ-2 отмечались существенные сдвиги гематологических показателей крови по сравнению с крысами с АВ без коррекции. Так, под влиянием МХФ-2 показатели крови превышали аналогичные показатели нелеченных особей по содержанию лейкоцитов на 54,4 ( $p = 0,0028$ ) и лимфоцитов на 82% ( $p = 0,0012$ ). Несмотря на незначительное увеличение ИИР (на 28%), показатели ЛИ повышались в 2 раза.

Пероральное введение рувимина более чем на 50% повышало абсолютное содержание лимфоцитов и сегментоядерных нейтрофилов. Однако ИИР и ЛИ оставались на уровне нелеченных крыс.

Таблица 3.13 - Показатели крови крыс с асептическим воспалением на фоне коррекции МХФ-2 и рувимином

| Показатели       | Ед. изм.             | Серии, М (СО), (n=10)* |                             |                               |                               |
|------------------|----------------------|------------------------|-----------------------------|-------------------------------|-------------------------------|
|                  |                      | АВ                     | АВ+ПО**                     | АВ+МХФ-2                      | АВ+Р                          |
| Через 1 сутки*** |                      |                        |                             |                               |                               |
| Лейкоциты        | x10 <sup>3</sup> /μL | 2,7 (0,5)              | 2,0 (0,4) <sup>a</sup>      | 1,9 (0,3) <sup>a</sup>        | 2,1 (0,3) <sup>a</sup>        |
| Эритроциты       | x10 <sup>6</sup> /μL | 6,8 (0,7)              | 7,0 (0,6)                   | 7,0 (0,8)                     | 6,7 (0,6)                     |
| Гемоглобин       | g/L                  | 140,0 (15,0)           | 132 (14,0)                  | 137 (13,0)                    | 127 (7,0)                     |
| Нейтрофилы       | x10 <sup>3</sup> /μL | 0,8 (0,2)              | 0,5 (0,1) <sup>a</sup>      | 0,5 (0,1) <sup>a</sup>        | 0,6 (0,1) <sup>a</sup>        |
|                  | %                    | 29,1 (6,0)             | 24,1 (3,4) <sup>a</sup>     | 24,0 (5,7) <sup>a</sup>       | 27,7 (5,1)                    |
| Лимфоциты        | x10 <sup>3</sup> /μL | 0,02 (0,01)            | 0,04 (0,03)                 | 0,04 (0,03)                   | 0,01 (0,01) <sup>d</sup>      |
|                  | %                    | 0,6 (0,7)              | 1,9 (1,4) <sup>a</sup>      | 1,8 (1,7)                     | 0,7 (0,7) <sup>d</sup>        |
| Моноциты         | x10 <sup>3</sup> /μL | 0,06 (0,03)            | 0,04 (0,02)                 | 0,04 (0,02) <sup>a</sup>      | 0,1 (0)                       |
|                  | %                    | 2,4 (1,1)              | 2,1 (1,0)                   | 2,0 (0,9)                     | 3,0 (2,2)                     |
| Эозинофилы       | x10 <sup>3</sup> /μL | 1,8 (0,4)              | 1,4 (0,3)                   | 1,3 (0,2) <sup>a</sup>        | 1,4 (0,2) <sup>a</sup>        |
|                  | %                    | 65,8 (6,5)             | 69,9 (3,0)                  | 67,7 (5,6)                    | 65,7 (4,9) <sup>d</sup>       |
| ИИР              | у.е.                 | 27,7                   | 34,2                        | 34,8                          | 22,1                          |
| ЛИ               | у.е.                 | 2,1                    | 2,7                         | 2,4                           | 2,1                           |
| Через 7 суток    |                      |                        |                             |                               |                               |
| Лейкоциты        | x10 <sup>3</sup> /μL | 5,7 (1,1)              | 12,5 (1,7) <sup>a,b</sup>   | 8,8 (1,8)                     | 8,8 (1,2) <sup>a,b,d</sup>    |
| Эритроциты       | x10 <sup>6</sup> /μL | 7,7 (0,6)              | 8,1 (0,6) <sup>b</sup>      | 8,0 (0,4)                     | 7,1 (0,7) <sup>d,e</sup>      |
| Гемоглобин       | g/L                  | 139,0 (12,0)           | 141 (7,0) <sup>b</sup>      | 137 (8,0)                     | 132 (6,0) <sup>d</sup>        |
| Нейтрофилы       | x10 <sup>3</sup> /μL | 1,44 (0,34)            | 2,1 (0,6) <sup>a,b</sup>    | 1,2 (0,3)                     | 2,1 (0,7) <sup>a,b,e</sup>    |
|                  | %                    | 25,0 (3,3)             | 16,8 (4,8) <sup>a</sup>     | 14,1 (2,6) <sup>a,b</sup>     | 23,8 (6,3) <sup>d,e</sup>     |
| Лимфоциты        | x10 <sup>3</sup> /μL | 0,06 (0,05)            | 0,2 (0,1) <sup>a,b</sup>    | 0,2 (0,1) <sup>a,b</sup>      | 0,1 (0,1) <sup>d</sup>        |
|                  | %                    | 1,0 (0,8)              | 1,3 (0,8)                   | 1,9 (1,4)                     | 0,8 (0,8)                     |
| Моноциты         | x10 <sup>3</sup> /μL | 0,13 (0,05)            | 0,2 (0,2)                   | 0,2 (0,1) <sup>b</sup>        | 0,3 (0,2)                     |
|                  | %                    | 2,3 (0,8)              | 1,5 (1,2)                   | 2,1 (1,0)                     | 2,8 (2,0)                     |
| Эозинофилы       | x10 <sup>3</sup> /μL | 3,9 (0,7)              | 9,8 (1,4)                   | 7,1 (1,6) <sup>a,b,d</sup>    | 6,1 (0,7)                     |
|                  | %                    | 68,7 (3,2)             | 78,6 (6,3)                  | 79,7 (3,3) <sup>a,b</sup>     | 69,5 (5,9) <sup>d,e</sup>     |
| ИИР              | у.е.                 | 30,3                   | 53,3                        | 38,8                          | 25,1                          |
| ЛИ               | у.е.                 | 2,4                    | 4,2                         | 4,9                           | 2,6                           |
| Через 14 суток   |                      |                        |                             |                               |                               |
| Лейкоциты        | x10 <sup>3</sup> /μL | 7,7 (1,7) <sup>a</sup> | 10,1 (1,5) <sup>a,b,c</sup> | 12,5 (1,2) <sup>a,b,c,d</sup> | 14,4 (2,2) <sup>a,b,c,d</sup> |
| Эритроциты       | x10 <sup>6</sup> /μL | 8,1 (0,5)              | 8,4 (0,3) <sup>b</sup>      | 8,1 (0,3)                     | 8,1 (0,5) <sup>b,c</sup>      |
| Гемоглобин       | g/L                  | 140,0 (9,0)            | 147 (6,0) <sup>a,b</sup>    | 140 (6,0) <sup>a,b,d</sup>    | 141(5,0) <sup>a,b,c</sup>     |
| Нейтрофилы       | x10 <sup>3</sup> /μL | 1,7 (0,35)             | 1,9 (0,2) <sup>b</sup>      | 2,1 (0,5) <sup>b,c</sup>      | 2,7(0,5) <sup>a,b,d</sup>     |
|                  | %                    | 22,0 (3,0)             | 19,5 (3,0) <sup>b</sup>     | 16,8 (3,6) <sup>a,b</sup>     | 18,9 (5,2) <sup>b</sup>       |
| Лимфоциты        | x10 <sup>3</sup> /μL | 0,1 (0,06)             | 0,1 (0,06)                  | 0,1 (0,1)                     | 0,5 (0,2) <sup>a,b,c,d</sup>  |
|                  | %                    | 1,3 (0,9)              | 0,8 (0,4)                   | 0,8 (1,0)                     | 3,1 (1,2) <sup>a,b,c,d</sup>  |
| Моноциты         | x10 <sup>3</sup> /μL | 0,2 (0,05)             | 0,1 (0,1) <sup>b</sup>      | 0,2 (0,1) <sup>b,d</sup>      | 0,3 (0,2) <sup>a,b,d</sup>    |
|                  | %                    | 2,1 (0,7)              | 1,2 (0,6) <sup>a,b</sup>    | 1,5 (0,7)                     | 2,3 (1,3) <sup>d</sup>        |
| Эозинофилы       | x10 <sup>3</sup> /μL | 5,4 (1,3)              | 7,8 (1,4) <sup>a,b,c</sup>  | 9,5 (1,2) <sup>a,b,c,d</sup>  | 10,3 (2,1) <sup>a,b,c,d</sup> |
|                  | %                    | 69,7 (3,2)             | 76,4 (3,5) <sup>a,b</sup>   | 75,8 (5,3) <sup>a,b</sup>     | 70,8 (5,2) <sup>d</sup>       |
| ИИР              | у.е.                 | 33,8                   | 64,3                        | 51,1                          | 32,1                          |
| ЛИ               | у.е.                 | 2,6                    | 3,5                         | 3,5                           | 3,0                           |

Примечание: \* - М – среднее; СО – стандартное отклонение; \*\* - ПО – полиоксидоний; МХФ-2 – не является препаратом; Р – рувимин; \*\*\* - по Mann-Whitney U- test достигнутый уровень статистической значимости: а – к АВ; b – к 1 сут; с – к 7 сут; d - к ПО; e – к МХФ-2

Обращает на себя внимание тот факт, что содержание лейкоцитов и лимфоцитов под действием ПО в этот срок исследования повышалось на 42%-60% больше по сравнению с МХФ-2 и рувимином.

Максимальная эффективность МХФ-2 и рувимины отмечена через 14 суток. К этому сроку исследования. Под влиянием МХФ-2 и рувимины установлено превышение исходного уровня общих лейкоцитов на 62,3% ( $p=0,0019$ ) и 87% ( $p=0,0005$ ), палочкоядерных на 53,8% ( $p=0,0003$ ) и 79,5% ( $p=0,0036$ ), сегментоядерных на 23,5% и 58,8% ( $p=0,0015$ ), лимфоцитов на 75,9% ( $p=0,0019$ ) и 90,7% ( $p=0,0003$ ) соответственно. Под влиянием МХФ-2 показатели, характеризующие иммунологическую реактивность (ИИР и ЛИ), превышали исходный уровень на 51,1% и 34,6%. Между тем, под влиянием рувимины эти показатели оставались на уровне нелеченных особей. По-видимому, максимальная эффективность препарата проявляется в более поздние сроки, чем это было предусмотрено условиями эксперимента.

Эффективность ПО в сравнении с предыдущим сроком исследования заметно снижалась, что, по-видимому, свидетельствовало о нивелировании воспалительной реакции. Между тем, ИИР и ЛИ оставались на высоком уровне, в 1,9 и 1,3 раза превышая показатели нелеченных особей.

Таким образом, в нашем эксперименте наибольшее повышение содержания лейкоцитов и всех их фракций наблюдалось у крыс с АВ, получавших полиоксидоний и МХФ-2. Корректирующая активность этих препаратов объясняется положительным индуктивным эффектом, благодаря которому повышалась пролиферативная активность лимфоцитов и гранулоцитов. Рувимин оказался эффективен в последний срок исследования.

Табл. 3.14 содержит основные гематологические показатели крови крыс, затравленных ванадатом аммония и дихроматом калия и получавших препараты. Через 1 сутки после применения препаратов было установлено, что у опытных крыс, получавших МХФ-2 и рувимины, содержание эритроцитов крови на 12,8% статистически значимо отставало от контрольного уровня.

Таблица 3.14 - Показатели крови опытных крыс, затравленных Me на фоне коррекции полиоксидонием, МХФ-2 и рувимином

| Показатели*       | Ед. изм.             | Серии, М (СО), (n=10)** |                          |                            |                          |
|-------------------|----------------------|-------------------------|--------------------------|----------------------------|--------------------------|
|                   |                      | Me                      | Me+ПО***                 | Me+МХФ-2                   | Me+P                     |
| Через 1 сутки**** |                      |                         |                          |                            |                          |
| Лейкоциты         | x10 <sup>3</sup> /μL | 6,8 (2,9)               | 8,9 (2,7)                | 8,4 (1,8)                  | 7,2 (0,8) <sup>b</sup>   |
| Эритроциты        | x10 <sup>6</sup> /μL | 7,8 (0,5)               | 7,1 (0,7)                | 6,8 (0,8) <sup>a</sup>     | 6,8 (0,8) <sup>a</sup>   |
| Гемоглобин        | g/L                  | 125,7 (7,3)             | 130,3 (7,1)              | 128,4 (9,3)                | 125,9 (7,3)              |
| Нейтрофилы        | x10 <sup>3</sup> /μL | 2,5 (1,4)               | 2,7 (1,7)                | 3,6 (0,9)                  | 2,9 (0,7)                |
|                   | %                    | 35,5 (13,5)             | 28,6 (15,3)              | 43,4 (13,7)                | 40,1 (10,4)              |
| Лимфоциты         | x10 <sup>3</sup> /μL | 3,7 (1,6)               | 5,5 (1,8)                | 4,2 (1,6)                  | 3,6 (0,8) <sup>b</sup>   |
|                   | %                    | 55,9 (12,9)             | 63,4 (14,9)              | 48,9 (10,4)                | 49,3 (8,9)               |
| Моноциты          | x10 <sup>3</sup> /μL | 0,5 (0,3)               | 0,5 (0,3)                | 0,5 (0,3)                  | 0,6 (0,3)                |
|                   | %                    | 7,0 (2,8)               | 5,7 (2,1)                | 6,0 (3,6)                  | 8,0 (3,6)                |
| Эозинофилы        | x10 <sup>3</sup> /μL | 0,1 (0,1)               | 0,2 (0,1)                | 0,1 (0,1)                  | 0,2 (0,1)                |
|                   | %                    | 1,6 (1,1)               | 2,0 (0,9)                | 1,8 (0,9)                  | 2,3 (1,6)                |
| ИИР               | у.е.                 | 8,2                     | 11,5                     | 8,4                        | 6,4                      |
| ЛИ                | у.е.                 | 1,6                     | 2,2                      | 1,1                        | 1,2                      |
| Через 7 суток     |                      |                         |                          |                            |                          |
| Лейкоциты         | x10 <sup>3</sup> /μL | 6,5 (1,9)               | 9,0 (1,6) <sup>a</sup>   | 9,0 (1,8) <sup>a</sup>     | 8,1 (1,5) <sup>a</sup>   |
| Эритроциты        | x10 <sup>6</sup> /μL | 8,0 (0,5)               | 7,3 (1,1)                | 7,7 (0,8) <sup>c</sup>     | 7,8 (0,4) <sup>c</sup>   |
| Гемоглобин        | g/L                  | 122,4 (8,8)             | 127,5 (7,7)              | 135,4 (7,8) <sup>a</sup>   | 132,8 (7,3) <sup>a</sup> |
| Нейтрофилы        | x10 <sup>3</sup> /μL | 1,8 (0,9)               | 2,5 (0,6) <sup>a</sup>   | 3,1 (0,9) <sup>a</sup>     | 3,0 (0,7) <sup>a</sup>   |
|                   | %                    | 26,8 (8,4)              | 28,0 (4,4)               | 34,4 (8,3)                 | 37,7 (7,0) <sup>a</sup>  |
| Лимфоциты         | x10 <sup>3</sup> /μL | 4,1 (1,1)               | 6,1 (1,2) <sup>a</sup>   | 4,9 (1,5)                  | 4,6 (1,4)                |
|                   | %                    | 64,3 (7,6)              | 67,1 (5,9)               | 55,1 (14,6)                | 55,7 (9,0)               |
| Моноциты          | x10 <sup>3</sup> /μL | 0,4 (0,2)               | 0,3 (0,1)                | 0,3 (0,1)                  | 0,3 (0,1)                |
|                   | %                    | 6,6 (1,9)               | 3,7 (1,6) <sup>a</sup>   | 3,7 (1,6) <sup>a</sup>     | 4,3 (1,9)                |
| Эозинофилы        | x10 <sup>3</sup> /μL | 0,1 (0,1)               | 0,1 (0,1)                | 0,1 (0,1)                  | 0,2 (0,1)                |
|                   | %                    | 2,3 (1,3)               | 1,6 (1,3)                | 1,8 (1,5)                  | 2,4 (2,0)                |
| ИИР               | у.е.                 | 10,1                    | 18,6                     | 15,4                       | 13,5                     |
| ЛИ                | у.е.                 | 2,4                     | 2,4                      | 1,6                        | 1,5                      |
| Через 14 суток    |                      |                         |                          |                            |                          |
| Лейкоциты         | x10 <sup>3</sup> /μL | 7,0 (3,2)               | 9,8 (1,3)                | 8,6 (0,7)                  | 7,4 (1,4)                |
| Эритроциты        | x10 <sup>6</sup> /μL | 8,2 (0,3)               | 7,9 (0,2)                | 7,9 (0,9)                  | 7,5 (0,6)                |
| Гемоглобин        | g/L                  | 122,6(4,8)              | 135,0 (4,8) <sup>a</sup> | 140,8 (7,2) <sup>a,c</sup> | 133,3 (5,0) <sup>a</sup> |
| Нейтрофилы        | x10 <sup>3</sup> /μL | 1,5 (0,6)               | 2,4 (0,5) <sup>a</sup>   | 2,7 (0,2) <sup>a</sup>     | 2,6 (0,2) <sup>a</sup>   |
|                   | %                    | 22,6 (3,9)              | 24,6 (3,9)               | 31,6 (3,2) <sup>a</sup>    | 36,8 (6,6) <sup>a</sup>  |
| Лимфоциты         | x10 <sup>3</sup> /μL | 4,7 (2,3)               | 6,8 (1,1)                | 5,5 (0,6)                  | 4,3 (1,4) <sup>b</sup>   |
|                   | %                    | 66,9 (4,6)              | 69,3 (3,7)               | 63,1 (2,6)                 | 57,5 (8,1)               |
| Моноциты          | x10 <sup>3</sup> /μL | 0,5 (0,2)               | 0,4 (0,1)                | 0,3 (0,1)                  | 0,3 (0,1)                |
|                   | %                    | 7,3 (0,5)               | 4,4 (1,2)                | 3,5 (1,5) <sup>a</sup>     | 4,3 (2,1) <sup>a</sup>   |
| Эозинофилы        | x10 <sup>3</sup> /μL | 0,2 (0,1)               | 0,2 (0,1)                | 0,2 (0,1)                  | 0,2 (0,1)                |
|                   | %                    | 3,1 (1,9)               | 1,8 (0,9)                | 1,9 (1,3)                  | 2,3 (1,7)                |
| ИИР               | у.е.                 | 9,6                     | 16,2                     | 16,8                       | 13,9                     |
| ЛИ                | у.е.                 | 3,0                     | 2,8                      | 2,0                        | 1,6                      |

Примечание: \* - ИИР – индекс иммунореактивности ЛИ – лимф.индекс; \*\*М – среднее; СО – стандартное отклонение; \*\*\* - ПО – полиоксидоний; МХФ-2 – не является препаратом; P – рувимином; \*\*\*\* - по Mann-Whitney U-test достигнутый уровень стат.знач. по отношению: а–к опыту; б – к ПО; с – к 1 сут; д– к 7 сут



Рувимин не корригировал общее содержание лейкоцитов, а также абсолютное содержание лимфоцитов, значения которых отставали от показателей опытных крыс, корригированных ПО, на 19,1% ( $p=0,0240$ ) и 34,5% ( $p=0,0177$ ).

Существенные сдвиги гематологических показателей крови отмечались через 7 суток. Лейкоциты крови максимально восстанавливали ПО и МХФ-2 со статистически значимой разницей от нелеченных особей в 1,4 раза. Под влиянием ПО полностью восстановилась лимфоцитарная фракция крови.

Все препараты вызывали активацию нейтрофильной реакции крови. Так, абсолютное содержание нейтрофилов под влиянием МХФ-2 и рувимина превышало показатели опытных крыс без коррекции в 2 раза ( $p<0,05$ ), тогда как под влиянием ПО в 1,4 раза ( $p=0,0063$ ). ИИР нарастал под влиянием ПО на 84,2%, МХФ-2 на 52,5%, рувимина на 33,7%. Под влиянием ПО и МХФ-2 в следующий срок исследования ИИР продолжал нарастать.

Через 14 суток под влиянием ПО полностью восстановилось содержание лейкоцитов за счет лимфоцитов и нейтрофилов. Несмотря на напряжение нейтрофильной реакции крови, под влиянием МХФ-2 и рувимина пролиферативная активность лимфоцитов крови оказалась несущественной. Между тем, под влиянием МХФ-2 содержание гемоглобина вернулось к исходному уровню, тогда как под влиянием ПО и рувимина отмечалась лишь тенденция к восстановлению.

Соли тяжелых металлов повышают интенсивность липопероксидации в клетках, инициируя окислительный стресс. Следовательно, эффективность препаратов напрямую связана с их мембранопротекторной активностью. Среди исследованных препаратов наибольшей мембранопротекторной активностью обладал полиоксидоний, т.к. при его использовании содержание лейкоцитов вернулось к исходному уровню. Наиболее эффективным антианемическим действием обладал МХФ-2, о чем судили по восстановлению гемоглобина. По-видимому, механизм действия препарата связан с его способностью повышать оксидорезистентность эритроцитов.

Таким образом, корректирующая активность полиоксидония по сравнению с МХФ-2 и рувимином проявлялась с первых суток, достигая максимальной эффективности к концу эксперимента. МХФ-2 показал более эффективную антианемическую активность.

Согласно проведенного исследования, через 1 сутки под влиянием препаратов в группе Me+AB+препараты обнаружены более высокие показатели всех фракций лейкоцитов (табл. 3.15). Так, общее содержание лейкоцитов превышало уровень нелеченных крыс под влиянием МХФ-2 в 2,6 раза ( $p=0,0002$ ), рувимины в 3,9 раза ( $p=0,0002$ ), ПО в 1,5 раза ( $p=0,0494$ ). Лимфоциты (абс) в группах МХФ-2 и рувимины в 3-4 раза превышали показатели нелеченных животных, тогда как под влиянием полиоксидония колебались на уровне контроля. МХФ-2 и рувимины в 3 ( $p=0,014$ ) и 6 ( $p=0,0002$ ) раз повышали палочкоядерные и в 2,3 ( $p=0,0036$ ) и 3,1 ( $p=0,0002$ ) раза сегментоядерные нейтрофилы. Также под влиянием этих препаратов содержание моноцитов (абс) пополнилось до 0,1 и 0,16, тогда как статистически значимая разница от уровня нелеченных животных составила 100% и 220%. Между тем, под влиянием ПО и рувимины в отличие от контрольной и опытной групп без коррекции в 3,5 и 6 раз статистически значимо повышалась эозинофильная реакция крови. Несмотря на отсутствие значимости, ИИР в группах ПО и МХФ-2 превышали аналогичные значения нелеченных животных на 61,1% и 70,6%. Рувимины повышал ИИР от уровня опыта лишь на 33,9%. МХФ-2 и рувимины не корректировали ЛИ, тогда как ПО повысил его до контрольного уровня. Однако у всех групп животных констатировали анемию из-за низкого содержания эритроцитов и гемоглобина.

Таким образом, в первые сутки исследования дебютировали МХФ-2 и рувимины, продемонстрировавшие более высокие показатели лейкоцитов и их фракций. ПО продемонстрировал менее выраженный корректирующий эффект по отношению к моноцитам и гранулоцитам, за исключением эозинофилов.

Таблица 3.15 - Показатели крови крыс с асептическим воспалением на фоне интоксикации Ме и коррекции МХФ-2 и рувимином

| *Показатели       | Ед. изм.               | Серии, М (СО), (n=10)** |                            |                                |                               |                                    |
|-------------------|------------------------|-------------------------|----------------------------|--------------------------------|-------------------------------|------------------------------------|
|                   |                        | АВ                      | Ме+АВ,<br>(опыт)           | Опыт+ПО<br>***                 | Опыт+<br>МХФ-2                | Опыт+Р                             |
| Через 1 сутки**** |                        |                         |                            |                                |                               |                                    |
| Лейкоциты         | $\times 10^3/\mu$<br>L | 2,7 (0,5)               | 1,5 (0,3) <sup>a</sup>     | 2,3 (0,3) <sup>a,b</sup>       | 3,9 (1,7) <sup>a,b,c</sup>    | 5,9 (0,7) <sup>a,b,c,d</sup>       |
| Эритроциты        | $10^{12}/л$            | 6,8 (0,7)               | 5,8 (0,5) <sup>a</sup>     | 6,8 (0,8)                      | 6,4 (0,7) <sup>b</sup>        | 6,0 (0,5) <sup>a,c</sup>           |
| Гемоглобин        | g/L                    | 131,0 (6,0)             | 127,0 (6,0)                | 131,0 (15,0)                   | 125,0 (5,0) <sup>a</sup>      | 120,0 (5,0)<br><sub>a,b,c,d</sub>  |
| ПЯ                | %                      | 2,1 (1,1)               | 2,9 (1,0)                  | 4,1 (4,0)                      | 2,8 (1,5)                     | 3,8 (2,0)                          |
|                   | абс.                   | 0,06 (0,03)             | 0,04 (0,02)                | 0,1 (0,05) <sup>a</sup>        | 0,12 (0,1) <sup>a,b</sup>     | 0,23 (0,12) <sup>b,c,d</sup>       |
| СЯ                | %                      | 29,1 (6,0)              | 31,4 (7,3)                 | 26,2 (3,5)                     | 34,4 (8,6)                    | 31,8 (5,7)                         |
|                   | абс.                   | 0,8 (0,2)               | 0,6 (0,3) <sup>a</sup>     | 0,6 (0,1) <sup>a</sup>         | 1,4 (0,7) <sup>b,c</sup>      | 1,87 (0,3) <sup>b,c,d</sup>        |
| Моноциты          | %                      | 2,4 (1,1)               | 3,1 (1,2)                  | 2,3 (0,9)                      | 2,3 (1,3)                     | 2,6 (1,3)                          |
|                   | абс.                   | 0,06 (0,03)             | 0,05 (0,02)                | 0,05 (0,02) <sup>a</sup>       | 0,1 (0,0) <sup>a</sup>        | 0,16 (0,1) <sup>b,d</sup>          |
| Лимфоциты         | %                      | 65,8 (6,5)              | 61,6 (7,1)                 | 64,5 (5,1)                     | 60,2 (7,8)                    | 59,7 (6,4) <sup>a,c</sup>          |
|                   | абс.                   | 1,8 (0,4)               | 0,9 (0,2) <sup>a</sup>     | 1,4 (0,2) <sup>a</sup>         | 2,6 (1,5) <sup>b,c</sup>      | 3,6 (0,7) <sup>a,b,c,d</sup>       |
| ИИР               | у,е                    | 34,9 (20,8)             | 22,1 (6,3)                 | 35,6 (18,6)                    | 37,7 (24,0)                   | 29,6 (15,1)                        |
| Через 7 суток     |                        |                         |                            |                                |                               |                                    |
| Лейкоциты         | $10^9/л$               | 5,7 (1,1)               | 3,8 (0,6)                  | 8,1 (0,7) <sup>a,b,e</sup>     | 10,9 (1,4) <sup>a,b,c,e</sup> | 8,2 (2,8) <sup>a,b,d</sup>         |
| Эритроциты        | $10^{12}/л$            | 7,7 (0,6)               | 6,2 (0,5) <sup>a,e</sup>   | 7,5 (0,7) <sup>b,e</sup>       | 6,6 (0,4) <sup>a,c</sup>      | 6,4 (0,3) <sup>a,c</sup>           |
| Гемоглобин        | g/L                    | 133,0 (5,0)             | 130,0(7,0)                 | 137,0 (1,0)                    | 128,0 (8,0) <sup>c</sup>      | 122,0 (4,0) <sup>a,b,c</sup>       |
| ПЯ                | %                      | 3,0 (1,3)               | 3,4 (1,5)                  | 2,4 (1,4)                      | 3,1 (1,2)                     | 3,4 (1,5)                          |
|                   | абс.                   | 0,17 (0,08)             | 0,13 (0,06) <sup>c</sup>   | 0,2 (0,1) <sup>e</sup>         | 0,31 (0,1) <sup>a,b,c</sup>   | 0,28 (0,15) <sup>b</sup>           |
| СЯ                | %                      | 25,0 (3,3)              | 26,6 (6,8)                 | 28,8 (4,9)                     | 21,4 (5,9)                    | 26,6 (5,6)                         |
|                   | абс.                   | 1,44 (0,34)             | 1,01 (0,32) <sup>a,b</sup> | 2,32 (0,4) <sup>a,b,e</sup>    | 2,29 (0,5) <sup>a,b,e</sup>   | 2,15 (0,87) <sup>b</sup>           |
| Моноциты          | %                      | 2,3 (0,8)               | 2,6 (1,2)                  | 2,0 (1,1)                      | 2,1 (0,7)                     | 2,6 (1,1)                          |
|                   | абс.                   | 0,13 (0,05)             | 0,1 (0,04) <sup>a,c</sup>  | 0,17 (0,1) <sup>e</sup>        | 0,23 (0,1) <sup>b,e</sup>     | 0,22 (0,14) <sup>b</sup>           |
| Лимфоциты         | %                      | 68,7 (3,2)              | 65,0 (6,2)                 | 65,7 (3,9)                     | 72,5 (6,0) <sup>b,c,e</sup>   | 66,4 (6,0) <sup>d,e</sup>          |
|                   | абс.                   | 3,9 (0,7)               | 2,4 (0,4) <sup>a,e</sup>   | 5,3 (0,6) <sup>a,b,e</sup>     | 7,9 (1,4) <sup>a,b,c,e</sup>  | 5,5 (2,0) <sup>b,d,e</sup>         |
| ИИР               | у,е                    | 36,2 (19,2)             | 31,6 (14,4)                | 42,5 (20,5)                    | 41,1 (21,4)                   | 31,7 (18,2)                        |
| Через 14 суток    |                        |                         |                            |                                |                               |                                    |
| Лейкоциты         | $10^9/л$               | 7,7 (1,7)               | 5,7 (0,9) <sup>a</sup>     | 11,6 (1,4) <sup>a,b,e,f</sup>  | 9,4 (1,9) <sup>a,b,c,e</sup>  | 12,0 (1,8)<br><sub>a,b,d,e,f</sub> |
| Эритроциты        | $10^{12}/л$            | 8,1 (0,5)               | 6,4 (0,7) <sup>a</sup>     | 8,0 (0,4) <sup>b,e</sup>       | 7,0 (0,6) <sup>a,c</sup>      | 6,5 (0,4) <sup>a,c</sup>           |
| Гемоглобин        | g/L                    | 133,0 (5,0)             | 134,0 (6,0)                | 140,0 (5,0) <sup>a,b</sup>     | 131,0 (4,0) <sup>c,e</sup>    | 123,0 (4,0)<br><sub>a,b,c,d</sub>  |
| ПЯ                | %                      | 4,9 (1,7)               | 3,7 (1,7)                  | 3,8 (1,3)                      | 2,7 (0,7)                     | 3,4 (1,8)                          |
|                   | абс.                   | 0,39 (0,17)             | 0,19 (0,08) <sup>b,c</sup> | 0,44 (0,16) <sup>a,b,e,f</sup> | 0,25 (0,06) <sup>a,c,e</sup>  | 0,41 (0,23)<br><sub>a,b,d,e</sub>  |
| СЯ                | %                      | 22,0 (3,0)              | 26,3 (6,9)                 | 25,6 (5,9)                     | 20,7 (2,8) <sup>b,c,e</sup>   | 21,7 (6,8) <sup>e</sup>            |
|                   | абс.                   | 1,68 (0,35)             | 1,45 (0,4) <sup>c,d</sup>  | 3,0 (0,8) <sup>a,b,e</sup>     | 2,0 (0,62) <sup>b,c,e</sup>   | 2,6 (0,91) <sup>a,b,e</sup>        |
| Моноциты          | %                      | 2,1 (0,7)               | 2,5 (0,7)                  | 1,6 (0,7)                      | 1,8 (0,8)                     | 2,9 (1,6)                          |
|                   | абс.                   | 0,16 (0,05)             | 0,13 (0,03) <sup>a,c</sup> | 0,19 (0,1) <sup>e</sup>        | 0,17 (0,1) <sup>e</sup>       | 0,36 (0,2) <sup>b,e</sup>          |
| Лимфоциты         | %                      | 69,7 (3,2)              | 66,1 (6,9)                 | 67,3 (6,1)                     | 72,5 (3,2) <sup>b,e</sup>     | 68,7 (7,0) <sup>e</sup>            |
|                   | абс.                   | 5,4 (1,3)               | 3,8 (0,8)                  | 7,8 (1,2) <sup>a,b,e,f</sup>   | 6,8 (1,3) <sup>a,b,e</sup>    | 8,2 (1,5) <sup>a,b,e,f</sup>       |
| ИИР               | у,е                    | 39,1 (18,1)             | 30,5 (12,9)                | 50,5 (20,3) <sup>b</sup>       | 50,3 (23,3) <sup>b</sup>      | 34,7 (23,1)                        |

Примечание: \* - ИИР – индекс иммунореактивности ЛИ – лимфоцитарный индекс; \*\*М – среднее; СО – стандартное отклонение; \*\*\* - ПО – полиоксидоний; МХФ-2 – МХФ-2 (не является препаратом); Р – рувимином; \*\*\*\* р – по Mann-Whitney U-test достигнутый уровень статистической значимости по отношению: а – к АВ; b – к опыту; с – к Опыт+ПО; d – к Опыт+МХФ-2; e – к 1 суткам; f – к 7 суткам

Существенный иммуномодулирующий эффект препаратов был отмечен после завершения коррекции, который был более выражен в группе животных, получавших МХФ-2 (см. табл. 3.14). Так, через 7 суток МХФ-2 восстановил содержание лейкоцитов до 10,9 (в 2 раза > «АВ» ( $p=0,0002$ ), в 3 раза > «Ме+АВ» ( $p=0,0002$ )) за счет статистически значимого повышения содержания лимфоцитов (абс) на 102,6% и 229,2% соответственно.

Двукратное статистически значимое увеличение палочкоядерных нейтрофилов по сравнению с интактной и опытной группами без коррекции свидетельствовало о гипорегенераторном ядерном сдвиге лейкоформулы влево.

Между тем, под влиянием ПО и рувимины содержание лейкоцитов в 2 раза статистически значимо превышало показатели нелеченных крыс. Препараты в 2 и более раза повышали содержание гранулоцитов, моноцитов и лимфоцитов, что носило статистически значимый характер по отношению к группе нелеченных животных. ПО и МХФ-2 улучшили показатели ИИР по сравнению с интактными и опытными животными в среднем на 25%.

Двухнедельный срок эксперимента продемонстрировал существенные гематологические сдвиги в группе животных, получавших препараты. Так, эффективность ПО и рувимины после прекращения их применения продолжала нарастать. По сравнению с предыдущим сроком исследования оба препарата статистически значимо повысили содержание лейкоцитов примерно на 50%. Также, ПО и рувимины оказались одинаково эффективны по восстановлению общих лейкоцитов, абсолютных содержаний лимфоцитов, палочкоядерных и сегментоядерных, значения которых превышали аналогичные показатели нелеченных животных на  $107\% \pm 3\%$ ,  $110,6 \pm 5\%$ ,  $123,5 \pm 8\%$  и  $143,1 \pm 36,2\%$  соответственно.

К 14-му сроку исследования, все гематологические показатели животных, получавших МХФ-2, по сравнению с предыдущим сроком исследования снизились. Однако эффективность МХФ-2 по сравнению с нелеченной группой животных оставалась высокой. Так, коррекция МХФ-2 сопровождалась менее выраженным по сравнению с ПО и рувимином, но статистически значимо

большим по сравнению с опытом без коррекции уровнем лейкоцитов и лимфоцитов (абс) более чем на 70%, гранулоцитов (абс) и моноцитов (абс) более чем на 30%. Между тем, под влиянием ПО и МХФ-2 наблюдали прирост ИИР по сравнению с нелеченной группой животных на 65% ( $p \leq 0,01$ ).

Стоит отметить, что в ряду исследованных препаратов к этому сроку исследования только ПО показал антианемическую эффективность, восстановив до контрольного уровня содержание эритроцитов и гемоглобина. В то же время, под влиянием МХФ-2 и рувимина к 14-м суткам исследования отмечался лишь незначительный прирост содержания эритроцитов и гемоглобина по сравнению с предыдущим сроком исследования, но значений группы АВ достигнуто не было. Более того, значения этих показателей отставали и от значений группы АВ+Ме (см. табл. 3.15).

Таким образом, по результатам проведенных исследований следует заключить, что после недельной коррекции препаратами опытных животных с асептическим воспалением установлено повышение в периферической крови лейкоцитов и их фракций. Наиболее выраженные изменения демонстрировал МХФ-2, благодаря которому был обеспечен приток лейкоцитов в очаг воспаления. Клинически зона воспаления выглядела отечной и гиперемированной. Морфологически вокруг очага воспаления отмечалось скопление лимфоцитов и макрофагов. Рувимин показал аналогичные МХФ-2 результаты.

Коррекция выявленных нарушений при помощи ПО в этот срок исследования также сопровождалось существенным изменением лейкоформулы, но менее выраженным, по сравнению с результатами МХФ-2. Основное отличие ПО заключалось в мощной стимуляции эозинофильной реакции крови. Нарастание лейкоцитарной фракции крови под влиянием ПО морфологически сопровождалось ярко выраженной экссудацией и четкой локализацией воспалительного очага.

Клиническая и морфологическая картина течения воспаления к двухнедельному сроку эксперимента полностью поменялась. Эффективность

ПО и рувимины после прекращения коррекции нарастала: установлено повышение лейкоцитов, лимфоцитов и гранулоцитов, тогда как эффективность МХФ-2 снижалась. Морфологически в ткани воспаления крыс, получавших ПО, зона некроза оказалась замещена грануляционной тканью с обилием фибробластов и коллагеновых волокон. ПО восстановил содержание эритроцитов и гемоглобина у опытных крыс.

К этому сроку исследования у опытных крыс, получавших МХФ-2, картина воспаления была представлена развитием гнойного экссудата, гистологически наблюдали наличие очага некроза и только начинающуюся организацию очага воспаления. Аналогичные результаты получены с рувимином.

Из вышеизложенного сделан вывод, что эффективность коррекции МХФ-2 и рувимином более выражена в 1-й и 7-й сроки эксперимента. Однако по завершению коррекции их эффективность снижается. ПО продемонстрировал пролонгирующую эффективность, что к 14-м суткам исследования приводило к нивелированию последствий асептического воспаления, вызванного на фоне предварительной интоксикации ВА и ДК.

Ранее проведенными *in vitro* исследованиями было установлено цитотоксическое влияние солей ванадия и хрома на нейтрофилы крови опытных крыс. В данной серии экспериментов изучение цитотоксических эффектов ванадия и хрома у крыс группы Me+AB было продолжено.

Нейтрофилы по активности отличаются от других клеток организма, т.к. участвуют в первой линии иммунологической защиты организма. Состояние функциональной активности нейтрофилов предопределяет течение и исход разворачивающегося воспалительного процесса. При этом нейтрофилы сами могут оказаться на линии повреждающего воздействия различных факторов, в том числе и ксенобиотиков. Следовательно, от степени повреждающего воздействия солей металлов зависит функциональная активность нейтрофилов крови, что служит обоснованием применения патогенетической терапии.

Нивелирование токсических эффектов *in vivo* заключается в повышении резистентности клеточных мембран к прямому или опосредованному действию ксенобиотиков [38]. Ранее проведенными *in vitro* исследованиями были установлены цитотоксические эффекты соединений ванадия и хрома в отношении нейтрофилов крови. Выявленные патогенетические механизмы повреждающего воздействия ванадия и хрома подлежат патогенетической коррекции.

Мембранопротекторные характеристики изученных препаратов в нашем эксперименте оказались сопоставимыми в условиях первых двух сроков исследования, где резистентность мембран нейтрофилов к ВА и ДК имела тенденцию к нарастанию. Результаты последнего срока исследования (через 14 суток) выявили отличительные особенности препаратов, результаты которых представлены на рис. 3.20.

Через 14 суток результаты ПО и МХФ-2 имели сопоставимый характер мембранопротекторной активности. В опытах *in vitro* при поочередном добавлении в пробы крови хрома и ванадия установлено, что мембраны нейтрофилов под влиянием ПО и МХФ-2 были более устойчивы к цитотоксическому действию хрома (рис.3.20.-А,Б). Под действием ванадия апоптоз нейтрофилов у этих животных был более выражен. Между тем, рувимин в данный срок исследования обладал большей мембранопротекторной эффективностью к повреждающему действию ванадия (рис.3.20.-В).

Из вышеизложенного следует, что более выраженной мембранопротекторной активностью к повреждающему действию мембраны нейтрофилов воздействию хрома обладают полиоксидоний и МХФ-2, тогда как рувимин вызывает большую устойчивость нейтрофилов к ванадию.

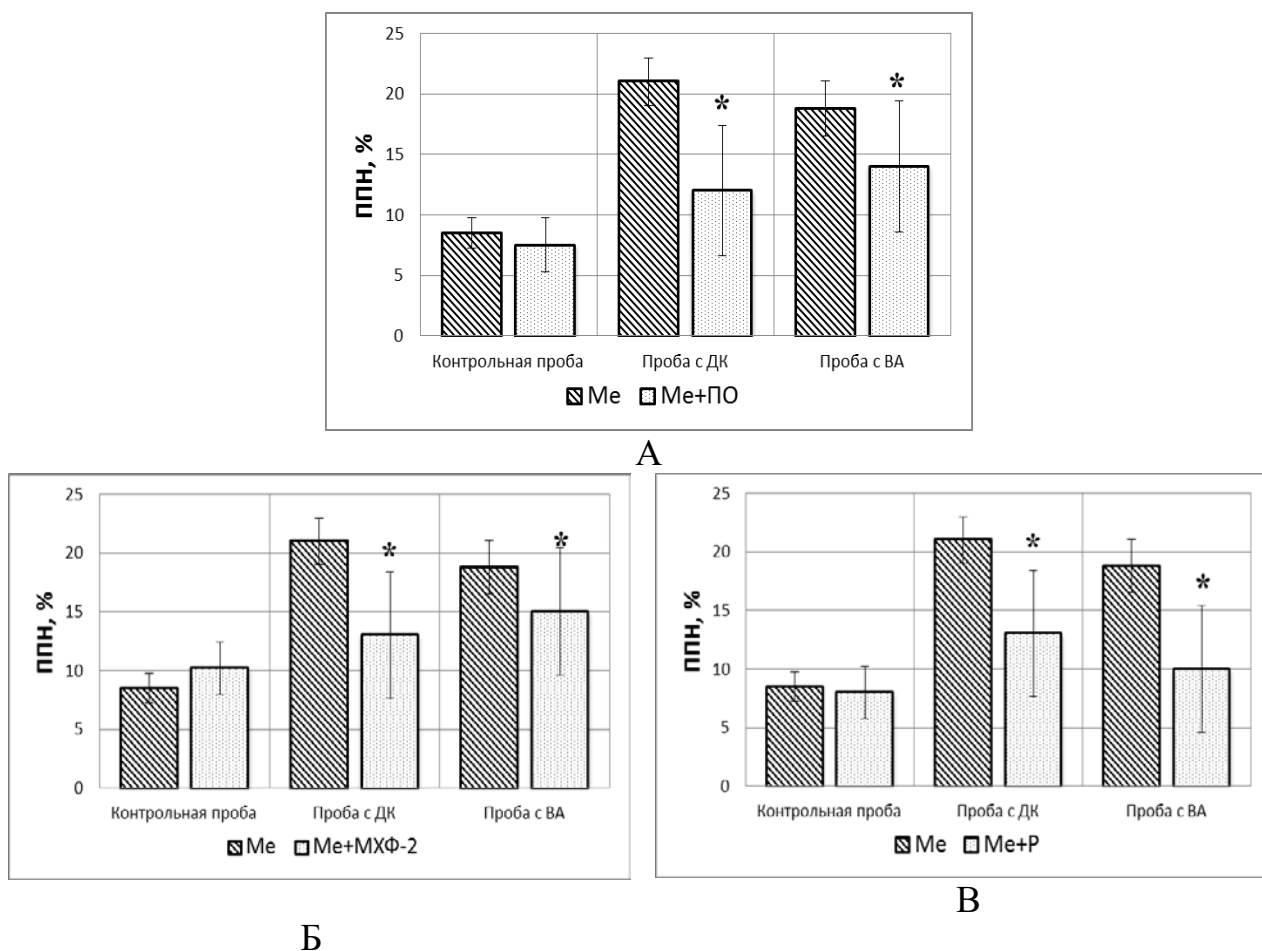


Рис. 3.20. Показатели повреждения нейтрофилов (ППН) у опытных крыс, затравленных ВА и ДК, после коррекции препаратами и МХФ-2 (через 14 суток)

Показаны результаты теста ППН через 14 суток после воздействия ВА+ДК и начала коррекции препаратами для групп: А - Me+ПО; Б - Me+МХФ-2; В - Me+P в сравнении с нелеченной группой Me. Значительные отличия между столбцами оценены по Mann-Whitney U-test с уровнем значимости \*  $p < 0,0001$  по отношению к Me

Вызванные ВА и ДК показатели степени разрушения нейтрофилов у крыс группы Me+AB представлены в табл. 3.16.



Таблица 3.16 - Показатели крови крыс с асептическим воспалением на фоне интоксикации Me и коррекции МХФ-2 и рувимином

| Показатель  | Серии, М (СО), (n=10)* |                             |                            |                             |                              |
|---|------------------------|-----------------------------|----------------------------|-----------------------------|------------------------------|
|   | АВ                     | АВ+ВА+ДК<br>(опыт)          | Опыт+ПО**                  | Опыт+<br>МХФ-2              | Опыт+Р                       |
| Через 1 сутки***  |                        |                             |                            |                             |                              |
| Контр. проба<br>(спонт.разруш.), %  | 7,2 (1,5)              | 10,5 (2,7) <sup>a</sup>     | 9,0 (1,6) <sup>a</sup>     | 9,6 (1,7) <sup>a</sup>      | 8,0 (1,3) <sup>b,d</sup>     |
| Опытная проба +<br>хром, %  | 9,8 (1,9)              | 25,0 (2,5) <sup>a</sup>     | 16,8 (2,8) <sup>a, b</sup> | 14,7 (2,2) <sup>a,b,e</sup> | 11,1 (2,5) <sup>b,c,d</sup>  |
| Индекс ППН, абс   | 0,7 (0,1)              | 0,4 (0,1) <sup>a</sup>      | 0,6 (0,2) <sup>a</sup>     | 0,7 (0,1) <sup>b</sup>      | 0,8 (0,2) <sup>b,c</sup>     |
| Опытная проба +<br>ванадий, %   | 9,6 (2,3)              | 22,0 (3,6) <sup>a</sup>     | 12,1 (3,0) <sup>b</sup>    | 11,1 (2,2) <sup>b</sup>     | 8,2 (2,1) <sup>b,c,d</sup>   |
| Индекс ППН, абс   | 0,8 (0,1)              | 0,5 (0,2) <sup>a</sup>      | 0,8 (0,3) <sup>b</sup>     | 0,9 (0,2) <sup>b</sup>      | 1,0 (0,4) <sup>a,b,c</sup>   |
| Через 7 суток   |                        |                             |                            |                             |                              |
| Контр. проба<br>(спонт.разруш.), %  | 8,3 (0,9)              | 9,7 (2,4)                   | 8,7 (2,4)                  | 8,5 (1,8)                   | 7,8 (2,2)                    |
| Опытная проба +<br>хром, %  | 12,0 (2,3)             | 27,5 (3,7) <sup>a</sup>     | 15,3 (3,7) <sup>b</sup>    | 11,8 (2,6) <sup>b,c</sup>   | 9,1 (1,8) <sup>a,b,c,d</sup> |
| Индекс ППН, абс   | 0,7 (0,1)              | 0,4 (0,1) <sup>a</sup>      | 0,6 (0,2) <sup>b</sup>     | 0,8 (0,3) <sup>b</sup>      | 0,9 (0,5) <sup>b</sup>       |
| Опытная проба +<br>ванадий, %   | 10,9 (2,6)             | 23,1 (3,4) <sup>a</sup>     | 10,5 (4,2) <sup>b</sup>    | 9,8 (1,4) <sup>b</sup>      | 7,7 (2,1) <sup>a,b,d</sup>   |
| Индекс ППН, абс   | 0,8 (0,2)              | 0,5 (0,1) <sup>a</sup>      | 1,0 (0,6) <sup>b</sup>     | 0,9 (0,2) <sup>b</sup>      | 1,1 (0,4) <sup>b</sup>       |
| Через 14 суток  |                        |                             |                            |                             |                              |
| Контр. проба<br>(спонт.разруш.), %  | 9,0 (1,6)              | 10,1 (2,2)                  | 7,1 (2,2) <sup>a,b,f</sup> | 7,8 (2,2) <sup>b</sup>      | 7,7 (2,4) <sup>b</sup>       |
| Опытная проба +<br>хром, %  | 12,5 (2,2)             | 30,7 (6,3) <sup>a,e</sup>   | 12,8 (3,3) <sup>b,f</sup>  | 13,0 (3,7) <sup>b</sup>     | 9,6 (1,7) <sup>a,b,c,d</sup> |
| Индекс ППН, абс   | 0,7 (0,1)              | 0,3 (0,1) <sup>b</sup>      | 0,6 (0,2) <sup>a,b</sup>   | 0,6 (0,1) <sup>b</sup>      | 0,8 (0,2) <sup>b,c,d</sup>   |
| Опытная проба +<br>ванадий, %   | 9,9 (3,2)              | 28,3 (4,6) <sup>a,e,f</sup> | 8,9 (3,2) <sup>b,f</sup>   | 11,3 (4,5) <sup>b</sup>     | 7,2 (2,3) <sup>a,b</sup>     |
| Индекс ППН, абс   | 1,0 (0,4)              | 0,4 (0,1) <sup>a</sup>      | 0,9 (0,4) <sup>b</sup>     | 0,8 (0,6) <sup>b</sup>      | 1,2 (0,6) <sup>b,d</sup>     |
| Примечание: *М – среднее; СО – стандартное отклонение; ** - ПО – полиоксидоний; МХФ-2 – МХФ-2 (не является препаратом); Р – рувимин;*** р – по Mann-Whitney U test достигнутый уровень статистической значимости по отношению: а – к АВ; b – к опыту; с – к Опыт+ПО; d – к Опыт+МХФ-2; e – к 1 суткам; f – к 7 суткам |                        |                             |                            |                             |                              |

Проведенными через 1 сутки исследованиями установлено, что наибольший мембраностабилизирующий эффект и меньший процент разрушенных нейтрофилов от воздействия хрома *in vitro* отмечался под воздействием рувимины. Так, процент разрушенных клеток в 2,2 раза ( $p=0,0002$ ) меньше показателей группы животных серии Me+АВ при добавлении хрома и в 2,7 раза ( $p=0,0002$ ) при добавлении ванадия.

Следующим по эффективности оказался МХФ-2. Под влиянием МХФ-2 процент разрушенных от хрома и ванадия клеток статистически значимо сократился в 1,7 и 2 раза соответственно.

Несмотря на то, что мембраностабилизирующая активность ПО оказалась на 51,4% (при добавлении хрома,  $p=0,0009$ ) и 47,6% (при добавлении ванадия,  $p=0,0065$ ) ниже эффективности рувимины, под его влиянием степень разрушения нейтрофилов от хрома и ванадия была соответственно на 32,8% и 45% статистически значимо меньше показателей нелеченных опытных крыс.

Через 7 суток мембраностабилизирующая эффективность препаратов проявилась в большей степени и в той же последовательности (см. табл. 3.16). В опытной пробе процент разрушенных от воздействия хрома клеток по сравнению с группой Me+AB статистически значимо сокращался на 67% под влиянием рувимины, на 57,1% под влиянием МХФ-2 и на 44,4% под влиянием ПО. Ванадиевые повреждения оказались в 3 (для рувимины), 2,4 (для МХФ-2) и 2,2 (для ПО) раза меньше по сравнению с нелеченной группой животных.

Исследованиями, проведенными через 14 суток, было установлено, что эффективность рувимины оставалась на прежнем высоком уровне. Между тем, мембраностабилизирующая активность ПО и МХФ-2 оказалась сопоставимой. Так, под влиянием ПО и МХФ-2 степень разрушения нейтрофилов под влиянием хрома оказалась более чем в 2 раза статистически значимо ниже показателей нелеченных животных. К повреждающему воздействию ванадия оказались устойчивы 91,1% и 88,7% нейтрофилов, защищенных ПО и МХФ-2, против 71,7% нейтрофилов крыс серии Me+AB.

Таким образом, следует заключить, что среди изученных препаратов наибольшей мембранопротекторной активностью обладал рувимин, эффективность которого начинала проявляться уже в первых сроках эксперимента. В последующие сроки эксперимента его эффективность лишь нарастала. 7 сутки эксперимента для МХФ-2 охарактеризовались повышением мембраностабилизирующей активности, которая к 14 суткам эксперимента стабильно сохранялась. Наибольшую мембранопротекторную эффективность

ПО продемонстрировал в последний срок исследования, тогда как в первые сроки его активность постепенно нарастала.

Из вышеизложенного сделан вывод, что мембранопротекторная активность препаратов убывает в ряду: рувимин > МХФ-2 > ПО.

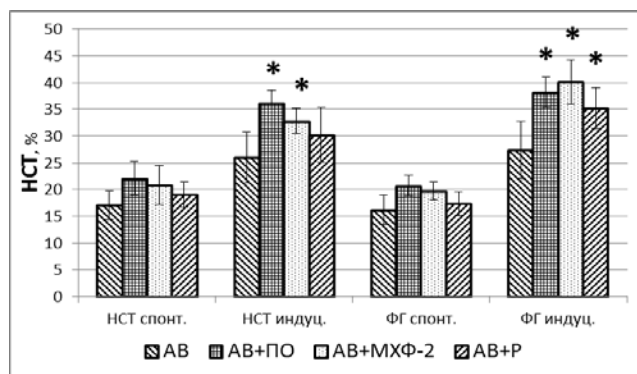
Дальнейшие исследования были проведены с целью выяснения функциональной активности нейтрофилов в тесте НСТ и фагоцитоза. Для этого изучали спонтанную активность нейтрофилов, индуцированную активность фагоцитов выявляли с добавлением латекса.

Противовоспалительная активность иммуномодуляторов во многом определяется их способностью повышать неспецифическую резистентность организма. В нашем эксперименте была изучена способность исследуемых препаратов повышать функциональную активность клеток фагоцитарной системы. Исследования проводились *in vitro* в НСТ-тесте (рис. 3.21.).

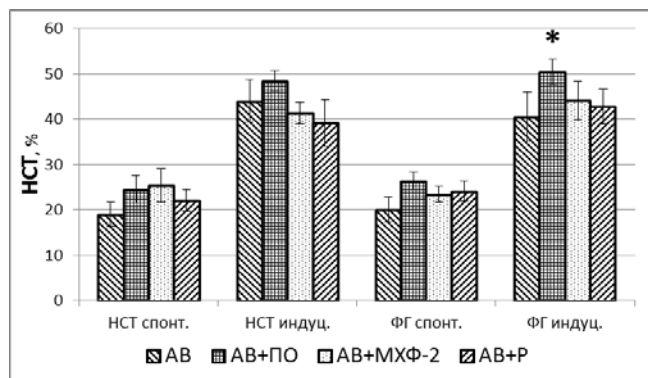
Исходя из результатов теста, под влиянием исследованных препаратов первые сутки охарактеризовались незначительным приростом метаболической и поглотительной активности нейтрофилов в спонтанных вариантах НСТ и фагоцитоза. Более существенные изменения в тесте показали их индуцированные варианты. Так, под влиянием ПО, МХФ-2 и рувимина наблюдали увеличение на 39,2% ( $p < 0,05$ ), 26,2% ( $p < 0,05$ ) и 16,2% метаболической активности и на 41,5% ( $p < 0,05$ ), 48,5% ( $p < 0,05$ ) и 30,4% ( $p < 0,05$ ) поглотительной активности соответственно.

Через 7 и 14 суток исследованная активность нейтрофилов в обоих вариантах НСТ-теста и фагоцитоза возрастала лишь под влиянием ПО.

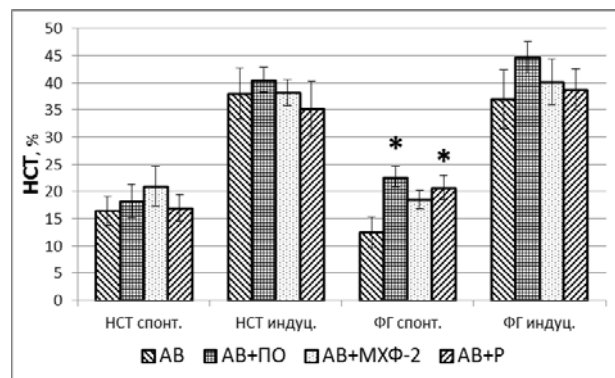
Для МХФ-2 и рувимина установлено незначительное увеличение поглотительной активности нейтрофилов в спонтанном варианте теста. Это свидетельствовало о наличии высоких резервных возможностей нейтрофилов у крыс без коррекции.



А



Б



В

Рис. 3.21. Показатели метаболической и поглотительной активности нейтрофилов в спонтанном и индуцированном вариантах НСТ-теста и ФГ у крыс с асептическим воспалением после коррекции МХФ-2 и рувимином. Показаны результаты НСТ-теста после моделирования асептического воспаления и начала коррекции препаратами для групп АВ, АВ+ПО, АВ+МХФ-2, АВ+Рувимин: А – через 1 сутки; Б – через 7 суток; В – через 14 суток в сравнении с нелеченной группой АВ. Значительные отличия между столбцами оценены по Mann-Whitney U-test с уровнем значимости  $* p < 0,05$  по отношению к АВ

Таким образом, в результате проведенных исследований было заключено, что нейтрофилы контрольных крыс с асептическим воспалением сохраняют функциональную активность благодаря высоким резервным возможностям. Все препараты в первые сутки исследования индуцировали метаболическую и поглотительную активность нейтрофилов, тогда как в последующие сроки более эффективным оказался ПО.

На следующем этапе нашего эксперимента была проведена патогенетическая коррекция метаболической и поглотительной активности нейтрофилов крови крыс в условиях интоксикации ванадием и хромом (рис. 3.22.).

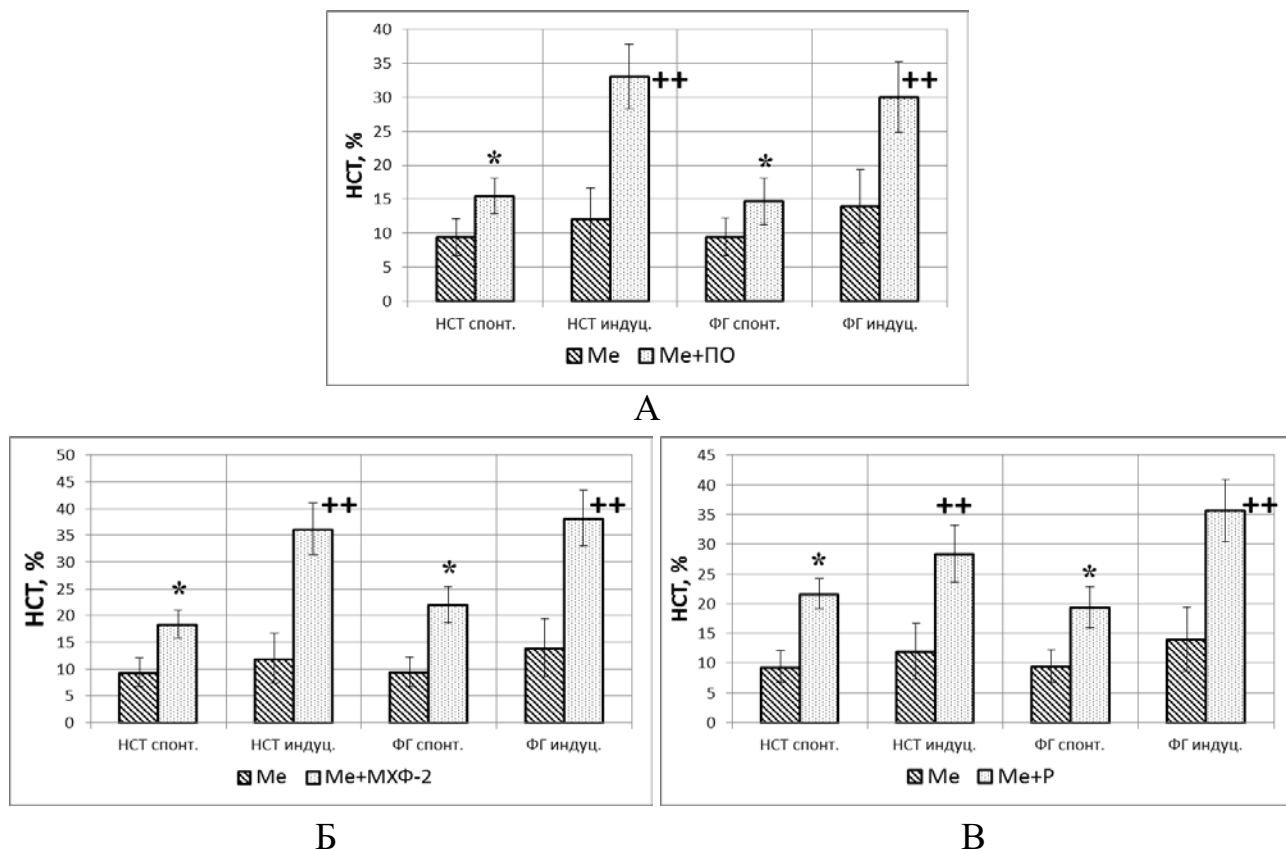


Рис. 3.22. Показатели метаболической и поглотительной активности нейтрофилов в спонтанном и индуцированном вариантах НСТ-теста и ФГ у контрольных и опытных крыс, затравленных ВА и ДК после коррекции МХФ-2 и рувимином

Показаны результаты НСТ-теста после окончания затравки ВА и ДК и начала коррекции препаратами для групп: **А**- Me+ПО через 7 суток; **Б** - Me+МХФ-2 через 7 суток; **В** - Me+P через 14 суток в сравнении с нелеченной группой Me. Значительные отличия между столбцами оценены по Mann-Whitney U-test с уровнем значимости \* -  $p < 0,05$  по отношению к Me; ++ -  $p < 0,0001$  по отношению к Me

Проведенная сравнительная оценка патогенетически корригирующих характеристик изученных препаратов показала, что ПО и МХФ-2

стимулировали *in vitro* метаболическую и поглотительную активность нейтрофилов, начиная с 7 суток исследования (рис. 3.22.-А,Б). Функциональная активация нейтрофилов под влиянием рувимина проявлялась к концу эксперимента (через 14 суток) (рис. 3.22-В).

Вывод: ПО и МХФ-2 эффективны на более ранних этапах эксперимента, тогда как рувимин показал более отдаленную эффективность.

Результаты проведенных в группе Me+AB исследований представлены в табл. 3.17.

Таблица 3.17 – Показатели метаболической и поглотительной активности нейтрофилов крови крыс с асептическим воспалением на фоне интоксикации ВА и ДК и коррекции МХФ-2 и рувиминном

| Показатель       | Серии, М (СО), (n=10)* |                           |                                  |                           |                                      |
|------------------|------------------------|---------------------------|----------------------------------|---------------------------|--------------------------------------|
|                  | АВ                     | АВ+ВА+ДК<br>(опыт)        | Опыт+ПО<br>**                    | Опыт+<br>МХФ-2            | Опыт+Р                               |
| Через 1 сутки*** |                        |                           |                                  |                           |                                      |
| НСТ спонтанный   | 17,1 (3,1)             | 8,2 (2,7) <sup>a</sup>    | 8,0 (2,1) <sup>a</sup>           | 8,8 (2,3) <sup>a</sup>    | 8,5 (3,7) <sup>a</sup>               |
| НСТ индуцир-й    | 26,0 (2,3)             | 17,0 (4,8) <sup>a</sup>   | 20,5 (2,3) <sup>a</sup>          | 23,1 (7,7)                | 19,2 (7,3)                           |
| ФГ спонтанный    | 16,2 (1,9)             | 9,5 (3,4) <sup>a</sup>    | 9,5 (2,5) <sup>a</sup>           | 10,8 (2,1) <sup>a</sup>   | 8,0 (1,6) <sup>a,d</sup>             |
| ФГ индуцир-й     | 27,4 (2,9)             | 20,0 (5,2) <sup>a</sup>   | 25,5 (2,8) <sup>b</sup>          | 30,3 (3,7) <sup>b,c</sup> | 18,7 (3,1)<br>a,c,d                  |
| Через 7 суток    |                        |                           |                                  |                           |                                      |
| НСТ спонтанный   | 19,0 (1,7)             | 10,6 (3,5) <sup>a</sup>   | 19,5 (1,6) <sup>b,e</sup>        | 20,3 (3,3) <sup>b,e</sup> | 21,7 (3,6)<br>b,e                    |
| НСТ индуцир-й    | 44,0 (3,6)             | 23,6 (8,7) <sup>a</sup>   | 45,0 (2,0) <sup>b,e</sup>        | 47,7 (3,8) <sup>b,e</sup> | 44,3 (6,2)<br>b,e                    |
| ФГ спонтанный    | 20,0 (3,0)             | 8,8 (2,7) <sup>a</sup>    | 20,0 (4,2) <sup>b,e</sup>        | 18,7 (2,1) <sup>b,e</sup> | 15,5 (4,0) <sup>a,<br/>b,c,d,e</sup> |
| ФГ индуцир-й     | 40,5 (4,6)             | 21,6(8,3) <sup>a</sup>    | 46,0 (3,5) <sup>a,<br/>b,e</sup> | 42,7 (3,7) <sup>b,e</sup> | 39,4 (6,0)<br>b,c,e                  |
| Через 14 суток   |                        |                           |                                  |                           |                                      |
| НСТ спонтанный   | 16,5 (1,8)             | 10,0 (1,5) <sup>a</sup>   | 19,0 (3,0) <sup>b,e</sup>        | 24,0 (3,0)<br>a,b,c,e,f   | 21,1 (2,6)<br>a,b,e                  |
| НСТ индуцир-й    | 38,0 (3,3)             | 24,5 (2,5) <sup>a,c</sup> | 45,0 (4,7) <sup>a,<br/>b,e</sup> | 48,5 (5,9)<br>a,b,e       | 44,9 (4,8)<br>a,b,e                  |
| ФГ спонтанный    | 12,5 (2,1)             | 10,0 (3,2)                | 18,0 (2,5)<br>a,b,e              | 22,0 (3,5)<br>a,b,c,e,f   | 20,5 (2,7)                           |
| ФГ индуцир-й     | 37,0 (2,9)             | 22,0 (3,1) <sup>a</sup>   | 44,5 (3,0) <sup>a,b,e</sup>      | 48,5 (2,3)<br>a,b,c,e,f   | 42,3 (3,3)<br>a,b,d,e                |

Примечание: \*М – среднее; СО – стандартное отклонение; \*\* - ПО – полиоксидоний; МХФ-2 – МХФ-2 (не является препаратом); Р – рувимин;\*\*\* р – по Mann-Whitney U-test достигнутый уровень статистической значимости по отношению: а – к АВ; b – к опыту; с – к Опыт+ПО; d – к Опыт+МХФ-2; e – к 1 суткам; f – к 7 суткам

Отличительной особенностью для первых суток исследования явилось то, что под влиянием МХФ-2 в тесте «фагоцитоз индуцированный» показатели поглотительной активности нейтрофилов опытных крыс статистически значимо превышали показатели серий Me+AB и AB на 51,5% и 10,6% соответственно. Под влиянием ПО показатели (M (CO)) индуцированного фагоцитоза составили 25,5 (2,8), что на 27,5% ( $p=0,0191$ ) было лучше показателей нелеченной группы опытных животных.

Недельная коррекция препаратами показала двукратное нарастание активности нейтрофилов как по сравнению с предыдущим сроком, так и с нелечеными опытными животными. Между тем, показатели фагоцитоза в его спонтанном и индуцированном вариантах у животных, получавших рувимин, отставала от показателей ПО на 22,5% ( $p=0,0233$ ) и 14,3% соответственно.

14 сутки исследования охарактеризовались для МХФ-2 по отношению к ПО повышением спонтанной активности нейтрофилов на 26,3% ( $p=0,0073$ ), спонтанной и индуцированной активности фагоцитоза на 22,2% ( $p=0,0126$ ) и 9% ( $p=0,0102$ ) соответственно [22].

Для рувимина в этот срок исследования показатели НСТ и фагоцитоза в обоих вариантах практически не отличались от показателей ПО. Следует отметить статистически значимый прирост показателей спонтанного и индуцированного фагоцитоза по сравнению с предыдущим сроком исследования на 32,2% и 7,4% соответственно. Между тем, по показателям индуцированного фагоцитоза рувимин отставал от МХФ-2 на 12,8% ( $p=0,001$ ).

Приведенные данные свидетельствуют о сопоставимой с ПО существенной способности МХФ-2 и рувимина корректировать нарушения метаболической и поглотительной активности нейтрофилов, в условиях асептического воспаления, вызванного на фоне предварительной интоксикации ванадием и хромом.

Предыдущими исследованиями было установлено, что исследованные препараты существенно стимулировали пролиферативную активность лимфоцитов. Нами были изучены кластеры дифференцировки Т-лимфоцитов в

крови крыс с асептическим воспалением, результаты которых представлены на рис. 3.23.

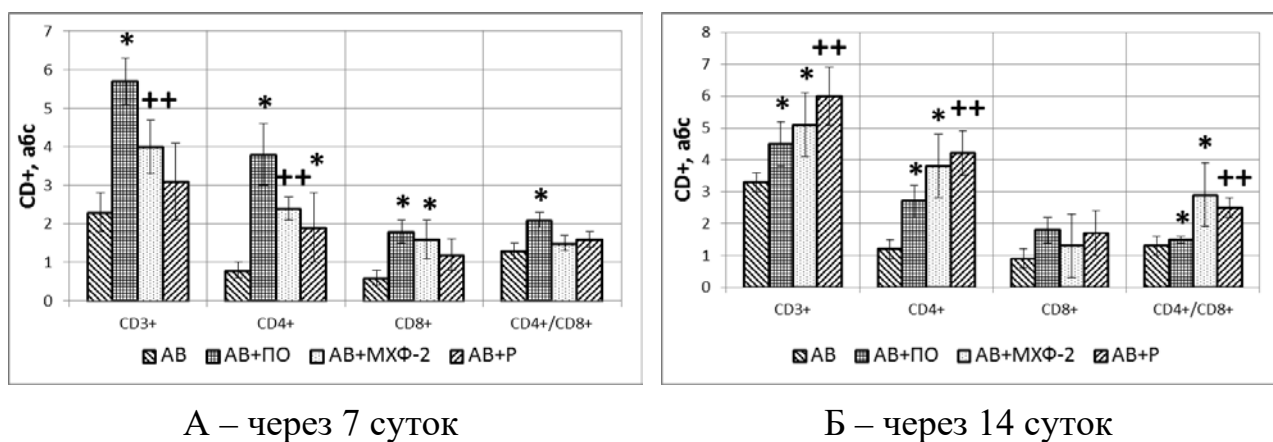


Рис. 3.23. Влияние ПО, МХФ-2 и рувимина на показатели пролиферативной активности сывороточных лимфоцитов, экспрессирующих CD3+, CD4+, CD8+ рецепторы, у крыс группы АВ в сравнении с нелечеными животными. Показаны результаты количественного определения субпопуляций лимфоцитов крови с использованием моноклональных антител для групп АВ, АВ+ПО, АВ+МХФ-2, АВ+Рувимин: А – через 7 суток; Б – через 14 суток после моделирования асептического воспаления и начала коррекции препаратами. Значительные отличия между столбцами оценены по Mann-Whitney U-test с уровнем значимости  $p < 0,05$ : \* - к АВ; ++ - к АВ+ПО

В первые сутки исследования все показатели крови были снижены. Уже через 7 суток под влиянием ПО уровень CD3+-лимфоцитов оказался статистически значимо выше уровня аналогичных клеток крыс без коррекции в 2,5 раза ( $p < 0,05$ ) за счет повышения CD4+ и CD8+-лимфоцитов в 4,8 и 2 раза ( $p < 0,05$ ) (рис. 3.23.-А). ИРИ, характеризующий отношение CD4+ к CD8+, под влиянием ПО повышался на 61,5% ( $p < 0,05$ ).

К 14-м суткам исследованные показатели крови оставались выше уровня показателей крыс без коррекции, но в динамике оказались ниже уровня предыдущего срока (рис. 3.23.-Б).

Для МХФ-2 и рувимина 7 сутки исследования оказались началом прироста пролиферативной активности лимфоцитов. Согласно полученным



данным под влиянием МХФ-2 содержание CD3+, CD4+ и CD8+-лимфоцитов превышало значения нелеченных особей на 73,9% ( $p<0,05$ ), 200% ( $p<0,05$ ) и 166,7% ( $p<0,05$ ) соответственно (рисунок 26-А). К 14 суткам исследования установлен более чем двукратный ( $p<0,05$ ) прирост ИРИ, что обусловлено заметным приростом общих (CD3+) и хелперных (CD4+) лимфоцитов на 54,5% ( $p<0,05$ ) и 216,7% ( $p<0,05$ ) по сравнению с нелеченной группой животных (см.рис.3.23.-Б).

Значительное повышение активности лимфоцитов под влиянием рувимины наблюдали к 14 суткам исследования, когда содержание CD3+ и CD4+ - лимфоцитов повышалось по сравнению с нелеченными животными в 2 и более раза больше и на 33% и 55,6% ( $p<0,05$ ) больше по сравнению с ПО.

Таким образом, проведенными исследованиями было установлено, что под влиянием ПО пролиферативная активность лимфоцитов повышается к 7 суткам и снижается к 14 суткам исследования, тогда как под влиянием МХФ-2 и рувимины отмечается динамика прироста пролиферативной активности лимфоцитов к последнему сроку исследования.

Введение солей ванадия и хрома по результатам наших предыдущих экспериментов сопровождалось дефектом пролиферативной активности лимфоцитов. Так, у крыс, затравленных ВА и ДК, было установлено статистически значимое снижение в 2 и более раза абсолютного содержания CD3+, CD4+, CD8+ - лимфоцитов по сравнению с контролем.

Результаты исследования иммуномодулирующего действия полиоксидония продемонстрированы на рис. 3.24. Первые сутки исследования не выявили статистически значимого отличия значений CD-рецепторов между сравниваемыми группами. Между тем, через 7 суток (рис. 3.24.-А) под влиянием ПО было установлено статистически значимое увеличение содержаний CD3+, CD4+ и CD8+лимфоцитов соответственно на 58%, 320% и 40% по сравнению с нелеченными животными, что приводило к трехкратному увеличению ИРИ.

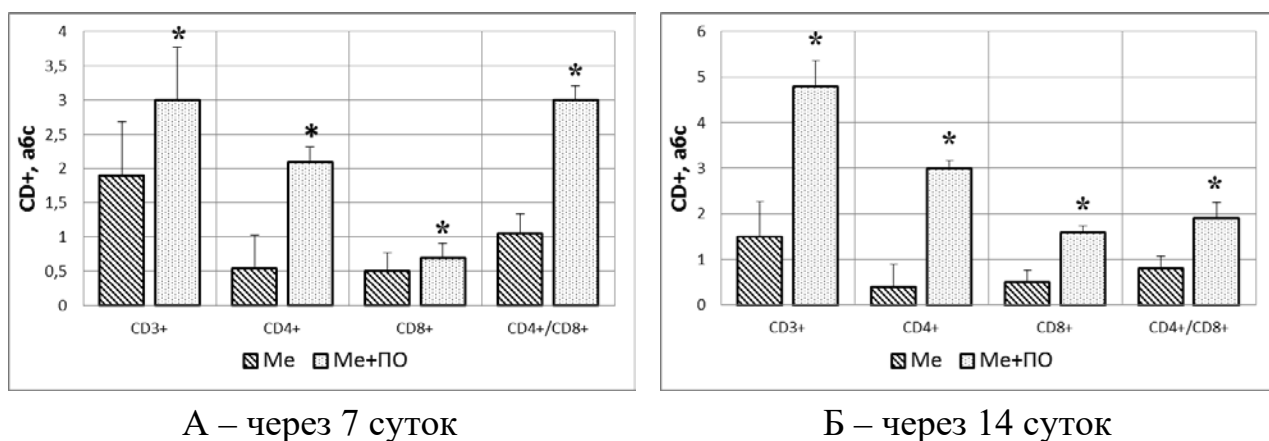


Рис. 3.24. Влияние ПО на показатели пролиферативной активности сывороточных лимфоцитов, экспрессирующих CD3+, CD4+, CD8+ рецепторы, у крыс группы Me+ПО в сравнении с нелеченной группой

Показаны результаты количественного определения субпопуляций лимфоцитов крови с использованием моноклональных антител для групп Me и Me+ПО: А – через 7 суток после окончания затравки ВА и ДК и коррекции ПО; Б – через 14 суток после окончания затравки Me и начала коррекции ПО. Значительные отличия между столбцами оценены по Mann-Whitney U-test с уровнем значимости  $*p < 0,0001$  по отношению к ВА+ДК

Через 14 суток исследования тенденция к нарастанию содержания CD4+ и CD8+лимфоцитов под влиянием иммуномодулятора полиоксидония продолжалась (рис.3.24.-Б).

Корректирующая эффективность МХФ-2 по сравнению с ПО была ниже. Например, пролиферативная активность лимфоцитов под влиянием МХФ-2 достигала своего пика к 7 суткам исследования и в последующий срок оставалась примерно на том же уровне. Так, через 7 суток повышенные концентрации CD3+, CD4+ и CD8+лимфоцитов соответствовали значениям 3,2 (0,6), 2,1 (0,2) и 1 (0,1) против значений опытных крыс 1,5 (0,8), 0,4 (0,2) и 0,5 (0,1). Через 14 суток под влиянием МХФ-2 нарастание содержания лимфоцитов колебалось в диапазоне 15-20% от предыдущего срока.

Под влиянием рувимина пролиферативная активность хелперно-цитотоксических лимфоцитов по сравнению с нелеченными опытными особями

существенно возрастала к последнему сроку исследования. Однако по эффективности рувимин существенно уступал ПО и МХФ-2.

Проведенными через 1 сутки после моделирования асептического воспаления исследованиями в группе Me+AB установлено, что пероральное введение рувимина опытным крысам вызывало наибольший эффект, что выражалось в статистически значимом повышении в 5,8 раз содержания CD3+-лимфоцитов в крови в отличие от показателей крыс группы Me+AB (табл. 3.18). Соответственно повышалось и содержание CD4+- (на 400% ( $p=0,0002$ )) и CD8+ лимфоцитов (на 600% ( $p=0,0002$ )). МХФ-2 продемонстрировал сходный эффект на активность CD3+-лимфоцитов, содержание которых в крови статистически значимо возрастало в 2,2 раза, а хелперная и цитотоксическая активность соответственно на 50% ( $p=0,0008$ ) и 200% ( $p=0,0009$ ) от группы Me+AB. Между тем, следует заметить, что преимущественное нарастание цитотоксической активности лимфоцитов под влиянием этих препаратов не способствовало повышению ИРИ, уровень которого оставался на уровне нелеченных животных.

В этот срок исследования среди изученных препаратов действие ПО характеризовалось наименьшим стимулирующим эффектом на активность CD3+-лимфоцитов. Несмотря на увеличение под влиянием ПО содержания CD3+-лимфоцитов на 40% ( $p=0,0073$ ), значения CD4+- и CD8+ - лимфоцитов в крови оставались на уровне Me+AB. Через 7 суток под влиянием ПО и МХФ-2 наблюдали существенное нарастание ИРИ на 38,5% ( $p=0,0002$ ) и 30,8% ( $p=0,014$ ) соответственно в отличие от серии Me+AB. Это указывало на то, что увеличение CD3+-лимфоцитов на 107,1% (ПО,  $p=0,0002$ ) и 235,7% (МХФ-2,  $p=0,0002$ ) происходило за счет преимущественного повышения содержания CD4+-лимфоцитов на 175% (ПО,  $p=0,0002$ ) и 325% (МХФ-2,  $p=0,0002$ ), чем CD8+-лимфоцитов [103].

Под влиянием рувимина содержание CD4+- и CD8+-лимфоцитов одинаково повышалось на 200%. Следовательно, влияние препарата на ИРИ оказалось несущественным, уровень которого лишь на 7,7% превышал

животных без коррекции.

Таблица 3.18 – Показатели СД крыс с асептическим воспалением на фоне интоксикации ВА и БК и коррекции МХФ-2 и рувимином

| Показатель  | Ед. изм. | Серии, М (СО), (n=10)* |                            |                             |                               |                                   |
|---|----------|------------------------|----------------------------|-----------------------------|-------------------------------|-----------------------------------|
|   |          | АВ                     | АВ+ВА+ДК (опыт)            | Опыт+ПО **                  | Опыт+МХФ-2                    | Опыт+Р                            |
| Через 1 сутки***  |          |                        |                            |                             |                               |                                   |
| CD3+  | %        | 57,5 (6,6)             | 50,7 (6,0) <sup>a</sup>    | 51,2 (4,4) <sup>a</sup>     | 52,7 (4,9) <sup>b,c,d</sup>   | 58,4 (3,6)                        |
|   | абс.     | 1,1 (0,3)              | 0,5 (0,1) <sup>a</sup>     | 0,7 (0,1) <sup>a,b</sup>    | 1,1 (0,5) <sup>b,c</sup>      | 2,9 (0,4) <sup>a,b,c,d</sup>      |
| CD4+-   | %        | 33,6 (4,0)             | 28,7 (4,1) <sup>a</sup>    | 30,6 (2,8)                  | 30,5 (2,8)                    | 33,6 (3,5) <sup>b,c</sup>         |
|   | абс.     | 0,4 (0,1)              | 0,2 (0,1) <sup>a</sup>     | 0,2 (0,1) <sup>a</sup>      | 0,3 (0,2) <sup>b,c</sup>      | 1,0 (0,2) <sup>a,b,c,d</sup>      |
| CD8+  | %        | 24,6 (3,1)             | 22,4 (2,5)                 | 20,5 (2,5) <sup>a</sup>     | 22,6 (3,2)                    | 25,8 (2,2) <sup>b,c,d</sup>       |
|   | абс.     | 0,3 (0,1)              | 0,1 (0,04) <sup>a</sup>    | 0,1 (0) <sup>a</sup>        | 0,3 (0,1) <sup>b,c</sup>      | 0,7 (0,1) <sup>a,b,c,d</sup>      |
| ИРИ, CD4+/CD8+  | абс.     | 1,4 (0,2)              | 1,3 (0,2)                  | 1,5 (0,2) <sup>b</sup>      | 1,4 (0,2)                     | 1,3 (0,2) <sup>c</sup>            |
| Через 7 суток   |          |                        |                            |                             |                               |                                   |
| CD3+  | %        | 55,6 (6,2)             | 52,9 (6,2)                 | 56,6 (4,0) <sup>e</sup>     | 58,2 (3,8) <sup>e</sup>       | 58,6 (3,6) <sup>b</sup>           |
|   | абс.     | 2,3 (0,5)              | 1,4 (0,3) <sup>a,e</sup>   | 2,9 (0,5) <sup>a,b,e</sup>  | 4,7 (1,0) <sup>a,b,c,e</sup>  | 3,4 (1,1) <sup>a,b,d</sup>        |
| CD4+-   | %        | 32,3 (4,4)             | 29,9 (3,3)                 | 36,9 (3,0) <sup>a,b,e</sup> | 36,8 (3,5) <sup>a,b,e</sup>   | 34,7 (2,5) <sup>b</sup>           |
|   | абс.     | 0,8 (0,2)              | 0,4 (0,1) <sup>a,e</sup>   | 1,1 (0,3) <sup>a,b,e</sup>  | 1,7 (0,5) <sup>a,b,c,e</sup>  | 1,2 (0,4)                         |
| CD8+  | %        | 24,2 (3,0)             | 23,1 (3,6)                 | 20,4 (1,6) <sup>a</sup>     | 22,5 (3,2)                    | 24,4 (2,7) <sup>c</sup>           |
|   | абс.     | 0,6 (0,2)              | 0,3 (0,1) <sup>a,e</sup>   | 0,6 (0,1) <sup>b,e</sup>    | 1,0 (0,3) <sup>a,b,c,e</sup>  | 0,9 (0,3) <sup>a,b</sup>          |
| ИРИ, CD4+/CD8+  | абс.     | 1,3 (0,2)              | 1,3 (0,1)                  | 1,8 (0,2) <sup>a,b,e</sup>  | 1,7 (0,3) <sup>a,b,e</sup>    | 1,4 (0,2) <sup>c</sup>            |
| Через 14 суток  |          |                        |                            |                             |                               |                                   |
| CD3+  | %        | 62,0 (5,9)             | 58,5 (6,3) <sup>e</sup>    | 69,6 (4,0) <sup>a,b,e</sup> | 69,4 (4,2) <sup>a,b,e,f</sup> | 73,6 (3,4) <sup>a,b,c,d,e,f</sup> |
|   | абс.     | 3,3 (0,9)              | 2,5 (0,5) <sup>a,e,f</sup> | 5,4 (1,1) <sup>a,b,e</sup>  | 4,7 (0,9) <sup>a,b,e</sup>    | 5,4 (0,9) <sup>a,b,e,f</sup>      |
| CD4+-   | %        | 36,2 (4,5)             | 33,1 (4,1) <sup>d</sup>    | 46,0 (4,7) <sup>a,b,e</sup> | 44,3 (4,5) <sup>a,b,e,f</sup> | 45,3 (4,5) <sup>a,b,e,f</sup>     |
|   | абс.     | 1,2 (0,4)              | 0,9 (0,3) <sup>a,e,f</sup> | 2,5 (0,7) <sup>a,b,e</sup>  | 2,1 (0,5) <sup>a,b,e</sup>    | 2,5 (0,6) <sup>a,b,e,f</sup>      |
| CD8+  | %        | 26,4 (2,5)             | 26,0 (2,8) <sup>e</sup>    | 25,0 (2,7) <sup>e</sup>     | 26,1 (1,9) <sup>e,f</sup>     | 29,4 (3,6) <sup>a,b,c,d,e,f</sup> |
|   | абс.     | 0,9 (0,3)              | 0,7 (0,2) <sup>a,e,f</sup> | 1,4 (0,3) <sup>a,b,e</sup>  | 1,2 (0,3) <sup>a,b,e</sup>    | 1,6 (0,2) <sup>a,b,d,e,f</sup>    |
| ИРИ, CD4+/CD8+  | абс.     | 1,4 (0,1)              | 1,3 (0,2)                  | 1,9 (0,4) <sup>a,b,e</sup>  | 1,7 (0,3) <sup>a,b,e</sup>    | 1,6 (0,4) <sup>b,e</sup>          |
| Примечание: *М – среднее; СО – стандартное отклонение; ** - ПО – полиоксидоний; МХФ-2 – МХФ-2 (не является препаратом); Р – рувимин;*** р – по Mann-Whitney U-test достигнутый уровень статистической значимости по отношению: а – к АВ; b – к опыту; с – к Опыт+ПО; d – к Опыт+МХФ-2; e – к 1 суткам; f – к 7 суткам |          |                        |                            |                             |                               |                                   |

Наибольшую эффективность всех изученных препаратов наблюдали через 14 суток. Под влиянием ПО ИРИ статистически значимо превосходил

показатели контроля и опыта на 35,7% и 46,2% соответственно. В отличие от Me+AB содержание CD4+- и CD8+-лимфоцитов под влиянием ПО нарастало соответственно на 177,8% ( $p=0,0001$ ) и 100% ( $p=0,0002$ ).

Значения ИРИ под влиянием МХФ-2 и рувимина оказались выше группы Me+AB соответственно на 30,8% ( $p=0,0002$ ) и 23,1% ( $p=0,0112$ ), что характеризовало их сопоставимую эффективность. Содержание общих CD3+-лимфоцитов в 2 раза статистически значимо превышало показатели группы Me+AB; прирост CD4+-лимфоцитов превышал прирост CD8+-лимфоцитов на 61,9% (МХФ-2) и 49,2% (рувимин).

Подводя итог полученным результатам следует заключить, что иммуномодулирующий эффект ПО продемонстрировал через 7 суток существенным нарастанием хелперной активности лимфоцитов, которое сохранялось до конца эксперимента. Максимальный иммуномодулирующий эффект показал МХФ-2, что проявилось большей по сравнению с ПО пролиферативной активностью CD4+-лимфоцитов, которая к 14 суткам исследования имела тенденцию к снижению. В суммарном отношении рувимин оказал слабый иммуномодулирующий эффект, т.к. в первые два срока эксперимента он преимущественно стимулировал цитотоксическую активность лимфоцитов. К 3-му сроку эксперимента эффективность рувимина оказалась близка к МХФ-2 за счет нарастания хелперной активности, что указывало на его более отдаленную эффективность.

Таким образом, следует заключить, что иммуномодулирующая эффективность изученных препаратов убывала в следующем порядке: МХФ-2  $\geq$  ПО > рувимин.

Цитокины являются важнейшими регуляторами реакций воспаления и иммунитета. От баланса про- и противовоспалительных цитокинов во многом зависит исход воспалительного процесса. К важнейшим свойствам иммуномодуляторов относят их способность оказывать костимулирующий эффект на синтез цитокинов в необходимом для регуляции воспаления объеме.

В нашей работе проводилась оценка иммуномодулирующей активности препаратов по результатам цитокинового профиля крови. Выбранные цитокины отличаются про- и противовоспалительной активностью. Согласно литературным данным IL-1 $\beta$  и IL-6 обладают выраженной провоспалительной активностью, модулируя развертывание воспалительных реакций. Противовоспалительные цитокины завершают воспалительный процесс за счет ингибирования провоспалительных цитокинов и Т-клеточного иммунитета. Следовательно, для оценки иммуномодулирующей активности препаратов нами выбраны четыре цитокина (IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-10, TGF- $\beta$ ), наиболее наглядно демонстрирующие динамику асептического воспаления на фоне корректирующей терапии.

Результаты исследования концентрации сывороточных цитокинов крыс с асептическим воспалением под влиянием препаратов представлены в табл. 3.19.

Таблица 3.19 – Показатели крови крыс с асептическим воспалением на фоне коррекции препаратами

| Показатель*   | Ед. изм. | Серии, М (СО), (n=10)** |                           |                             |
|---|----------|-------------------------|---------------------------|-----------------------------|
|   |          | АВ                      | АВ+ПО                     | АВ+МХФ-2                    |
| Через 1 сутки   |          |                         |                           |                             |
| IL-1  | пкг/мл   | 30,0 (4,7)              | 21,9 (1,7) <sup>a</sup>   | 35,5 (7,3) <sup>d</sup>     |
| IL-6  | пкг/мл   | 273,4 (28,4)            | 352,0 (48,0)              | 482,5 (94,0) <sup>a,d</sup> |
| TGF- $\beta$  | пкг/мл   | 39,3 (8,8)              | 50,9 (8,4)                | 29,3 (7,2) <sup>d</sup>     |
| IL-10   | пкг/мл   | 33,0 (5,6)              | 22,6 (3,0)                | 45,5 (17,8)                 |
| Через 7 суток   |          |                         |                           |                             |
| IL-1  | пкг/мл   | 25,8 (4,7)              | 28,6 (3,0) <sup>b</sup>   | 28,6 (4,9)                  |
| IL-6  | пкг/мл   | 52,3 (6,0)              | 119,8 (65) <sup>a,b</sup> | 98,9 (46,9) <sup>b</sup>    |
| TGF- $\beta$  | пкг/мл   | 57,4 (15,6)             | 68,7 (4,2) <sup>b</sup>   | 57,1 (21,2) <sup>b</sup>    |
| IL-10   | пкг/мл   | 18,1 (1,5)              | 27,2 (10,0)               | 33,4 (10,2) <sup>a</sup>    |
| Через 14 суток  |          |                         |                           |                             |
| IL-1  | пкг/мл   | 26,0 (2,9)              | 21,2 (1,9) <sup>a,c</sup> | 33,9 (4,5) <sup>a,d</sup>   |
| IL-6  | пкг/мл   | 79,2 (34,6)             | 54,9 (11,0) <sup>b</sup>  | 73,8 (10,8) <sup>b</sup>    |
| TGF- $\beta$  | пкг/мл   | 48,6 (5,6)              | 37,9 (9,2) <sup>c</sup>   | 34,9 (19,5)                 |
| IL-10   | пкг/мл   | 30,6 (5,7)              | 24,7 (8,0)                | 54,5 (5,1) <sup>c,d</sup>   |
| Примечание: * IL – интерлейкин, TGF- $\beta$ – трансформирующий фактор роста- $\beta$ ; **М – среднее; СО – стандартное отклонение; *** - по Mann-Whitney U-test достигнутый уровень статистической значимости: а – к АВ; b – к 1 суткам; с – к 7 суткам; d - к ПО; e – к МХФ-2; здесь и далее эффективность рувимина не установлена. |          |                         |                           |                             |

Таким образом, проведенными исследованиями удалось установить, что МХФ-2 и ПО индуцируют синтез IL-6. В первые сутки исследования под влиянием ПО на фоне резкого снижения IL-1 повышалась концентрация IL-6, с тенденцией к снижению в последующие сроки. Под влиянием МХФ-2 установлены максимальные концентрации IL-6 и IL-1 поочередно в первый и последний сроки исследования, тогда как в промежутке исследований (через 7 суток) МХФ-2 индуцировал противовоспалительный цитокин IL-10.

Активность сывороточных цитокинов группы Me несущественно отличалась от уровня контрольных крыс. Патогенетическая коррекция при помощи МХФ-2 существенно изменила значения этих цитокинов (рис. 3.25.).

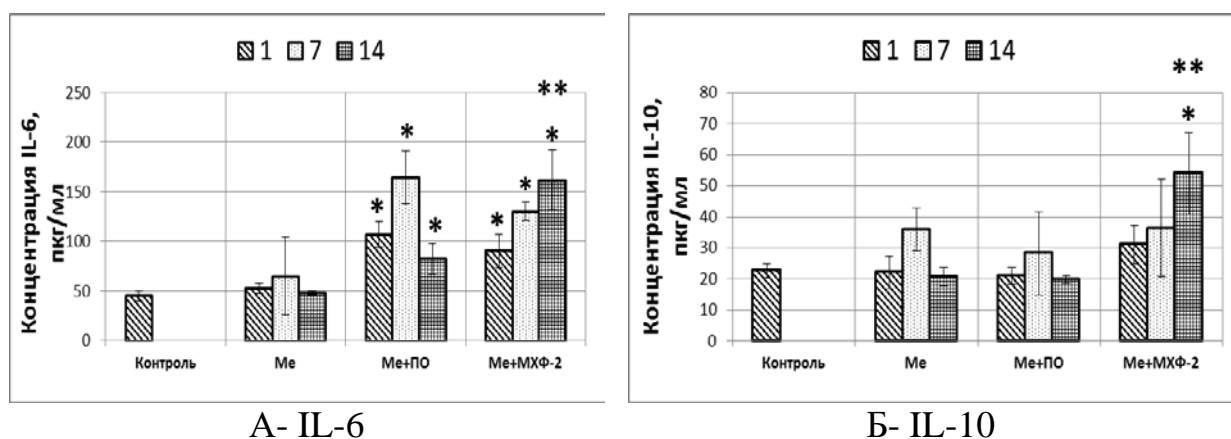


Рис. 3.25. Содержание цитокинов в сыворотке периферической крови опытных крыс после коррекции препаратами

Показаны результаты исследований сывороточных цитокинов у животных групп **Контроль**, **Me**, **Me+ПО**, **Me+МХФ-2**: **А** – IL-6; **Б** – IL-10. Значительные отличия между столбцами оценены по Mann-Whitney U-test с уровнем значимости  $p < 0,05$  по отношению: \* – к Me; \*\* – к Me+ПО

Среди исследованных цитокинов наибольшую активность продемонстрировал IL-6 (рис. 3.25.-А). Согласно полученным результатам, наблюдалось статистически значимое увеличение активности IL-6 в сыворотке крови опытных крыс, получавших МХФ-2, через 1 сутки соответственно на 73,6% ( $p=0,05$ ), через 7 суток на 100,9% ( $p=0,004$ ), через 14 суток на 238%

( $p=0,021$ ) больше, чем у нелеченных крыс группы Me. Значения Me+МХФ-2 во все сроки исследования не уступали значениям группы Me+ПО.

Под влиянием МХФ-2 в последний срок исследования (через 14 суток) статистически значимо повышалась противовоспалительная активность IL-10 как по отношению к Me, так и по отношению к Me+ПО соответственно в 3,4 и 2 раза больше (рис. 3.25.-Б).

Повреждение клеточных мембран, как результат воздействия соединений ванадия и хрома, может привести к нарушению функционирования мембраносвязанных рецепторов, улавливающих внешние стимулирующие сигналы. Известно, что сигналы первоначального повреждения от нейтрофилов классически передаются при посредничестве мембраносвязанного рецептора IL-6R, с чем связано повышение провоспалительной активности IL-6 [153]. Это дало нам основание предположить, что повышение концентрации IL-6 в сыворотке крови под влиянием препаратов стало возможным в результате восстановления трансмембранной сигнализации.

Таким образом, из вышеизложенного следует заключить, что МХФ-2, также, как и ПО, модулируют провоспалительную активность IL-6. При этом, МХФ-2 модулирует противовоспалительную активность IL-10 на поздних этапах.

В следующей серии экспериментов было изучено влияние этих препаратов на течение асептического воспаления у крыс группы АВ и Me+АВ по результатам оценки сывороточных цитокинов. Рис. 3.26. наглядно демонстрирует результаты корригирующей эффективности препаратов в группе Me+АВ.



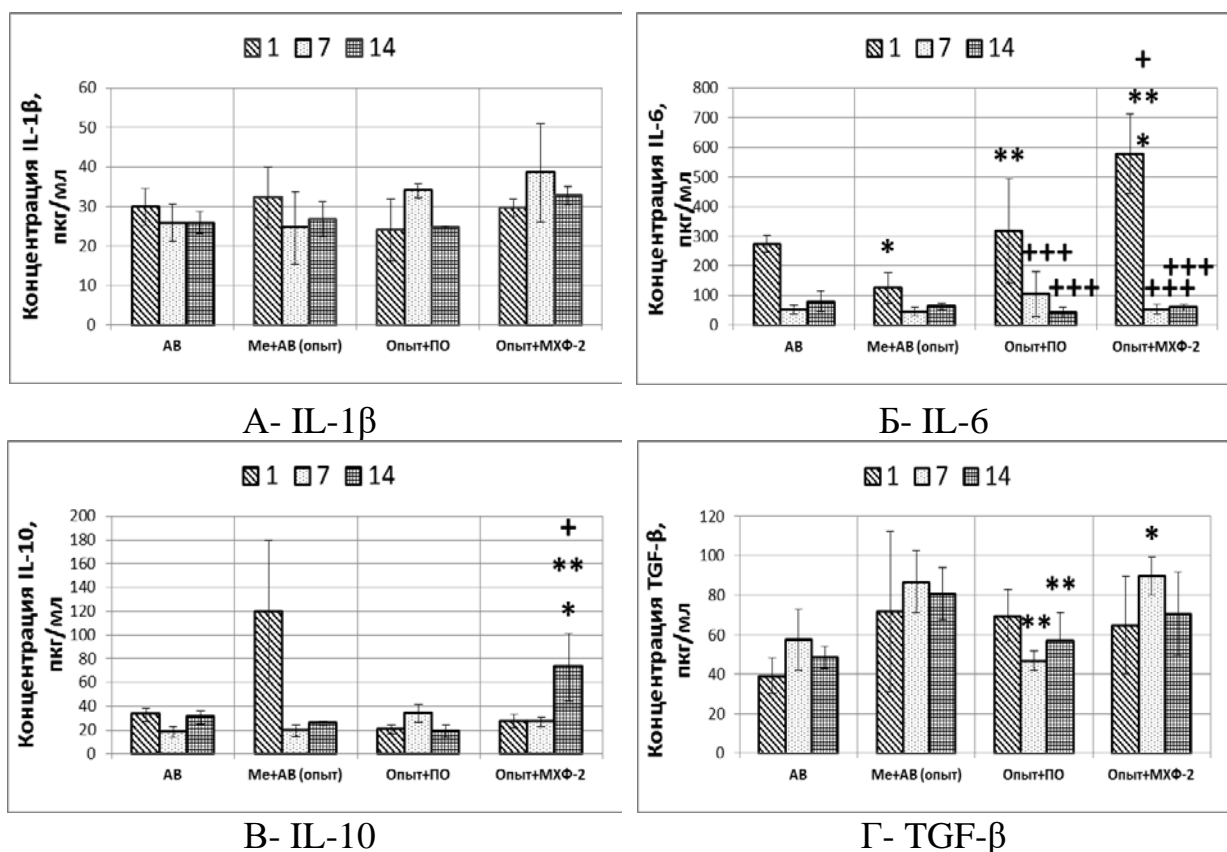


Рис. 3.26. Содержание цитокинов в сыворотке периферической крови опытных крыс с асептическим воспалением после коррекции препаратами. Показаны результаты исследований сывороточных цитокинов у животных групп АВ, Me+AB (опыт), Опыт+ПО, Опыт+МХФ-2: А – IL-1 $\beta$ ; Б – IL-6; В – IL-10, Г - TGF- $\beta$ . Значительные отличия между столбцами оценены по Mann-Whitney U-test с уровнем значимости  $p < 0,05$  по отношению: \* – к АВ; \*\* – к Me+AB; + – к Опыт+ПО

Наибольшие показатели провоспалительной активности обнаружены у IL-6. Его концентрация в первый срок исследования существенно повышалась в крови у опытных крыс, получавших МХФ-2 (рис. 3.26.-Б). Так, среднее (M (CO)) содержание IL-6 через 1 сутки достигало значений 578,2 (135,5) против 125,1 (52,6) нелеченных опытных (Me+AB) и 273,4 (28,4) контрольных крыс (АВ), статистически значимо превышая их в 4,6 и 2,1 раза.

Под влиянием рувимина уровень IL-6 через 1 сутки в 3,5 раза статистически значимо превышал показатели группы Me+AB и в 1,6 раза – АВ. Под влиянием ПО выброс IL-6 через 1 сутки был практически сопоставим с показателями контрольной группы с АВ, однако его уровень в 2,5 превосходил

уровень крыс Me+AB. Через 7 суток, несмотря на общее снижение IL-6 во всех исследуемых группах, он под влиянием ПО оставался в 2 раза статистически значимо выше уровня Me+AB.

В группах животных, получавших ПО и МХФ-2, отмечалось незначительное повышение IL-1 $\beta$  через 7 суток, тогда как под влиянием рувимины его уровень повышался в первый и последний сроки исследования (рис. 3.26-А). Однако эти значения не носили статистически значимого характера.

Противовоспалительная активность IL-10 проявилась в последний срок исследования у животных, получавших МХФ-2, в 2,9 раза статистически значимо превышавшая показатели группы Me+AB (рис. 3.26.-В).

В первый срок исследования колебания уровней TGF- $\beta$  под влиянием всех препаратов были минимальны от уровня опытных крыс группы Me+AB (рис. 3.26.-Г). Максимальным изменениям активность TGF- $\beta$  подвергалась под влиянием ПО. Так, через 7 и 14 суток его активность статистически значимо снижалась по сравнению с группой Me+AB в 1,8 и 1,4 раза соответственно. Уровень TGF- $\beta$  под влиянием МХФ-2 в эти сроки исследования колебался в пределах значений группы Me+AB.

Таким образом, из вышеизложенного следует заключить, что все препараты оказались эффективны в модуляции провоспалительной активности IL-6, однако эффективность МХФ-2 превосходит ПО. МХФ-2 в последний срок эксперимента существенно повышал противовоспалительную активность IL-10, тогда как под влиянием ПО противовоспалительная активность TGF- $\beta$  на всем протяжении эксперимента имела тенденцию к снижению.

### **3.3.3. Оценка эффективности патогенетической коррекции при помощи МХФ-2 и рувимины селезеночных субклеточных популяций у экспериментальных животных с асептическим воспалением**

К еще одним важным аспектам в регуляции воспаления относят миелоидные супрессорные клетки (МСК), функциональная роль которых неоднозначна. Выявленные при опухолевом росте как иммуносупрессоры, МСК определяют и при некоторых инфекционных процессах. Считают, что миелоидные супрессорные клетки играют важную роль при регуляции воспалительного процесса.

Результаты изучения клеточных популяций селезенки с фенотипом His48+/CD11b/c+(МСК), представленные в табл. 3.20, показывают, что при патогенетической коррекции при помощи ПО и МХФ-2 клеточность селезенки крыс за 1-е сутки развития асептического воспаления не претерпевала изменений. Седьмые сутки развития воспаления у всех групп животных сопровождались резким накоплением в селезенке МСК, в 3 и более раза превышавшим результаты предыдущих исследований ( $p < 0,05$ ). К 14-м суткам содержание МСК под влиянием всех исследованных препаратов оставалось на уровне 7 суток, однако статистически значимая разница с нелеченной группой животных установлена лишь для ПО (на 28%,  $p < 0,05$ ). Как для нелеченных особей, так и для крыс, получавших препараты, установлен Th1 иммунный ответ, о котором судили по преимущественной продукции Т-клетками IFN $\gamma$ +

Резюмируя результаты исследований корригирующей эффективности МХФ-2 в сравнении с полиоксидонием на течение асептического воспаления следует заключить:

МХФ-2 через 1 сутки существенно повышает метаболическую и поглотительную активность фагоцитов в индуцированных вариантах НСТ и фагоцитоза, стимулирует выброс IL-6, клеточность селезенки.

Таблица 3.20 – Результаты иммунофенотипирования клеток селезенки крыс с асептическим воспалением на фоне коррекции препаратами, pg/ml (M (CO), n=10)

| Показатели<br>-----<br>Серии   | His48+/<br>CD11b/c+<br>(общие) | His48High/<br>CD11b/c+<br>(гранулоц) | His48 low/<br>CD11b/c+<br>(моноцит.) | His-<br>/CD11b+<br>(моноциты) | CD3+CD4+<br>(Th)        | IFNg+/IL-4-<br>(Th1)    | IFNg-/IL-4+<br>(Th2)   | CD8+                    |
|--|--------------------------------|--------------------------------------|--------------------------------------|-------------------------------|-------------------------|-------------------------|------------------------|-------------------------|
| Через 1 сутки  |                                |                                      |                                      |                               |                         |                         |                        |                         |
| AB   | 6,0 (1,7)                      | 4,2(1,4)                             | 1,6 (0,9)                            | 30,4 (3,8)                    | 37,6 (5,6)              | 25,6 (5,1)              | 4,1 (0,6)              | 21,6 (6,6)              |
| AB+ПО  | 5,3 (2,6)                      | 3,9 (1,8)                            | 1,3 (1,0)                            | 25,5 (7,6)                    | 41,5 (5,6)              | 30,3 (7,8)              | 3,6 (1,2)              | 16,0 (1,7)              |
| AB+МХФ-2   | 7,6 (2,7)                      | 5,9 (3,1)                            | 2,0 (2,1)                            | 31,0 (7,9)                    | 38,2 (8,1)              | 25,3 (3,2)              | 2,9 (1,8)              | 19,3 (5,4)              |
| Через 7 суток  |                                |                                      |                                      |                               |                         |                         |                        |                         |
| AB   | 21,1 (5,4) <sup>e</sup>        | 18,0 (5,0) <sup>e</sup>              | 3,1 (0,9) <sup>e</sup>               | 28,8 (5,6) <sup>e</sup>       | 26,3 (2,5) <sup>e</sup> | 38,6 (6,1)              | 4,1 (1,0) <sup>e</sup> | 5,5 (0,7) <sup>e</sup>  |
| AB+ПО  | 16,6 (2,6) <sup>e</sup>        | 14,7 (3,2) <sup>e</sup>              | 2,2 (0,8) <sup>e</sup>               | 30,7 (4,5)                    | 32,6 (9,6)              | 44,2 (5,5) <sup>e</sup> | 3,0 (1,0)              | 12,8 (2,9)              |
| AB+МХФ-2   | 20,8 (3,7) <sup>c,e</sup>      | 12,2 (4,0) <sup>e</sup>              | 2,8 (0,7)                            | 32,4 (6,5)                    | 29,3 (8,9)              | 40,9 (3,8) <sup>e</sup> | 2,3 (1,1) <sup>a</sup> | 11,1 (4,8) <sup>e</sup> |
| Через 14 суток   |                                |                                      |                                      |                               |                         |                         |                        |                         |
| AB   | 21,4 (6,8) <sup>e</sup>        | 16,9 (6,7) <sup>e</sup>              | 5,2 (2,0) <sup>f</sup>               | 30,1 (7,0)                    | 29,5 (6,2)              | 32,3 (4,5)              | 5,1 (0,7) <sup>e</sup> | 22,5 (2,7) <sup>f</sup> |
| AB+ПО  | 15,4 (2,6) <sup>a,e</sup>      | 12,1(3,7) <sup>e</sup>               | 3,8 (2,3) <sup>e</sup>               | 33,5 (9,5)                    | 34,4 (9,0)              | 30,4 (9,1) <sup>f</sup> | 3,4 (1,6)              | 15,8 (8,1)              |
| AB+МХФ-2   | 18,6 (6,5) <sup>e</sup>        | 15,8 (7,5) <sup>e</sup>              | 2,9 (2,2)                            | 29,6 (8,6)                    | 32,7 (8,0)              | 25,6 (6,4) <sup>f</sup> | 2,8 (1,6) <sup>a</sup> | 12,8 (8,9)              |
| Примечание: * p – по Mann-Whitney U-test достигнутый уровень статистической значимости по отношению: a – к AB; c – к AB+ПО; e – к 1 суткам; f – к 7 суткам |                                |                                      |                                      |                               |                         |                         |                        |                         |

Через 7 суток МХФ-2 стимулирует соединительную и коллагеновую ткань с последующим полным заживлением раны. МХФ-2 стимулирует костномозговое кроветворение менее выражено, чем полиоксидоний повышает содержание лейкоцитарного пула, ЛИ, концентрацию IL-10. МХФ-2 существенно повышает клеточный состав тимуса и селезенки, однако не корректирует содержания МСК в селезенке. К 14-м суткам исследования МХФ-2 стимулирует выброс IL-1, тогда как тенденция прироста остальных исследованных показателей продолжается.

Полиоксидоний за 1-е сутки вызывал существенное повышение функциональной активности нейтрофилов в индуцированных вариантах НСТ и фагоцитоза, повышение клеточности селезенки. Полиоксидоний заметно ускоряет репаративную активность зоны повреждения с полным восстановлением ткани к концу эксперимента. К 7-м суткам исследования полиоксидоний индуцирует костномозговое кроветворение, в крови существенно повышается содержание лейкоцитов, нейтрофилов, хелперно-супрессорных лимфоцитов, ИИР, ЛИ, метаболическая и поглотительная активность нейтрофилов, концентрация ИЛ-6. В двухнедельный срок исследования полиоксидоний полностью нивелирует воспалительный процесс, повышает клеточность тимуса и селезенки, сдерживает накопление MDSC. Динамика прироста исследованных показателей крови заметно ослабевает.

Таким образом, проведенными исследованиями установлено, что иммуномодулирующая эффективность препаратов убывала в ряду: полиоксидоний > МХФ-2 > рувимин.

В предыдущих исследованиях клеточных популяций в селезенке крыс, затравленных ВА и ДК, установлено накопление МСК. Применение препаратов в качестве патогенетической терапии не способствовало накоплению миелоидных клеточных популяций в селезенке (табл.3.21).

Под влиянием МХФ-2 через 1 и 7 суток установлено снижение содержания His48 low/CD11b/c+ в 3 и 2,4 раза ( $p \leq 0,05$ ) по сравнению с

Таблица 3.21 – Результаты иммунофенотипирования клеток селезенки крыс, затравленных ВА и ДК, в сравнении с контролем, pg/ml (M (CO), n=10

| Показатели*<br>-----<br>Серии   | His48+/<br>CD11b/c+<br>(общие) | His48High/<br>CD11b/c+<br>(гранулоц) | His48 low/<br>CD11b/c+<br>(моноцит.) | His-<br>/CD11b+<br>(моноциты) | CD3+CD4<br>+<br>(Th)      | IFNg+/IL-4-<br>(Th1)      | IFNg-/IL-<br>4+<br>(Th2) | CD8+       |
|---|--------------------------------|--------------------------------------|--------------------------------------|-------------------------------|---------------------------|---------------------------|--------------------------|------------|
| Через 1 сутки**   |                                |                                      |                                      |                               |                           |                           |                          |            |
| Контроль  | 6,5 (2,4)                      | 4,9 (1,8)                            | 1,5 (0,7)                            | 25,8 (10,4)                   | 38,2 (14,6)               | 11,3 (9,0)                | 2,2 (1,0)                | 16,1 (3,2) |
| Me  | 16,6 (14,4)                    | 12,4 (8,3)                           | 4,1 (1,6)                            | 29,8 (4,4)                    | 37,2 (7,3)                | 16,5 (3,4)                | 2,1 (0,8)                | 16,8 (4,8) |
| Me+ПО   | 8,6 (2,0)                      | 7,5 (4,9)                            | 1,1 (0,7) <sup>a</sup>               | 27,6 (5,5)                    | 40,7 (4,2) <sup>a</sup>   | 20,5 (5,5) <sup>a</sup>   | 1,3 (0,3)                | 15,3 (1,8) |
| Me+МХФ-2  | 11,3 (4,4)                     | 10,1 (3,2)                           | 1,4 (0,9) <sup>a</sup>               | 29,1 (5,5)                    | 43,7 (3,0) <sup>a</sup>   | 19,0 (2,3)                | 2,2 (0,4)                | 17,1 (2,1) |
| Через 7 суток   |                                |                                      |                                      |                               |                           |                           |                          |            |
| Контроль  | 6,5 (2,4)                      | 4,9 (1,8)                            | 1,5 (0,7)                            | 25,8 (10,4)                   | 38,2 (14,6)               | 11,3 (9,0)                | 2,2 (1,0)                | 16,1 (3,2) |
| Me  | 16,1 (6,7)                     | 10,5 (7,1)                           | 5,2 (2,5)                            | 22,5 (1,4)                    | 26,3 (4,4) <sup>d</sup>   | 14,3 (2,9)                | 2,7 (0,4)                | 17,6 (7,3) |
| Me+ПО   | 13,9 (1,7) <sup>d</sup>        | 9,7 (1,4)                            | 3,7 (1,5) <sup>d</sup>               | 31,5 (3,0) <sup>a</sup>       | 31,2 (6,3) <sup>d</sup>   | 22,1 (3,9) <sup>a</sup>   | 3,4 (1,4) <sup>a,d</sup> | 18,8 (5,7) |
| Me+МХФ-2  | 9,7 (3,9)                      | 7,3 (3,7)                            | 2,2 (0,5) <sup>a</sup>               | 30,9 (2,2) <sup>a</sup>       | 29,2 (4,3) <sup>d</sup>   | 18,9 (1,2) <sup>a</sup>   | 2,7 (0,4) <sup>b</sup>   | 18,2 (7,0) |
| Через 14 суток  |                                |                                      |                                      |                               |                           |                           |                          |            |
| Контроль  | 6,5 (2,4)                      | 4,9 (1,8)                            | 1,5 (0,7)                            | 25,8 (10,4)                   | 38,2 (14,6)               | 11,3 (9,0)                | 2,2 (1,0)                | 16,1 (3,2) |
| Me  | 16,1 (4,0)                     | 10,8 (5,7)                           | 5,5 (3,1)                            | 35,0 (6,9) <sup>e</sup>       | 22,1 (1,6) <sup>d</sup>   | 15,6 (2,6)                | 1,3 (0,4) <sup>e</sup>   | 13,0 (5,6) |
| Me+ПО   | 14,8 (3,5) <sup>d</sup>        | 12,8 (4,1)                           | 2,5 (2,0)                            | 29,0 (5,3)                    | 24,1 (3,1) <sup>d</sup>   | 18,0 (4,5)                | 1,2 (0,6) <sup>e</sup>   | 11,4 (3,0) |
| Me+МХФ-2  | 16,1 (6,7)                     | 13,3 (4,7)                           | 2,7 (2,5)                            | 33,5 (1,6)                    | 20,5 (3,8) <sup>d,e</sup> | 12,9 (3,5) <sup>d,e</sup> | 1,3 (0,4) <sup>d,e</sup> | 16,4 (2,1) |
| Примечание: * – кластеры дифференцировки миелоидных супрессорных клеток, His48High/CD11b/c+– гранулоцитарные, His48 low/CD11b/c+– моноцитарные, His-/CD11b+ - моноциты; Th (Th1, Th2) – Т-хелперы, ** - по Mann-Whitney U-test p≤0,05 по отношению: a – к Me; b – к Me+ПО; d - к 1 суткам; e – к 7 суткам |                                |                                      |                                      |                               |                           |                           |                          |            |

опытом. Через 14 суток эти значения оставались на том же уровне, несмотря на то, что общие популяции His48+/CD11b/c+ вернулись к опыту. Статистически значимый прирост селезеночных макрофагов (моноцитов) под влиянием МХФ-2 наблюдали через 7 суток (в 1,4 раза > опыта,  $p \leq 0,05$ ).

Через 1 сутки под влиянием МХФ-2 наблюдали увеличение общих Т-хелперов (на 17,5% > опыта,  $p \leq 0,05$ ). Через 7 суток последовало повышение пролиферативной активности Th1 (на 32,2% > опыта,  $p \leq 0,05$ ), значения которых к 14 сроку исследования вернулись к контрольному уровню. Под действием ПО в первые сутки исследования снижалось содержание общих популяций His48+/CD11b/c+ за счет статистически значимого снижения His48 low/CD11b/c+ в 3,7 раза по сравнению с группой нелеченных животных. В последующие сроки исследований (через 7 и 14 суток) содержание His48+/CD11b/c+ вернулось к уровню нелеченных опытных крыс с расширением в сторону His48High/CD11b/c+. Максимальный пик концентрации селезеночных моноцитов приходился на 7 сутки исследования, когда их значения превышали значения опыта на 40% ( $p \leq 0,05$ ). В остальные сроки их значения колебались на уровне контрольных величин.

Под влиянием ПО уже в первый срок исследования наблюдалось увеличение популяций селезеночных CD4+-лимфоцитов на 9,4% (Th,  $p \leq 0,05$ ) и 24,2% (Th1,  $p \leq 0,05$ ) по сравнению с опытом. Через 7 суток наблюдали максимальную пролиферативную активность Th1-лимфоцитов (22,1 (3,9),  $p \leq 0,05$  против 14,3 (2,9) опыта). Через 14 суток эта тенденция ослабла.

По литературным сведениям к особенностям МП относят их миелоидное происхождение, незрелость и способность подавлять Т-клеточные ответы. В дополнение к их подавляющим приобретенный иммунный ответ эффектам сообщается о способности регулирования врожденных иммунных ответов путем модуляции продукции цитокинов макрофагами [275]. Их активация в патологических условиях приводит к увеличению аргиназы, синтазы азота, оксида азота, пироксинитрита и активных форм кислорода (АФК). Повышенная активность аргиназы способствует увеличению катаболизма L-

аргинина, который регулирует функцию Т-клеток. Недостаток L-аргинина в микроокружении Т-клеток приводит к угнетению их пролиферативной активности. По сведениям De Santo C, et al., 2005, в снижении иммуносупрессивных эффектов МП эффективны ингибиторы АФК [240]. Эти результаты были достигнуты при применении авторами нестероидных противовоспалительных препаратов. Один из таких препаратов – нитроаспирин, направленный против аргиназы и индуцибельной NO-синтазы, существенно ингибировал синтез АФК, тем самым повысив пролиферативную активность антиген-специфичных Т-лимфоцитов. Опираясь на литературные сведения, а также по результатам собственных исследований, следует полагать, что препараты оказывали антиоксидантную эффективность за счет подавления свободно-радикального окисления, индуцированного соединениями ванадия и хрома, а также производства АФК миелоидными предшественниками.

Таким образом, в результате проведенных исследований клеточных популяций в селезенке крыс, затравленных ВА и ДК, установлено, что исследованные препараты не оказывают влияния на генерацию селезеночных миелоидных предшественников, тогда как эффективность МХФ-2 в ранней активации пролиферативной активности Th1 оказалась сопоставима с ПО.

Коррекция оказала эффективное воздействие на общую численность клеточного состава селезенки. После моделирования асептического воспаления опытным животным сразу начинали коррекцию препаратами. Результаты оценки клеточности селезенки представлены в табл. 3.22. В 1-е и 7-е сутки после начала коррекции ПО клеточность селезенки по значениям оказалась близка с клеточностью селезенки группы Me+AB. Через 14 суток под влиянием ПО клеточность селезенки, о чем судили по индексу Кл/М, продолжала нарастать и статистически значимо превышала показатели опытной группы Me+AB и AB на 100% и 350% соответственно.



Таблица 3.22 – Оценка клеточности селезенки крыс с асептическим воспалением на фоне интоксикации ВА и ДК и коррекции препаратами

| Показатель   | Серии, М (СО), (n=10)*     |                             |                               |                                |
|--|----------------------------|-----------------------------|-------------------------------|--------------------------------|
|  | АВ**                       | Ме+АВ (опыт)                | Опыт+ПО                       | Опыт+МХФ-2                     |
| Через 1 сутки  |                            |                             |                               |                                |
| Масса, мг  | 610,1 (107,3)              | 746,8 (163,2)               | 767,0 (190,4)                 | 943,6 (284,7) <sup>a</sup>     |
| Клетки, млн.кл/мг  | 316,6 (67,6)               | 861,4 (274,9) <sup>a</sup>  | 867,4 (222,2) <sup>a</sup>    | 813,7 (460,0) <sup>a</sup>     |
| Кл/М, абс  | 0,5 (0,1)                  | 1,2 (0,3) <sup>a</sup>      | 1,2 (0,3) <sup>a</sup>        | 1,0 (0,6) <sup>b</sup>         |
| Через 7 суток  |                            |                             |                               |                                |
| Масса, мг  | 835,5 (137,0) <sup>e</sup> | 983,8 (344,7)               | 739,0 (109,4)                 | 858,1 (95,8)                   |
| Клетки, млн.кл/мг  | 325,0 (59,4)               | 1015,9 (353,0) <sup>a</sup> | 1022,7 (165,3) <sup>a</sup>   | 1071,7 (390,2) <sup>a</sup>    |
| Кл/М, абс  | 0,4 (0,1)                  | 1,2 (0,6) <sup>a</sup>      | 1,4 (0,1) <sup>a</sup>        | 1,2 (0,4) <sup>a</sup>         |
| Через 14 суток   |                            |                             |                               |                                |
| Масса, мг  | 750,5 (197,1)              | 760,8 (160,4)               | 678,5 (163,9)                 | 564,0 (112,1) <sup>b,e,f</sup> |
| Клетки, млн.кл/мг  | 304,2 (54,8)               | 711,0 (348,3) <sup>a</sup>  | 1199,9 (283,2) <sup>a,b</sup> | 631,9 (266,5) <sup>a,c,f</sup> |
| Кл/М, абс  | 0,4 (0,2)                  | 0,9 (0,3) <sup>a</sup>      | 1,8 (0,3) <sup>a,b,e,f</sup>  | 1,1 (0,3) <sup>a,c</sup>       |
| Примечание: * М – среднее; СО – стандартное отклонение; р – по Mann-Whitney U-test достигнутый уровень статистической значимости по отношению: ** р - а – к АВ; b – к Ме+АВ; c – к Опыт+ПО; d – к Опыт+МХФ-2; e – к 1 суткам; f – к 7 суткам |                            |                             |                               |                                |

В первые 2 срока исследования наблюдали аналогичную с ПО картину клеточности селезенки для группы Опыт+МХФ-2. Однако, через 14 суток в группе Опыт+ПО наблюдали прогрессирующий прирост клеточности селезенки, тогда как индекс Кл/М в группе Опыт+МХФ-2 оказался на 38,8% статистически значимо меньше этого уровня.

Результаты иммунофенотипирования клеток селезенки опытных крыс с асептическим воспалением после коррекции препаратами представлены в табл. 3.23. Через 1 сутки от начала коррекции ПО опытных крыс с асептическим воспалением в клеточном составе селезенки каких-либо отличий от остальных групп не выявлено. Уровень His48+/CD11b/c+ во второй срок исследования имел незначительную тенденцию к накоплению. Так, через 7 суток наблюдалось повышение His48+/CD11b/c+ по сравнению с предыдущим сроком на 61,6% ( $p \leq 0,05$ ), однако его уровень был ниже показателей

Таблица 3.23 – Результаты иммунофенотипирования клеток селезенки крыс с асептическим воспалением, вызванным на фоне двухнедельной интоксикации ванадием и хромом и коррекции МХФ-2 и рувимином, pg/ml (M (CO), n=10)

| Показатели<br>-----<br>Серии  | His48+/<br>CD11b/c+<br>(MDSC) | His48 High/<br>CD11b/c+<br>(G-MDSC) | His48 low/<br>CD11b/c+<br>(M-MDSC) | His-<br>/CD11b+<br>(M)       | CD3+CD4+<br>(Th)               | IFNg+/IL-4-<br>(Th1)           | IFNg-/IL-4+<br>(Th2)       | CD8+                    |
|---|-------------------------------|-------------------------------------|------------------------------------|------------------------------|--------------------------------|--------------------------------|----------------------------|-------------------------|
| Через 1 сутки   |                               |                                     |                                    |                              |                                |                                |                            |                         |
| АВ  | 6,0 (1,7)                     | 4,2(1,4)                            | 1,6 (0,9)                          | 30,4 (3,8)                   | 37,6 (5,6)                     | 25,6 (5,1)                     | 4,1 (0,6)                  | 21,6 (6,6)              |
| Me+АВ (опыт)  | 9,0 (3,7)                     | 6,3 (3,0)                           | 2,5 (0,7)                          | 28,2 (5,3)                   | 46,4 (4,1)                     | 19,2 (4,0)                     | 3,4 (1,6)                  | 16,9 (1,7)              |
| Опыт+ПО   | 8,6 (2,0)                     | 7,5 (4,9)                           | 1,1 (0,7)                          | 27,6 (5,5)                   | 40,7 (4,2) <sup>a,b</sup>      | 20,5 (5,5) <sup>a</sup>        | 1,3 (0,3)                  | 15,3 (1,8) <sup>a</sup> |
| Опыт+МХФ-2  | 11,3 (4,4)                    | 10,1 (3,2) <sup>a</sup>             | 1,4 (0,9) <sup>a,b,c</sup>         | 29,1 (5,5) <sup>c</sup>      | 43,7 (3,0) <sup>a,b</sup>      | 19,0 (2,3) <sup>a,b</sup>      | 2,2 (0,4)                  | 17,1 (2,1) <sup>a</sup> |
| Через 7 суток   |                               |                                     |                                    |                              |                                |                                |                            |                         |
| АВ  | 21,1 (5,4) <sup>e</sup>       | 18,0 (5,0) <sup>e</sup>             | 3,1 (0,9) <sup>e</sup>             | 28,8 (5,6) <sup>e</sup>      | 26,3 (2,5) <sup>e</sup>        | 38,6 (6,1)                     | 4,1 (1,0) <sup>e</sup>     | 15,5 (0,7) <sup>e</sup> |
| Me+АВ (опыт)  | 12,0 (3,7) <sup>a</sup>       | 9,7 (3,5) <sup>a</sup>              | 2,3 (0,5)                          | 22,0 (2,0) <sup>a</sup>      | 35,4 (7,3) <sup>a,e</sup>      | 12,1 (2,9) <sup>a,e</sup>      | 1,1 (0,6) <sup>a,e</sup>   | 15,3 (4,2)              |
| Опыт+ПО   | 13,9<br>(1,7) <sup>a,e</sup>  | 9,7 (1,4) <sup>a</sup>              | 3,7 (1,5) <sup>e</sup>             | 31,5 (3,0) <sup>b</sup>      | 31,2<br>(6,3) <sup>a,b,e</sup> | 22,1<br>(3,9) <sup>a,b,e</sup> | 3,4 (1,4) <sup>a,b,e</sup> | 18,8 (5,7)              |
| Опыт+МХФ-2  | 9,7 (3,9) <sup>a</sup>        | 7,3 (3,7) <sup>a</sup>              | 2,2 (0,5) <sup>a,c</sup>           | 30,9 (2,2) <sup>b</sup>      | 29,2 (4,3)                     | 18,9 (1,2) <sup>a,b</sup>      | 2,7 (0,4) <sup>a,e</sup>   | 18,2 (7,0)              |
| Через 14 суток  |                               |                                     |                                    |                              |                                |                                |                            |                         |
| АВ  | 21,4 (6,8) <sup>e</sup>       | 16,9 (6,7) <sup>e</sup>             | 5,2 (2,0) <sup>f</sup>             | 30,1 (7,0)                   | 29,5 (6,2)                     | 32,3 (4,5)                     | 5,1 (0,7) <sup>e</sup>     | 22,5 (2,7) <sup>f</sup> |
| Me+АВ (опыт)  | 18,8 (3,9) <sup>e</sup>       | 13,1 (2,9) <sup>e</sup>             | 6,1 (5,0)                          | 30,7 (3,4) <sup>f</sup>      | 25,1 (3,4) <sup>e,f</sup>      | 11,0 (2,4) <sup>a,e</sup>      | 1,2 (0,6) <sup>a,e</sup>   | 16,0 (4,5) <sup>a</sup> |
| Опыт+ПО   | 14,8 (3,5) <sup>e</sup>       | 12,8 (4,1) <sup>e</sup>             | 2,5 (2,0) <sup>e</sup>             | 29,0 (5,3) <sup>e</sup>      | 24,1 (3,1) <sup>e</sup>        | 18,0<br>(4,5) <sup>a,b,e</sup> | 1,2 (0,6) <sup>a,e</sup>   | 11,4 (3,0) <sup>a</sup> |
| Опыт+МХФ-2  | 16,1 (6,7) <sup>a</sup>       | 13,3 (4,7)                          | 2,7<br>(2,5) <sup>a,c,e,f</sup>    | 33,5<br>(1,6) <sup>c,e</sup> | 20,5 (3,8)                     | 12,9 (3,5)<br>a,b,c,e,f        | 1,3 (0,4)<br>b,c,f         | 16,4 (2,1) <sup>a</sup> |
| Примечание: * p – по Mann-Whitney U-test достигнутый уровень статистической значимости по отношению: a – к АВ; b – к опыту; c – к Опыт+ПО; d – к Опыт+МХФ-2; e – к 1 суткам; f – к 7 суткам |                               |                                     |                                    |                              |                                |                                |                            |                         |

интактных крыс с асептическим воспалением на 34,1% ( $p \leq 0,05$ ). Через 14 суток уровень His48+/CD11b/c+ возрастал от предыдущего срока лишь на 6,5%, т.е. практически оставался на прежнем уровне, однако оказался ниже аналогичных показателей в группах АВ и Me+АВ на 30,8% и 21,3% соответственно.

Через 1 сутки после коррекции ПО у опытных животных снижалась пролиферативная активность Т-хелперов за счет редукции Th2 иммунного ответа, о чем судили по сниженной продукции этими клетками IL-4, на 68,3% и 61,8% по сравнению с группами АВ и Me+АВ. Через 7 суток, несмотря на снижение пролиферации наивных Т-хелперов на 11,9% ( $p \leq 0,05$ ) по сравнению с нелечеными опытными крысами, отмечалось двух-трехкратное нарастание по сравнению с ними же пролиферативной активности Th1 и Th2 лимфоцитов с преимущественной дифференцировкой в сторону Th1 иммунного ответа. Несмотря на отсутствие статистической значимости, к 14 сроку эксперимента пролиферативная активность CD4+ и CD8+ лимфоцитов по сравнению с предыдущим сроком исследования продолжала снижаться, однако по сравнению с показателями нелеченных опытных животных пролиферативная активность Th1 лимфоцитов оказалась на 63,6% статистически значимо выше.

Уровень клеточных популяций с фенотипом His48+/CD11b/c+ в селезенке крыс, получавших МХФ-2, повышался на 88,3% и 25,6% по отношению к интактным и опытным крысам с асептическим воспалением со статистически значимым расширением в сторону His48High/CD11b/c+. Через 7 суток накопления His48+/CD11b/c+ в селезенке опытных крыс, получавших МХФ-2, не происходило, тогда как его уровень у интактных крыс группы АВ в 3,5 раза статистически значимо превысил собственные результаты предыдущего срока, а разница с МХФ-2 составила 117,5% ( $p \leq 0,05$ ). Лишь к 14 суткам исследования уровень His48High/CD11b/c+ повышался на 66%, но оставался ниже аналогичных показателей нелеченных интактных и опытных крыс с асептическим воспалением на 24,8% ( $p \leq 0,05$ ) и 14,4% соответственно.

В отличие от первого срока во второй срок (через 7 суток) пролиферативная активность наивных Т хелперов крыс, получавших МХФ-2, снижалась в 1,5 раза, впрочем, также как и в последующий (через 14 суток). Между тем, пролиферативная активность Th1 лимфоцитов имела тенденцию к снижению, особенно выраженную между 7 и 14 сутками. Так, уровень продуцируемого Th1 лимфоцитами IFN $\gamma$  снижался на 31,7% ( $p \leq 0,05$ ), отставая от показателей ПО на 28,3% ( $p \leq 0,05$ ).

Таким образом, иммуномодулирующая эффективность препаратов по отношению к клеточным популяциям селезенки убывала в следующем направлении: ПО  $\geq$  МХФ-2.

### **3.4. Оценка эффективности патогенетической коррекции при помощи МХФ-2 и рувимины по результатам цитологических, микроскопических и морфометрических исследований лимфоорганов экспериментальных животных с асептическим воспалением**

#### **3.4.1. Оценка эффективности патогенетической коррекции при помощи МХФ-2 и рувимины по результатам цитологических исследований костного мозга экспериментальных животных с асептическим воспалением в сравнении с полиоксидонием**

Эффективность патогенетической коррекции гематотоксических нарушений костно-мозгового кроветворения при помощи МХФ-2 и рувимины была оценена в сравнении с иммуномодулирующей активностью полиоксидония. Через 1 сутки у опытных крыс с экспериментальным воспалением после патогенетической коррекции при помощи МХФ-2 и рувимины установлено, что клеточность костного мозга у этих животных оставалась на уровне контроля (табл. 3.24).

Таблица 3.24– Клеточность костного мозга крыс с асептическим воспалением, вызванным после воздействия ванадия и хрома и коррекции МХФ-2 в сравнении с полиоксидонием (общее содержание клеток в бедренной кости)

| Показатель   | Серии, М (95%ДИ), (n=10) |                                  |                                  |                                  |
|--|--------------------------|----------------------------------|----------------------------------|----------------------------------|
|  | Контроль                 | Ме+АВ                            | Опыт+ПО                          | Опыт+МХФ-2                       |
| Через 1 сутки*   |                          |                                  |                                  |                                  |
| Клетки<br>КМ, млн.<br>кл./мг   | 67,8<br>(51,5-84,0)      | 43,5 <sup>a</sup><br>(21,7-65,4) | 48,4<br>(24,5-72,4)              | 65,8<br>(43,7-87,9)              |
| Через 7 суток  |                          |                                  |                                  |                                  |
| Клетки<br>КМ, млн.<br>кл./мг   | 67,8<br>(51,5-84,0)      | 43,6 <sup>a</sup><br>(34,6-52,6) | 59,0 <sup>b</sup><br>(49,6-68,4) | 59,7<br>(35,0-84,5)              |
| Через 14 суток   |                          |                                  |                                  |                                  |
| Клетки<br>КМ, млн.<br>кл./мг   | 67,8<br>(51,5-84,0)      | 49,6 <sup>a</sup><br>(40,3-58,9) | 68,4 <sup>b</sup><br>(54,0-82,7) | 76,2 <sup>b</sup><br>(57,6-94,9) |
| Примечание: *р – по Mann-Whitney U-test достигн. уровень стат.значимости по отношению: а – к контролю; b – к Ме+АВ; с – к Ме+АВ+ПО; d – к Ме+АВ+МХФ-2; e – к 1 сут;f – к 7 сут |                          |                                  |                                  |                                  |

Между тем, в группе Опыт+ПО установлено снижение клеточности костного мозга от контрольного уровня на 28,6%.

Дальнейшие исследования количественного и качественного состава КМП выявили, что МХФ-2 и ПО не стимулировали пролиферативную активность клеточных элементов гранулоцитарно- моноцитарного и эритроцитарного ростков кроветворения в группах Опыт+МХФ-2 и Опыт+ПО (табл. 3.25), тогда как число митозов зрелых и юных клеточных элементов эозинофильного ряда в КМП этих групп оказалось в 3 раза выше исходного уровня, что, по-видимому, и отразилось на общей численности клеток КМ.

Таблица 3.25 - Клеточный состав пунктата КМ бедренной кости контрольных крыс и опытных крыс с экспериментальным воспалением на фоне воздействия ванадия и хрома и коррекции МХФ-2 и рувиномом (подсчет на 100 клеток)

| Лейкобласт.росток (%)         |                 | Контр       | Опыт+МХФ-2  |             |             | Опыт +Р |             |             | Опыт +ПО    |             |             |
|-------------------------------|-----------------|-------------|-------------|-------------|-------------|---------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|
|                               |                 |             | 1сут        | 7сут        | 14сут       | 1сут    | 7сут        | 14сут       | 1сут        | 7сут        | 14сут       |
| Гранулоцитарно-               | Промиелоцит     | 1,8         | 3,2         | -           | -           | -       | -           | -           | 4,2         | 1,2         | 2,5         |
|                               | Миелоцит        | 6,8         | 6,1         | 12,8        | 5,6         | -       | 11,0        | 10,0        | 5,3         | 5,4         | 7,0         |
|                               | Юные            | 15,0        | 14,2        | 6,8         | 5,2         | -       | 3,0         | 5,0         | 13,7        | 14,1        | 10,7        |
|                               | Палочкоядерные  | 10,2        | 8,8         | 27,6        | 25,2        | -       | 19,0        | 21,0        | 9,5         | 9,3         | 17,1        |
|                               | Сегментоядерные | 23,6        | 18,2        | 12,8        | 14,8        | -       | 31,0        | 30,0        | 17,2        | 28,2        | 18,4        |
|                               | Моноциты        | 3,6         | 1,2         | 1,2         | 3,6         | -       | 5           | 7,0         | 2,1         | 2,1         | 7,6         |
|                               | Лимфоциты       | 7,8         | 3,1         | 4,4         | 10,8        | -       | 10,0        | 12,0        | 4,2         | 8,8         | 10,8        |
|                               | <b>Всего:</b>   | <b>69,0</b> | <b>54,8</b> | <b>65,6</b> | <b>65,2</b> | -       | <b>79,0</b> | <b>85,0</b> | <b>56,2</b> | <b>69,1</b> | <b>74,1</b> |
| Эозинофиль-                   | Промиелоцит     | 0,4         | 2,4         | 0,4         | 0,8         | -       | -           | -           | 2,5         | 0,5         |             |
|                               | Миелоцит        | 0,2         | 4,8         | 0,6         | 0,5         | -       | -           | 0,3         | 5,2         | 0,3         | 0,2         |
|                               | Юные            | 0,8         | 4,4         | 1,2         | 1,2         | -       | 0,7         | 0,8         | 2,6         | 0,7         | 0,5         |
|                               | Палочкоядерные  | 1,4         | 6,1         | 5,2         | 4,6         | -       | 2,1         | 2,4         | 6,8         | 4,6         | 1,2         |
|                               | Сегментоядерные | 7,0         | 11,7        | 7,0         | 9,3         | -       | 13,2        | 6,5         | 10,0        | 5,3         | 2,9         |
|                               | <b>Всего:</b>   | <b>9,8</b>  | <b>29,4</b> | <b>16,4</b> | <b>16,4</b> | -       | <b>16,0</b> | <b>10,0</b> | <b>27,1</b> | <b>11,4</b> | <b>4,8</b>  |
| Эритробластический росток (%) |                 |             |             |             |             |         |             |             |             |             |             |
|                               | Пронормоцит     | 2,4         | 1,8         | -           | -           | -       | -           | -           | 1,8         | 2,8         | 3           |
|                               | Базоф.нормоцит  | 6,8         | 3,2         | 3,2         | 1,2         | -       | -           | -           | 3,7         | 8,1         | 7,4         |
|                               | Полихр.нормоцит | 10,4        | 9,2         | 14,0        | 16,6        | -       | 5,0         | 5,0         | 9,8         | 6,8         | 9,4         |
|                               | Оксиф. нормоцит | 1,6         | 1,6         | 0,8         | 0,6         | -       | -           | -           | 1,4         | 1,8         | 1,3         |
|                               | <b>Всего:</b>   | <b>21,2</b> | <b>15,8</b> | <b>18,0</b> | <b>18,4</b> | -       | <b>5,0</b>  | <b>5,0</b>  | <b>16,7</b> | <b>19,5</b> | <b>21,1</b> |

Морфологически в этот срок исследования пунктат КМ был представлен либо гиперплазией эозинофильного ростка как в группе Опыт+ПО (рис. 3.27.-Б), либо клетками цитолиза как в группе Опыт+Р (рис. 3.27.-А).

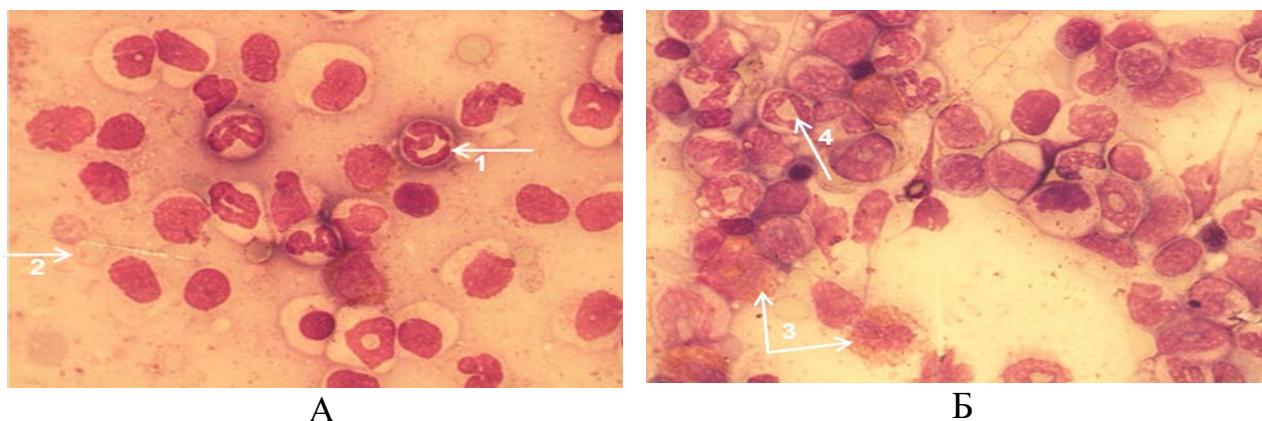


Рис. 3.27. Клеточный состав костного мозга опытных животных со скипидар-индуцированным воспалением после патогенетической коррекции рувиномом в сравнении с полиоксидонием

*Пунктат костного мозга бедренной кости крысы окрашивали по Романовскому-Гимза. Увеличение  $\times 1000$ . Показаны цитологические слайды для группы **Опыт+Р**: А - через 1 сутки после моделирования скипидар-индуцированного воспаления: расширение гранулоцитарно-эритроцитарного ростков кроветворения: 1 – нейтрофил, 2 – эритроцит; для группы **Опыт+ПО**: Б - через 1 сутки после моделирования скипидар-индуцированного воспаления: полиморфный КМП: 3 – эозинофилы (увеличены в 2,8 раза от эозинофильного состава контроля) 4 – гранулоцит (представлены умеренно)*

Таким образом, в первые сутки исследования МХФ-2, рувимин и ПО не оказывали корректирующей эффективности.

На 7-е сутки исследования общая клеточность КМ опытных крыс, получавших рувимин, соответствовал контрольному уровню, тогда как под влиянием МХФ-2 и ПО клеточность КМ опытных животных нарастала соответственно на 36,9% и 35,3% в сравнении с Me+AB, но контрольного уровня так и не достигала (см. табл. 3.24). Подсчет клеточного состава КМП показал, что рувимин лучше, чем МХФ-2 и ПО стимулировал пролиферативную активность клеток КМ.

Исследования КМП опытных крыс после коррекции рувимином, проведенные через 7 суток, представлены на рис. 3.28.-В. Так, морфологическая картина КМ в этот срок исследования предстала малоклеточной, отмечалось много разрушенных клеток, «голых» и кольцевидных ядер. Гранулоцитарный росток был гиперплазирован, преобладали зрелые нейтрофилы. Эритроцитарный росток был представлен единичными клетками, мегакариоциты также обнаружены в единичном количестве. Общая клеточность КМ была сохранена, по-видимому, за счет клеточных элементов гранулоцитарного ростка (см. табл. 3.20). В клеточном составе этих крыс преобладали клетки гранулоцитарно-моноцитарного ростка кроветворения, в основном за счет увеличения числа митозов миелоцитов, палочко- и сегментоядерных нейтрофилов, моноцитов и лимфоцитов на 61,2%, 86,3%, 31,4%, 38,9% и 28,2% соответственно (см. табл. 3.25). Эозинофильная реакция костного мозга по сравнению с контролем

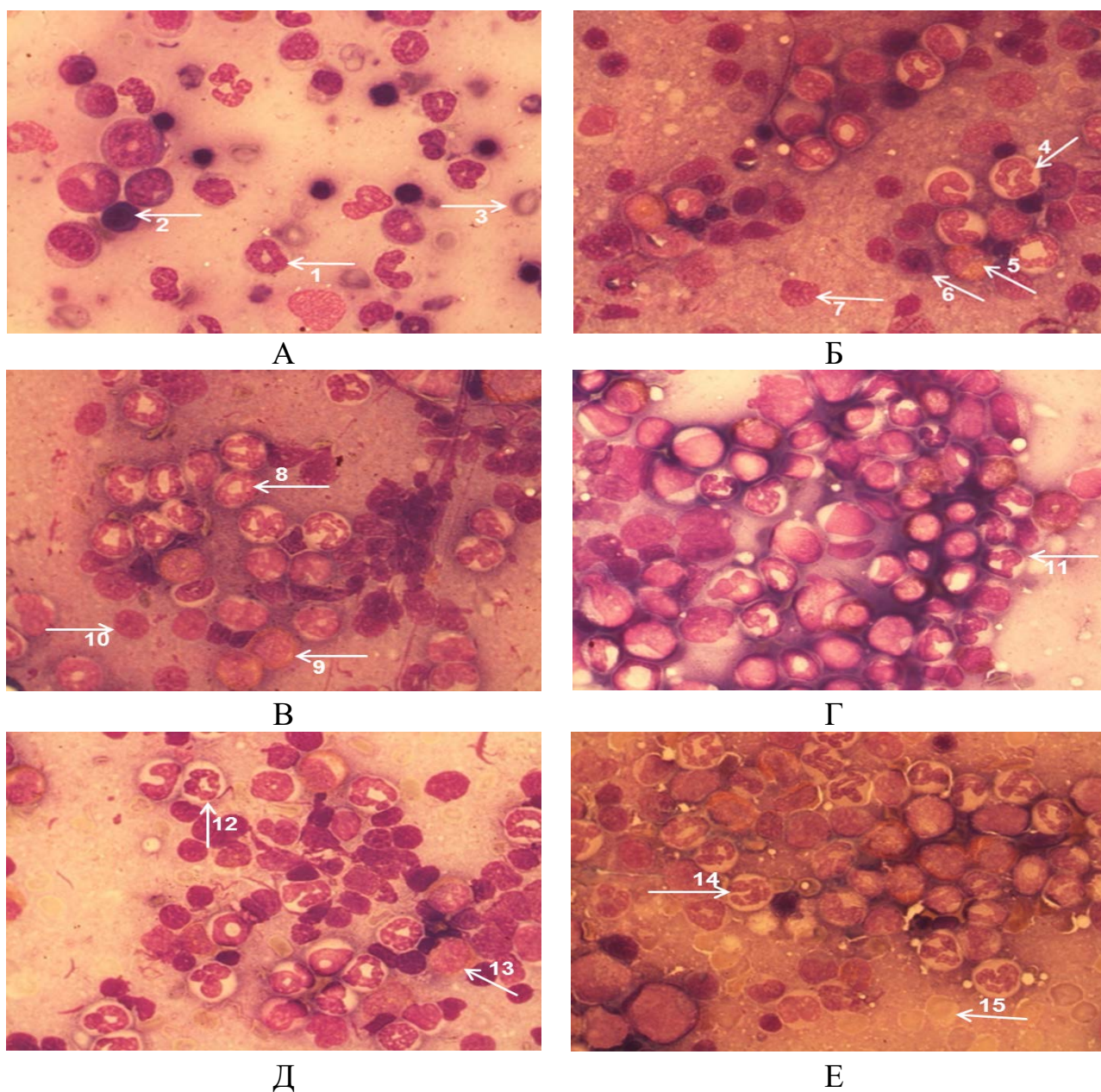


Рис. 3.28. Клеточный состав костного мозга опытных животных со скипидар-индуцированным воспалением после патогенетической коррекции МХФ-2 и рувимином

Пунктат костного мозга бедренной кости крысы окрашивали по Романовскому-Гимза. Увеличение  $\times 1000$ . Показаны цитологические слайды для группы **Опыт+МХФ-2**: **А** - через 7 суток после моделирования скипидар-индуцированного воспаления: полиморфный КМП: 1 - нейтрофил, 2 - лимфоцит, 3 - кольцевидные ядра нейтрофилов (признаки дисгранулопоэза); **Б** - через 14 суток после моделирования скипидар-индуцированного воспаления: зрелые нейтрофилы в расширенном гранулоцитарном ростке: 4 - нейтрофил, 5 - эозинофил, 6 - лимфоцит, 7 - голое ядро; для группы **Опыт+Р**: **В** - через 7 суток после моделирования скипидар-индуцированного воспаления: малоклеточный КМП,



*гиперплазированный гранулоцитарный росток: 8 - нейтрофилы, 9 – эозинофилы, 10 - голые ядра; Г - через 14 суток после моделирования скипидар-индуцированного воспаления: расширение гранулоцитарного ростка кроветворения: 11 – нейтрофилы; для группы Опыт+ПО: Д - через 7 суток после моделирования скипидар-индуцированного воспаления: клеточный и полиморфный КМП: зрелые нейтрофилы в расширенном гранулоцитарном ростке: 12 - нейтрофил, 13 – эозинофил; Е - через 14 суток после моделирования скипидар-индуцированного воспаления: клеточный и полиморфный КМП: расширение гранулоцитарного и эритроцитарного ростков кроветворения: 14 - нейтрофил, 15 - эритроцит.*

возрастала на 63,3%, что свидетельствовало о наличии очага антигенной стимуляции. Рувимин не стимулировал пролиферативную активность клеток эритробластического ростка, количество которых в 4 раза отставало от контрольного уровня.

Под влиянием МХФ-2 отмечали активацию гранулоцитопоеза преимущественно за счет размножения палочкоядерных нейтрофилов и юных миелоцитов, в 2,7 и 1,9 раза превышавших контрольный уровень. Пополнялись элементы костного мозга и за счет тенденции восстановления пролиферативной активности лимфоцитов, количество которых от предыдущего срока возросло на 42%. В результате патогенетической коррекции при помощи МХФ-2 в эритробластическом ростке отмечался прирост пролиферативной активности полихроматофильных нормоцитов, в 1,5 раза превышавший значения контроля. К этому сроку пролиферативная активность клеток эозинофильного ряда оставалась выше контрольного уровня на 67,3% за счет его молодых форм (см. табл. 3.25). Между тем, в цитологической картине КМ этих животных наряду с гранулоцитами и лимфоцитами встречались зрелые нейтрофилы с кольцевидными ядрами, что являлось признаком дисгранулопоеза, вызванного солями ванадия и хрома (рис. 3.28.-А).

Недельная коррекция при помощи ПО опытных животных с асептическим воспалением сопровождалось существенными сдвигами в

цитограмме костного мозга. Так, под влиянием ПО восстанавливалось и повышалось количество лимфоцитов от предыдущего срока исследования на 110%, пролиферативная активность сегментоядерных нейтрофилов на 64% от предыдущего срока исследования и на 19,5% от контрольного уровня (см. табл. 3.25). Под влиянием ПО на 17% пополнился состав эритробластического ростка КМ опытных животных преимущественно за счет увеличения соответственно на 56% и 119% его юных форм - пронормоцитов и базофильных нормоцитов. Цитологическая картина КМ представлена на рис. 3.28.-Д.

Таким образом, через 7 суток рувимин более эффективен по способности стимулировать пролиферативную активность миелоцитов, палочко- и сегментоядерных нейтрофилов, моноцитов и лимфоцитов по сравнению с МХФ-2 и ПО. Однако рувимин не восполняет клеточный состав эритроцитарного ростка кроветворения.

Эффективность МХФ-2 сопоставима с эффективностью ПО по способности стимулировать пролиферативную активность зрелых нейтрофилов и юных предшественников эритропоэза. Однако, МХФ-2 не восстанавливает лимфоцитарно-моноцитарный состав костного мозга.

Проведенными через 14 суток исследованиями было установлено, что все препараты полностью восстановили клеточность КМ (см. табл. 3.20), значения которой оказались выше  $Me+AB$  под влиянием рувимина на 68% ( $p=0,0012$ ), МХФ-2 на 53,6% ( $p=0,0169$ ), ПО на 38% ( $p=0,0081$ ). При этом, эффективность рувимина оказалась выше ПО на 21,8% ( $p=0,0455$ ).

Цитологическое исследование костного мозга опытных крыс, проведенное через 14 суток от начала воздействия скипидара и коррекции рувином [20], показало гиперплазию гранулоцитарного ростка: на фоне дегенеративно измененных клеток было обнаружено много зрелых нейтрофилов, эозинофилов. Клетки эритробластического ростка и мегакариоциты были представлены в единичном количестве (рис.3.28.-Г). Как и в предыдущем сроке исследования, в клеточном составе костного мозга

опытных крыс (см. табл. 3.25) в этот срок исследования продолжалось расширение гранулоцитарно-моноцитарного ростка, также как и сужение эритробластического ростка, наблюдавшееся с начала эксперимента. Эозинофильная реакция костного мозга по сравнению с предыдущим сроком исследования уменьшалась на 37,5%.

Как показано на рис. 3.28.-Б через 14 суток в цитологической картине пунктата КМ опытных крыс после коррекции МХФ-2 сохранился его клеточный и полиморфный состав. В гранулоцитарном ростке преобладали зрелые нейтрофилы, эозинофилы, лимфоциты, обнаружены остатки «голых» ядер. Эритроцитарный росток был сохранен.

Под влиянием патогенетической коррекции МХФ-2 клеточный состав гранулоцитарно-моноцитарного ряда был пополнен за счет пролиферации лимфоцитов и палочкоядерных нейтрофилов, количество которых оказалось выше исходного уровня на 38,5% и 147,1% соответственно. Моноцитарные клеточные элементы костного мозга были полностью восстановлены. Эозинофильная реакция оставалась на прежнем уровне.

Как и в предыдущем сроке исследования, тенденция прироста полихроматофильных нормоцитов продолжалась и в этот срок исследования, что приводило к увеличению общего клеточного состава эритробластического ростка.

Через 14 суток под влиянием ПО продолжалось нарастание пролиферативной активности палочкоядерных нейтрофилов и их предшественников – промиелоцитов соответственно на 83,9% и 108,3% от предыдущего срока исследования. Костный мозг существенно пополнился моноцитами и лимфоцитами, количество которых возросло с 7 суток на 262% и 22,7% соответственно. Эритробластический росток был восстановлен до исходного уровня, тогда как эозинофильная реакция костного мозга оказалась в 2 раза ниже контрольного уровня. Морфологически предстала та же картина расширения гранулоцитарного и эритроцитарного ростков кроветворения (рис. 3.28.-Е).

Таким, образом, установленная с 7 суток эксперимента эффективность патогенетической коррекции при помощи МХФ-2 заключалась в приросте пролиферативной активности палочкоядерных нейтрофилов, миелоцитов, эозинофилов и полихроматофильных нормоцитов эритроцитарного ростка, а также в тенденции к восстановлению лимфоцитов, тогда как к последующему сроку исследования к нарастающему пулу клеточных элементов присоединились лимфоциты и моноциты. Эффективность МХФ-2 по способности восстанавливать клеточный состав эритроцитарного ростка сопоставима с ПО.

Начиная с 7 суток исследования, рувимин полностью нивелирует токсические эффекты солей ванадия и хрома в костном мозге за счет восстановления, а в последующем (через 14 суток) повышения пролиферативной активности зрелых и юных форм нейтрофилов, моноцитов и лимфоцитов. Рувимин лучше, чем МХФ-2 стимулирует гиперпластические процессы в гранулоцитарно-моноцитарном ростке кроветворения. В отличие от МХФ-2 рувимин не восстанавливает клеточный состав эритроцитарного ростка.

#### **3.4.2. Экспериментальная оценка регенеративного потенциала МХФ-2 и рувимины в сравнении с полиоксидонием по результатам микро- и морфометрических исследований тимуса опытных крыс в динамике течения воспаления**

Металлиндуцированная инволюция тимуса имеет глубокие последствия для функционирования иммунной системы. Тем более важен поиск средств иммунокоррекции повреждений тимуса, вызванных соединениями тяжелых металлов. С этой целью в наших экспериментах была изучена иммунокорригирующая эффективность препаратов.

Снижение массы органов иммунитета в ответ на длительное воздействие потенциально токсического вещества является косвенным показателем его

иммунотоксичности. Однако более адекватным показателем является клеточность органа, представляющая собой отношение количества клеток органа к его массе [123, 21].

Показатели клеточности тимуса продемонстрированы в табл. 3.26.

Таблица 3.26 – Оценка клеточности тимуса крыс с асептическим воспалением на фоне интоксикации ВА и ДК и коррекции препаратами

| Показатель   | Серии, М (95%ДИ), (n=10)* |                           |                            |                            |
|--|---------------------------|---------------------------|----------------------------|----------------------------|
|  | АВ**                      | Ме+АВ (опыт)              | Опыт+ПО                    | Опыт+МХФ-2                 |
| Через 1 сутки  |                           |                           |                            |                            |
| Масса, мг  | 140,0 (40,0)              | 145,0 (88,9)              | 218,0 (100,0)              | 236,0 (37,8) <sup>a</sup>  |
| Клетки, млн.кл/мг  | 152,2 (47,6)              | 106,6 (73,8)              | 276,1 (152,0) <sup>b</sup> | 284,9 (119,1) <sup>b</sup> |
| Кл/М, абс  | 1,1 (0,1)                 | 0,7 (0,3) <sup>a</sup>    | 1,2 (0,4) <sup>b</sup>     | 1,2 (0,4) <sup>b</sup>     |
| Через 7 суток  |                           |                           |                            |                            |
| Масса, мг  | 161,7 (32,5)              | 151,0 (34,1)              | 207,2 (24,5) <sup>b</sup>  | 194,3 (50,6) <sup>b</sup>  |
| Клетки, млн.кл/мг  | 219,1 (68,4)              | 132,8 (57,6) <sup>a</sup> | 260,0 (118,2) <sup>b</sup> | 161,6 (65,0) <sup>a</sup>  |
| Кл/М, абс  | 1,4 (0,4)                 | 0,9 (0,4) <sup>a</sup>    | 1,4 (0,4)                  | 0,9 (0,4) <sup>a,c</sup>   |
| Через 14 суток   |                           |                           |                            |                            |
| Масса, мг  | 148,3 (16,0)              | 176,7 (50,0)              | 175,0 (16,4) <sup>f</sup>  | 150,0 (45,6) <sup>e</sup>  |
| Клетки, млн.кл/мг  | 249,1 (65,4)              | 203,0 (76,4) <sup>e</sup> | 290,4 (92,2)               | 283,2 (136,3) <sup>f</sup> |
| Кл/М, абс  | 1,7 (0,3)                 | 1,2 (0,3) <sup>a,e</sup>  | 1,7 (0,5) <sup>e</sup>     | 1,8 (0,3) <sup>e,f</sup>   |
| Примечание: * - М – среднее; СО – стандартное отклонение;** – по Mann-Whitney U-test p≤0,05 по отношению: а – к АВ; b – к опыту; с – к Опыт+ПО; d – к Опыт+МХФ-2; e – к 1 суткам; f – к 7 суткам |                           |                           |                            |                            |

Так, по результатам ранее проведенных исследований было установлено, что через 1 сутки у группы Ме+АВ индекс клеточности тимуса, рассчитанный отношением клеток к массе органа (Кл/М), в 1,6 раза статистически значимо отставал от показателя группы АВ. Патогенетическая коррекция МХФ-2 и ПО в 1,7-2 раза статистически значимо повышала Кл/М по сравнению с Ме+АВ. При этом эффективность рувимина оказалась на 25% выше остальных препаратов, несмотря на то, что не носила статистически значимого характера.

Через 7 суток Кл/М тимуса под влиянием ПО сохранялась, тогда как у группы Опыт+МХФ-2 этот показатель оказался статистически значимо ниже показателей АВ и Опыт+ПО на 35,7%. Через 14 суток все препараты существенно повышали индекс Кл/М селезенки опытных крыс и соответствовали значениям АВ этого срока исследования.

Таким образом, эффективность МХФ-2 сопоставима с ПО. Препараты нивелируют токсические эффекты солей ванадия и хрома, восстанавливая клеточность тимуса до уровня АВ.

Далее была проведена микроскопическая оценка тимуса опытных крыс, получавших МХФ-2 (рис. 3.29.).

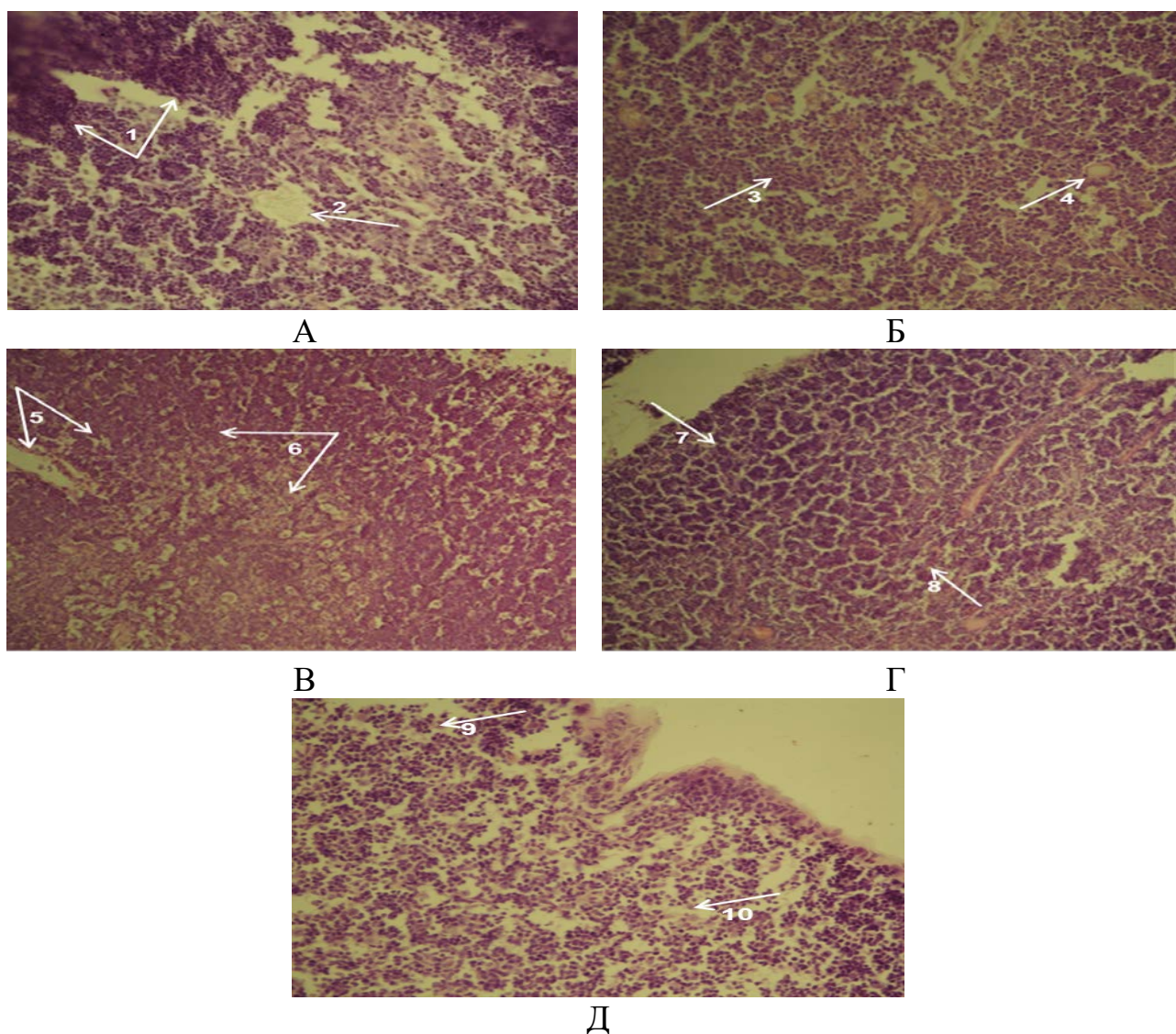


Рис. 3.29. Микроскопическая картина тимуса опытных животных со скипидар-индуцированным воспалением после патогенетической коррекции препаратами

*Ткань тимуса фиксировали в парафине и окрашивали по Ван Гизону и гематоксилин-эозином. Увеличение x200. Показаны гистологические слайды для группы Опыт+МХФ-2: А - через 7 суток после моделирования скипидар-индуцированного воспаления: граница между корковым и мозговым слоями нечеткая: 1 – границы коркового слоя, 2 – тельца вилочковой железы в состоянии дистрофии; Б – через 14 суток после моделирования скипидар-индуцированного воспаления: резкая гиперплазия тимуса: 3 – лимфоциты, 4 – тельца вилочковой железы; для группы Опыт+ПО: В - через 7 суток после моделирования скипидар-индуцированного воспаления: 5 – очаги делимфатизации в корковом слое, 6 - нечеткость границы между корковым и мозговым слоями; Г – через 14 суток после моделирования скипидар-индуцированного воспаления: 7 - диффузная гиперплазия тимуса, 8 - утолщение коркового слоя; для группы Опыт+Р: Д - через 14 суток после моделирования скипидар-индуцированного воспаления: снижение количества лимфоцитов в корковом слое с переходом на мозговой слой (инверсия слоев) [31]: 9 – корковый слой, 10 – мозговой слой*

Исследованиями, проведенными через 7 суток в тимусе крыс после индукции воспаления скипидаром и коррекции опытных крыс МХФ-2, установлено расширение границ коркового вещества с нечеткими очертаниями, обнаружены неплотные скопления лимфоцитов с очагами делимфатизации (рис. 3.29.-А). Мозговой слой был более плотно упакован. Более крупные тельца Гассалья состояли из клеток эпителиального происхождения (4-5 слоя), отдельные из которых находились в дистрофичном состоянии с наличием апоптозных телец. Среди клеток встречались тельца Гассалья, окруженные макрофагами, лимфоцитами.

Параллельно проведенными морфометрическими исследованиями тимуса опытных крыс группы Опыт+МХФ-2 установлено аналогичное увеличение ширины мозгового вещества, на 120,7% и 47,4% статистически значимо превышавшее значения групп АВ и Ме+АВ (табл. 3.27). По сравнению с МХФ-2 в микроскопической картине тимуса опытных крыс, получавших рувимин, корковый и мозговой слои выделялись четкими границами.

Таблица 3.27 – Морфометрические параметры тимуса крыс с экспериментальным воспалением, вызванным на фоне интоксикации ВА и ДК и коррекции препаратами, ( $M \pm m$ )

| Серии          | Ширина, $\text{мкм}^2$    |                             | Площадь, $\text{мкм}^2$     |                           | КМИ<br>(y.e.) |
|----------------|---------------------------|-----------------------------|-----------------------------|---------------------------|---------------|
|                | КВ*                       | МВ                          | КВ                          | МВ                        |               |
| Через 7 суток  |                           |                             |                             |                           |               |
| АВ             | 82,6±6,1                  | 137,1±7,5                   | 126912±42716                | 74925±23429               | 1,64±0,2      |
| Ме+АВ (опыт)   | 102,5±8,2 <sup>a</sup>    | 205,3±13,6 <sup>a</sup>     | 236631±55535                | 159331±49970              | 1,59±0,2      |
| Опыт+МХФ-2     | 97,7±9,3                  | 302,6±30,9 <sup>a,b</sup>   | 200347±32647                | 150758±52303              | 2,13±0,8      |
| Опыт+Р         | 166,1±18,9 <sup>a,b</sup> | 388,2±28,9 <sup>a,b</sup>   | 435356±49194 <sup>a,b</sup> | 255476±41275 <sup>a</sup> | 2,0±0,6       |
| Опыт+ПО        | 138,4±9,3 <sup>a,b</sup>  | 425,8±29,5 <sup>a,b</sup>   | 312749±39537 <sup>a</sup>   | 211084±45433 <sup>a</sup> | 2,04±0,5      |
| Через 14 суток |                           |                             |                             |                           |               |
| АВ             | 83,6±8,0                  | 106,3±13,4 <sup>c</sup>     | 122556±44418                | 77287±38464               | 2,1±0,6       |
| Ме+АВ (опыт)   | 81,4±3,8 <sup>c</sup>     | 187,0±9,1 <sup>a</sup>      | 176071±42087                | 131447±37659              | 1,57±0,3      |
| Опыт+МХФ-2     | 109,7±9,4 <sup>a,b</sup>  | 254,0±20,9 <sup>a,c</sup>   | 164325±35752                | 80751±20695               | 2,39±0,5      |
| Опыт+Р         | 80,4±7,3 <sup>c</sup>     | 350,7±43,0 <sup>a,b</sup>   | 146725±36990 <sup>c</sup>   | 161015±75606              | 1,81±0,6      |
| Опыт+ПО        | 116,8±8,2 <sup>a,b</sup>  | 234,9±17,2 <sup>a,b,c</sup> | 235907±54226                | 98389±23151 <sup>c</sup>  | 2,81±0,7      |

Примечание: -  $p \leq 0,05$  по отношению: а - к АВ; b - к Ме+АВ; с - к предыдущему сроку; \* - КВ – корковое вещество, МВ – мозговое вещество

Рувимин статистически значимо повышал ширину и площадь коркового вещества тимуса по сравнению с Ме+АВ в 1,6 и 1,8 раза, ширину и площадь мозгового вещества в 1,9 и 1,6 раза соответственно, за счет чего был увеличен корково-мозговой индекс (КМИ). Следует отметить, что нарастание ширины и площади мозгового вещества тимуса под влиянием рувимина сопоставимо с ПО. В микроскопической картине тимуса в группе сравнения Опыт+ПО отмечалось утолщение коркового вещества, четко разграниченного с мозговым, с большим содержанием лимфоцитов среднего размера (см. рис. 3.29.-В).

Мозговое вещество было плотно упаковано лимфоцитами, перешедшими из коркового слоя. Встречались увеличенные в размерах ретикулоэпителиоцитарные клетки со светлой цитоплазмой. Макрофагов в окружении большого количества мелких телец Гассалья, состоявших из нескольких слоев эпителиальных клеток, встречалось мало. Отмечалось статистически значимое увеличение ширины и площади коркового и мозгового слоев тимуса, что приводило к повышению КМИ (см. табл. 3.27).



Таким образом, в первый срок исследования МХФ-2, также как и полиоксидоний восстанавливает клеточность тимуса опытных животных до уровня АВ в соответствии с динамикой воспаления. Между тем, через 7 суток эффективность МХФ-2 уступает ПО. В этот срок исследования под влиянием МХФ-2 клеточность тимуса снижается, по-видимому, из-за сохранившихся очагов делимфатизации в корковом слое, в неравномерно утолщенном мозговом слое встречаются тельца Гассалья с признаками дистрофии и апоптоза.

Рувимин в первый срок исследования, также, как и МХФ-2 восстанавливает клеточность тимуса. Через 7 суток рувимин активирует гиперпластические процессы в корковом и мозговом слоях тимуса. Эффективность рувимины в этот срок исследования сопоставима с ПО.

Через 14 суток отмечалось усиление гиперпластических процессов в тимусе опытных животных группы Опыт+МХФ-2 в виде двукратного увеличения площади коркового слоя в сравнении с мозговым (см. табл.3.27). Между тем, в мозговом слое МХФ-2 нивелировал токсические проявления солей ванадия и хрома в виде повреждений дистрофического характера эпителиальных слоев мелких телец Гассалья, количество которых повышалось по сравнению с предыдущим сроком исследования (см. рис. 3.29.-Б).

Под влиянием рувимины к этому сроку исследования обнаружены нечеткие границы между слоями, размеры коркового слоя были резко снижены (см. рис. 3.29.-Д). Напротив, в мозговом веществе обнаружено увеличение тимоцитов, макрофагов и телец Гассалья. У некоторых эпителиальных клеток телец Гассалья обнаружены признаки дистрофии.

Через 14 суток под влиянием ПО отмечалась диффузная гиперплазия тимуса за счет утолщения коркового слоя, увеличения площади коркового вещества по сравнению с мозговым слоем (см. рис. 3.29.-Б). В плотных рядах лимфоцитов коркового слоя преобладали лимфоциты средних размеров. КМИ был увеличен (см. табл. 3.27). В мозговом веществе встречались тельца

Гассалья с крупными эпителиальными клетками без дистрофических изменений в окружении макрофагов.

Полученные результаты морфометрических и морфологических исследований полностью совпадали с приведенными выше данными и свидетельствовали о завершении к этому сроку воспалительного процесса у опытных крыс, получавших ПО.

Таким образом, к 14 суткам эксперимента эффективность МХФ-2 и рувимина оказалась сопоставимой с ПО. Все изученные препараты нивелируют токсические эффекты солей ванадия и хрома, восстанавливая клеточность тимуса до уровня АВ.

МХФ-2 вызывает активацию гиперпластических процессов коркового слоя тимуса, ускоряя дифференцировку в нем Т лимфоцитов, устраняет в эпителиальных клетках телец Гассалья повреждения дистрофического характера.

Рувимин эффективнее, чем МХФ-2 и ПО, стимулирует пролиферативную активность клеток тимуса опытных крыс с асептическим воспалением. Рувимин продолжает активацию гиперпластических процессов мозгового слоя тимуса, по-видимому, за счет ускорения перехода лимфоцитов из коркового слоя, увеличения тимоцитов, макрофагов и телец Гассалья.

Резюмируя представленные результаты морфологических, морфометрических и цитологических исследований тимуса опытных животных с экспериментальным воспалением, следует отметить, что морфологические признаки истощения тимуса, вызванные двухнедельной интоксикацией соединениями ванадия и хрома, под влиянием препаратов восстанавливались уже на ранних этапах эксперимента, проявляясь гиперплазией его корковой и мозговой зон, и поэтапно наблюдались в течение всего эксперимента.

Основываясь на результатах проведенных исследований сделано заключение: патогенетическая эффективность МХФ-2 и рувимина

сопоставима с препаратом сравнения полиоксидонием во все сроки исследования.

### **3.4.3. Экспериментальная оценка регенеративного потенциала МХФ-2 и рувимина по результатам цитологических и микроскопических исследований брыжеечных лимфатических узлов опытных крыс в динамике течения воспаления**

Параллельно с исследованием тимуса проводили микроскопическое и цитологическое исследование брыжеечных лимфатических узлов крыс, относящихся к периферическим органам иммуногенеза. Перед проведением этих исследований была проведена оценки клеточности брыжеечных лимфатических узлов крыс после патогенетической коррекции препаратами МХФ-2, рувимин и ПО (табл. 3.28).

Через 1 сутки все исследованные препараты статистически значимо повышали клеточность брыжеечных лимфатических узлов. Так, под влиянием МХФ-2 и ПО клеточность брыжеечных лимфатических узлов оказалась выше АВ на 176,2% и 179%, тогда как по сравнению с Me+AB на 126,3% и 128,5% соответственно.

В последующие 7 и 14 суток исследования индексы Кл/М препаратов оставались на уровне АВ. Между тем, клеточность брыжеечных лимфатических узлах оказалась выше АВ и Me+AB у крыс, получавших соответственно МХФ-2 (на 51,1% и 90,3%) и ПО (на 24,5% и 56,7%).

Через 14 суток клеточность брыжеечных лимфатических узлов под влиянием МХФ-2 вернулась к уровню АВ, тогда как под влиянием ПО оставалась статистически значимо выше АВ на 46,7%.

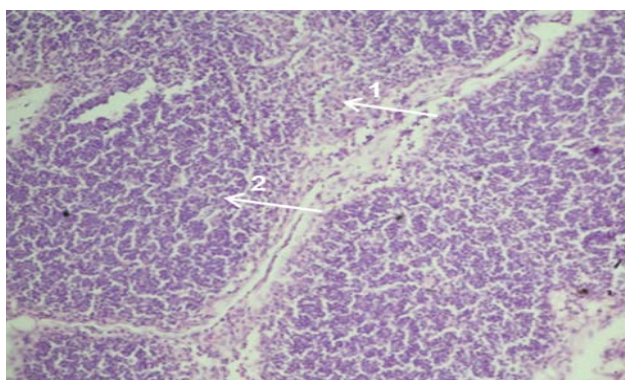
Таким образом, исследованные препараты с 1 суток исследования восстанавливали клеточность брыжеечных лимфатических узлов с последующим приростом клеточности к 7 суткам исследования. Через 14

Таблица 3.28 – Оценка клеточности брыжеечных лимфатических узлов крыс с асептическим воспалением на фоне интоксикации ВА и БК и коррекции препаратами

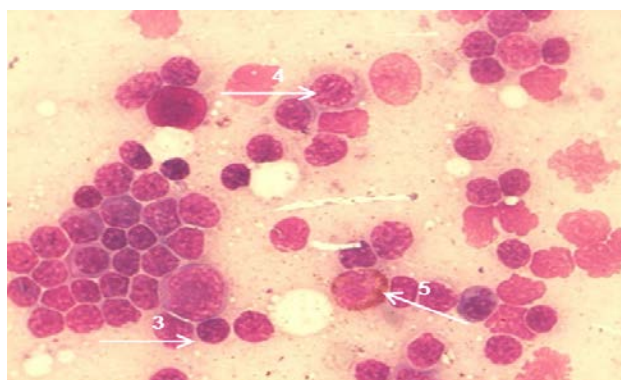
| Показатель  | Серии, М (95%ДИ), (n=10)*  |                          |                             |                             |
|---|----------------------------|--------------------------|-----------------------------|-----------------------------|
|   | АВ**                       | Ме+АВ (опыт)             | Опыт+ПО                     | Опыт+МХФ-2                  |
| Через 1 сутки   |                            |                          |                             |                             |
| Масса, мг   | 73,2 (18,6)                | 82,5 (51,2)              | 102,0 (33,5)                | 128,0 (26,8) <sup>a</sup>   |
| Клетки, млн.кл/мг   | 50,8 (14,3)                | 62,0 (25,7)              | 141,7 (41,8) <sup>a,b</sup> | 140,3 (37,5) <sup>a,b</sup> |
| Кл/М, абс   | 0,7 (0,2)                  | 0,8 (0,2)                | 1,5 (0,6) <sup>a</sup>      | 1,1 (0,2) <sup>a</sup>      |
| Через 7 суток   |                            |                          |                             |                             |
| Масса, мг   | 71,7 (21,4)                | 85,4 (19,5)              | 93,3 (16,9) <sup>b</sup>    | 147,1 (18,0) <sup>a,b</sup> |
| Клетки, млн.кл/мг   | 105,0 (22,5) <sup>e</sup>  | 83,4 (24,6)              | 130,7 (16,9) <sup>a,b</sup> | 158,7 (48,0) <sup>a,b</sup> |
| Кл/М, абс   | 1,5 (0,2) <sup>e</sup>     | 1,0 (0,3) <sup>a</sup>   | 1,4 (0,3)                   | 1,1 (0,3)                   |
| Через 14 суток  |                            |                          |                             |                             |
| Масса, мг   | 66,7 (15,1)                | 92,0 (16,4) <sup>a</sup> | 90,0 (26,1)                 | 65,0 (32,7) <sup>e,f</sup>  |
| Клетки, млн.кл/мг   | 79,6 (15,0) <sup>e,f</sup> | 90,0 (22,2)              | 116,8 (44,9) <sup>a</sup>   | 84,9 (43,8) <sup>e,f</sup>  |
| Кл/М, абс   | 1,2 (0,1) <sup>e,f</sup>   | 1,0 (0,3)                | 1,3 (0,3)                   | 1,3 (0,2)                   |
| Примечание: * - М – среднее; СО – стандартное отклонение;** – по Mann-Whitney U-test $p \leq 0,05$ по отношению: а – к АВ; b – к опыту; с – к Опыт+ПО; d – к Опыт+МХФ-2; e – к 1 суткам; f – к 7 суткам |                            |                          |                             |                             |

суток под влиянием МХФ-2 этот показатель снижался до уровня АВ.

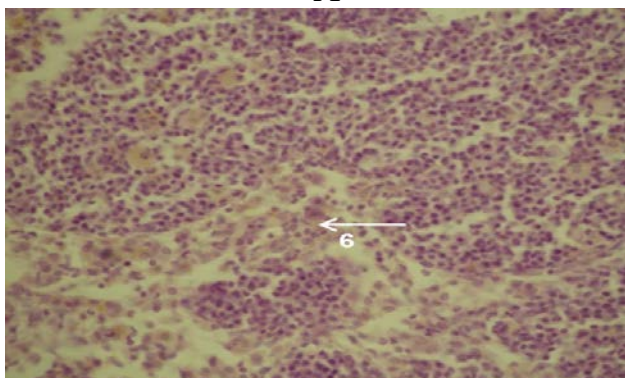
Полученные результаты были подтверждены морфологическими исследованиями лимфоорганов опытных крыс, получавших МХФ-2. Так, через 7 суток после коррекции МХФ-2 опытных животных с экспериментальным воспалением отмечалась гиперплазия как субкапсулярной, так и паракортикальной зон, что являлось показателем продолжающегося антигенного раздражения из зон повреждения. (рис. 3.30.- А). Обнаружены вторичные лимфоидные фолликулы с активными крупными герминативными центрами. Количество эозинофильных лейкоцитов в мозговом слое было увеличено.



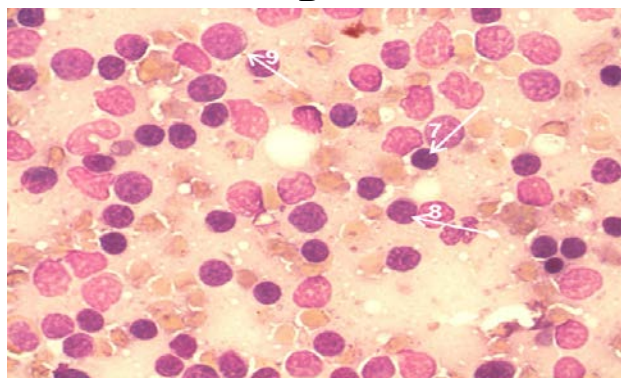
А



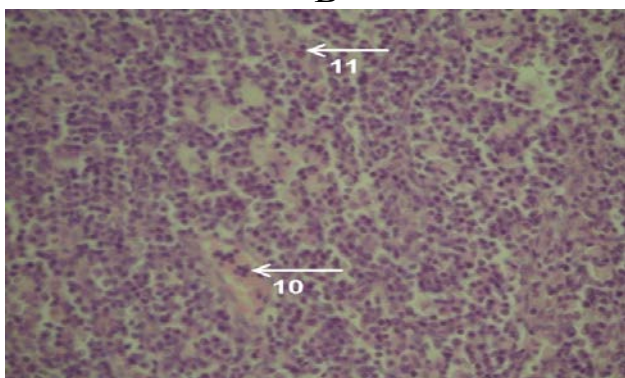
Б



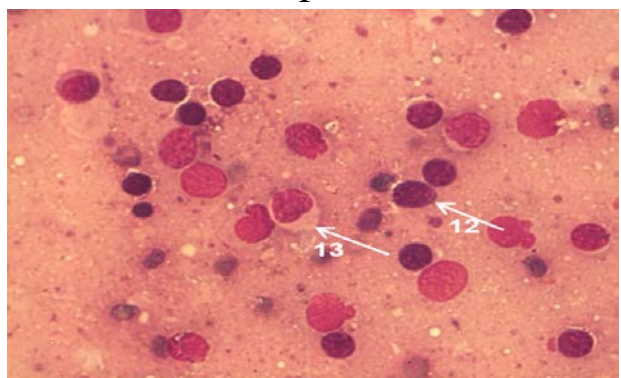
В



Г



Д



Е

Рис. 3.30. Микроскопическая картина и клеточный состав брыжеечных лимфатических узлов опытных животных со скипидар-индуцированным воспалением после патогенетической коррекции препаратами (через 7 суток) Ткань брыжеечного лимфатического узла фиксировали в парафине и окрашивали по Ван Гизону и гематоксилин-эозином. Увеличение  $\times 200; 1000$ . Показаны репрезентативные гистологические и цитологические слайды для группы **Опыт+МХФ-2**: А - гиперплазия как субкапсулярной, так и паракортикальной зон: 1 – субкапсулярная зона, 2 – паракапсулярная зона; Б - 3 – лимфоцит, 4 – плазматическая клетка, 5 - эозинофил; для группы **Опыт+Р**: В - в мякотных шнурах увеличено количество макрофагов, они перегружены пигментами (коричневого цвета): 6 – макрофаги; Г - 7 – лимфоцит, 8 – пролимфоцит, 9 -

*плазматическая клетка; для группы Опыт+ПО: Д - расширение мозгового слоя: 10 – лимфобласты, 11 – эозинофилы; Е - 12 – пролимфоцит, 13 – плазматическая клетка*

Параллельными цитологическими исследованиями пунктатов брыжеечных лимфоузлов (рис. 3.30.-Б) обнаружены мелкие лимфоциты с грубоватой структурой хроматина, единичные гистиоциты, эозинофилы и плазматические клетки.

Таким образом, морфологические изменения лимфатических узлов показали, что после недельной коррекции МХФ-2 антигенная стимуляция оставалась достаточно высокой, т.е. в области раны оставались очаги повреждения, в паренхиматозных органах - дистрофические изменения, обусловленные действием токсических металлов.

Через 7 суток в брыжеечных лимфоузлах опытных крыс под влиянием рувимина активировалась в основном паракортикальная зона, корковый слой в целом был утолщен, КМИ увеличен за счет паракортикальной зоны, в мягкотных тяжах было много эозинофильных лейкоцитов (рис. 3.30.-В).

Морфологически в клеточном пунктате отмечалось увеличение лимфоцитов (рис. 3.30-Г). Пунктат лимфоузла на 98% был представлен лимфоцитами и на 2% пролимфоцитами, единичные гистиоциты, единичные эозинофилы, количество плазматических клеток было увеличено.

После коррекции ПО опытных крыс с экспериментальным воспалением, проведенными через 7 суток микроскопическими исследованиями установлена умеренная гиперплазия лимфатического узла. Мозговой слой был расширен, в медуллярных тяжах отмечалось много лимфобластов, плазмобластов (рис. 3.30.-Д), в корковом слое было много эозинофильных лейкоцитов, макрофагов. В мозговом слое появлялись вторичные лимфоидные фолликулы. Кровеносные сосуды мозгового слоя были полнокровны, отмечались явления отека.

Аналогичные изменения были обнаружены и при исследовании пунктатов лимфатических узлов. Так, цитологическими исследованиями,

проведенными через 7 суток, выявлено увеличение в пунктате брыжеечного лимфатического узла опытных крыс пролимфоцитов и плазматических клеток (рис. 3.30.-Е).

Исследованиями, проведенными через 14 суток от начала воздействия скипидара и коррекции при помощи МХФ-2 опытных крыс с экспериментальным воспалением выявлена резкая гиперплазия лимфатических узлов, утолщение коркового слоя за счет паракортикальной зоны (рис. 3.31.-А). В мягкотных тяжах преобладали лимфобласты и плазмобласты, количество средних лимфоцитов было увеличено, а увеличение КМИ развивалось за счет паракортикальной зоны. Пунктат брыжеечного лимфоузла был представлен на 60-65% лимфоцитами и на 35-40% - «голыми» ядрами, единичными плазматическими клетками, эозинофилами и гистиоцитами (рис. 3.31.-Б).

Через 14 суток в брыжеечных лимфоузлах опытных крыс под влиянием рувимины наблюдалась диффузная гиперплазия как паракортикальной, так и субкапсулярной зон. В мягкотных тяжах было увеличено количество лимфобластов, плазмобластов и плазматических клеток. Отмечались полнокровие сосудов и отек мозгового слоя (рис. 3.31.-В). В мягкотных шнурах было много лимфобластов, плазмобластов, сосуды полнокровны. Следовательно, антигенное раздражение, связанное с повреждением в зоне раны, а также дистрофические изменения, обусловленные токсическим действием металлов, оставались еще достаточными.

В пунктате брыжеечного лимфоузла помимо зрелых лимфоцитов (более 80%) обнаружены единичные плазматические клетки, эозинофилы и гистиоциты (рис. 3.31.-Г). Через 14 суток на гистологических срезах брыжеечных лимфатических узлов опытных животных под влиянием полиоксидония отмечалась диффузная гиперплазия паракортикальной зоны по сравнению с субкапсулярной зоной (рис. 3.31.-Д).

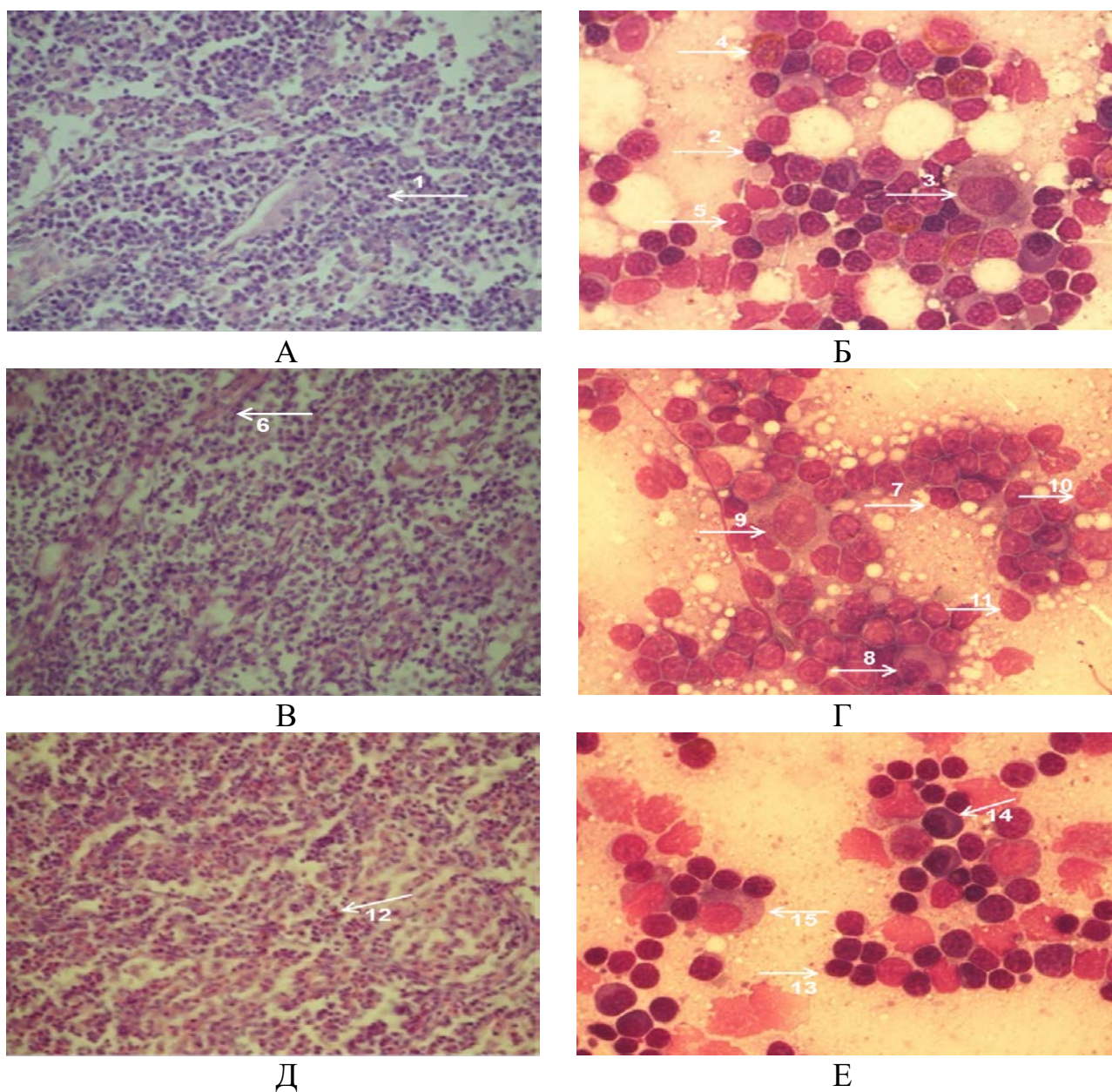


Рис. 3.31. Микроскопическая картина и клеточный состав брыжеечного лимфатического узла у опытных животных со скипидар-индуцированным воспалением после патогенетической коррекции препаратами (через 14 суток) Ткань брыжеечного лимфатического узла фиксировали в парафине и окрашивали по Ван Гизону и гематоксилин-эозином. Увеличение  $\times 200; 1000$ . Показаны репрезентативные гистологические и цитологические слайды для группы **Опыт+МХФ-2**: А - в мякотных шнурах много лимфобластов и плазмобластов: 1 – лимфобласты; Б - 2 – лимфоцит, 3 – плазматическая клетка, 4 – эозинофил, 5 – голое ядро; для группы **Опыт+Р**: В - в мозговом слое сосуды полнокровны, в мякотных шнурах много лимфобластов и плазмобластов: 6 – лимфобласты; Г - 7 – лимфоцит, 8 – пролимфоцит, 9 – плазматическая клетка, 10 – эозинофил, 11 – голое ядро; для группы **Опыт+ПО**: Д - диффузная



*гиперплазия паракортикальной зоны: 12 – лимфобласты; Е - 13 – лимфоцит, 14 – пролимфоцит, 15 – плазматическая клетка*

В мягкотных шнурах было много лимфобластов и плазматических клеток. Кровеносные сосуды были умеренно кровенаполнены. Установлено, что структура лимфатических узлов полностью восстанавливалась, отмечалось снижение количества вторичных фолликулов по сравнению с предыдущими сроками. В мягкотных шнурах обнаруживались в основном лимфобласты и гистиоциты. Пунктат брыжеечного лимфоузла был представлен на 95% зрелыми лимфоцитами и на 5% пролимфоцитами. В пунктате также обнаруживались гистиоциты и плазматические клетки (рисунок 3.31.-Е).

Таким образом, исследованные препараты с 1 суток исследования восстанавливали клеточность брыжеечных лимфатических узлов с последующим приростом клеточности к 7 суткам исследования. Через 14 суток под влиянием МХФ-2 и рувимины этот показатель снижался до уровня АВ.

Брыжеечные лимфатические узлы после коррекции МХФ-2 в начале эксперимента реагировали гиперплазией как субкапсулярной, так и паракортикальной зон, что являлось показателем продолжающегося антигенного раздражения из зон повреждения. Через 14 суток гиперпластические процессы сохранялись только в паракортикальной (тимусзависимой) зоне.

Под влиянием рувимины в брыжеечных лимфатических узлах опытных крыс с асептическим воспалением активация паракортикальной зоны и утолщение коркового слоя в начале эксперимента приводила к гиперплазии коркового слоя и увеличению КМИ. Пунктат лимфатических узлов большей частью был представлен лимфоцитами и меньшей - пролимфоцитами, что полностью соответствовало картине животных с АВ.

Коррекция полиоксидонием опытных животных с асептическим воспалением к концу второй недели приводило к увеличению ширины и площади коркового вещества тимуса с преобладанием в них лимфоцитов средних размеров, что свидетельствовало об активации тимуса. В ответ на лечение полиоксидонием в эти же сроки исследования брыжеечные лимфатические узлы отреагировали гиперплазией паракортикальной зоны с преобладанием в пунктатах зрелых лимфоцитов. Полученные данные были обусловлены улучшением к этому сроку морфофункционального состояния тимуса и брыжеечных лимфоузлов опытных животных с асептическим воспалением после коррекции полиоксидонием.

### **3.5 Математический анализ массива данных с применением многомерных методов статистического анализа**

#### **3.5.1 Математическое моделирование массива данных с применением метода канонической корреляции**

С патогенетической точки зрения варьирование показателей различных компонентов иммунологической реактивности на воздействие тяжелых металлов должно отражать принципы общности ответной реакции организма.

На данном этапе работы были изучены гематологические и иммунологические параметры крови, взаимосвязь которых при отравлении солями ванадия и хрома мы изучили с применением метода канонической корреляции. Для этого весь массив данных был разделен на 2 подгруппы, обозначенные как «Гематология» и «Иммунология», где фактором, характеризующим направление и силу корреляционной связи канонических переменных, являются соли ванадия и хрома. Подобное подразделение признаков позволит определить на начальном этапе работы достаточность связей между подгруппами с целью выявления наиболее значимых факторов и

информативных параметров-откликов различных компонентов иммунологической реактивности на токсическое воздействие солей ванадия и хрома.

Признаки, характеризующие принадлежность к подгруппам, представлены в табл. 3.29. В результате проведенного анализа были отобраны максимальные стандартизированные канонические коэффициенты, которые использовались для ранжирования вкладов разных признаков в каноническую ось. Так, наибольший вклад в каноническую ось «GEMAT1» внесли лимфоциты, тогда как в «IMMUNO1» - показатели метаболической и поглотительной активности нейтрофилов, лимфоциты и показатели повреждения, вызванные ванадием. Так, при анализе взаимосвязи между подгруппами «Иммунология» и «Гематология», сгруппированным по группам «Контроль» и «Me», установлено, что комплексное воздействие соединений тяжелых металлов оказывает большее влияние на содержание лимфоцитов в обеих подгруппах, что нашло отклик в высоких коэффициентах корреляции абсолютных содержаний CD3+- и CD4+-лимфоцитов равных 1,4717 и 0,4789 соответственно для подгруппы «Иммунология», а также общих лейкоцитов и абсолютного содержания лимфоцитов равных 0,9053 и 0,9886 соответственно для подгруппы «Гематология».

Каноническая корреляция между двумя наборами признаков выявила высокий коэффициент корреляции, равный 0,983659 с величиной коэффициента, скорректированного на объем наблюдений 0,977642.

Таблица 3.29 – Канонические корреляции гематологических и иммунологических показателей крови экспериментальных животных

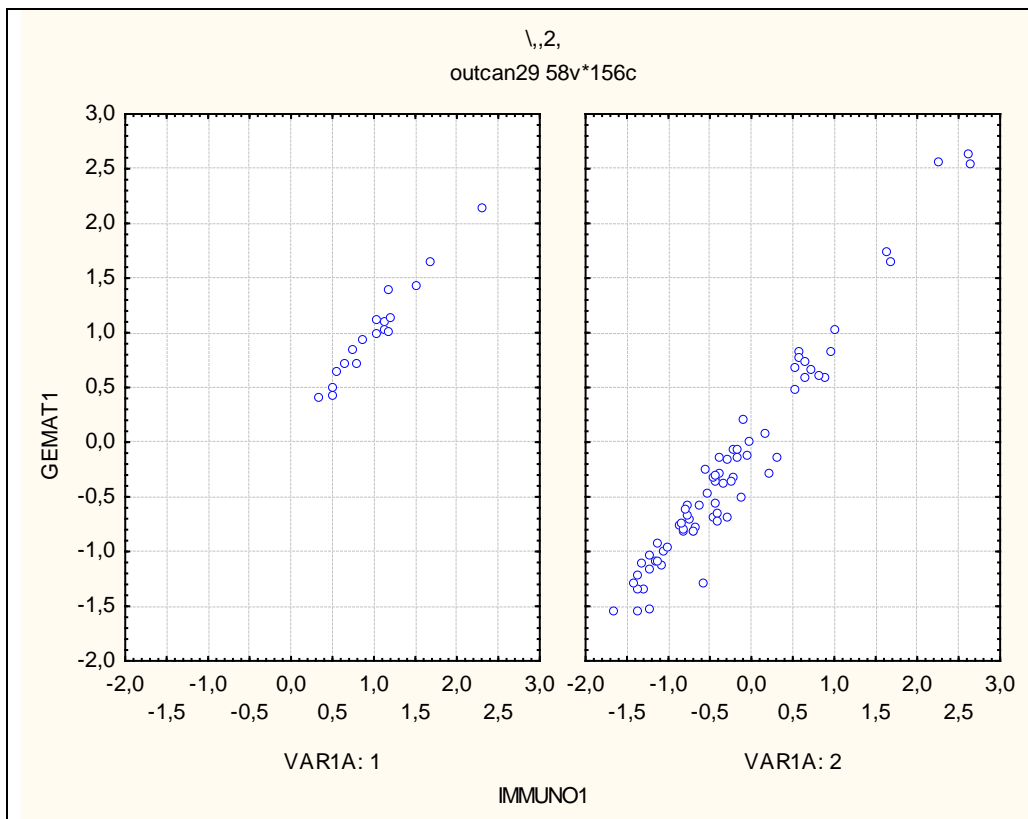
| Набор переменных «Гематология» | Канонические стандартизованные коэфф. для «Гематология» | Коэфф. корреляции | Коэфф. корреляции «Гематология» к оси IMMUNO1 | Набор переменных «Иммунология» | Канонические стандартизованные коэфф. для «Иммунология» | Коэфф. корреляции | Коэфф. корреляции «Гематология» к оси GEMAT1 |
|--------------------------------|---|-------------------|---|--------------------------------|---|-------------------|--|
| Лейкоциты                      | -0,1213   | <b>0,9053</b>     | <b>0,8905</b>                                 | НСТ спонт.                     | <b>0,5166</b>   | -0,1413           | -0,1389                                      |
| Лимфоциты, %                   | -0,2603   | 0,4974            | 0,4893  | НСТ индуц.                     | <b>-0,4204</b>  | -0,1900           | -0,1869                                      |
| П/Я, %                         | -0,0148   | -0,1629           | -0,1603                                       | ФН спонт.                      | <b>-0,4774</b>  | -0,2562           | -0,2520                                      |
| С/Я, %                         | -0,1976   | -0,4547           | -0,4473                                       | ФГ индуц.                      | <b>0,3525</b>   | -0,2382           | -0,2343                                      |
| Эозинофилы, %                  | -0,0198   | -0,0743           | -0,0731                                       | Контр.проба                    | -0,1423   | -0,1862           | -0,1832                                      |
| Моноциты, %                    | 0,0000  | -0,2797           | -0,2751                                       | Контр.проба+БК                 | -0,0943   | -0,4247           | -0,4178                                      |
| Лимфоциты, абс                 | <b>1,1237</b>   | <b>0,9886</b>     | <b>0,9724</b>                                 | "Индекс повр. хрома            | -0,0241   | 0,4182            | 0,4114                                       |
| ЛИИ                            | -0,0053   | -0,3086           | -0,3036                                       | Контр.проба+ВА                 | <b>0,2097</b>   | -0,2069           | -0,2035                                      |
| Индекс ИРИ                     | 0,0186  | 0,3266            | 0,3213  | Индекс повр. ванадия           | 0,0648  | 0,1061            | 0,1044                                       |
| ЛИ                             | 0,0078  | 0,3373            | 0,3318  | CD3+, %                        | -0,3988   | 0,5990            | 0,5892                                       |
| Эритроциты                     | 0,0486  | 0,4555            | 0,4481  | CD3+, абс                      | <b>1,4717</b>   | <b>0,9719</b>     | <b>0,9560</b>                                |
| Гемоглобин                     | 0,0337  | 0,3264            | 0,3211  | CD4+, %                        | <b>0,4781</b>   | 0,5742            | 0,5648                                       |
| ЦПК                            | -0,1472   | 0,0587            | 0,0578  | CD4+, абс                      | <b>0,4789</b>   | <b>0,9112</b>     | <b>0,9061</b>                                |
|                                |   |                   |   | CD8+, %                        | -0,1248   | 0,1092            | 0,1074                                       |
|                                |   |                   |   | CD8+, абс                      | 0,0133  | <b>0,9103</b>     | <b>0,8954</b>                                |
|                                |   |                   |   | CD4+/CD8+                      | <b>-0,2278</b>  | 0,3312            | 0,3258                                       |
|                                |   |                   |   | ЦИК                            | 0,0264  | 0,3003            | 0,3159                                       |

В табл. 3.30 приведены результаты проверки многомерных нулевых гипотез для полученной канонической корреляции. Последний столбец содержит уровни значимости гораздо меньшие, чем 5%, что означает значимость канонической корреляции.

Таблица 3.30 - Многомерная статистика и F-приближение

| S=12 M=5 N=26,5          |           |         |        |        |        |
|--------------------------|-----------|---------|--------|--------|--------|
| Statistic                | Value     | F Value | Num DF | Den DF | Pr> F  |
| Лямбда Уилкса            | 0,0003643 | 2,47    | 276    | 621,17 | <,0001 |
| Признак Пиллая           | 4,2546216 | 1,58    | 276    | 792    | <,0001 |
| Признак Хотеллинга-Лоули | 36,572492 | 7,06    | 276    | 354,23 | <,0001 |
| Наибольший корень Роя    | 29,850778 | 85,66   | 23     | 66     | <,0001 |

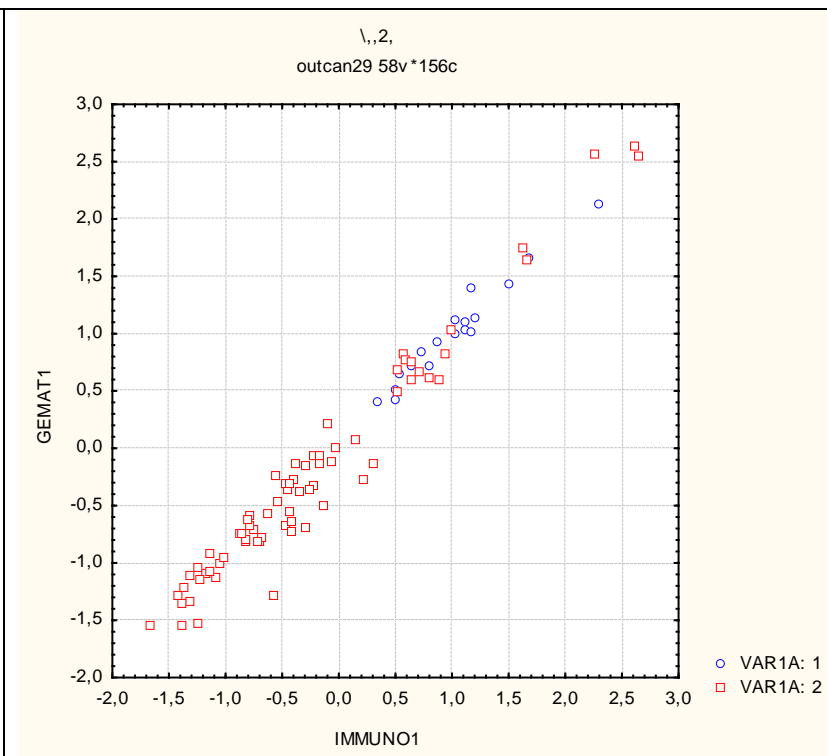
Оценка парной корреляции между двух переменных показал сильную корреляционную взаимосвязь иммунологических и гематологических показателей крови, что с патофизиологической точки зрения является закономерной. Для наглядности полученные результаты приведены в виде двумерных распределений наблюдений в осях канонических переменных (рис.3.32.-А, 3.32.-Б, рис.3.33). На представленных рисунках видно, что распределение наблюдений для контрольной и опытной групп животных различны. Так, для опытной группы животных наблюдается большая вариабельность значений по каноническим осям «IMMUNO1» и «GEMAT1», что свидетельствовало о напряжении резервных возможностей организма экспериментальных крыс. Большой угол наклона линии регрессии для градации группы «Ме» свидетельствует о сильной взаимосвязи между переменными.



Примечание: VAR1A:1 – контроль; VAR1A:2 – Me

Рис. 3.32. – А: График двухмерных распределений наблюдений в осях канонических переменных, характеризующих группу «Контроль» в подгруппах «Иммунология» и «Гематология»

Рис. 3.32. – Б:– График двухмерных распределений наблюдений в осях канонических переменных, характеризующих группу «Me» в подгруппах «Иммунология» и «Гематология»

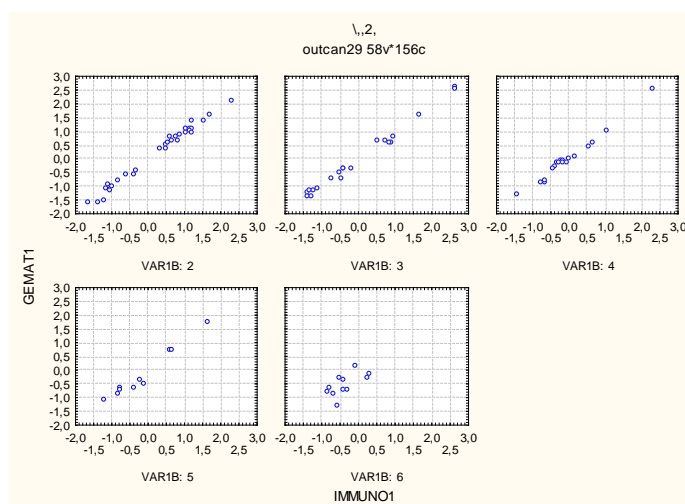


Примечание: синие– контроль; красные– Me

Рис. 3.33. – Совмещенный график двухмерных распределений наблюдений в осях канонических переменных, характеризующих группы «Контроль» и «Me» в подгруппах «Иммунология» и «Гематология»

Эта тенденция хорошо прослеживается в совмещенном графике на рис. 3.33.

Далее исследовали вариабельность вышеизложенных показателей иммунологической реактивности экспериментальных животных на фоне коррекции препаратами (рис. 3.34.).



Примечание: VAR1B:2 – Me; VAR1B:3 – Me +ПО; VAR1B:4 – Me +МХФ-2; VAR1B:5 – Me +Рувимин

Рис. 3.34. График двухмерных распределений наблюдений в осях канонических переменных, характеризующих группу «Me+Препараты» в подгруппах «Иммунология» и «Гематология»

Более выраженную и сопоставимую ответную реакцию организма при интоксикации солями ванадия и хрома вызывали ПО и МХФ-2, результаты которых представлены на рисунке 12 (VAR1B:3 и VAR1B:4). Вытянутость канонических переменных в оси «IMMUNO1» вместе с большим углом наклона по оси «GEMAT1» свидетельствовали о сильной корреляционной связи между этими подгруппами.

Становится очевидным тот факт, что вызванный ПО и МХФ-2 существенный размах иммунологических и гематологических показателей, обусловлен их выраженной иммуномодулирующей активностью.

Оценка парной корреляции в группе экспериментальных животных, получавших руvimин, показал меньший отклик корреляционных

взаимодействий между изученными показателями иммунологической реактивности организма по сравнению с ПО и МХФ-2.

Из вышеизложенного следует заключить, что ответная реакция организма на интервенцию тяжелых металлов сопровождалась сдвигами гематологических и иммунологических показателей крови, характеризовавшими состояние иммунологической реактивности экспериментальных животных. Становится очевидным, что одним из ключевых звеньев в патогенезе металлиндуцированной иммунодепрессии является дефект Т-клеточного звена иммунитета. Оценка парной корреляции в группе препаратов выявила, что наибольший отклик иммунологической реактивности при комбинированном отравлении солями ванадия и хрома вызывали ПО и МХФ-2.

### **3.5.2 Математическое моделирование массива данных с применением метода дискриминантного анализа**

Для того чтобы выяснить главные отличительные признаки, которые бы позволили оптимальным способом разделить изучаемые группы между собой, нами был проведен дискриминантный анализ. В данном виде анализа нам было важно выяснить отличия между Me+AB (нелеченные животные с асептическим воспалением) и Опыт+Препараты (опытные животные с асептическим воспалением после введения препаратов).

Дискриминантный анализ проводился для 29 переменных, состоявших из 2515 наблюдений. В качестве группирующей переменной были взяты группы «Me+AB» и «Опыт+ПО», «Опыт+МХФ-2» «Опыт+Рувимин». В исходную совокупность дискриминантных переменных были включены иммунологические и гематологические показатели группы.



Пошаговая статистика включала 6 шагов, после которой было выявлено 6 информативных показателей, основные статистические показатели которых представлены в табл. 3.31.

Таблица 3.31 – Показатели заключительного пошагового анализа дискриминантных функций (через 1 сутки)

| Итоги анализа дискриминантных функций (Опыт+Препараты иммунологические показатели, 1 сутки) Шаг 6, Переменных в модели: 6; Группир: Группы (4 группы) Лямбда Уилкса: ,00000 при бл. F (18,8)=48,379 p< ,0000 |               |                |                |          |          |                  |
|--|---------------|----------------|----------------|----------|----------|------------------|
|  | Лямбда Уилкса | Частная лямбда | F-исключ (3,3) | p-уров.  | Толер.   | 1-толер. (R-кв.) |
| Опыт+Va  | 0,001365      | 0,001706       | 585,2718       | 0,000120 | 0,005813 | 0,994187         |
| CD4+   | 0,000953      | 0,002444       | 408,1871       | 0,000205 | 0,001153 | 0,998846         |
| Лейкоциты  | 0,000238      | 0,009788       | 101,1626       | 0,001639 | 0,006788 | 0,993212         |
| Th   | 0,000900      | 0,002588       | 385,4160       | 0,000223 | 0,002697 | 0,997303         |
| МСК моноц.   | 0,000441      | 0,005283       | 188,2973       | 0,000651 | 0,004133 | 0,995867         |
| CD8+   | 0,000011      | 0,203904       | 3,9043         | 0,146370 | 0,063839 | 0,936161         |

Частичная статистика лямбда Уилкса показала, что переменная «Опыт+ванадий» дает больший вклад (0,001706, F=585,2718) в дискриминацию между группами. Далее по значимости вклада (по нисходящей) переменные расположились в следующем порядке: CD4+, Th, МСК моноцитарные, лейкоциты. Несмотря на то, что переменная CD8+ вошла в модель, ее вклад в общую дискриминацию оказался меньшим (лямбда Уилкса 0,203904, F=3,9043) и статистически незначимым (p=0,146370).

Следовательно, на данном этапе исследования (через 1 сутки) мы можем заключить, что вышеуказанные переменные являются главными переменными, позволяющими производить дискриминацию между сравниваемыми группами.

Далее вычислили действительную дискриминантную функцию, которая позволила выяснить вклад 5 переменных в групповые различия. Результаты канонического анализа выявили 3 дискриминантных функции (корня), статистическая значимость между которыми представлена в таблице 3.32.

Таблица 3.32 – Результаты расчета статистической значимости критерия Хи-квадрат последовательных корней (через 1 сутки)

| Корни<br>исключен. | Критерий Хи-квадрат с послед. Исключ. Корней<br>(Опыт+Препараты иммунологические показатели 1 сутки) |               |                  |          |         |          |
|--------------------|--|---------------|------------------|----------|---------|----------|
|                    | Собств.<br>Знач.   | Канонич.<br>R | Уилкса<br>Лямбда | Хи-квад. | Ст. св. | р-уров.  |
| 0                  | 5134,218   | 0,999903      | 0,000002         | 77,82266 | 18      | 0,000000 |
| 1                  | 19,191   | 0,974922      | 0,011955         | 26,55939 | 10      | 0,003056 |
| 2                  | 3,143  | 0,870980      | 0,241394         | 8,52794  | 4       | 0,074045 |

Первая строка (нулевая) демонстрирует статистическую значимость корней ( $p \leq 0,00001$ ). Статистическая значимость второго корня относительно первого (строка 1) тоже статистически значима ( $p = 0,003056$ ). Третий корень после удаления второго корня оказался статистически незначим ( $p = 0,074045$ ). Следовательно интерпретировать будем стандартизованные коэффициенты первого и второго корня (табл. 3.33).

Таблица 3.33 – Стандартизованные дискриминантные коэффициенты (через 1 сутки)

| Переменные   | Стандартиз. Коэффициенты для канонических переменных |          |          |
|--------------|--|----------|----------|
|              | Корень 1   | Корень 2 | Корень 3 |
| Опыт+Va      | 13,099   | 0,41118  | 0,17173  |
| CD4+         | 29,349   | -1,75176 | 0,99144  |
| Лейкоциты    | -11,932  | -0,17593 | -2,14883 |
| Th           | 19,178   | -1,08749 | -1,10434 |
| МСК моноцит. | 15,514   | -0,22754 | 0,01047  |
| Соб.знач.    | 5134,218   | 19,19110 | 3,14260  |
| CD8+         | -3,474   | 0,61930  | 0,22106  |
| Кум. доля    | 0,996  | 0,99939  | 1,00000  |

Как видно из табл. 3.33, наиболее существенный вклад в разделение первой дискриминантной функции внесли CD4+, Th и МСК моноцитарные. Дискриминирующая мощность первой дискриминантной функции объясняется высоким показателем собственных значений (5134,218) и 99% накопленной доли объясненной дисперсии. Таким образом, важность первой функции становится неоспоримой.

Вторая дискриминантная функция наиболее тяжело взвешивается показателями CD4+, Th и повреждениями, вызванными ванадием. Несмотря на высокий процент кумулятивной доли объясненной дисперсии (99%), собственные значения этого корня намного ниже первого.

С целью визуализации полученных результатов ниже представлена диаграмма рассеяния канонических значений (рис. 3.35).

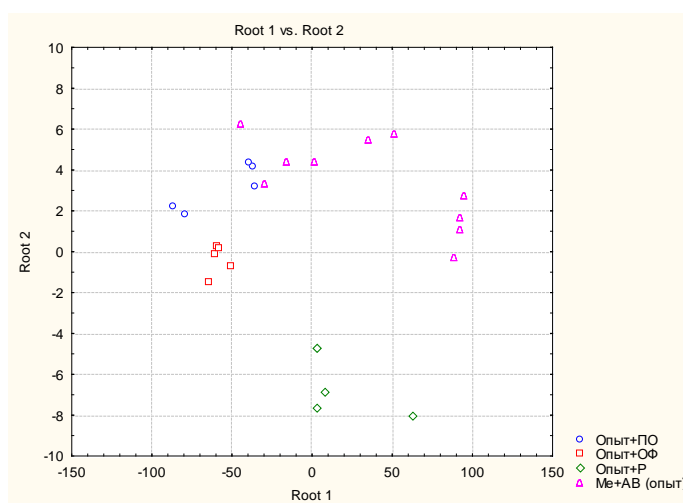


Рис. 3.35. Диаграмма рассеяния канонических корреляций для групп Me+AB, Опыт+ПО, Опыт+МХФ-2, Опыт+Р через 1 сутки после моделирования асептического воспаления и патогенетической коррекции препаратами

Как представлено на рис.3.35, по первой дискриминантной функции (корень 1) прослеживаются различия между группами, статистическая значимость которых представлена в табл.3.34.

Таблица 3.34 – Уровни статистической значимости между сравниваемыми группами (через 1 сутки)

| p-уровни (Опыт+Препараты иммунологические показатели, 1 сутки) |          |            |          |          |
|--|----------|------------|----------|----------|
| Группы   | Опыт+ПО  | Опыт+МХФ-2 | Опыт+Р   | Ме+АВ    |
| Опыт+ПО  |          | 0,001071   | 0,000102 | 0,000001 |
| Опыт+МХФ-2   | 0,001071 |            | 0,000020 | 0,000001 |
| Опыт+Р   | 0,000102 | 0,000020   |          | 0,000004 |
| Ме+АВ  | 0,000001 | 0,000001   | 0,000004 |          |

Вместе с тем, на рис. 3.35 наглядно продемонстрировано, что расстояния между центроидами по первой дискриминантной функции (Root 1) различны: группы Опыт+ПО и Опыт+МХФ-2 представлены левее от центра, т.е. ей соответствуют меньшие значения корня 1. Ближе к центроиду расположилась группа Опыт+Р. По второму корню ближе к центроиду оказались группа Опыт+ПО с положительными значениями корня и Опыт+МХФ-2 – с отрицательными.

По результатам таблицы 3.35 наибольший классификационный вес вычислен для рувимины.

Таблица 3.35 – Уровни функциональной эффективности между сравниваемыми группами (через 1 сутки)

| Функции классификации; группировка: Группы (Опыт+Препараты иммунологические показатели, 1 сутки) |          |            |          |          |
|--|----------|------------|----------|----------|
|  | Опыт+ПО  | Опыт+МХФ-2 | Опыт+Р   | Ме+АВ    |
| Опыт+Va  | 1823,1   | 1662,9     | 2109,3   | 2761,3   |
| CD4+   | 49464,3  | 45173,2    | 57386,6  | 74918,8  |
| Лейкоциты  | -2431,3  | -2211,0    | -2815,4  | -3685,9  |
| Th   | 1137,1   | 1040,2     | 1318,8   | 1721,5   |
| МСК мон  | 106,8    | 97,5       | 123,7    | 161,7    |
| Константа  | -32394,9 | -27062,7   | -43526,1 | -74275,0 |

В результате проведенного дискриминантного анализа удалось установить, что через 1 сутки после моделирования асептического воспаления в ряду сравниваемых препаратов классификационный вес рувимина оказался близок к значениям группы Me+AB, что позволило сделать заключение, что первые сутки для рувимина охарактеризовались большими признаками повреждения, вызванными ванадием, меньшими значениями CD4+, лейкоцитов, Th и МСК мон по сравнению с МХФ-2 и ПО.

Далее проведен дискриминантный анализ для второго срока (через 7 суток) исследований. Результаты пошагового анализа представлены в таблице 3.36.

Таблица 3.36 – Показатели заключительного пошагового анализа дискриминантных функций (через 7 суток)

| Итоги анализа дискриминантных функций (Опыт+Препараты иммунологические показатели, 7 сутки) Шаг 7, Переменных в модели: 7; Группир: Группы (4 группы) Лямбда Уилкса: ,00000 при бл. F (21,6)=71,045 p< ,0000 |               |                |                |                 |          |                  |
|--|---------------|----------------|----------------|-----------------|----------|------------------|
|  | Лямбда Уилкса | Частная лямбда | F-исключ (3,2) | p-уров.         | Толер.   | 1-толер. (R-кв.) |
| Опыт+Хр  | 0,000192      | 0,000778       | 855,7698       | <b>0,001167</b> | 0,003326 | 0,996674         |
| МСК мон  | 0,000014      | 0,010933       | 60,3108        | <b>0,016355</b> | 0,013592 | 0,986408         |
| Эритроциты   | 0,000017      | 0,008851       | 74,6553        | <b>0,013247</b> | 0,002836 | 0,997164         |
| Th1  | 0,000031      | 0,004860       | 136,5157       | <b>0,007281</b> | 0,002145 | 0,997855         |
| ФГ сп  | 0,000004      | 0,033863       | 19,0205        | 0,050362        | 0,004243 | 0,995757         |
| ИЛ 6   | 0,000002      | 0,062132       | 10,0631        | 0,091735        | 0,011860 | 0,988140         |
| CD8+   | 0,000001      | 0,108654       | 5,4690         | 0,158470        | 0,081929 | 0,918072         |

В результате проведенного анализа было выделено 7 переменных, у трех из которых (ФГсп, ИЛ6, CD8+) p-уровни оказались незначимыми. Дискриминация между группами была проведена по значимости вклада переменной в следующем порядке: Опыт+хром, Th1, эритроциты и МСК мон. Для дальнейшего анализа выяснили вклад четырех переменных в групповые различия (табл. 3.37).

Таблица 3.37 – Результаты расчета статистической значимости критерия Хи-квадрат последовательных корней (через 7 суток)

| Корни<br>исключен. | Критерий Хи-квадрат с послед. Исключ. Корней<br>(Опыт+Препараты иммунологические показатели 1 сутки) |               |                  |          |         |          |
|--------------------|--|---------------|------------------|----------|---------|----------|
|                    | Собств.<br>Знач.   | Канонич.<br>R | Уилкса<br>Лямбда | Хи-квад. | Ст. св. | p-уров.  |
| 0                  | 4474,251   | 0,999888      | 0,000000         | 86,42894 | 21      | 0,000000 |
| 1                  | 58,161   | 0,991512      | 0,000670         | 40,19419 | 12      | 0,000067 |
| 2                  | 24,224   | 0,979977      | 0,039645         | 17,75278 | 5       | 0,003273 |

Все корни статистически значимы относительно друг друга, следовательно в анализ будут включены стандартизованные коэффициенты трех корней (табл. 3.38).

Таблица 3.38 – Стандартизованные дискриминантные коэффициенты (через 7 суток)

| Переменные | Стандартиз. коэффициенты для канонических переменных |          |          |
|------------|--|----------|----------|
|            | Корень 1   | Корень 2 | Корень 3 |
| Опыт+Хр    | 17,298   | 1,14460  | -0,08433 |
| МСК мон    | -8,278   | 1,99420  | -0,59747 |
| Эритроциты | -18,582  | 0,06132  | 2,11776  |
| Th1        | 21,218   | -1,28582 | 3,57532  |
| Соб.знач.  | 4474,251   | 58,16062 | 24,22355 |
| Кум. доля  | 0,982  | 0,99468  | 1,00000  |

Высокие показатели собственных значений (4474,251) и 98% накопленной доли объясненной дисперсии первого корня определили его дискриминирующую мощность, существенный вклад в который внесли Th1, эритроциты и Опыт+Хром. Вторая дискриминантная функция существенно отличается от первого собственным значением и кумулятивной долей, между тем тяжело взвешивается МСК мон, Th1 и повреждениями, вызванными хромом. В третьем менее значимом корне выделены Th1 и эритроциты.

Различия между группами оказались статистически значимыми, результаты которых представлены в табл.3.39.

Таблица 3.39 – Уровни статистической значимости между сравниваемыми группами (через 7 суток)

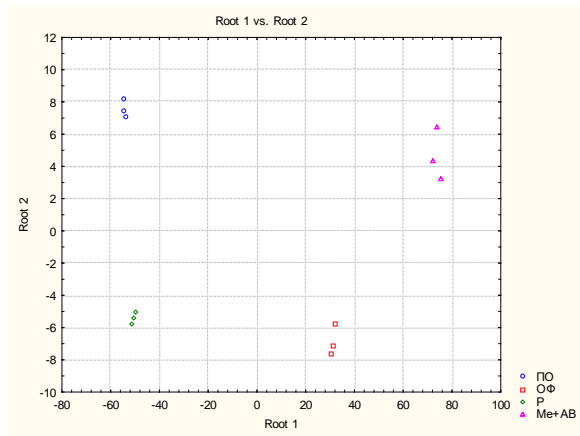
| p-уровни (Опыт+Препараты иммунологические показатели, 7 сутки) |          |            |          |          |
|--|----------|------------|----------|----------|
| Группы   | Опыт+ПО  | Опыт+МХФ-2 | Опыт+Р   | Ме+АВ    |
| Опыт+ПО  |          | 0,000189   | 0,029944 | 0,000058 |
| Опыт+МХФ-2   | 0,000189 |            | 0,000219 | 0,001333 |
| Опыт+Р   | 0,029944 | 0,000219   |          | 0,000063 |
| Ме+АВ  | 0,000058 | 0,001333   | 0,000063 |          |

На рис. 3.36 представлены канонические корреляции между группами по трем дискриминантным функциям. Как видно из табл. (3.38 стандарт.коэфф.), наиболее существенный вклад в разделение первой дискриминантной функции внесли показатели Th1, эритроциты и повреждения, вызванные хромом. Вместе с тем, на рис. 3.36. наглядно продемонстрировано, что расстояния между центроидами по первой дискриминантной функции (Root 1) различны: группа «МХФ-2» представлена правее от центра, т.е. ей соответствуют большие значения корня 1.

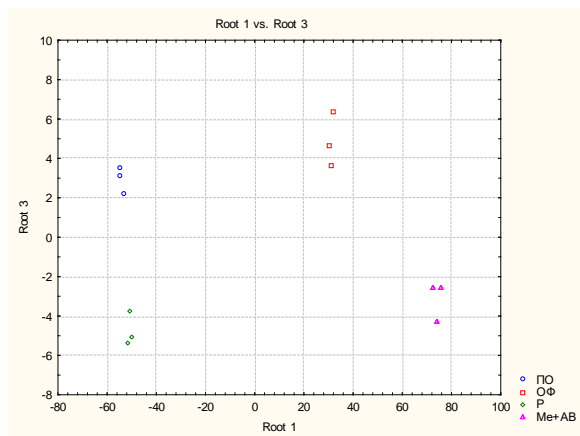
Это означало, что МХФ-2 эффективнее остальных препаратов повышал значения Th1 и эритроцитов, тогда как повреждения, вызванные хромом не корректировал.

По вертикальной оси Root 2 распределены значения второй дискриминантной функции. По ним ближе к центроиду распределился ПО. Это означало, что главным отличием ПО от остальных препаратов являлась более выраженная способность по сравнению с МХФ-2 и рувимином стимулировать пролиферативную активность моноцитарных миелоидных предшественников и Th1. По третьей дискриминантной функции ПО и МХФ-2 распределились правее от центроида с положительными значениями Th1 и эритроцитов.

Для рувимина по всем дискриминантным функциям все переменные сгруппировались ближе к центроиду, но с отрицательными значениями.



А



Б

Рис. 3.36. Диаграмма рассеяния канонических корреляций для групп Me+AB, Опыт+ПО, Опыт+МХФ-2, Опыт+Р через 7 суток после моделирования асептического воспаления и патогенетической коррекции препаратами

В таблице 3.40 продемонстрированы значения классификационных весов сравниваемых групп. Низкий уровень константы для Me+AB и высокий для препаратов характеризует их эффективность в данный срок исследования. Так, эффективность рувимины оказалась сопоставима с ПО, которая продемонстрирована его способностью восстанавливать содержание эритроцитов, нивелировать токсические эффекты хрома, стимулировать пролиферативную активность селезеночных МСК мон и Th1.



Таблица 3.40 – Уровни функциональной эффективности между сравниваемыми группами (через 7 суток)

| Функции классификации; группировка: Группы (Опыт+Препараты иммунологические показатели, 7 сутки) |          |            |          |          |
|--|----------|------------|----------|----------|
| Переменные   | Опыт+ПО  | Опыт+МХФ-2 | Опыт+Р   | Ме+АВ    |
| Опыт+Хр  | -2134,8  | -1459,2    | -2112,8  | -1110,4  |
| МСК мон  | 2993,3   | 1999,0     | 2924,5   | 1558,4   |
| Эритроциты   | 16201,1  | 11196,8    | 15937,2  | 8632,7   |
| Th1  | -1315,5  | -877,3     | -1300,0  | -671,1   |
| Константа  | -37719,4 | -18363,2   | -36169,9 | -11282,0 |

Таким образом, по эффективности препараты распределились следующим образом: полиоксидоний → рувимин → МХФ-2.

Ниже представлены результаты пошагового анализа дискриминантных функций для последнего срока исследования - через 14 суток (табл. 3.41).

Таблица 3.41 – Показатели заключительного пошагового анализа дискриминантных функций (через 14 суток)

| Итоги анализа дискриминантных функций (Опыт+Препараты иммунологические показатели, 14 сутки) Шаг 7, Переменных в модели: 7; Группир: Группы (4 группы) Лямбда Уилкса: ,00000 при бл. F (21,6)=62,495 p< ,0000 |                 |                 |                |                 |                 |                  |
|---|-----------------|-----------------|----------------|-----------------|-----------------|------------------|
|   | Лямбда Уилкса   | Частная лямбда  | F-исключ (3,2) | p-уров.         | Толер.          | 1-толер. (R-кв.) |
| ФГ инд  | 0,000067        | 0,003202        | 207,5154       | 0,004800        | 0,000987        | 0,999013         |
| <b>СД4+</b>   | <b>0,000001</b> | <b>0,165634</b> | <b>3,3583</b>  | <b>0,237860</b> | <b>0,075224</b> | <b>0,924776</b>  |
| Th2   | 0,000070        | 0,003091        | 215,0414       | 0,004632        | 0,009764        | 0,990236         |
| ФГ сп   | 0,000031        | 0,007040        | 94,0301        | 0,010541        | 0,001130        | 0,998870         |
| ЛФ, абс   | 0,000017        | 0,012822        | 51,3283        | 0,019171        | 0,012182        | 0,987818         |
| TGF-β   | 0,000007        | 0,030424        | 21,2457        | 0,045287        | 0,028665        | 0,971335         |
| <b>СД8</b>  | <b>0,000001</b> | <b>0,173540</b> | <b>3,1749</b>  | <b>0,248666</b> | <b>0,117623</b> | <b>0,882377</b>  |

Среди семи включенных в модель переменных у двух переменных (СД4+, СД8+) p-уровни оказались статистически незначимыми. Оставшиеся переменные (фагоцитоз индуцированный и спнтанный, лимфоциты, Th2 и

TGF-β) были включены в список дискриминирующих признаков сравниваемых групп.

Для дальнейшего анализа выяснили вклад пяти переменных в групповые различия (табл. 3.42). были выявлены 3 дискриминантные функции, которые оказались статистически значимыми.

Таблица 3.42 – Результаты расчета статистической значимости критерия Хи-квадрат последовательных корней (через 14 суток)

| Корни<br>исключен. | Критерий Хи-квадрат с послед. Исклуч. Корней<br>(Опыт+Препараты иммунологические показатели 1 сутки) |               |                  |          |         |          |
|--------------------|--|---------------|------------------|----------|---------|----------|
|                    | Собств.<br>Знач.   | Канонич.<br>R | Уилкса<br>Лямбда | Хи-квад. | Ст. св. | р-уров.  |
| 0                  | 4695,608   | 0,999894      | 0,000000         | 84,41285 | 21      | 0,000000 |
| 1                  | 127,170  | 0,996091      | 0,001015         | 37,91257 | 12      | 0,000159 |
| 2                  | 6,689  | 0,932711      | 0,130050         | 11,21909 | 5       | 0,047205 |

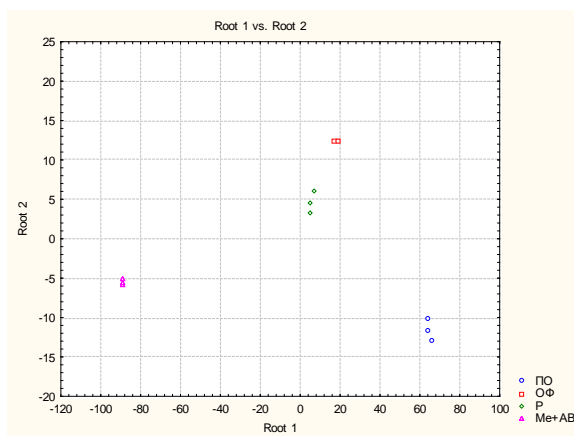
С целью вычисления весов дискриминантной функции (вклада каждой переменной) были применены стандартизованные коэффициенты, которые были распределены между 3 группами (корнями) (табл. 4.43).

Таблица 3.43 – Стандартизованные дискриминантные коэффициенты (через 14 суток)

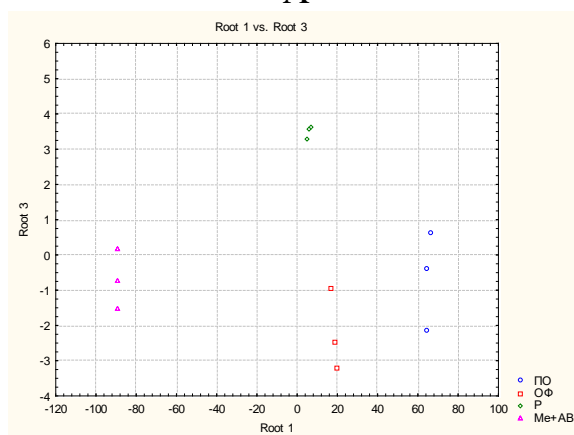
| Переменные | Стандартиз. Коэффициенты для канонических переменных |          |          |
|------------|--|----------|----------|
|            | Корень 1   | Корень 2 | Корень 3 |
| ФГ инд     | 31,460   | -4,4819  | -1,02823 |
| Th2        | -9,275   | 4,0145   | -0,33320 |
| ФГ сп      | -28,587  | 7,7400   | 1,69826  |
| ЛФ, абс    | 8,556  | -2,1461  | 1,94218  |
| TGF-β      | -5,608   | 1,3509   | -0,80932 |
| Соб.знач.  | 4695,608   | 127,1703 | 6,68933  |
| Кум. доля  | 0,972  | 0,9986   | 1,00000  |

Показатель собственных значений и накопленная доля объясненной дисперсии для первого корня составили 4695,608 и 97%, что указывало на мощность первой дискриминирующей функции. Она тяжело взвешивалась индуцированной (31,460) и спонтанной (-28,587) фагоцитарной активностью нейтрофилов. Мощность второго менее значимого корня дополнила переменная Th2. Мощность третьего корня тяжело взвешивалась показателями абсолютного содержания лимфоцитов, фагоцитарной (спонтанной и индуцированной) активности нейтрофилов и концентрации TGF- $\beta$ .

На рис. 3.37 с визуализацией вычисленных дискриминантных корней сравниваемые группы четко разделились.



А



Б

Рис. 3.37. Диаграмма рассеяния канонических корреляций для групп Me+AB, Опыт+ПО, Опыт+МХФ-2, Опыт+Р через 14 суток после моделирования асептического воспаления и патогенетической коррекции препаратами

По горизонтальной оси Root 1 все препараты распределились правее от центроида, тогда как Me+AB далеко левее от центроида (рис.3.37.-А). Это означало, что рувимин и МХФ-2, ближе расположенные к центроиду, а также ПО дискриминируют с группой Me+AB улучшенными показателями переменных ФГ инд, ФГ сп, Th2, лимфоциты абс и TGF-β. Различия между группами оказались статистически значимыми (табл. 3.44).

Таблица 3.44 – Уровни статистической значимости между сравниваемыми группами (через 14 суток)

| p-уровни (Опыт+Препараты иммунологические показатели, 14 сутки) |          |            |          |          |
|---|----------|------------|----------|----------|
| Группы  | Опыт+ПО  | Опыт+МХФ-2 | Опыт+P   | Me+AB    |
| Опыт+ПО   |          | 0,000847   | 0,000521 | 0,000034 |
| Опыт+МХФ-2  | 0,000847 |            | 0,027620 | 0,000095 |
| Опыт+P  | 0,000521 | 0,027620   |          | 0,000142 |
| Me+AB   | 0,000034 | 0,000095   | 0,000142 |          |

По вертикальной оси Root 2 рувимин и МХФ-2 значительно улучшили показатели фагоцитарной активности нейтрофилов и пролиферативную активность Th2.

Третья дискриминантная функция оказалась малоинформативной, поскольку имела меньшую весовую категорию (рис.3.37.-Б).. Между тем, дискриминация здесь оказалась аналогичной первым двум дискриминантным функциям. Так, третья дискриминантная функция различала сравниваемые группы по их способности восстанавливать фагоцитарную активность нейтрофилов пролиферативную активность лимфоцитов. Значения канонических переменных третьей дискриминантной функции представлены по вертикальной оси, где тенденции дискриминации хорошо прослеживаются. По ним левее от центроида распределился рувимин (положительные значения). Это означало, что главным отличием препаратов между собой являлась более выраженная способность рувимины по сравнению с ПО и

МХФ-2 стимулировать поглотительную активность нейтрофилов и восстанавливать лимфоцитарную активность в крови у экспериментальных животных.

По результатам таблицы 3.45, по параметрам функциональной активности вклад каждой группы представлен в следующей последовательности: ПО, МХФ-2, рувимин.

Таблица 3.45 – Уровни функциональной эффективности между сравниваемыми группами (через 14 суток)

| Функции классификации; группировка: Группы (Опыт+Препараты иммунологические показатели, 14 сутки) |          |            |          |          |
|---|----------|------------|----------|----------|
| Переменные  | Опыт+ПО  | Опыт+МХФ-2 | Опыт+Р   | Ме+АВ    |
| ФГ инд  | 1927,9   | 1500,3     | 1398,9   | 601,80   |
| Th2   | -1363,6  | -1016,0    | -959,8   | -408,26  |
| ФГ сп   | -2167,5  | -1655,6    | -1549,3  | -663,37  |
| ЛФ, абс   | 1236,5   | 945,0      | 892,5    | 380,08   |
| TGF- $\beta$  | -86,8    | -66,3      | -62,4    | -26,27   |
| Constant  | -25621,7 | -16615,4   | -14201,6 | -2713,40 |

Это свидетельствовало о том, что для данного срока исследования (через 14 суток) корригирующая эффективность МХФ-2 и рувимины сопоставима с ПО.

Таким образом, в результате проведенного дискриминантного анализа удалось установить, что начиная с 7 суток исследования эффективность рувимины оказалась сопоставима с ПО, которая продемонстрирована его способностью восстанавливать содержание эритроцитов, нивелировать токсические эффекты хрома, стимулировать пролиферативную активность селезеночных МСК мон и Th1. Через 14 суток МХФ-2 и рувимин наряду с ПО дискриминируют с группой Ме+АВ улучшенными показателями переменных ФГ инд, ФГ сп, Th2, лимфоциты абс и TGF- $\beta$ .

### **3.6. Патогенез ванадий- и хроминдуцированных повреждений и патогенетическое обоснование корригирующего влияния МХФ-2 и рувимина в сравнении с полиоксидонием**

Имеются убедительные доказательства, подтверждающие важную роль факторов окружающей среды в патофизиологии заболеваний разных органов и систем, в том числе воспалительного генеза [105, 32, 15]. Между тем, нет полного понимания молекулярных путей дисфункциональной воспалительной реакции, вызванной внешними стимулами, и целостного представления об изменениях в организме, в условиях функционального дефицита защитных гомеостатических механизмов. Недостаточно изученным остается течение воспалительного процесса на фоне металлиндуцированной дисфункции иммунной системы, тем более механизмы, лежащие в основе перехода к хроническому воспалению, опосредуемые этими металлами. Это обуславливает актуальность изучения воспаления с позиции расширения и углубления представлений о его патогенезе, в которой существенную роль играют иммуноопосредующие механизмы.

В настоящем исследовании изучено влияние метаванадата аммония и дихромата калия на развитие воспаления, вызванного введением скипидара.

Классически острая фаза воспаления характеризуется высвобождением провоспалительных цитокинов (TNF $\beta$ , IL-1, IL-6, IL-8 и IL-12), продуцируемых макрофагами, которые вызывают повышенную сосудистую проницаемость и быструю миграцию нейтрофилов и моноцитов в воспаленную ткань [178]. Когда макрофаги поглощают чужеродный антиген, они обрабатывают его и представляют на клеточной мембране, где они будут распознаваться Th клетками, которые высвобождают цитокины, активирующие В-клетки. Активированные В-лимфоциты затем выделяют специфические антитела, которые присоединяются к антигенам и способствуют их более эффективному фагоцитозу [146]. После антигенного

представления противовоспалительные цитокины, такие как IL-4, IL-10 и TGF- $\beta$ , макрофаги, способствующие разрешению, белки семейства липоксигеназы, а также липидные медиаторы, такие как липоксины и резольвины E- и D-ряда, способствуют разрешению воспаления [211]. Таким образом, острый воспалительный ответ полезен для восстановления и поддержания гомеостаза ткани хозяина. Между тем, предварительная затравка крыс метаванадатом аммония и дихроматом калия до начала воспаления приводила к недостаточной инфильтрации раны нейтрофилами в начальной воспалительной фазе, связанной с более широкой зоной некроза, с низким выделением экссудата и задержкой заживления. Полученные результаты согласуются с более ранним сообщением, показывающим, что недостаточная инфильтрация нейтрофилов задерживает восстановление раны [240, 262, 202]. Причиной тому служат цитотоксические эффекты ванадия и хрома [141]. В наших экспериментах установлен высокий процент разрушенных нейтрофилов при контакте с ванадием и хромом. Так, воспалительный процесс у опытных животных сопровождался снижением функциональных и резервных возможностей нейтрофилов крыс (рис.3.38.).

Между тем, в костном мозге опытных животных отмечался высокий процент лимфоцитов и гранулоцитов с признаками апоптоза.

Также мы предполагаем, что плохая инфильтрация раневой ткани нейтрофилами у крыс Me+AB была результатом недостаточного продуцирования IL-6 в острой фазе воспаления, наблюдавшейся на 1-й день после начала воспаления. Хорошо известно, что IL-6 необходим для индукции провоспалительных иммунных реакций [261]. Полученные нами данные подтверждают ранее полученными результатами, показывающими, что соединения, содержащие хром и ванадий, способны уменьшать продукцию IL-6. Таким образом, было показано, что высвобождение IL-2 и IL-6 с помощью РНА-стимулированных мононуклеарных клеток периферической крови человека ингибировалось хромом. Снайдер К.А. с соавт., 1996, обнаружили

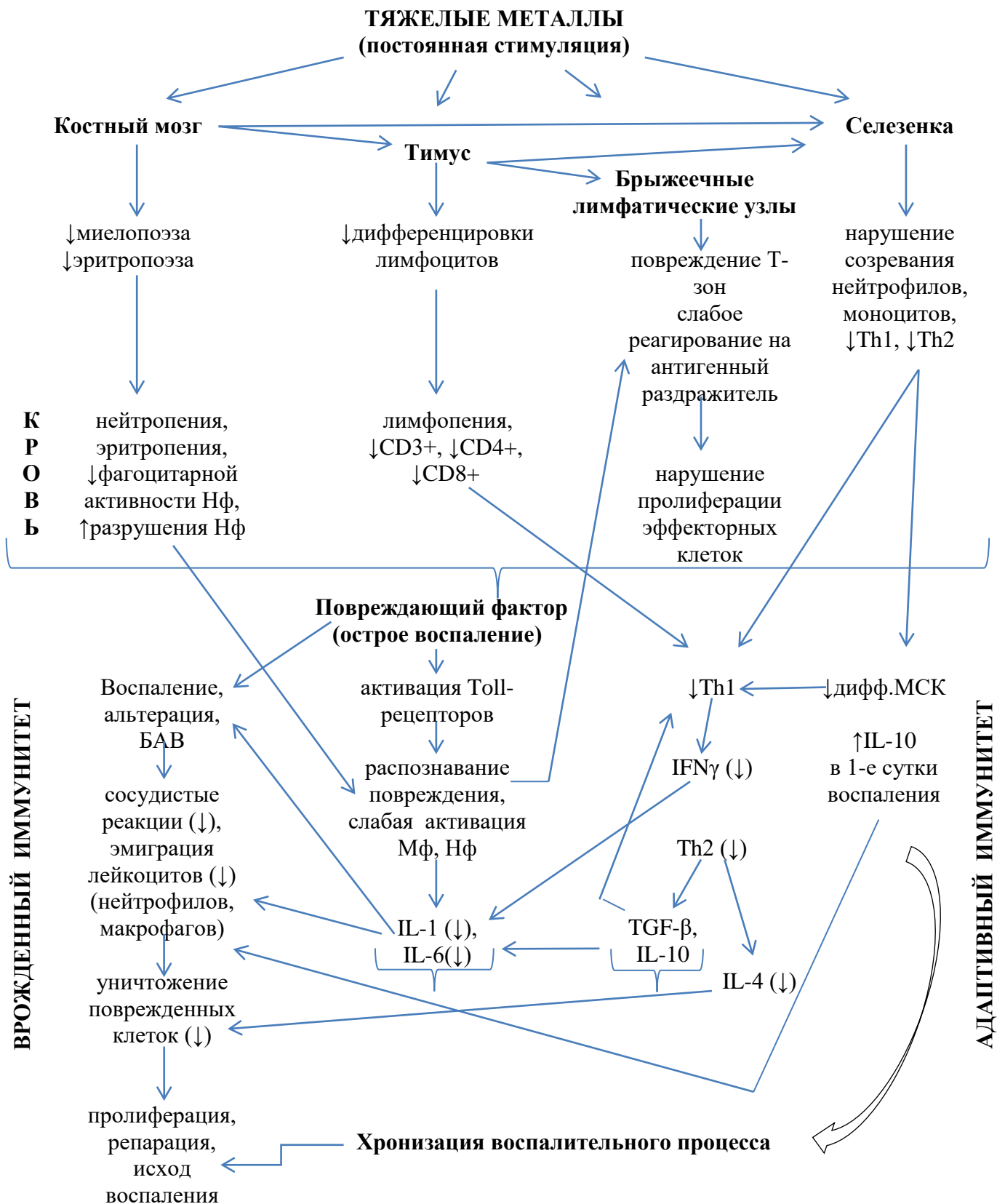


Рис. 3.38. Схема патогенеза хронизации воспаления



значительное снижение уровней IL-6 у людей, подвергшихся воздействию хрома [261]. Метаванадат аммония уменьшал содержание IL-2 в сыворотке крови и IL-6 у бройлеров [188].

С другой стороны, ранняя воспалительная реакция у крыс Me+AB характеризовалась увеличением продуцирования IL-10. Этот цитокин координирует фазу разрешения из-за его способности смягчать эффекты провоспалительных цитокинов [177] и его чрезмерное производство во время острой фазы воспаления может привести к недостаточному иммунному ответу на антиген и, следовательно, развитию хронического воспаления. Аналогичные результаты были получены Снайдером С.А. и др. [261]. Они продемонстрировали, что ванадий значительно увеличивает уровни IL-10 в ишемической пограничной зоне коры головного мозга. Более того, мы наблюдали, что воздействие Me приводило к увеличению уровней сывороток другого противовоспалительного цитокина TGF- $\beta$  в более поздней фазе воспаления, что также может способствовать нарушению разрешения воспаления. Полученные результаты показывают, что метаванадат аммония и дихромат калия ограничивают провоспалительные сигналы в воспаленном месте за счет недостаточного продуцирования IL-6 и индукции образования IL-10 и TGF- $\beta$ , что приводит к уменьшению рекрутирования эффекторных миелоидных клеток.

Плохая раневая инфильтрация нейтрофилами также сопровождалась уменьшением числа нейтрофилов His48HighCD11b / c + и моноцитов His48lowCD11b / c + в селезенке крыс Me+AB. Установлено, что в периферической крови присутствуют гемопоэтические стволовые клетки (ГСК), способные к экстренному экстрамедуллярному кроветворению в инфицированных тканях [214]. Редкая популяция ГСК в крови и селезенке напоминает ГСК костного мозга. Поскольку мобилизованные ГСК имеют высокие пролиферативные индексы, их накопление в селезенке представляет собой резервуар первичных гемопоэтических стволовых и прогениторных клеток, способных вовлекаться в экстрамедуллярный гемопоэз, который

может вносить существенный вклад в увеличение периферических нейтрофилов и моноцитов [194]. Исследованиями Baldrige et al., 2010, показано, что ГСК демонстрируют внутреннюю клеточную чувствительность к IFN- $\gamma$ . Исследователи предполагают, что IFN- $\gamma$  может выполнять свою роль при колите не только путем стимулирования эффекторных функций зрелых лейкоцитов, но также путем усиления гемопоэтической активности на уровне первичных ГСК [151]. В наших исследованиях металлы ингибировали продукцию IFN $\gamma$  и IL-4 клетками CD4 + у опытных крыс с асептическим воспалением, что сопровождалось более медленным накоплением миелоидных предшественников по сравнению с контрольными крысами с классическим воспалением. Механизмы, лежащие в основе подавления образования IFN $\gamma$  и IL-4, могут включать снижение транскрипционной активности промотора IFN- $\gamma$  и транскрипции гена IL-4 [272]. Ранее было показано, что воздействие ортометаванадата ингибирует активацию NFAT как в покоящихся, так и в антиген-стимулированных Т-клетках [208]. С другой стороны, было показано, что шестивалентный хром ингибирует транскрипцию NF- $\kappa$ B [272]. Данные свидетельствуют о том, что модуляция сигналов NFAT и NF- $\kappa$ B метавадатом аммония и дихроматом калия может уменьшить экспрессию IFN $\gamma$  и IL-4 CD4 + клетками селезенки. Принимая во внимание, что IFN $\gamma$  и IL-4 являются хорошо известными индукторами клеточного и гуморального иммунного ответа [272], соответственно, можно предположить, что кратковременное воздействие метаванадата аммония и дихромата калия может ингибировать оба типа иммунных ответов.

Мы также изучали влияние метаванадата аммония и дихромата калия на клеточный ответ у крыс с асептическим воспалением. Расширение подмножеств Т-клеток во время воспалительного ответа представляет собой нормальный физиологический процесс, направленный на локализацию воспаления [283]. Влияние соединений хрома и ванадия на количество и активацию Т-клеток было описано только в нескольких исследованиях. Хром ингибировал пролиферацию Т-лимфоцитов периферической крови человека in

vitro [188, 143]. Метаванадат аммония ингибировал пролиферативную активность CD3+, CD3+ CD4+ и CD3+ CD8+ селезеночных Т-клеток и депрессивную активность у бройлеров [188]. Было предложено, чтобы ванадий воздействовал на миграцию зрелых Т-клеток от тимуса до селезенки [21, 266]. У мышей, подвергшихся воздействию ванадия путем ингаляции, отмечалось уменьшение дендритных клеток тимуса CD11c, которые необходимы для созревания Т-клеток [283]. В наших экспериментах воздействие метаванадата аммония и дихромата калия предотвращало расширение CD8 + Т-клеток, вызванное асептическим воспалением, что могло быть результатом деструктивных изменений тимуса, наблюдаемых нами у крыс Me+AB.

Таким образом, метаванадат аммония и дихромат калия способны исказить нормальный ход острого воспаления путем смещения провоспалительных сигналов на активацию противовоспалительных цитокинов IL-10 и TGF- $\beta$  и ингибирования эффекторного миелоидного и расширения и активации Т-клеток, которые вместе могут препятствовать разрешению воспаления и, следовательно, способствовать патогенезу хронических воспалительных процессов (см. рис.3.38.).

Целью наших дальнейших исследований был поиск новых патогенетических путей коррекции выявленных нарушений.

К категориям иммуномодулирующих препаратов или иммунокорректоров относят препараты, характеризующиеся нормализующим действием на иммунную систему, способные в конкретных условиях повышать сниженные показатели или подавлять повышенные [94].

Исследование состояния клеточного иммунитета опытных крыс, предварительно затравленных ВА и ДК, показало, что все изученные препараты существенно модулировали функциональную активность нейтрофилов. Так, показатели нарастания метаболической и поглотительной активности нейтрофилов под влиянием МХФ-2 не имели статистически значимых различий от полиоксидония, из чего сделан вывод о сопоставимости

их иммуномодулирующей эффективности. По нашему мнению, данное обстоятельство отражает определенную общность клеточных механизмов полиоксидония и МХФ-2.

Исследованиями Пинегина Б.В. с соавт., 2004, установлено, что полиоксидоний активирует хемотаксис фагоцитов, повышает поглотительную и бактерицидную активность фагоцитов, за счет стимуляции как «кислородзависимых», так и «кислороднезависимых» механизмов бактерицидности лейкоцитов [94]. Объяснение тому мы нашли в наших результатах, когда мембранопротекторная эффективность полиоксидония была ниже рувина и МХФ-2. Оказалось, что полиоксидоний индуцирует внутриклеточное образование активных форм кислорода, от которых зависит гибель поглощенной макрофагом бактерии. Однако, чрезмерная внутриклеточная продукция АФК и активация свободно-радикального окисления отмечается и под влиянием солей тяжелых металлов, что, возможно, не позволяет полиоксидонию в этих условиях «защищать» мембраны нейтрофилов. Между тем, оценка результатов проведенных исследований показала, что функциональная активация нейтрофилов под влиянием МХФ-2 происходила за счет его антиоксидантной эффективности.

Под влиянием рувина также повышается функциональная активность нейтрофилов благодаря его мембраностабилизирующим свойствам. Нашими исследованиями установлено, что мембранопротекторная эффективность рувина оказалась выше эффективности полиоксидония и МХФ-2. Доказательством тому служит то обстоятельство, что рувин повышает устойчивость мембран нейтрофилов к повреждающему действию ванадия и хрома, существенно сокращая процент разрушенных нейтрофилов. Подобный эффект рувина, по нашему мнению, достигается благодаря повышению антиоксидантной защиты клетки.

Полиоксидоний стимулирует выброс IL-6, но в гораздо меньших концентрациях, чем МХФ-2 и рувин. IL-6 относят как к про-, так и к противовоспалительным цитокинам. Поэтому, его высокие концентрации

препятствуют образованию провоспалительных цитокинов IL-1 и ФНО. Полиоксидоний, как истинный иммуномодулятор, сдерживает чрезмерное образование IL-6, так как его накопление может привести к развитию тяжелых последствий, вплоть до септического шока.

Индукция IL-6 МХФ-2 и рувином также характеризует их эффективность, т.к. заживление асептической раны у опытных крыс имело аналогичный с полиоксидонием характер. Кроме того, к концу эксперимента в сыворотке крови опытных крыс отмечалась активация противовоспалительной активности IL-10, что характеризовало смену провоспалительного баланса цитокинов на противовоспалительный.

По сведениям [94], полиоксидоний активно взаимодействует с мембраной лимфоцитов, моноцитов и нейтрофилов, однако внутриклеточное его содержание обнаружено только в нейтрофилах, что дает основание предполагать, что полиоксидоний оказывает лучшее влияние на фагоцитарное звено иммунитета. Однако по результатам наших исследований полиоксидоний существенно восстанавливает содержание лимфоцитов крови во многом, по мнению Пинегина Б.В. с соавт., 2004., благодаря способности полиоксидония ингибировать внеклеточное образование АФК [94]. В наших исследованиях мы показали, что под влиянием солей тяжелых металлов происходит накопление миелоидных предшественников преимущественно за счет расширения гранулоцитарных миелоидных фракций, которые производят в больших количествах АФК, пероксинитрит, оксид азота. Нейтрализация продуктов жизнедеятельности миелоидных клеток полиоксидонием способно восстановить пролиферативную активность Т-лимфоцитов, не лишенных питательной среды.

Рувимин, как антиоксидант, также как и полиоксидоний, сдерживает накопление миелоидных супрессорных клеток в селезенке опытных крыс. По-видимому, молекулярные механизмы действия рувимина обусловлены не только его антиоксидантными свойствами и способностью внутриклеточно дисмутировать образование супероксида, но и далеко за его пределами.

Полиоксидоний не оказывал воздействия на клеточные популяции селезенки. Так, при определении цитокинов в спленоцитах опытных крыс с асептическим воспалением с помощью иммуноферментного анализа мы не обнаружили способности полиоксидония индуцировать синтез IFN-g и IL-4 субклеточными популяциями CD4<sup>+</sup>-лимфоцитов - Th1- и Th2-клетками. МХФ-2 и рувимин не оказали заметного влияния на уровень селезеночных клеточных субпопуляций, однако в последний срок исследования заметно стимулировали Th1 иммунный ответ.

Результаты исследований с экспериментальными животными, несмотря на разные механизмы влияния, достаточно убедительно демонстрируют синергизм иммуномодулирующего действия препаратов в отношении фагоцитарного звена иммунитета. Следует отметить, что препараты и МХФ-2, несмотря на существенное различие в структуре, имеют определенное сходство в механизмах клеточных эффектов.

Особое место среди препаратов занимает МХФ-2, однако существует необходимость более детального исследования механизмов эффективности МХФ-2 на молекулярно-биологическом уровне, в соответствии с современными требованиями.

## ВЫВОДЫ

1. Ключевые показатели экспериментального воспаления под влиянием метаванадата аммония и дихромата калия в крови опытных животных ассоциированы с фагоцитарной дисфункцией макрофагов; развитием анемии; снижением CD3<sup>+</sup>-, CD4<sup>+</sup>-, CD8<sup>+</sup>-лимфоцитов; дисбалансом цитокиновой регуляции в сторону повышения противовоспалительных IL-10 и TGF- $\beta$  цитокинов и недостаточной продукции IL-6 и IL-1 $\beta$ . Выявленные нарушения сопровождаются в очаге воспаления широкой зоной некроза замедлением воспалительной фазы и задержкой репаративной фазы воспаления в последний срок исследования.

2. Повреждающие эффекты метаванадата аммония и дихромата калия проявляются нарушением в селезенке дифференцировки предшественников гранулоцитов и моноцитов, дисбалансом селезеночных субклеточных популяций с фенотипами IFN $\gamma$ <sup>+</sup>/IL-4<sup>-</sup> и IFN $\gamma$ <sup>-</sup>/IL-4<sup>+</sup> с нарушением дифференцировки CD4<sup>+</sup> Т-лимфоцитов на Th1 и Th2 лимфоциты, снижением цитотоксических CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> Т-лимфоцитов.

3. Метаванадат аммония и дихромат калия вызывают деструктивные изменения костного мозга и препятствуют расширению гемопоэтического кроветворения в ответ на скипидар-индуцированное воспаление. Выраженные структурные изменения лимфоорганов на всем протяжении эксперимента были представлены снижением корково-медуллярного индекса, дистрофически измененными клетками и их скудностью.

4. Наибольший вклад в характеристику ванадий- и хроминдуцированных нарушений иммунологической реактивности организма опытных крыс вносят дисфункция адаптивного иммунитета и гипоксия за счет снижения лимфоцитов с кластерами дифференцировки CD3<sup>+</sup>, CD4<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup>, нарушения Th1 и Th2 иммунных ответов, снижения содержания эритроцитов и

гемоглобина, а также нарушение дифференцировки в селезенке His48<sup>+</sup>/CD11b/c<sup>+</sup>, His48 High/CD11b/c<sup>+</sup>.

5. Рувимин и МХФ-2 повышают устойчивость мембран нейтрофилов опытных крыс с асептическим воспалением к воздействию ванадия и хрома, благодаря чему улучшаются функциональные свойства нейтрофилов. МХФ-2, также как и ПО, восстанавливает содержание лимфоцитов крови, тогда как рувимин улучшает этот показатель в последний срок эксперимента. Благодаря восстановлению клеточного состава и гемоглобина крови опытных крыс с асептическим воспалением наблюдалась активация IL-6 в первый срок исследования и IL-10 в последний, в чем МХФ-2 и рувимин оказались эффективнее ПО. МХФ-2 и рувимин не влияют на уровень селезеночных клеточных субпопуляций, однако в последний срок исследования заметно стимулируют Th1 иммунный ответ.

6. Коррекция МХФ-2 и рувимином восстанавливает клеточность костного мозга сопоставимо с ПО. МХФ-2 модулирует раннюю структурную активацию тимуса, тогда как рувимин не вызывает структурных изменений тимуса, свидетельствующих о его активации. МХФ-2 и рувимин модулируют гиперпластические процессы в паракортикальной (тимусзависимой) зоне брыжеечных лимфатических узлов и процессы формирования грануляционной ткани воспаления в более поздние по сравнению с ПО сроки.

7. В результате проведенного дискриминантного анализа удалось установить, что начиная с 7 суток исследования эффективность рувимиона оказалась сопоставима с ПО, которая продемонстрирована его способностью восстанавливать содержание эритроцитов, нивелировать токсические эффекты хрома, стимулировать пролиферативную активность селезеночных моноцитов и Th1. Через 14 суток МХФ-2 и рувимин существенно корректируют показатели фагоцитарной активности нейтрофилов, Th2, абсолютного содержания лимфоцитов и TGF- $\beta$ .



## ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

1. Установленные в ходе экспериментальных исследований данные могут быть полезны при проведении прикладных исследований, посвященных изучению медицинской проблемы в рамках актуального приоритетного направления.

2. Данные об иммунотоксическом влиянии ванадия и хрома, как одних из распространенных антропогенных загрязнителей, могут быть полезны при оценке факторов риска заболевания с учетом региона проживания пациента и предотвращения его хронизации с включением в диагностику оценку иммунного статуса.

3. С целью поиска оптимальных вариантов применения МХФ-2 необходимо провести дополнительные исследования на молекулярно-биологическом уровне для выявления более тонких механизмов его корректирующей эффективности.

4. Выводы настоящего исследования могут также быть полезными для государственных и коммерческих структур, заинтересованных в разработке и продвижении новых лекарственных брендов отечественного производства.

5. Материалы диссертации могут быть использованы в учебно-методическом процессе на медицинских и биологических факультетах, а также на курсах последипломного образования иммунологов, терапевтов и врачей общей практики.

6. Результаты проведенных исследований внедрены в учебный процесс кафедры патологической физиологии КГМА им. И.К. Ахунбаева, а также в медицинском колледже «Эмили» г. Алматы. По результатам проведенных исследований получены два свидетельства на полезную модель [5, 6]. По материалам диссертации издана монография [13], которая включена в список рекомендуемой литературы для студентов 2, 3 курса общей медицины при подготовке к практическим занятиям.

## СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ

1. Абдувалиев, А. М. Сезонная миграция загрязняющих веществ в поверхностных водах в результате деятельности горнодобывающей компании в Кыргызстане [Текст] / А. М. Абдувалиев, Б. М. Худайбергенова // Теорет. и прикл. экология. – 2016. – № 1. – С. 27–32.
2. Азимбекова, А. К. Анализ состояния окружающей среды регионов Казахстана [Текст] / А. К. Азимбекова, К. О. Нурғалиева // Вестн. ун-та «Туран». – 2016. – № 1 (69). – С. 113–118.
3. Айдосов, А. Модельная оценка экологической обстановки компонентов природной среды с учетом атмосферных процессов [Текст] / А. А. Айдосов, Г. А. Айдосов, Н. С. Заурбеков. – М.: Изд. дом Акад. естествознания, 2018. – 342 с.
4. Акынбек кызы, С. Изучение кариотипа некоторых позвоночных животных вблизи Майлысуйского радиоактивного хвостохранилища [Текст] / С. Акынбек кызы // Изв. вузов Кыргызстана. – 2018. – № 2. – С. 32–36.
5. Алубаева, Н. Г. Применение полиоксидония в комплексной терапии хронических рецидивирующих эндометритов [Текст] / Н. Г. Алубаева, П. П. Сизякина // Иммунология. – 2007. – № 6. – С. 368–370.
6. Альназарова, А. Ш. Содержание тяжелых металлов в биосубстратах больных хроническими гастритами в районах Кызылординской области [Текст] / А. Ш. Альназарова // Гигиена, эпидемиология и иммунобиология. – 2010. – № 1. – С. 32–34.
7. Альназарова, А.Ш. Основные факторы риска последствия антропогенной нагрузки на водоемы Приаралья и проблемы водоснабжения региона [Текст] / А. Ш. Альназарова, М. Н. Омарова, Л. Ж. Оракбай // Гигиена, эпидемиология и иммунобиология. – 2010. – № 1. – С. 9–12.
8. Антоняк, Г. Л. Вплив шестивалентного хрому на активність ензимів гліколізу та пентозофосфатного шляху в лейкоцитах крові кроликів [Text] / Г. Л. Антоняк, Н. П. Хомич // Біологія тварин. – 2014. – Т. 16, № 1. – С. 21–28.

9. Аршинова, С. С. Эффективность иммунотерапии полиоксидонием при лечении больных активным туберкулезом легких [Текст] / С. С. Аршинова, Б. В. Пинегин, В. А. Стаханов // Аллергология и иммунология. – 2003. – Т. 4, № 2. – С. 98.
10. Арыстанова А. Ж. Гликардин в лечении больных ревматизмом [Текст] / А. Ж. Арыстанова // Фармация Казахстана. – 2002. – № 12. – С. 31–33.
11. Арыстанова, А. Ж. Противовоспалительные и кардиопротекторные свойства препаратов корня солодки [Текст] / А. Ж. Арыстанова, А. К. Джусипов // Терапевт. вестн. – 2005. – № 1. – С. 73–77.
12. Арыстанова, А. Ж. Противовоспалительные препараты корня солодки как средства медикаментозной коррекции дилатационного синдрома у больных неревматическим миокардитом [Текст] / А. Ж. Арыстанова, Р. М. Бердыханова // Терапевт. вестн. – 2007. – № 1. – С. 23–26.
13. Арыстанова, Т. А. Фармакологические свойства биологически активных соединений корня солодки и их производных [Текст] / Т. А. Арыстанова, С. К. Ордабаева, С. С. Дуйсебаева // Астана медициналык журналы. – 2004. – № 2. – С. 22–28.
14. Арыстанова, Т. П. Исследование биологической доступности таблеток «Рувимин» в опытах «in vitro» [Текст] / Т. П. Арыстанова // Мед. журн. Казахстана. – 2000. – № 3 (9). – С. 82–84.
15. Бабанов, С. А. Доказательность, профессиональные риски и биологические маркеры при профессиональных заболеваниях легких [Текст] / С. А. Бабанов, Д. С. Будащ // Медицина труда и экология человека. – 2018. – № 1 (13). – С. 34–43.
16. Байкадамова, Л. И. Клинико-экономическая оценка сочетанного применения масляных экстрактов крапивы и солодки при железодефицитной анемии легкой степени у студентов [Текст]: автореф. дис. ... канд. мед. наук: (14.00.25) / Л. И. Байкадамова. – Актобе, 2009. – 25 с.
17. Байманова, А. М. Использование растительного препарата рувимин при хронических бронхитах и гепатитах у рабочих нефтехимической промышленности [Текст] / А. М. Байманова // Бюл. Вост.-сиб. Науч. центра Сиб. отд-ния Рос. акад. мед. наук. – 2005. – № 8 (46). – С. 103–108.

18. Бакирова, С. Ф. Экологические проблемы нефтедобывающей отрасли [Текст] / С. Ф. Бакирова // Добыча, подготовка, транспорт нефти и газа. – 2016. – № 1. – С. 230–232.
19. Балабекова, М. К. Ванадий- и хроминдуцированные повреждения [Текст] / М. К. Балабекова // Вестн. Алматин. гос. ин-та усовершенствования врачей. – 2010. – № 2 (10). – С. 80–82.
20. Балабекова, М. К. Влияние полиоксидония на костно-мозговое кроветворение после двухнедельной интоксикации ванадием и хромом у крыс с экспериментальным воспалением [Текст] / М. К. Балабекова, А. Н. Нурмухамбетов, К. Т. Нурғалиева // Вестн. Алматин. гос. ин-та усовершенствования врачей. – 2010. – № 3/4 (11/12). – С. 63–65.
21. Балабекова, М. К. Изучение клеточности лимфоорганов крыс в эксперименте [Текст] / М. К. Балабекова, А. Н. Токушева, В. В. Трубачев // Актуал. науч. исслед. в соврем. мире. – 2016. – Вып. 10 (18). – С. 28–31.
22. Балабекова, М. К. Лабораторная оценка асептического воспаления, вызванного на фоне интоксикации тяжелыми металлами [Текст] / М. К. Балабекова // Наука и новые технологии. – 2012. – № 1. – С. 72–75.
23. Балабекова, М. К. Морфологическая характеристика иммунокомпетентных органов и гематологические изменения у крыс с экспериментальным воспалением [Текст] / М. К. Балабекова, Т. П. Ударцева, А. Н. Нурмухамбетов // Здравooхранение Кыргызстана. – 2011. – № 2. – С. 186–191.
24. Балабекова, М. К. Морфологические особенности течения воспаления у опытных крыс на фоне комбинированного воздействия ванадия и хрома [Текст] / М. К. Балабекова // Вестн. Кырг.-Рос. Славян. ун-та. – 2014. – Т. 14, № 10. – С. 87–90.
25. Балабекова, М. К. Органотоксические эффекты тяжелых металлов [Текст] / М. К. Балабекова // Наука и новые технологии. – 2012. – № 1. – С. 122–124.
26. Балабекова, М. К. Поиск новых путей коррекции нарушений, вызванных комбинированным влиянием ванадия и хрома [Электронный ресурс] / М. К. Балабекова // Интернет. журн. ВАК. – 2011. – № 4. – Режим доступа: URL: [http://ais.vak.kg/jurnalVAK/files\\_article/34.pdf](http://ais.vak.kg/jurnalVAK/files_article/34.pdf). – Загл. с экрана.

27. Бекташов, Б. Б. Проблемы урановых хвостохранилищ Кыргызстана [Текст] / Б. Б. Бекташов, А. К. Тельтаева // Изв. Кырг. гос. техн. ун-та им. И. Раззакова. – 2014. – № 33. – С. 483–485.
28. Биологическая активность и острая токсичность новых мембраностабилизирующих лекарственных средств из группы производных пиперидина [Текст] / С. Н. Шин, К. Д. Пралиев, В. К. Ю [и др.] // Изв. корейск. НТО «КАХАК». – 2000. – Вып. 3. – С. 70–77.
29. Бнятова, Л. Г. Мониторинг экологического состояния территории Республики Казахстан [Текст] / Л. Г. Бнятова // Экол. проблемы региона и пути их разрешения. – 2018. – № 10. – С. 24–28.
30. Бриль, Е. А. Иммунокоррекция у детей с зубочелюстными аномалиями и деформациями на этапах ортодонтического лечения [Текст] / Е. А. Бриль // Материалы VII Всерос. науч. форума с междунар. участием «Стоматология 2005». – М., 2005. – С. 50–51.
31. Бриль, Е. А. Эффективность профилактики кариеса зубов у детей с зубочелюстными аномалиями и деформациями при проведении иммунокоррекции на этапах ортодонтического лечения [Текст] / Е. А. Бриль, А. А. Левенец // Материалы VII Всерос. науч. форума с междунар. участием «Стоматология 2005». – М., 2005. – С. 51–52.
32. Будащ, Д. С. Профессиональный риск и факторы роста в прогнозировании профессиональных заболеваний легких [Текст] / Д. С. Будащ, С. А. Бабанов // Аспирант. вестн. Поволжья. – 2018. – № 1/2. – С. 137–144.
33. Валеева, А. Р. Роль врожденных лимфоидных клеток в патогенезе иммунного воспаления при язвенном колите [Текст] / А. Р. Валеева, О. В. Скороходкина // Рос. иммунол. журн. – 2018. – Т. 12 (21), № 4. – С. 618–620.
34. Васильев, А. В. Лекарственные растения России – неиссякаемый источник для создания новых высокоэффективных лечебно-профилактических препаратов и биологически активных пищевых добавок [Текст] / А. В. Васильев, Т. П. Полоз, Н. Н. Соколов // Вопр. мед. химии. – 2002. – № 2. – С. 357–370.
35. Васильянова, Л. С. Экология Казахстана (Ч. 1) [Текст] / Л. С. Васильянова, Г. А. Козбагарова // Новости науки Казахстана. – 2018. – № 2 (136). – С. 218–238.

36. Васильянова, Л. С. Экология Казахстана (Ч. 2) [Текст] / Л. С. Васильянова, Г. А. Козбагарова // Новости науки Казахстана. – 2018. – № 3 (137). – С. 209–224.
37. Влияние вскармливания солодкой и надрезания седалищного нерва на активность аргиназы и ферментов биосинтеза пролина в различных органах крыс [Текст] / А. Х. Агаджанян, А. А. Агаджанян, М. С. Мартиросян [и др.] // Вестн. Междунар. акад. наук экологии и безопасности жизнедеятельности. – 2002. – Вып. 7, № 6 (54). – С. 83–85.
38. Влияние иммунофана на показатели системы иммунитета и перекисного окисления липидов после острых отравлений токсичными химическими веществами [Текст] / П. Ф. Забродский, В. Г. Германчук, М. Л. Нодель [и др.] // Эксперим. и клин. фармакология. – 2004. – № 5. – С. 28–30.
39. Влияние корня солодки голой на показатели периферической крови в динамике вибрационного воздействия [Текст] / Ц. И. Адамян, Э. С. Геворкян, С. М. Минасян [и др.] // Бюл. эксперим. биол. и медицины. – 2005. – Т. 140, № 8. – С. 164–168.
40. Влияние экстракта восковой моли «Мелонелла» на фагоцитарную активность крови [Текст] / А. П. Семитко, Т. А. Ударцева, Н. Н. Сорокина [и др.] // Биология: теория, практика, эксперимент: материалы Междунар. науч. конф., посвящ. 100-летию со дня рождения д-ра биол. наук, проф. Е. В. Сапожниковой: в 2-х кн. / редкол.: Р. В. Борченко (отв. ред.) [и др.]. – Саранск, 2008. – Кн. 2. – С. 311–312.
41. Газалиева, М. А. Риск развития иммунодефицитных состояний и аллергопатологии у населения экологически неблагополучных регионов Республики Казахстан [Текст] / М. А. Газалиева, Н. Ш. Ахметова, Г. Ж. Утебаева // Вестн. Каз. нац. мед. ун-та. – 2017. – № 4. – С. 428–432.
42. Газалиева, М. А. Состояние иммунологического здоровья населения экологически неблагополучных регионов Казахстана (обзор литературы) [Текст] / М. А. Газалиева, Н. Ш. Ахметова, Б. К. Жумабекова // Науч. обозрение. Мед. науки. – 2016. – № 5. – С. 32–39.
43. Джакенова, А. С. Влияние малых доз ионизирующей радиации на активность энзимов трансаминирования в печени крыс при ингаляции пылью урановой руды в дозах 5 и 10 ПДК и при применении экстракта солодки [Текст] / А. С.

- Джакенова, Р. Х. Мустафина, П. К. Казымбет // Астана медициналык журналы. – 2009. – № 3 (55). – С. 176–181.
44. Джакипбекова, З. К. Влияние рувина на окислительный метаболизм белков у больных с хронической интоксикацией соединениями фосфора [Текст] / З. К. Джакипбекова, Д. А. Адильбекова // Медицина и экология. – 2006. – № 4 (41). – С. 81–82.
45. Джамгырчиев, Д. Ч. Проявления опасных природных явлений (ОПЯ) и техногенных процессов (ТП) в ландшафтах западной части Чуйской долины Кыргызстана [Текст] / Д. Ч. Джамгырчиев, Э. А. Атабаева // Вестн. Кырг. нац. ун-та им. Ж. Баласагына. – 2018. – № 4 (96). – С. 90–93.
46. Джиембаев, Б. Ж. Фундаментальные и прикладные исследования лаборатории химии природных соединений [Текст] / Б. Ж. Джиембаев // Химия природных и синтетических биологически активных соединений (строение, превращения и свойства). – Алматы, 2001. – С. 24–36. – (Тр. Ин-та хим. наук им. А. Б. Бектурова; Т. 76).
47. Джумашева, Р. Т. Эффективность применения препарата корня солодки при воздействии на организм животных пыли урановой руды [Текст] / Р. Т. Джумашева // Гигиена, эпидемиология и иммунобиология. – 2010. – № 1 (43). – С. 48–51.
48. Дьяконова, В. А. Изучение механизма действия иммуномодулятора полиоксидония на клеточном и молекулярном уровне на клетках периферической крови человека в условиях *in vitro* [Текст] / В. А. Дьяконова, С. В. Дамбаева, М. В. Голубева // Физиол. патология иммунной системы. – 2004. – № 2. – С. 100–115.
49. Елецкая, О. А. Исследования по разработке лекарственного растительного сбора мочегонного, противовоспалительного и иммуномодулирующего действия [Текст] / О. А. Елецкая, В. А. Яцюк, Г. А. Чалый // Биология: теория, практика, эксперимент: материалы Междунар. науч. конф., посвящ. 100-летию со дня рождения д-ра биол. наук, проф. Е. В. Сапожниковой: в 2-х кн. / редкол.: Р. В. Борченко (отв. ред.) [и др.]. – Саранск, 2008. – Кн. 2. – С. 295–296.

50. Жакен, А. Проблемы экологии в Республике Казахстан и мероприятия по улучшению экологической ситуации [Текст] / А. Жакен // Инновационные технологии в науке и образовании: сб. ст. победителей IV Междунар. науч.-практ. конф. – Пенза, 2017. – С. 21–22.
51. Жакыпбекова, А. Т. Состояние хвостохранилищ поселка городского типа Сумсар и технология восстановления реки «Сумсар» [Текст] / А. Т. Жакыпбекова, К. Ж. Усенов // Фундаментальные и прикладные научные исследования: актуальные вопросы, достижения и инновации. – Пенза, 2017. – Т. 1, ч. 1. – С. 184–187.
52. Журабекова, Г. А. Морфофункциональная характеристика структур коры надпочечников при длительном воздействии формальдегида и при применении фитопрепарата «Масло солодки» [Текст]: автореф. дис. ... канд. мед. наук: (14.00.15) / Г. А. Журабекова. – Алматы, 2008. – 22 с.
53. Забродский, П. Ф. Иммунотоксикология ксенобиотиков [Текст]: моногр. / П. Ф. Забродский, В. Г. Мандыч. – Саратов: СВИБХБ, 2007. – 420 с.
54. Изучение инкапсулированной формы местного анестетика казкаина в  $\gamma$ -циклодекстрин в растворе методом  $^1\text{H}$  ЯМР-спектроскопии [Текст] / Г. М. Калдыбекова, И. Е. Оспанов, Р. А. Шарипов [и др.] // Биотехнология. Теория и практика. – 2011. – № 2. – С. 14–18.
55. Имашова, Ш. О. Изыскание комплекса местных анестетиков пролонгированного действия [Текст]: автореф. дис. ... канд. мед. наук: (14.00.25) / Ш. О. Имашова. – Алматы, 2008. – 25 с.
56. Иммуномодулятор полиоксидоний в терапии хронического простатита [Текст] / С. Г. Шестаков, А. И. Конопля, М. Н. Шатохин [и др.] // Аллергология и иммунология. – 2003. – Т. 4, № 2. – С. 145.
57. Инженерно-геономическая оценка георисков от гидрохимических аномалий и отходов горного производства в Кыргызстане [Текст] / Э. Э. Атыкенова, Ш. Э. Усупаев, А. Ф. Малышев [и др.] // Изв. Кырг. гос. техн. ун-та им. И. Раззакова. – 2014. – № 33. – С. 439–442.
58. Интегральные гематологические показатели лейкоцитарной формулы как критерий оценки тяжести течения ожоговой болезни, ее осложнений и эффективности проводимого лечения [Текст] / В. К. Гринь, Э. Я. Фисталь, И. И.



- Сперанский [и др.] // Материалы науч.-практ. конф. «Сепсис: проблемы диагностики, терапии та профілактики», 29–30 марта 2006 г. – Харьков, 2006. – С. 77–78.
59. Информативность тестов оценки иммунного статуса при инфекционных и аллергических заболеваниях [Текст]: метод. рек. / НИИ эпидемиологии, микробиологии и инфекц. болезней Минздрава КазССР. – Алма-Ата: [б. и.], 1989. – 145 с.
60. Искаков, Н. Устойчивое развитие Республики Казахстан: экономические, социальные, экологические аспекты [Текст]: моногр. / Н. Искаков, А. Корчевский. – Астана: [б. и.], 2007. – 172 с.
61. Исследование функциональной активности CD-рецепторов мембран Т-лимфоцитов в условиях УФ-облучения и воздействия циклоферона [Текст] / В. Г. Артюхов, О. В. Путинцева, С. М. Дубова [и др.] // Биология: теория, практика, эксперимент: материалы Междунар. науч. конф., посвящ. 100-летию со дня рождения д-ра биол. наук, проф. Е. В. Сапожниковой: в 2-х кн. / редкол.: Р. В. Борченко (отв. ред.) [и др.]. – Саранск, 2008. – Кн. 2. – С. 242–243.
62. Исследования в области создания новых лекарственных препаратов пролонгированного действия [Текст] / Е. О. Батырбеков, В. К. Ю, К.Д. Пралиев [и др.] // Изв. НТО «Кахак». – 2002. – № 6. – С. 53–57.
63. Казимов, М. А. Экспериментальное изучение особенностей токсикокинетики ванадия и хрома при их совместном поступлении в организм [Текст]: моногр. / М. А. Казимов. – Алма-Ата: [б. и.], 1987. – 136 с.
64. Калинина, Н. М. Травма: воспаление и иммунитет [Текст] / Н. М. Калинина, А. Е. Сосюкин, Д. А. Воложанин // Цитокины и воспаление. – 2005. – Т. 4, № 1. – С. 28–34.
65. Карашева, А. А. Оценка группы риска по иммунологической недостаточности у жителей экологически неблагоприятных регионов горной местности [Текст] / А. А. Карашева // Изв. вузов Кыргызстана. – 2009. – № 4. – С. 42–44.
66. Кеворков, Н. Н. Выбор препаратов иммунокорректирующей терапии и путей их введения в лечении вторичных иммунодефицитных состояний [Текст] / Н. Н.

- Кеворков // Рациональное использование лекарств: материалы Рос. науч.-практ. конф., 10-12 марта 2004 г. – Пермь, 2004. – С. 296–297.
67. Кенжебеков, Н. Д. Оценка результативности и влияния природоохранной деятельности региона на возможность ассимиляции окружающей среды [Текст] / Н. Д. Кенжебеков, А. К. Кабдыбай // Вестн. Сиб. ун-та потреб. кооперации. – 2017. – № 3 (21). – С. 25–34.
68. Клиническая эффективность применения полиоксидония при язвенной болезни [Текст] / Л. П. Сизякина, Н. Н. Титова, А. В. Ткачев [и др.] // Аллергология и иммунология. – 2003. – Т. 4, № 2. – С. 141.
69. Клинические и иммуномодулирующие влияния полиоксидония для коррекции вторичного иммунодефицита у больных ишемической болезнью сердца, ассоциированной с сахарным диабетом типа II [Текст] / А. Т. Тепляков, Л. А. Болотская, Т. В. Вдовина [и др.] // Иммунология. – 2008. – № 1. – С. 44–50.
70. Козинец, Г. И. Исследование системы крови в клинической практике [Текст] / Г. И. Козинец, В. А. Макаров. – М.: Триада-Х, 1997. – 303 с.
71. Комбинированное воздействие шума и корней солодки на активность аргиназы и ферментов биосинтеза пролина в крови кроликов [Текст] / А. Х. Агаджанян, А. О. Оганисян, С. М. Минасян [и др.] // Биология: теория, практика, эксперимент: материалы Междунар. науч. конф., посвящ. 100-летию со дня рождения д-ра биол. наук, проф. Е. В. Сапожниковой: в 2-х кн. / редкол.: Р. В. Борченко (отв. ред.) [и др.]. – Саранск, 2008. – Кн. 2. – С. 95–96.
72. Компоненты корня солодки как природные субстраты для получения лекарственных средств [Текст] / С. К. Ордабаева, Т. А. Арыстанова, К. Д. Рахимов [и др.] // Здоровье семьи – XXI век: материалы XIV Междунар. науч. конф. – Пермь, 2010. – С. 341–342.
73. Корреляция прогнозируемых и экспериментальных данных по местноанестезирующей активности 1-(2-этоксипропил)-4-алкинил-4-бензоилоксиопиридинов [Текст] / С. С. Ибраева, С. Р. Уахитова, Т. Г. Бимурзаева [и др.] // Химия и химическая технология в XXI веке: материалы XVI Междунар. науч.-практ. конф. студентов и молодых ученых, посвящ. 115-летию со дня рождения проф. Л. П. Кулёва: в 2-х т. – Томск, 2015. – Т. 1. – С. 134–135.

74. Космагамбетов, А. Ж. Антиоксидантные свойства масла солодки [Текст] / А. Ж. Космагамбетов, К. Д. Калиева // Медицина. – 2000. – № 4. – С. 57–58.
75. Кропотова, А. В. Регуляция синтеза гамма-интерферона женьшенем в условиях экспериментального асептического воспаления [Текст] / А. В. Кропотова, Н. В. Степаненко // Биология: теория, практика, эксперимент: материалы Междунар. науч. конф., посвящ. 100-летию со дня рождения д-ра биол. наук, проф. Е. В. Сапожниковой: в 2-х кн. / редкол.: Р. В. Борченко (отв. ред.) [и др.]. – Саранск, 2008. – Кн. 2. – С. 303–304.
76. Куланчиева, Ж. А. Пути коррекции гемо- и нейротоксического ванадия в эксперименте [Текст]: автореф. дис. ... канд. мед. наук: (14.00.16) / Ж. А. Куланчиева. – Алматы, 2007. – 24 с.
77. Куценко, С. А. Основы токсикологии [Текст] / С. А. Куценко. – СПб.: Медицина, 2004. – 405 с.
78. Лабораторные животные. Разведение, содержание, использование в эксперименте [Текст]: моногр. / И. П. Западнюк, В. И. Западнюк, Е. А. Захария [и др.]. – Киев: Вища шк., 1983. – 383 с.
79. Ланг, Т. А. Как описывать статистику в медицине [Текст]: рук. для авторов, ред. и рецензентов / Т. А. Ланг. – М.: Практик. медицина, 2011. – 480 с.
80. Лосев, Н. И. Руководство к практическим занятиям по патологической физиологии [Текст] / Н. И. Лосев. – М.: Медицина, 1985. – 208 с.
81. Мамбеталиева, Ш. М. Методы оценки геохимических опасностей в Кыргызстане [Текст] / Ш. М. Мамбеталиева, Ш. Э. Усупаев, А. Ф. Мальшев // Изв. Кырг. гос. техн. ун-та им. И. Раззакова. – 2014. – № 33. – С. 442–445.
82. Морфологические особенности строения органов иммунной системы неполовозрелых крыс после введения тимогена [Текст] / С. А. Кащенко, И. В. Бобрышева, М. И. Моисеева [и др.] // Карповские чтения: материалы III Всеукр. науч. морфол. конф., 11-14 апр. 2006 г. – Днепропетровск, 2006. – С. 86.
83. Мусульманова, М. М. Исследование микроэлементного состава белок-минеральных комплексов [Текст] / М. М. Мусульманова, Ю. В. Чимурбаева // Изв. Кырг. гос. техн. ун-та им. И. Раззакова. – 2016. – № 3-2 (39). – С. 142–146.

84. О возможности применения фитотерапии при лечении стоматологических заболеваний [Текст] / Х. М. Шайдуллина, К. А. Пупыкина, Ф. Х. Кильдияров [и др.] // Здоровье семьи – XXI век: материалы XIV Междунар. науч. конф. – Пермь, 2010. – С. 489–490.
85. О некоторых видах лабораторных исследований объектов внешней среды на содержание солей тяжелых металлов в Актюбинской области [Текст] / Ж. Е. Танибергенова, А. А. Кенжалина, К. А. Аяпбергенов [и др.] // Гигиена, эпидемиология и иммунобиология. – 2010. – № 1. – С. 105–107.
86. О современных иммуноактивирующих средствах [Текст] / Г. А. Базанов, А. Б. Лебедев, Е. Ю. Лебедева [и др.] // Материалы науч.-практ. конф. «Рациональное использование лекарств», 10-12 марта 2004 г. – Пермь, 2004. – С. 290–291.
87. Обухова, Л. А. Морфологическое исследование эпителиального компонента тимуса при холодовых воздействиях и фармакологической коррекции [Текст] / Л. А. Обухова // Бюл. Сиб. отд-ния Рос. акад. мед. наук. – 2001. – Т. 21, № 4. – С. 78–83.
88. Оганисян, А. О. Комбинированное воздействие шума и корней солодки на активность сукцинатдегидрогеназы [Текст] / А. О. Оганисян, С. М. Минасян, К. Р. Оганисян // Биол. журн. Армении. – 2006. – № 1/2 (58). – С. 71–72.
89. Опытнo-промышленный регламент на производство таблеток Рувимин [Текст] / М. П. Ирисметов, Т. А. Арыстанова, Б. Ж. Джиембаев [и др.]. – Алматы: [б. и.], 2000. – 76 с.
90. Осмонбетов, К. О. Экогеохимия месторождений полезных ископаемых Кыргызстана [Текст] / К. О. Осмонбетов, Г. А. Жангазиева // Изв. вузов Кыргызстана. – 2009. – № 4. – С. 50–55.
91. Оценка интенсивности процесса перекисного окисления липидов и проницаемости плазматической мембраны для ионов  $Ca^{2+}$  в тимоцитах крыс при воздействии кадмия [Текст] / Э. Б. Мирзоев, В. О. Кобялко, О. А. Губина [и др.] // Токсикол. вестн. – 2005. – № 31. – С. 38–39.
92. Оценка эколого-гигиенического состояния основных объектов окружающей среды крупного промышленного центра цветной металлургии г. Усть-Каменогорска [Текст] / М. Н. Омарова, Е. Ж. Жаркинов, А. Т. Исмагулов [и др.] //

- Здоровье семьи – XXI век: материалы XIV Междунар. науч. конф. – Пермь, 2010. – С. 338–339.
93. Павелковская, Г. П. Фитопрепараты – из настоящего в будущее [Текст] / Г. П. Павелковская, Ж. Н. Алимбаева // Фармацевт. бюл. – 2005. – № 4. – С. 6–7.
94. Пинегин, Б. В. Иммуномодулятор полиоксидоний: механизмы действия и аспекты клинического применения [Текст] / Б. В. Пинегин, А. В. Некрасов, Р. М. Хаитов // Цитокины и воспаление. – 2004. – № 3. – С. 21–27.
95. Пинегин, Б. В. Механизм действия и клинические аспекты применения иммуномодулятора полиоксидония [Текст] / Б. В. Пинегин, А. В. Некрасов, Р. М. Хаитов // Труды 4-го конгр. Рос. ассоц. аллергологов и клин. иммунологов (РААКИ) «Современные проблемы аллергологии, иммунологии и иммунофармакологии». – М., 2001. – Т. 1. – С. 334–348.
96. Плаксен, Н. В. Коррекция иммунодефицитных состояний с помощью препарата из асцидии пурпурной – «Мобилана» [Текст] / Н. В. Плаксен, Н. С. Хильченко // Биология: теория, практика, эксперимент: материалы Междунар. науч. конф., посвящ. 100-летию со дня рождения д-ра биол. наук, проф. Е. В. Сапожниковой: в 2-х кн. / редкол.: Р. В. Борченко (отв. ред.) [и др.]. – Саранск, 2008. – Кн. 2. – С. 307–308.
97. Порфириадис, М. Б. Перспективы применения препарата «Полиоксидоний» в комплексном лечении флегмон челюстно-лицевой области [Текст] / М. Б. Порфириадис, В. В. Шулаков // Материалы VII Всерос. науч. форума с междунар. участием «Стоматология-2005». – М., 2005. – С. 220–221.
98. Потапнев, М. П. Иммунные механизмы стерильного воспаления [Текст] / М. П. Потапнев // Иммунология. – 2015. – № 5. – С. 312–318.
99. Пралиев, К. Д. Биологически активные вещества в ряду производных пиперидина: задачи, пути реализации, результаты и перспективы [Текст] / К. Д. Пралиев, В. К. Ю // Химия и применение природных и синтетических биологически активных соединений: тр. Междунар. науч. конф., посвящ. 100-летию со дня рождения акад. АН КазССР М. И. Горяева. – Алматы, 2004. – С. 36–40.

100. Пред. пат. 5011 Респ. Казахстан. 1-(2-Этоксипиперидин)-4-(диметоксифосфорил)-4-гидроксипиперидин, обладающий стимулирующей рост растений активностью [Текст] / В. К. Ю, К. Д. Пралиев. – Заявл. 28.12.95; Оpubл. 15.08.97. – Бюл. № 3.
101. Разработка, создание и внедрение новых оригинальных отечественных лекарственных средств из синтетического и растительного сырья Казахстана [Текст] / К. Д. Пралиев, Б. Ж. Джембаев, М. П. Ирисметов [и др.] // Хим. журн. Казахстана. – 2003. – № 1. – С. 12–25.
102. Распространенность заболеваемости у жителей горных районов Кыргызстана с техногенным загрязнением внешней среды [Текст] / К. А. Собуров, Н. Б. Тюмонбаева, И. А. Абрамова [и др.] // Изв. вузов. – 2005. – № 6. – С. 69–71.
103. Реакция периферической крови крыс в ответ на воспаление, вызванное на фоне интоксикации соединениями ванадия и хрома (эксперимент) [Электронный ресурс] / М. К. Балабекова, А. Н. Токушева, С. Е. Мырзагулова [и др.] // Современные проблемы науки и образования. – 2015. – № 6. – Режим доступа: URL: <http://science-education.ru/ru/article/view?id=23769>. – Загл. с экрана.
104. Реакция периферической крови крыс в ответ на воспаление, вызванное на фоне интоксикации соединениями ванадия и хрома (эксперимент) [Текст] / А. Н. Токушева, М. К. Балабекова, С. Е. Мырзагулова [и др.] // Современ. проблемы науки и образования. – 2015. – № 6. – С. 273.
105. Рубцов, Р. В. Особенности телосложения рабочих горнорудной промышленности с хроническим обструктивным заболеванием легких профессиональной этиологии в постконтактный период [Текст] / Р. В. Рубцов // Вестн. проблем биологии и медицины. – 2016. – Т. 1, № 4 (133). – С. 298–303.
106. Сапин, М. Р. Особенности реакции иммунной системы на различные внешние воздействия [Текст] / М. Р. Сапин // Морфология. – 2006. – Т. 129, № 4. – С. 109–110.
107. Сарсембаев, М. А. Казахстанские и международно-правовые нормы об экологически чистых транспортных средствах [Текст] / М. А. Сарсембаев // Право и государство. – 2019. – № 1 (82). – С. 97–110.

108. Синтез 1-(3-этоксипропил)-4-гексил-4-гидроксипиперидина [Текст] / С. С. Ибраева, К. Д. Пралиев, Т. К. Исакова, Т. М. Сейлханов // Изв. вузов. Сер. Химия и хим. технология. – 2014. – Т. 57, № 2. – С. 48–50.
109. Системный воспалительный ответ и цитокиновый профиль в динамике развития ожоговой болезни [Текст] / В. В. Моррисон, А. Ю. Божедомов, М. А. Симонян [и др.] // Саратов. науч.-мед. журн. – 2017. – Т. 13, № 2. – С. 229–232.
110. Сихимбаев, М. Р. Пути обеспечения экологической безопасности в нефтедобывающих регионах Казахстана [Текст] / М. Р. Сихимбаев, Т. А. Ханов // Междунар. журн. прикл. и фундам. исслед. – 2014. – № 8 (1). – С. 101–105.
111. Собуров, К. А. Экология горных биогеохимических провинций и иммунитет [Текст] / К. А. Собуров, Н. Б. Тюмонбаева // Медицина Кыргызстана. – 2014. – № 5. – С. 66–70.
112. Современный взгляд на механизмы формирования экологенной иммунодепрессии [Текст] / М. К. Балабекова, А. Н. Нурмухамбетов, Р. Р. Тухватшин [и др.] // Вестн. Каз. нац. мед. ун-та им. С. Д. Асфендиярова. – 2017. – № 1. – С. 375–380.
113. Сравнительная комплексная экологическая оценка населенных пунктов Актюбинской области зоны Приаралья [Текст] / Г. Р. Хантурина, А. Т. Такибаева, С. Н. Дербуш [и др.] // Междунар. журн. прикл. и фундам. исслед. – 2018. – № 4. – С. 116–119.
114. Стрижаков, А. Н. Клинико-иммунологическое обоснование терапии больных с острым воспалением придатков матки [Текст] / А. Н. Стрижаков, Ж. А. Каграманова, Д. В. Якубович // Вопр. гинекологии, акушерства и перинатологии. – 2004. – Т. 3, № 1. – С. 18–22.
115. Сулейманова, Н. О. Этоксикологическая оценка содержания тяжелых металлов в темно-каштановых почвах агроценозов центральной части Чуйской долины [Текст] / Н. О. Сулейманова // Изв. вузов. – 2005. – № 6. – С. 163–165.
116. Татарко, С. В. Сравнительная характеристика фагоцитарной активности нейтрофилов периферической крови при различных по течению и этиологии видах воспаления [Текст] / С. В. Татарко // Вестн. проблем биологии и медицины. – 2014. – Т. 1, № 4 (113). – С. 203–208.

117. Токтомурадова, Н. С. Экологическое состояние хвостохранилищ юга Кыргызстана [Текст] / Н. С. Токтомурадова // Вестн. Кырг. нац. ун-та им. Ж. Баласагына. – 2018. – № 4 (96). – С. 118–124.
118. Толепбергенова, М. Ж. Патогенетическая коррекция морфофункциональных нарушений головного мозга и системы крови под влиянием соединений ванадия и хрома [Текст]: автореф. дис. ... канд. мед. наук: (14.00.16) / М. Ж. Толепбергенова. – Алматы, 2010. – 25 с.
119. Тотолян, А. А. Метод постановки НСТ-теста [Текст] / А. А. Тотолян // Лаборатор. дело. – 1987. – № 11. – С. 863–866.
120. Тяжелые металлы внешней среды и их влияние на иммунный статус населения [Текст] / Н. М. Паранько, Э. Н. Белицкая, Н. И. Карнаух [и др.] // Днепропетровск: Полиграфист, 2002. – 143 с.
121. Умарова, Ж. С. Влияние масла солодки на течение шигеллеза у детей [Текст] / Ж. С. Умарова // Фармация Казахстана. – 2008. – № 12. – С. 30–32.
122. Фрадкин, В. А. Диагностика аллергии реакциями нейтрофилов крови [Текст] / В. А. Фрадкин. – М.: Медицина, 1985. – 170 с.
123. Хабриев, Р. У. Руководство по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ [Текст] / Р. У. Хабриев. – М.: Медицина, 2005. – 832 с.
124. Хайруллина, З. С. Сравнительный анализ фармако-экономической эффективности применения масла солодки в комплексном лечении больных бронхиальной астмой [Текст] / З. С. Хайруллина // Астана медициналык журналы. – 2007. – № 1 (37). – С. 60–62.
125. Хайтов, Р. М. Иммуномодуляторы и некоторые аспекты их клинического применения [Текст] / Р. М. Хайтов, Б. В. Пинегин // Клин. медицина. – 1996. – Т. 74, № 8. – С. 7–12.
126. Хайтов, Р. М. Основные принципы иммуномодулирующей терапии [Текст] / Р. М. Хайтов, Б. В. Пинегин // Аллергия, астма и клин. иммунология. – 2000. – № 1. – С. 6–9.



127. Черешнев, В. А. Иммунологические механизмы локального воспаления [Текст] / В. А. Черешнев, М. В. Черешнева // Мед. иммунология. – 2011. – Т.13, № 6. – С. 55–568.
128. Черешнев, В. А. Иммунология воспаления: роль цитокинов [Текст] / В. А. Черешнев, Е. Ю. Гусев // Мед. иммунология. – 2001. – Т. 3, № 3. – С. 361–368.
129. Шабалов, Н. П. Гетерогенность системного воспалительного ответа при неонатальном сепсисе [Электронный ресурс] / Н. П. Шабалов, Д. О. Иванов, Н. Н. Шабалова // Педиатрия и неонатология. – 2005. –Режим доступа: URL: <http://www.medlinks.ru/article.php?sid=22343>. - Загл. с экрана.
130. Шайхутдинов, Е. М. Последствия нефтяного загрязнения для окружающей среды Атырауской области Республики Казахстан [Текст] / Е. М. Шайхутдинов, А. Г. Касанова // Science time. – 2020. – № 2 (74). – С. 68–72.
131. Шамырканов, У. М. Классификация хвостохранилищ Кыргызстана [Текст] / У. М. Шамырканов // Науч. и образоват. проблемы граждан. защиты. – 2010. – № 3. – С. 41–48.
132. Шаназарова, А. С. Оценка содержания тяжелых металлов в растениях хвостохранилища п. Сумсар (Джалал-Абадская область) [Текст] / А. С. Шаназарова, А. Т. Ахматова // Вестн. Кырг.-Рос. Славян. ун-та. – 2015. – Т. 15, № 1. – С. 165–167.
133. Шаршенова, Д. С. Воздействие угледобычи Кавакского угольного бассейна на состояние атмосферного воздуха [Текст] / Д. С. Шаршенова // Наука, новые технологии и инновации Кыргызстана. – 2019. – № 3. – С. 91–94.
134. Шейбак, В. М. Аргинин и иммунная система – возможные механизмы взаимодействия [Текст] / В. М. Шейбак, А. Ю. Павлюковец // Вестн. Витеб. гос. мед. ун-та. – 2013. – Т. 12, № 1. – С. 6–11.
135. Шукирбекова, А. Б. Перспективы использования компонентов корня солодки в разработке противовирусных лекарственных препаратов [Текст] / А. Б. Шукирбекова // Фармация Казахстана. – 2006. – № 2. – С. 38–39.
136. Эффективное новое противоаритмическое средство – производное пиперидина – казкаин [Текст] / Г. М. Пичхадзе, Е. Е. Браун, Д. М. Кадырова [и др.] // Тезисы докл. IV Рос. нац. конгр. "Человек и лекарство". – М., 1997. – С. 283.

137. Эффективность полиоксидония в комплексной терапии хронического пародонтита у пациентов с общей вариабельной иммунной недостаточностью [Текст] / Н. Х. Сетдикова, Г. В. Журавская, В. Д. Шаповалов [и др.] // Иммунология. – 2007. – № 3. – С. 167–169.
138. Эффективность полиоксидония при остром инфекционном мононуклеозе у детей [Текст] / В. В. Иванова, Г. Ф. Железникова, А. С. Левина [и др.] // Аллергология и иммунология. – 2003. – Т. 4, № 2. – С. 176.
139. A paradoxical role for myeloid-derived suppressor cells in sepsis and trauma [Text] / A. G. Cuenca, M. J. Delano, K. M. Kelly-Scumpia [et al.] // *Molecular Medicine*. – 2011. – Vol. 17, N 3/4. – P. 281–292.
140. A review on peripheral blood CD4+ T lymphocyte counts in healthy adult Indians [Text] / Ashwini Shete, Madhuri Thakar, Philip Raj Abraham [et al.] // *Indian J. Med. Res.* – 2010. – Vol. 132, N 6. – P. 667–675.
141. A role for associated transition metals in the immunotoxicity of inhaled ambient particulate matter [Text] / J. T. Zelikoff, K. R. Schermerhorn, K. Fang [et al.] // *Environ Health Perspect.* – 2002. – Vol. 110, N 5. – P. 871–875.
142. A Single 9-Colour Flow Cytometric Method to Characterise Major Leukocyte Populations in the Rat: Validation in a Model of LPS-Induced Pulmonary Inflammation [Text] / A. Barnett-Vanes, A. Sharrock, M. A. Birrell, S. Rankin // *PLoS One*. – 2016. – Vol. 11, N 1. – E. 0142520.
143. Accumulation of Metal-Specific T Cells in Inflamed Skin in a Novel Murine Model of Chromium-Induced Allergic Contact Dermatitis [Электронный ресурс] / Hiroaki Shigematsu, Kenichi Kumagai, Hiroshi Kobayashi [et al.] // *PLoS One*. – 2014. – Vol. 9, N 1. – Режим доступа: URL: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/sars-cov-2/>. – Загл. с экрана.
144. Activation of dendritic cells via inhibition of Jak2/STAT3 signaling [Text] / Y. Nefedova, P. Cheng, D. Gilkes [et al.] // *Immunol.* – 2005. – Vol. 175, N 7. – P. 4338–4346.
145. Active replication of Middle East respiratory syndrome coronavirus and aberrant induction of inflammatory cytokines and chemokines in human macrophages:

- Implications for pathogenesis [Text] / J. Zhou, H. Chu, C. Li [et al.] // *J. Infect. Dis.* – 2014. – Vol. 209, N 9. – P. 1331–1342.
146. Acute phase inflammation is characterized by rapid changes in plasma/peritoneal fluid N-glycosylation in mice [Text] / Y. Rombouts, H. S. Jónasdóttir, Ederveen Hipgrave [et al.] // *Glycoconjugate J.* – 2016. – Vol. 33, N 3. – P. 457–470.
147. Air pollution, oxidative stress, and exacerbation of autoimmune diseases [Text] / A. Gawda, G. Majka, B. Nowak, J. Marcinkiewicz // *Cent. Eur. J. Immunol.* – 2017. – Vol. 42, N 3. – P. 305–312.
148. Anke, M. Vanadium. An element both essential and toxic to plants, animals and humans? [Text] / M. Anke // *Anales de la Real Academia Nacional de Farmacia.* – 2005. – Vol. 70, N 4. – P. 115–123.
149. Anti-hyperglycemic activity of chromium(III) malate complex in alloxan-induced diabetic rats [Text] / X. Y. Wu, F. Li, W. D. Xu, [et al.] // *Biol. Trace Elem. Res.* – 2011. – Vol. 143, N 2. – P. 1031–1043.
150. Bagaitkar, J. Cellular dynamics of resolving inflammation [Text] / J. Bagaitkar // *Blood.* – 2014. – Vol. 124, N 11. – P. 1701–1703.
151. Baldrige, M. T. Quiescent hematopoietic stem cells are activated by IFN $\gamma$  in response to chronic infection [Text] / M. T. Baldrige, K. Y. King, N. C. Boles // *Nature.* – 2010. – N 465 (7299). – P. 793–797.
152. Becker, K. W. Metal limitation and toxicity at the interface between host and pathogen [Text] / K. W. Becker, E. P. Skaar // *FEMS Microbiol Rev.* – 2014. – Vol. 38, N 6. – P. 1235–1249.
153. Benoist, C. Treg cells, life history, and diversity [Text] / C. Benoist, D. Mathis // *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology.* – 2012. – Vol. 4, N 9. – P. 325–634.
154. Biomarkers of inflammation and innate immunity in atrophic nonunion fracture [Text] / D. de Seny, G. Cobraiville, P. Leprince [et al.] // *J. Transl. Med.* – 2016. – Vol. 14, N 1. – P. 258–268.
155. Blood changes generated after vanadium inhalation [Text] / A. González-Villalva, A. Rodríguez-Lara, L. f. Montaña, Araceli Lima-Melo // *Current Topics in Toxicology.* – 2009. – N 6. – P. 31–38.

156. Bone marrow and the control of immunity [Text] / Ende Zhao, Huanbin Xu, Lin Wang [et al.] // Cell. Mol. Immunol. – 2012. – Vol. 9, N 1. – P. 11–19. 275
157. Bone marrow mesenchymal stem cells modified pathological changes and immunological responses in ovalbumin-induced asthmatic rats possibly by the modulation of miRNA155 and miRNA133 [Text] / Mahdi Ahmadi, Reza Rahbarghazi, Amir-Ali Shahbazfar [et al.] // Gen. Physiol. Biophys. – 2018. – Vol. 37, N 3. – P. 263–274.
158. Bone marrow mesenchymal stem cells repair Cr (VI)- injured kidney by regulating mitochondria-mediated apoptosis and mitophagy mediated via the MAPK signaling pathway [Text] / Fei Yin, Jun Yan, Yue Zhao [et al.] // Ecotoxicol. Environ Saf. – 2019. – N 176. – P. 234–241.
159. Brain metal distribution and neuro-inflammatory profiles after chronic vanadium administration and withdrawal in mice [Text] / O. R. Folarin, A. M. Snyder, D. G. Peters [et al.] // Front. Neuroanat. – 2017. – № 11. – P. 58.
160. Briffa, J. Environmental pollution with heavy metals and their toxicological effects on humans [Text] / J. Briffa, E. Sinagra, R. Blundell // Helion. – 2020. – Vol. 6, N 9. – P. 1–26.
161. Bronte, V. L-arginine metabolism in myeloid cells controls T-lymphocyte functions [Text] / V. Bronte, P. Serafini, A. Mazzone // Trends in Immunology. – 2003. – Vol. 24, N 6. – P. 302–306.
162. Cancer Risks of Hexavalent Chromium in the Respiratory Tract [Text] / Kazuhiro Yatera, Yasuo Morimoto, Susumu Ueno [et al.] // J. UOEH. – 2018. – Vol. 40, N 2. – P. 157–172.
163. CD8+CD122+ T-cells: a newly emerging regulator with central memory cell phenotypes [Text] / J. Liu, D. Chen, G. D. Nie, Z. Dai // Frontiers in Immunology. – 2015. – N 6. – P. 752–770.
164. Characteristic indices of red blood in babies of the first year of life suffering from obstructive bronchitis living in an ecologically unfavourable region [Text] / A. K. Жумалина, Б. Т. Тусупкалиев, Ж. М. Есиркепов [и др.] // Здоровье семьи – 21 век. – 2015. – № 5. – С. 149–152.

165. Chemokine nitration prevents intratumoral infiltration of antigen-specific T cells [Text] / B. Molon, S. Ugel, F. Del Pozzo, C. Soldani // *J. Exp. Med.* – 2011. – Vol. 208, N 10. – P. 1949–1962.
166. Chromium speciation, bioavailability, uptake, toxicity and detoxification in soil-plant system: A review [Text] / Muhammad Shahid, S. Shamshad, M. Rafiq [et al.] // *Chemosphere.* – 2017. – N 178. – P. 513–533.
167. Circulating immunosuppressive cells of prostate cancer patients before and after radical prostatectomy: profile comparison [Text] / D. Brusa, M. Simone, P. Gontero [et al.] // *Int. J. Urol.* – 2013. – № 20. – P. 971–978.
168. Common and distinct mechanisms of induced pulmonary fibrosis by particulate and soluble chemical fibrogenic agents [Text] / Jie Dong, Xiaoqing Yu, Dale W Porter [et al.] // *Arch. Toxicol.* – 2016. – Vol. 90, N 2. – P. 385-402.
169. Control of transplant tolerance and intragraft regulatory T cell localization by Myeloid-derived suppressor cells and CCL5 [Text] / N. Dilek, N. Poirier, C. Usal, B. Martinet // *Immunology.* – 2012. – Vol. 188, N 9. – P. 4209–4216.
170. Copper-induced cytotoxicity and transcriptional activation of stress genes in human liver carcinoma cells [Text] / P. Tchounwou, C. Newsome, J. Williams, K. Glass // *Metal Ions Biol Med.* – 2008. – N 10. – P. 285–290.
171. Cross-talk between myeloid-derived suppressor cells and macrophages subverts tumor immunity toward a type 2 response [Text] / P. Sinha, V. K. Clements, S. K. Bunt [et al.] // *Immunology.* – 2007. – Vol. 179, N 2. – P. 977–983.
172. Dendritic cells trigger imbalance of Th1/Th2 cells in silica dust exposure rat model via MHC-II, CD80, CD86, and IL-12 [Text] / L. Bao, C. Hao, S. Liu [et al.] // *RSC Adv.* – 2018. – N 8. – P. 26108–26115.
173. Dengming, Lai. Myeloid-Derived Suppressor Cells in Sepsis [Text] / Lai Dengming, Qin Chaojin, Shu Qiang // *Biomed. Res. Int.* – 2014. – N 82. – P. 127–139.
174. Depletion of regulatory T cells facilitates growth of established tumors: a mechanism involving the regulation of myeloid-derived suppressor cells by lipoxin A4 [Text] / B. Zhang, H. Jia, J. Liu [et al.] // *Immunology.* – 2010. – Vol. 185, N 12. – P. 7199–7206.
175. Does the relief of glucose toxicity act as a mediator in proliferative actions of vanadium on pancreatic islet beta cells in streptozocin diabetic rats? [Text] / L. Pirmoradi, M. T.

- Mohammadi, A. Safaei, F. Mesbah // *Iran. Biomed. J.* – 2014. – Vol. 18, N 3. – P. 173–180.
176. Dong, J. Macrophage polarization and activation at the interface of multi-walled carbon nanotube-induced pulmonary inflammation and fibrosis [Text] / J. Dong, Q. Ma // *Nanotoxicology.* – 2018. – Vol. 12, N 2. – P. 153–168.
177. Dovi, J. V. Accelerated wound closure in neutrophil-depleted mice [Text] / J. V. Dovi, L. K. He, L. A. DiPietro // *J. Leukoc. Biol.* – 2003. – Vol. 73, N 4. – P. 448–455.
178. Duque, G. A. Macrophage cytokines: involvement in immunity and infectious diseases [Text] / G. A. Duque, A. Descoteaux // *Frontiers in immunology.* – 2014. – N 5. – C. 491.
179. Durand, J. B cells with regulatory properties in transplantation tolerance [Text] / J. Durand, E. Chiffolleau // *World J. of Transplantation.* – 2015. – Vol. 5, N 4. – P. 196–208.
180. Effect of the militarily-relevant heavy metals, depleted uranium and heavy metal tungsten-alloy on gene expression in human liver carcinoma cells (HepG2) [Text] / A. C. Miller, K. Brooks, J. Smith, N. Page // *Mol. Cell. Biochem.* – 2004. – Vol. 255, N 1/2. – P. 247–256.
181. Effects of an amylopectin and chromium complex on the anabolic response to a suboptimal dose of whey protein [Text] / T. N. Ziegenfuss, H. L. Lopez, A. Kedia [et al.] // *J. Int. Soc. Sports Nutr.* – 2017. – N 14. – P. 6.
182. Effects of trimester-specific exposure to vanadium on ultrasound measures of fetal growth and birth size: a longitudinal prospective prenatal cohort study [Text] / J. Hu, Y. Peng, T. Zheng [et al.] // *Lancet Planet Health.* – 2018. – Vol. 2, N 10. – P. 427–437.
183. Elevated tissue Cr levels, increased plasma oxidative markers, and global hypomethylation of blood DNA in male Sprague-Dawley rats exposed to potassium dichromate in drinking water [Text] / Yu Wang, Wei Wu, Chunji Yao [et al.] // *Environ Toxicol.* – 2016. – Vol. 31, N 9. – P. 1080-1090.
184. Elkabets, M. IL-1beta regulates a novel myeloid-derived suppressor cell subset that impairs NK cell development and function [Text] / M. Elkabets // *Eur. J. Immunol.* – 2010. – N 40. – P. 3347–3357.

185. Emerging Tim-3 functions in antimicrobial and tumor immunity [Text] / K. Sakuishi, P. Jayaraman, S.M. Behar [et al.] // Trends. Immunol. – 2011. – Vol. 32, N 8. – P. 345–349.
186. Englert, N. Fine particles and human health—a review of epidemiological studies [Text] / N. Englert // Toxicology Letters. – 2004. – Vol. 149, N 1/3. – P. 235–242.
187. Evaluation of neutrophil-to-lymphocyte ratio in newly diagnosed patients receiving bortezomib-based therapy for multiple myeloma [Text] / X. Zhou, J. Wang, J. Xia [et al.] // Cancer Biomark. – 2018. – Vol. 22, N 1. – P. 43–48.
188. Excess dietary vanadium induces the changes of subsets and proliferation of splenic T cells in broilers [Text] / W. Cui, H. Cui, X. Peng [et al.] // Biol. Trace Elem. Res. – 2011. – Vol. 143, N 2. – P. 932–938.
189. Exposure to Welding Fumes, Hexavalent Chromium, or Nickel and Risk of Lung Cancer [Text] / B. Pesch, B. Kendzia, H. Pohlmann, W. Ahrens // Am. J. Epidemiol. – 2019. – Vol. 188, N 11. – P. 1984–1993.
190. Failure to detect production of IL-10 by activated human neutrophils [Text] / M. S. Davey, N. Tamassia, M. Rossato, F. Bazzoni // Nat. Immunol. – 2011. – Vol. 12, N 11. – P. 1017–1028.
191. Fibrosis biomarkers in workers exposed to MWCNTs [Text] / L. M. Fatkhutdinova, T. O. Khaliullin, O. L. Vasil'yeva [et al.] // Toxicol. Appl. Pharmacol. – 2016. – N 299. – P. 125–131.
192. Gabrilovich, D. I. Coordinated regulation of myeloid cells by tumours [Text] / D. I. Gabrilovich, S. Ostrand-Rosenberg, V. Bronte // Nat. Rev. Immunol. – 2012. – Vol. 12, N 4. – P. 253–268.
193. Gabrilovich, D. I. The terminology issue for myeloid-derived suppressor cells [Text] / D. I. Gabrilovich, V. Bronte, S. H. Chen [et al.] // Cancer. Res. – 2007. – Vol. 67, N 1. – P. 425.
194. Global analysis of proliferation and cell cycle gene expression in the regulation of hematopoietic stem and progenitor cell fates [Text] / E. Passegué, A. J. Wagers, S. Giuriato [et al.] // J. Exp. Med. – 2005. – Vol. 202, N 11. – P. 1599–1611.

195. González-Villalva, A. E. Signaling pathways involved in megakaryopoiesis [Text] / A. E. González-Villalva, C. I. Falcón-Rodríguez, T. I. Fortoul-van der Goes // *Gaceta Médica de México*. – 2010. – Vol. 146, N 2. – P. 136–143.
196. Gr-1+CD115+ immature myeloid suppressor cells mediate the development of tumor-induced T regulatory cells and T-cell anergy in tumor-bearing host [Text] / B. Huang, P-Y. Pan, Q. Li [et al.] // *Cancer Research*. – 2006. – Vol. 66, N 2. – P.1123–1131.
197. Guo, X. J. New fronts emerge in the influenza cytokine storm [Text] / X. J. Guo, P. G. Thomas // *Semin. Immunopathol.* – 2017. – Vol. 39, N 5. – P. 541–550.
198. Harvey, L. J. Biomarkers of copper status: a brief update [Text] / L. J. Harvey, H. J. McArdle // *Br. J. Nutr.* – 2008. – Vol. 99, N 3. – P. 10–13.
199. Health risk assessment of heavy metal exposure to street dust in the zinc smelting district, northeast of China [Text] / N. Zheng, J. Liu, Q. Wang, Z. Liang // *Sci. Total Environ.* – 2010. – Vol. 408, N 4. – P. 726–733.
200. Heavy Metals Toxicity and the Environment Paul B Tchounwou [Text] / P. B. Tchounwou, C. G. Yedjou, A. K. Patlolla, D. J. Sutton // *EXS*. – 2012. – N 101. – P. 133–164.
201. Hexavalent chromium induces renal apoptosis and autophagy by disrupting the balance of mitochondrial dynamics in rats [Text] / Xiaoyan Zheng, Siyu Lee, Chiayi Lee [et al.] // *Ecotoxicol Environ Saf.* – 2020. – Vol. 204. – P. 204.
202. Hossam, Ebaid. Neutrophil depletion in the early inflammatory phase delayed cutaneous wound healing in older rats: improvements due to the use of un-denatured camel whey protein [Text] / Ebaid Hossam // *Diagn. Pathol.* – 2014. – N 9. – P. 46.
203. Huang, Y. Inflammatory bowel disease related innate immunity and adaptive immunity [Text] / Y. Huang, Z. Chen // *Am. J. Transl. Res.* – 2016. – Vol. 8, N 6. – P. 2490-2497.
204. Human Colon Tumors Express a Dominant-Negative Form of SIGIRR That Promotes Inflammation and Colitis-Associated Colon Cancer in Mice [Text] / J. Zhao, K. Bulek, M.F. Gulen [et al.] // *Gastroenterology*. – 2015. – Vol. 149, N 7. – P. 1860–1871.
205. Human macrophages differentially produce specific resolvin or leukotriene signals that depend on bacterial pathogenicity [Text] / O. Werz, J. Gerstmeier, S. Libreros [et al.] // *Nat. Commun.* – 2018. – Vol. 9, N 1. – P. 59.



206. IL1 receptor antagonist inhibits pancreatic cancer growth by abrogating NF-kappaB activation [Text] / Z. Zhuang, H. Q. Ju, M. Aguilar [et al.] // Clin. Cancer Res. – 2016. – Vol. 22, N 6. – P. 1432–1444.
207. IL-1beta suppresses innate IL-25 and IL-33 production and maintains helminth chronicity [Text] / M. M. Zaiss, K. M. Maslowski, I. Mosconi [et al.] // PLoS Pathog. – 2013. – Vol. 9, N 8. – E. 1003531.
208. IL-6 regulates neutrophil trafficking during acute inflammation via STAT3 [Text] / C. A. Fielding, R. M. McLoughlin, L. McLeod [et al.] // Colmont. J. Immunol. – 2008. – Vol. 181, N 3. – P. 2189-2195.
209. Immune cell production of Interleukin 17 induces stem cell features of pancreatic intraepithelial neoplasia cells [Text] / Y. Zhang, M. Zoltan, E. Riquelme [et al.] // Gastroenterology. – 2018. – Vol. 155, N 1. – P. 210–223.
210. Immune stimulatory receptor CD40 is required for T-cell suppression and T regulatory cell activation mediated by myeloid-derived suppressor cells in cancer [Text] / P.-Y. Pan, G. Ma, K. J. Weber [et al.] // Cancer. Res. – 2010. – Vol. 70, N 1. – P. 99–108.
211. Immunophenotyping of patients with oral squamous cell carcinoma in peripheral blood and associated tumor tissue [Text] / M. Grimm, O. Feyen, H. Hofmann [et al.] // Tumour Biol. – 2016. – Vol. 37, N 3. – P. 3807-3816.
212. Immunosuppressive activity of CD14+ HLA-DR- cells in squamous cell carcinoma of the head and neck [Text] / K. Chikamatsu, K. Sakakura, M. Toyoda [et al.] // Cancer Science. – 2012. – Vol. 103, N 6. – P. 976–983.
213. Immunosuppressive and Anti-Inflammatory Effects of Nicotine Administered by Patch in an Animal Model [Text] / Roma Kalra, Shashi P. Singh, J. C. Pena-Philippides [et al.] // Clin. Diagn. Lab. Immunol. – 2004. – Vol. 11, N 3. – P. 563–568.
214. Immunosurveillance by hematopoietic progenitor cells trafficking through blood, lymph, and peripheral tissues [Text] / S. Massberg, P. Schaerli, I. Knezevic-Maramica [et al.] // Cell. – 2007. – Vol. 131, N 5. – P. 994–1008.
215. In utero exposure to hexavalent chromium disrupts rat fetal testis development [Text] / W. Zheng, F. Ge, K. Wu [et al.] // Toxicol. Lett. – 2018. – Vol. 299. – P. 201–209.
216. Inflammation–Nature's Way to Efficiently Respond to All Types of Challenges: Implications for Understanding and Managing “the Epidemic” of Chronic Diseases

- [Text] / J. M. Bennett, G. Reeves, G. E. Billman, J. P. Sturmborg // *Front. Med. (Lausanne)*. – 2018. – N 5. – P. 316.
217. Inflammatory responses and inflammation-associated diseases in organs [Text] / Linlin Chen, Huidan Deng, Hengmin Cui, Jing Fang // *Oncotarget*. – 2018. – Vol. 9, N 6. – P. 7204–7218.
218. Influence of vanadium supplementation on oxidative stress factors in the muscle of STZ-diabetic rats [Text] / O. Kurt, T. Y. Ozden, N. Ozsoy [et al.] // *Biometals*. – 2011. – N 24. – P. 943–949.
219. Interleukin 33: an innate alarm for adaptive responses beyond Th2 immunity-emerging roles in obesity, intestinal inflammation, and cancer [Text] / C. Schwartz, K. O'Grady, E. Lavelle [et al.] // *Eur. J. Immunol.* – 2016. – Vol. 46, – N. 5. – P. 1091–1100.
220. Intracellular interleukin-1 receptor 2 binding prevents cleavage and activity of interleukin-1alpha, controlling necrosis-induced sterile inflammation [Text] / Y. Zheng, M. Humphry, J. J. Maguire [et al.] // *Immunity*. – 2013. – Vol. 38, N 2. – P. 285–295.
221. Is vanadate reduced by thiols under biological conditions? Changing the redox potential of V(V)/V(IV) by complexation in aqueous solution [Text] / D. C. Crans, B. Zhang, E. Gaidamauskas [et al.] // *Inorg. Chem.* – 2010. – Vol. 49, N 9. – P. 4245–4256.
222. Isolation of a novel coronavirus from a man with pneumonia in Saudi Arabia [Text] / A.M. Zaki, S. van Boheemen, T. M. Bestebroer [et al.] // *J. Med.* – 2012. – Vol. 367, N 19. – P. 1814–1820.
223. Khaled, Y. S. Myeloid-derived suppressor cells in cancer: recent progress and prospects [Text] / Y. S. Khaled, B. J. Ammori, E. Elkord // *Immunol. Cell. Biol.* – 2013. – Vol. 91, N 8. – P. 493–502.
224. Kobayashi, Tetsuro. Choreographing immunity in the skin epithelial barrier [Text] / Tetsuro Kobayashi, Shruti Naik, Keisuke Nagao // *Immunity*. – 2019. – Vol. 50, N 3. – P. 552–565.
225. Kopf, M. The development and function of lung-resident macrophages and dendritic cells [Text] / M. Kopf, C. Schneider, S. P Nobs // *Nat. Immunol.* – 2015. – Vol. 16, N 1. – P. 36–44.

226. Kumar, K. P. Partners in crime: neutrophils and monocytes/macrophages in inflammation and disease [Text] / P. K. Kumar, A. J. Nicholls, C. H. Y. Wong // *Cell. Tissue Res.* – 2018. – Vol. 371, N 3. – P. 551–565.
227. Kystaubayeva, N. Complexes of 1-(2-ethoxyethyl-4-(dimethoxyphosphoryl)-4-hydroxypiperidine with ions of biogenic metals: synthesis and properties [Text] / N. Kystaubayeva, T. Zharkynbek, R. Rakhmatulina // *Хим. журн. Казахстана.* – 2018. – № 3. – С. 145–154.
228. Lafuente, A. Differential effects of cadmium on blood lymphocyte subsets [Text] / A. Lafuente, A. Gonzalez-Carracedo, A. I. Esquifino // *BioMetals.* – 2004. – Vol. 17, N 4. – P. 451–456.
229. Lead impairs the development of innate lymphoid cells by impeding the differentiation of their progenitors [Text] / T. Zhu, Y. Zhao, P. Zhang [et al.] // *Toxicol. Sci.* – 2020. – Vol. 176, N 2. – P. 410–422.
230. Mechanisms of vanadate-induced cellular toxicity: Role of cellular glutathione and NADPH [Text] / L. S. Capella, M. R. Gefé, E. F. Silva [et al.] // *Arch. Biochem. Biophys.* – 2002. – Vol. 406, N 1. – P. 65–72.
231. Membrane transport of vanadium compounds and the interaction with the erythrocyte membrane [Text] / X. Yang, K. Wang, J. Lu [et al.] // *Coord. Chem. Rev.* – 2003. – N 237. – P. 103–111.
232. Meng, F. G. Redox regulation of protein tyrosine phosphatase activity by hydroxyl radical [Text] / F.G. Meng, Z.Y. Zhang // *Biochim. Biophys. Acta.* – 2013. – Vol. 1834, N 1. – P. 464–469.
233. Mesenchymal stromal cells and immunomodulation: a gathering of regulatory immune cells [Text] / M. Najar, G. Raicevic, H. Fayyad-Kazan [et al.] // *Cytotherapy.* – 2016. – Vol. № 18, N 2. – P. 160–171.
234. Morphological characteristics of immune system organs of young cattle raised in the polluted radioactive territory. «Current problems of intensive development of animal husbandry» [Text] / M. I. Zhyla, Y. S. Stronskyj, M. I. Skil Zhyla [et al.] // *Collection of scientific papers.* – 2010. – Vol. 13. – P. 236–241.
235. MyD88-dependent expansion of an immature GR-1+CD11b+ population induces T cell suppression and Th2 polarization in sepsis [Text] / M. J. Delano, P. O. Scumpia, J. S.

- Weinstein [et al.] // *J. of Experimental Medicine*. – 2007. – Vol. 204, N 6. – P. 1463–1474.
236. Myeloid-derived suppressor cell heterogeneity and subset definition [Text] / E. Peranzoni, S. Zilio, I. Marigo [et al.] // *Curr. Opin Immunol.* – 2010. – Vol. 22, N 2. – P. 238-244.
237. Myeloid-derived Suppressor Cells: Paradoxical Roles in Infection and Immunity [Text] / Jun Dai, Mohamed El. Gazzar, Guang Y. Li [et al.] // *J. Innate Immun.* – 2015. – Vol. 7, N 2. – P. 116–126.
238. Neutrophil depletion delays wound repair in aged mice [Text] / N. Nishio, Y. Okawa, H. Sakurai [et al.] // *AGE*. – 2008. – N 30. – P. 11–19.
239. Neutrophils and granulocytic myeloid-derived suppressor cells: immunophenotyping, cell biology and clinical relevance in human oncology [Text] / C. A. Dumitru, K. Moses, S. Trellakis [et al.] // *Cancer. Immunol. Immunother.* – 2012. – Vol. 61, N 8. – P. 1155–1167.
240. Nitroaspirin corrects immune dysfunction in tumor-bearing hosts and promotes tumor eradication by cancer vaccination [Text] / C. De Santo, P. Serafini, Ilaria Marigo [et al.] // *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*. – 2005. – Vol. 102, N 11. – P. 4185–4190.
241. Ochando, J. C. Myeloid-derived suppressor cells in transplantation and cancer [Text] / J. C. Ochando, S. H. Chen // *Immunologic Research*. – 2012. – Vol. 54, N 1/3. – P. 275–285.
242. Oral administration of Cr (VI) induced oxidative stress, DNA damage and apoptotic cell death in mice [Text] / X. F. Wang, M. L. Xing, Y. Shen [et al.] // *Toxicology*. – 2006. – Vol. 228, N 1. – P. 16–23.
243. Ortega-Gómez, A. Resolution of inflammation: an integrated view [Text] / A. Ortega-Gómez, M. Perretti, O. Soehnlein // *EMBO Mol. Med.* – 2013. – Vol. 5, N 5. – P. 661–674.
244. Ostrand-Rosenberg, S. Myeloid-derived suppressor cells: linking inflammation and cancer [Text] / S. Ostrand-Rosenberg, P. Sinha // *Immunology*. – 2009. – Vol. 182, N 8. – P. 4499–4506.

245. Oxidative stress, DNA damage and antioxidant enzyme activity induced by hexavalent chromium in Sprague Dawley rats [Text] / A. Patlolla, C. Barnes, C. Yedjou [et al.] // *Environ. Toxicol.* – 2009. – Vol. 24, N 1. – P. 66–73.
246. Particulate hexavalent chromium is cytotoxic and genotoxic to the North Atlantic right whale (*Eubalaena glacialis*) lung and skin fibroblasts [Text] / T. L. Chen, S. S. Wise, S. Kraus [et al.] // *Environ. Mol. Mutagenesis.* – 2009. – Vol. 50, N 5. – P. 387–393.
247. Persistently activated Stat3 maintains constitutive NF-kappaB activity in tumors [Text] / H. Lee, A. Herrmann, Jie-Hui Deng [et al.] // *Cancer Cell.* – 2009. – Vol. 15, N 4. – P. 283–293.
248. Pituitary Adenylate Cyclase-Activating Polypeptide Reverses Ammonium Metavanadate-Induced Airway Hyperresponsiveness in Rats [Text] / M. Tlili, S. Rouatbi, B. Sriha [et al.] // *Oxid. Med. Cell. Longev.* – 2015. – N 22. – P. 257–269.
249. Plasticity of human Th17 cells and iTregs is orchestrated by different subsets of myeloid cells [Text] / B. Hoechst, J. Gamrekelashvili, M. P. Manns [et al.] // *Blood.* – 2011. – Vol. 117, N 24. – P. 6532–6541.
250. Potassium dichromate-induced cytotoxicity, genotoxicity and oxidative stress in human liver carcinoma (HepG2) cells [Text] / A. Patlolla, C. Barnes, J. Field, P. B. Tchounwou // *Int. J. Environ Res. Public Health.* – 2009. – Vol. 6, N 2. – P. 643–653.
251. Potential health risks of heavy metals in cultivated topsoil and grains, including correlations with human primary liver, lung and gastric cancer, in Anhui province, Eastern China [Text] / Q. Zhao, Y. Wang, Y. Cao [et al.] // *Sci. Tot. Environ.* – 2014. – Vol. 470/471. – P. 340–347.
252. Praliev, K. D. Kazkaine a new original local anaesthetic and antiarrhythmic Agent [Text] / K. D. Praliev, V. K. Yu, S. A. Tarakov // *International. Conf. on Natural Products and physiological active substances (ICNPAS-98).* – Novosibirsk, 1998. – P. 39.
253. Prognostic role of the neutrophil-to-lymphocyte ratio in pancreatic cancer: A meta-analysis containing 8252 patients [Text] / Y. Zhou, Q. Wei, J. Fan [et al.] // *Clin. Chim. Acta.* – 2018. – Vol. 479. – P. 181–189.
254. Prostaglandin I2 suppresses proinflammatory chemokine expression, CD4 T cell activation, and STAT6-independent allergic lung inflammation [Text] / W. Zhou, J.

- Zhang, K. Goleniewska [et al.] // *J. Immunol. Baltim. Md.* – 2016. – Vol. 197, N 5. – P. 1577–1586.
255. Quantitative Assessment of Proliferative Effects of Oral Vanadium on Pancreatic Islet Volumes and Beta Cell Numbers of Diabetic Rats [Text] / L. Pirmoradi, Ali Noorafshan, A. Safaee, G. A. Dehghani // *Iran. Biomed. J.* – 2016. – Vol. 20, N 1. – P. 18–25.
256. Rani Ray, Rina. Adverse hematological effects of hexavalent chromium: an overview [Text] / Rina Rani Ray // *Interdiscip. Toxicol.* – 2016. – Vol. 9, N 2. – P. 55–65.
257. Rapid generation of a mouse model for middle east respiratory syndrome [Text] / J. Zhao, K. Li, C. Wohlford-lenane [et al.] // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – 2014. – Vol. 111, N 13. – P. 4970–4975.
258. Reactive Oxygen Species in Inflammation and Tissue Injury [Текст] / M. Manish, R. S. Mohammad, T. Khiem [et al.] // *Antioxid. Redox. Signal.* – 2014. – Vol. 20, N 7. – P. 1126–1167.
259. Reactive oxygen species production by blood neutrophils of patients with laryngeal carcinoma and antioxidative enzyme activity in their blood [Text] / A. Szuster-Ciesielska, E. Hryciuk-Umer, A. Stepulak [et al.] // *Acta Oncologica.* – 2004. – Vol. 43, N 3. – P. 252–258.
260. Recommendations for myeloid-derived suppressor cell nomenclature and characterization standards [Text] / V. Bronte, S. Brandau, Shu-Hsia Chen [et al.] // *Nat Commun.* – 2016. – N 7. – P. 121–150.
261. Reduced IL-6 levels among individuals in Hudson County, New Jersey, an area contaminated with chromium [Text] / C. A. Snyder, I. Udasin, S. J. Waterman [et al.] // *Arch. Environ Health.* – Vol. 51, N 1. – P. 26–28.
262. Reduced neutrophil chemotaxis and infiltration contributes to delayed resolution of cutaneous wound infection with advanced age [Text] / A. L. Brubaker, J. L. Rendon, L. Ramirez [et al.] // *Immunol.* – 2013. – Vol. 190, N 4. – P. 1746–1757.
263. Regulation of protein tyrosine phosphatases by reversible oxidation [Text] / A. Ostman, J. Frijhoff, A. Sandin, F.-D. Böhner // *J. Biochem.* – 2011. – Vol. 150, N 4. – P. 345–356.

264. Resolution of pulmonary inflammation induced by carbon nanotubes and fullerenes in mice: role of macrophage polarization [Text] / C. S. Lim, D. W. Porter, M. S. Orandle [et al.] // *Front. Immunol.* – 2020. – N 11. – P. 1186.
265. Review of Chromium (VI) Apoptosis, Cell Cycle Arrest, and Carcinogenesis [Text] / A. Chiu, J. Shi, W. K. P. Lee [et al.] // *Environ. Sci. Health. With Environ. Carcinog. Ecotoxicol.* – 2010. – Vol. 28, N 3. – P. 188–230.
266. Role of vanadium in cellular and molecular immunology: association with immune-related inflammation and pharmacotoxicology mechanisms [Text] / O. Tsave, S. Petanidis, E. Kioseoglou [et al.] // *Oxid. Med. Cell. Longev.* – 2016. – N 40. – P. 122–130.
267. Rosmarinic acid attenuates chromium-induced hepatic and renal oxidative damage and DNA damage in rats [Text] / Azem A. Khalaf, Eman I. Hassanen, Marwa A. Ibrahim [et al.] // *J. Biochem. Mol. Toxicol.* – 2020. – Vol. 34, N 11. – e22579.
268. Ruchala, P. The pathophysiology and pharmacology of hepcidin [Text] / P. Ruchala, E. Nemeth // *Trends Pharmacol. Sci.* – 2014. – Vol. 35, N 3. – P. 155–161.
269. Seidler, A. Systematic review and quantification of respiratory cancer risk for occupational exposure to hexavalent chromium [Text] / A. Seidler, S. Jähnichen, J. Hegewald // *Int. Arch. Occup. Environ. Health.* – 2013. – Vol. 86, N 8. – P. 943–955.
270. Shanker, A. K. Chromium interactions in plants: current status and future strategies [Text] / A. K. Shanker, M. Djanaguiraman, B. Venkateswarlu // *Metallomics.* – 2009. – Vol. 1, N 5. – P. 375–383.
271. Shelnutt, S. R. Dermatological toxicity of hexavalent chromium [Text] / S. R. Shelnutt, P. Goad, D. V. Belsito // *Crit. Rev. Toxicol.* – 2007. – Vol. 37, N 5. – P. 375–387.
272. Sonnenberg, G. F. Functional interactions between innate lymphoid cells and adaptive immunity [Text] / G. F. Sonnenberg, M. R. Hepworth // *Nat. Rev. Immunol.* – 2019. – Vol. 19, N 10. – P. 599–613.
273. Soveid, M. Long-term efficacy and safety of vanadium in the treatment of type 1 diabetes. [Text] / M. Soveid, G. A. Dehghani, G. R. Omrani // *Arch. Iran. Med.* – 2013. – Vol. 16, N 7. – P. 408–411.

274. Stern, B. R. Essentiality and toxicity in copper health risk assessment: overview, update and regulatory considerations [Text] / B. R. Stern // *Toxicol. Environ. Health A.* – 2010. – Vol. 73, N 2. – P. 114–127.
275. Straub, R. H. Chronic inflammatory systemic diseases: An evolutionary trade-off between acutely beneficial but chronically harmful programs [Text] / R. H. Straub, C. Schradin // *Evol. Med. Public Health.* – 2016. – N 1. – P. 37–51.
276. Subsets of myeloid-derived suppressor cells in tumor-bearing mice [Text] / J.-I. Youn, S. Nagaraj, M. Collazo, D. I. Gabrilovich // *Immunology.* – 2008. – Vol. 181, N 8. – P.5791–5802.
277. Systemic delivery of mesenchymal stem cells condition media in repeated doses acts as magic bullets in restoring IFN- $\gamma$ /IL-4 balance in asthmatic rats [Text] / R. Keyhanmanesh, R. Rahbarghazi, M. Reza Aslani [et al.] // *Life Sci.* – 2018. – N 212. – P. 30–36.
278. Talmadge, J. E. History of myeloid-derived suppressor cells [Text] / J. E. Talmadge, D. I. Gabrilovich // *Nat. Rev. Cancer.* – 2013. – Vol. 13, N 10. – P. 739–752.
279. The addition of an amylopectin/chromium complex to branched-chain amino acids enhances muscle protein synthesis in rat skeletal muscle [Text] / J. R. Komorowski, S. P. Ojalvo, Sarah Sylla [et al.] // *J. Int. Soc. Sports Nutr.* – 2020. – Vol. 17, N 1. – P. 26.
280. The protective effect of vanadium against diabetic cataracts in diabetic rat model [Text] / L. Sun, D. J. Shi, X. C. Gao [et al.] // *Biol. Trace Elem. Res.* – 2014. – Vol. 158. – P. 219–223.
281. The Role of Heavy Metals in Plant Response to Biotic Stress [Text] / I. Morkunas, A. Woźniak, Van Chung Mai [et al.] // *Molecules.* – 2018. – Vol. 23, N 9. – P. 2320.
282. The role of myeloid cells in the promotion of tumour angiogenesis [Text] / C. Murdoch, M. Muthana, S. B. Coffelt [et al.] // *Nat. Rev. Cancer.* – 2008. – Vol. 8, N 8. – P. 618–631.
283. Thymic cytoarchitecture changes in mice exposed to vanadium [Text] / M. Ustarroz-Cano, I. Garcia-Pelaez, S. Cervantes-Yepez [et al.] // *J. Immunotoxicol.* – 2017. – Vol. 14, N 1. – P. 9–14.



284. Toxicology of Heavy Metals to Subsurface Lithofacies and Drillers during Drilling of Hydrocarbon Wells [Text] / E. E. Okoro, A. G. Okolie, S. E. Sanni, O. Maxwell // *Sci. Rep.* – 2020. – Vol. 10, N 1. – P. 6152.
285. Tytła, Malwina. Assessment of Heavy Metal Pollution and Potential Ecological Risk in Sewage Sludge from Municipal Wastewater Treatment Plant Located in the Most Industrialized Region in Poland—Case Study [Электронный ресурс] / Malwina Tytła // *Int. J. Environ. Res. Public. Health.* – 2019. – Vol. 16, N 13. – P. 2430.
286. Vanadate-Induced Renal cAMP and Malondialdehyde Accumulation Suppresses Alpha 1 Sodium Potassium Adenosine Triphosphatase Protein Levels [Text] / S. Eiam-Ong, Y. Nakchui, M. Chaipipat, S. Eiam-Ong // *Toxicol. Res.* – 2018. – Vol. 34, N 2. – P. 143–150.
287. Vanadium in Biological Action: Chemical, Pharmacological Aspects, and Metabolic Implications in Diabetes Mellitus [Text] / S. Treviño, A. Díaz, E. Sánchez-Lara [et al.] // *Biol. Trace Elem. Res.* – 2019. – Vol. 188, N 1. – P. 68–98.
288. Vanadium in the detection, prevention and treatment of cancer: the in vivo evidence [Text] / A. Bishayee, A. Waghray, M. A. Patel [et al.] // *Cancer Lett.* – 2010. – Vol. 294, N 1. – P. 1–12.
289. Vanadium: Risks and possible benefits in the light of a comprehensive overview of its pharmacotoxicological mechanisms and multi-applications with a summary of further research trends [Электронный ресурс] / A. Ścibior, Ł. Pietrzyk, Z. Plewa, A. Skiba // *J. Trace Elem. Med. Biol.* – 2020. – N 61. – Режим доступа: URL: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7152879/>. – Загл. с экрана.
290. Velma, V. Ecotoxicology of hexavalent chromium in freshwater fish: a critical review [Text] / V. Velma, S. S. Vutukuru, P. B. Tchounwou // *Rev. Environ Health.* – 2009. – Vol. 24, N 2. – P. 129–145.
291. Vignali, D. A. How regulatory T cells work [Text] / D. A. Vignali, L. W. Collison, C. J. Workman // *Nature Reviews Immunology.* – 2008. – Vol. 8, N 7. – P. 523–532.
292. Wang, S. Molecular mechanisms of metal toxicity and carcinogenesis [Text] / S. Wang, X. Shi // *Mol. Cell. Biochem.* – 2001. – Vol. 222, N 1/2. – P. 3–9.
293. Whitsett, J. A. Respiratory epithelial cells orchestrate pulmonary innate immunity [Text] / J. A. Whitsett, T. Alenghat // *Nat. Immunol.* – 2015. – Vol. 16, N 1. – P. 27–35.

294. Xinglong, Q. Immunological Approaches Towards Cancer and Inflammation: A Cross Talk [Электронный ресурс] / Q. Xinglong, T. Ying, H. Shucheng // *Front Immunol.* – 2018. – Режим доступа: URL: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5890100/>. – Загл. с экрана.
295. Yedjou, G. C. N-acetyl-cysteine affords protection against lead-induced cytotoxicity and oxidative stress in human liver carcinoma (HepG2) cells [Text] / G. C. Yedjou, P. B. Tchounwou // *Int. J. Environ Res. Public Health.* – 2008. – Vol. 4, N 2. – P. 132–137.
296. Zhou, L. Plasticity of CD4+ T cell lineage differentiation [Text] / L. Zhou, M. M. Chong, D. R. Littman // *Immunity.* – 2009. – Vol. 30, N 5. – P. 646–655.
297. Zhu, H. Oxidative stress and redox signaling mechanisms of inflammatory bowel disease: updated experimental and clinical evidence [Text] / H. Zhu, Y. R. Li // *Experimental. Biology and Medicine.* – 2012. – Vol. 237, N 5. – P. 474–480.
298. Zhu, J. Differentiation of effector CD4 T cell populations [Text] / J. Zhu, H. Yamane, W. E. Paul // *Annu. Rev. Immunol.* – 2010. – N 28. – P. 445–489.
299. Zitvogel, L. Nutrition, inflammation and cancer [Text] / L. Zitvogel, F. Pietrocola, G. Kroemer // *Nat. Immunol.* – 2017. – N 18. – P. 843–850.
300. Zlobet, J. M. Acute toxicity of vanadium compounds in rats and mice [Text] / J. M. Zlobet, J. L. Domingo // *Toxicol. Lett.* – 1984. – Vol. 23, N 2. – P. 227–231.
301. Zwolak, I. Protective Effects of Dietary Antioxidants against Vanadium-Induced Toxicity: A Review [Электронный ресурс] / I. Zwolak // *Oxid. Med. Cell. Longev.* – 2020. – Режим доступа: URL: <https://doi.org/10.1155/2020/1490316>. – Загл. с экрана.



(19) **МИНИСТЕРСТВО ЮСТИЦИИ РЕСПУБЛИКИ КАЗАХСТАН**

## ПАТЕНТ

(11) **№ 3006**

(12) **НА ПОЛЕЗНУЮ МОДЕЛЬ**

(54) **НАЗВАНИЕ:** Способ прогнозирования хронизации воспалительного процесса в условиях интоксикации солями кадмия и хрома

(73) **ПАТЕНТООБЛАДАТЕЛЬ:** Республиканское государственное предприятие на праве хозяйственного ведения "Казакский национальный медицинский университет им. С.Д. Асфендиярова" Министерства здравоохранения Республики Казахстан (KZ)

(72) **АВТОР (АВТОРЫ):** Балабаскова Марина Казыбаевна (KZ); Нурмухамбетов Адильман (KZ); Рыспекова Наталия Николаевна (KZ); Мырзагулова Сырсулу Ермуканбетовна (KZ); Жукешева Майя Капатовна (KZ); Токушева Алия Нурлановна (KZ); Трубочев Василий Владимирович (KZ); Беляев Николай Николаевич (RU)

(21) Заявка № 2017/0608.2

(22) Дата подачи заявки: 21.09.2017

Зарегистрирован в Государственном реестре полезных моделей Республики Казахстан 09.07.2018.

Действие патента распространяется на всю территорию Республики Казахстан при условии своевременной оплаты поддержания патента в силе.

Вне-министр юстиции  
Республики Казахстан

Н. Пан

Сведения о внесении изменений приводятся на отдельном листе в виде приложения к настоящему патенту

Керим Берке  
руководитель секретариата  
ФС РФ № 18.585



МИНИСТЕРСТВО ЮСТИЦИИ РЕСПУБЛИКИ КАЗАХСТАН

## ПАТЕНТ

(11)

№ 3007

(12)

**НА ПОЛЕЗНУЮ МОДЕЛЬ**

(54) **НАЗВАНИЕ**: Способ оценки иммунноупрессивной роли His48+/CD11b/c+ в условиях антропогенной нагрузки

(73) **ПАТЕНТОБЛАДАТЕЛЬ**: Республиканское государственное предприятие на праве хозяйственного ведения "Казахский национальный медицинский университет им. С.Д. Асфендиярова" Министерства здравоохранения Республики Казахстан (KZ)

(72) **АВТОР (АВТОРЫ)**: Балабекова Марина Казыбаевна (KZ); Нурмухамбетов Адильман (KZ); Рыспекова Наталья Николаевна (KZ); Мырзагулова Сырсулу Ермукавбетовна (KZ); Жукешева Майя Канатовна (KZ); Тоқушева Алия Нурлаповна (KZ); Трубачев Василий Владимирович (KZ); Беляев Николай Николаевич (RU)

(21) Заявка № 2017/0609.2

(22) Дата подачи заявки: 21.09.2017

Зарегистрировано в Государственном реестре полезных моделей Республики Казахстан 09.07.2018.

Действие патента распространяется на всю территорию Республики Казахстан при условии своевременной оплаты поддержания патента в силе.

Вице-министр юстиции  
Республики Казахстан

Н. Пан

Сведения о внесении изменений приводятся на отдельном листе в виде приложения к настоящему патенту



«УТВЕРЖДАЮ»

Проректор по научной и  
лечебной работе

д.м.н., профессор А.А. Сопуев

« 21 » февраля 2019 г.

### Акт

#### **внедрения в учебный процесс Кыргызской государственной медицинской академии им. И.К. Ахунбаева результатов научного исследования**

**Наименование внедрения:** «Влияние металлндуцированного угнетения реактивности организма на течение экспериментального воспаления и пути его коррекции»

**Автор:** докторант кафедры патологической физиологии КГМА им. И.К. Ахунбаева, кандидат медицинских наук М.К. Балабекова

Мы, нижеподписавшиеся члены комиссии по внедрению достижений научных исследований в учебный процесс, в составе: председателя – к.м.н., доц. Раимова Б.Р. и членов к.м.н., доц. Оторбаева Ч.К., к.м.н., и.о. доц. Казиевой А.А. удостоверяем, что полученные результаты исследования М.К. Балабековой внедрены в учебный процесс кафедры патологической физиологии и используются при чтении лекций и занятий для студентов 2–3 курсов лечебного и педиатрического факультетов по теме: «Этиология и патогенез воспаления», что позволило раскрыть причинно-следственные связи нарушения регуляции воспаления, вызванные дефектами отдельных звеньев иммунитета в условиях интоксикации тяжелыми металлами.

**Председатель комиссии:**

к.м.н., доц.

Б.Р. Раимов

**Члены комиссии:**

к.м.н., доц.

Ч.К. Оторбаев

к.м.н., и.о. доц.

А.А. Казиева

«ЭМИЛИ»  
МЕДИЦИНА ОРТАЛЫҒЫ

Қазақстан Республикасы, 050040  
Алматы қ., Көктем-1 ы.а., 11 үйі  
8 (727) 376-42-95  
8 (727) 376-42-80  
e-mail: emili-centre@yandex.kz



МЕДИЦИНСКИЙ ЦЕНТР  
«ЭМИЛИ»

Республика Казахстан, 050040  
г. Алматы, мкр. Көктем-1, дом 11  
8 (727) 376-42-95  
8 (727) 376-42-80  
e-mail: emili-centre@yandex.kz



«УТВЕРЖДАЮ»  
заместитель директора  
по учебно-методической  
работе Медицинского центра  
«Эмили»  
А.Ю. Сиротина  
«29» апреля 2019 г.

### АКТ ВНЕДРЕНИЯ научных достижений в учебный процесс

1. **Наименование учреждения, где внедряется работа** Медицинский центр «Эмили»
2. **Наименование предложения** «Повреждающее действие факторов внешней среды»
3. **Использовано в учебном процессе:** для студентов 2 курса специальностей «Лечебное дело», «Сестринское дело» по дисциплине «Общая патология» по теме «Общая этиология и патогенез»
4. **Ответственный за внедрение** Балабекова М.К.
5. **Эффективность внедрения** Учебно-методическая. При изучении дисциплины «Общая патология» студент должен знать, что патогенез изучает механизм развития болезни, включающий изменения возникающие в организме на различном уровне, в результате действия болезнетворного фактора. Кроме того, в современном мире развития науки и техники возникла глобальная проблема загрязнения окружающей среды. Человек постоянно и в быту, и на производстве подвергается воздействию различных химических соединений. Точное знание этиологии и патогенеза различных заболеваний необходимо для развития профилактического направления в медицине.

**Заключение:** Внедрить в учебный процесс дисциплины «Общая патология» для специальностей «Лечебное дело», «Сестринское дело» предложение «Повреждающее действие факторов внешней среды» на занятие по теме «Общая этиология и патогенез».

Председатель комиссии:

Сиротина А.Ю.

Члены комиссии:

Пулькинова А.В.

Абдилдаева К.К.

Гурарова Ж.С.

