

НАО «Казахский национальный медицинский университет  
им. С.Д. Асфендиярова»

УДК 616-002+612.017:577.2

На правах рукописи

**ТОКУШЕВА АЛИЯ НУРЛАНОВНА**

**Молекулярно-биологические особенности течения асептического  
воспаления, ассоциированного с экологенной иммунодепрессией**

6D110100 – Медицина

Диссертация на соискание степени  
доктора философии (PhD)

Научный консультант  
доктор медицинских наук,  
М.К. Балабекова

Зарубежный научный консультант  
MD, PhD,  
профессор  
Сулев Кокс

Республика Казахстан  
Алматы, 2024

## СОДЕРЖАНИЕ

<b>ОБОЗНАЧЕНИЯ И СОКРАЩЕНИЯ</b> .....	4
<b>ВВЕДЕНИЕ</b> .....	9
<b>1 СОВРЕМЕННОЕ СОСТОЯНИЕ ПРОБЛЕМЫ ВЛИЯНИЯ АНТРОПОГЕННОГО ЗАГРЯЗНЕНИЯ ОКРУЖАЮЩЕЙ СРЕДЫ НА ИММУННУЮ СИСТЕМУ</b> .....	15
1.1 Биологические эффекты соединений тяжелых металлов.....	15
1.2 Современное представление о патогенезе асептического воспаления..	26
1.2.1 Гены, регуляторы воспаления.....	26
1.2.2 Воспаление как проявление врожденного иммунитета. Распознавание альтерации тканей.....	34
1.2.3 Основные цитокины, модулирующие воспалительный ответ при асептическом воспалении.....	35
1.2.4 Нейтрофилы как первая линия иммунной защиты.....	41
1.2.5 Эффекторные и регулирующие функции иммунной системы.....	42
<b>2 МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ</b> .....	53
2.1 Условия и характер экспериментов.....	53
2.2 Дизайн эксперимента.....	54
2.3 Лабораторные методы.....	55
2.3.1 Реагенты.....	55
2.3.2 Оборудование.....	56
2.3.3 Приготовление культуральной среды .....	57
2.3.4 Приготовление буферных растворов .....	57
2.3.5 Получение суспензии клеток из лимфоорганов и их подсчет .....	57
2.3.6 Вычисление клеточной численности лимфоорганов .....	58
2.3.7 Культивирование клеток.....	58
2.3.8 Получение сыворотки крови.....	58
2.3.9 Проточная цитофлуориметрия.....	58
2.3.10 Иммуноферментный анализ.....	59
2.3.11 Секвенирование на MiSeq (Illumina).....	59
2.4 Статистическая обработка результатов исследования.....	60
<b>3 РЕЗУЛЬТАТЫ СОБСТВЕННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ</b> .....	61
3.1 Контроль качества (FastQC) запусков номер 1-5.....	61
3.1.2 Анализ дифференциальной экспрессии генов в лимфоорганах экспериментальных крыс.....	69
3.1.3 Анализ генных комплексов с использованием базы данных MSigDB на основе анализа генного обогащения (GSEA) .....	72
3.2 Изучение гематологических показателей у крыс с асептическим воспалением после предварительного воздействия метаванадата аммония и бихромата калия.....	79
3.3 Оценка цитокинового профиля у крыс с асептическим воспалением после предварительного воздействия метаванадата аммония и бихромата калия.....	85

3.4 Изучение клеточной численности, селезеночных субпопуляций крыс в динамике течения асептического воспаления после предварительного воздействия метаванадата аммония и бихромата калия.....	88
3.5 Математический анализ массива данных с применением статистических методов факторного и дискриминантного анализа.....	97
3.5.1 Факторный анализ массива данных, исследованных показателей крови.....	97
3.5.2 Математическое моделирование массива данных с применением статистических методов дискриминантного анализа.....	101
3.6 Изучение гематологических показателей у крыс с асептическим воспалением в условиях коррекции МХФ18 и ПО.....	104
3.7 Изучение клеточной численности, селезеночных субпопуляций крыс в динамике течения асептического воспаления и коррекции МХФ18 и ПО.....	107
3.8 Изучение гематологических показателей у крыс с асептическим воспалением после предварительного воздействия метаванадата аммония и бихромата калия в условиях коррекции МХФ18 и ПО .....	112
3.9 Изучение клеточной численности, селезеночных субпопуляций у крыс с асептическим воспалением после предварительного воздействия метаванадата аммония и бихромата калия в условиях коррекции МХФ18 и ПО.....	115
3.10 Математическое моделирование массива данных с применением статистических методов дискриминантного анализа.....	119
<b>ЗАКЛЮЧЕНИЕ.....</b>	<b>124</b>
<b>СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ.....</b>	<b>132</b>
<b>ПРИЛОЖЕНИЕ А – Патент.....</b>	<b>151</b>

## ОБОЗНАЧЕНИЯ И СОКРАЩЕНИЯ

A2A	– аденозиновый рецептор
ADAM17	– дезинтегрин и металлопротеиназа 17
АКТ	– протеинкиназа В
AP-1	– белок-активатор 1
Araf-1	– фактор активации апоптотической протеазы 1
APC	– антигенпрезентирующая клетка
АРОВЕС	– фермент редактирования мРНК аполипопротеина В, каталитический полипептидоподобный
APRIL	– лиганд, индуцирующий пролиферацию
AREs	– антиоксидант-чувствительный элемент
ASK1	– киназа 1, регулирующая сигнал апоптоза
BAFF/BLyS	– фактор активации В-клеток
BCR	– В-клеточный рецептор антигена
BIR	– бакаловирусные ингибиторные повторы
BPI	– белок, увеличивающий проницаемость
c-myc	– протоонкоген, кодирующий белок c-Myc
C- $\gamma$ 1	– константный регион иммуноглобулина G1
CARD	– домен для рекрутинга каспаз
CCL	– хемокин
CCR	– СС хемокиновый рецептор
CD	– кластер дифференцировки
CdCl <sub>2</sub>	– хлорид кадмия
CLDN	– клаудин
CLU	– кластерин
Cr	– хром
Cr <sup>3+</sup>	– трехвалентный хром
Cr <sup>6+</sup>	– шестивалентный хром
CSF2	– колониестимулирующий фактор 2
CTLA-4	– цитотоксический Т-лимфоцитарный антиген-4
CXCL	– хемокин СХС
CXCR3	– С-Х-С хемокиновый рецептор типа 3
Cyp1a1	– цитохром P450 Семейство 1 Подсемейство А Член 1
Cys	– цистеин
DAMPs	– молекулярные паттерны, связанные с повреждением
DAXX	– белок, ассоциированный с доменом смерти
DC	– дендритные клетки
ERK	– киназа, регулируемая внеклеточным сигналом
eT регуляторные клетки	– эффекторные Т-регуляторные клетки
Foxp3	– транскрипционный фактор развития и функционирования регуляторных Т-клеток
GH/IGF-I-deficient	– соматотропин/инсулиноподобный фактор роста-I
GITR	– глюкокортикоид-индуцированный туморальный

	некрот-фактор-рецептор
GLUT-1	– односторонний белок переносчик глюкозы
GM-CSF	– гранулоцитарно-макрофагальный колониестимулирующий фактор
gp130	– гликопротеин 130
Gpx2	– глутатионпероксидаза 2
GRE	– глюкокортикоид чувствительный элемент
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	– гидроперекись водорода
HCT	– гематокрит
HGB	– гемоглобин
HIF-1	– гипоксия индуцибельный фактор
HMGB1	– амфотерин
HMHC-IIA	– антигены главного комплекса гистосовместимости человека класса II
Hmox1	– гемоксигеназа 1
HSF-1	– фактор транскрипции теплового шока 1
HSP	– белки теплового шока
ICAM	– молекула межклеточной адгезии
IFN $\gamma$	– интерферон гамма
IFNGR1/2	– рецептор гамма-интерферона 1/2
Ig	– иммуноглобулин
IgA	– иммуноглобулин А
IgE	– иммуноглобулин Е
IgG	– иммуноглобулин G
IgG2a	– иммуноглобулин G2a
IgM	– иммуноглобулин М
IGF	– инсулиноподобный фактор роста
IL-1 $\beta$	– интерлейкин 1-бета
IL-1RAcP	– дополнительный белок рецептора интерлейкина-1
IL-10	– интерлейкин-10
IL-18R $\beta$	– бета-рецептор интерлейкина-18
IL-4	– интерлейкин-4
IL-6	– интерлейкин-6
IL-6R	– рецептор интерлейкина-6
IL-12	– интерлейкин -12
IL-35	– интерлейкин -35
iT регуляторных клеток	– индуцированные T-регуляторные клетки
JAK	– Янус киназа
LAG-3	– ген активации лимфоцитов 3
LAP	– латентно-ассоциированный белок
LRR	– повторы богатые лейцином
LTBP	– латентный трансформирующий бета-связывающий белок фактора роста
MAPK	– митоген активированная протеин киназа

MCH-	– среднее содержание гемоглобина в эритроците
MCV	– средний объем эритроцита
MDSC	– миелоидные супрессорные клетки
MHC	– главный комплекс гистосовместимости
MICA	– белок А, родственной цепи главного комплекса гистосовместимости класса I
MICB	– белок В, родственной цепи главного комплекса гистосовместимости класса I
MMP	– матриксная металлопротеиназа 1
MRE	– металл-чувствительный элемент
Mt1	– металлотионеин 1
Mt2	– металлотионеин 2
MTF-1	– металл-чувствительный фактор транскрипции
NACHT	– нуклеотид-связывающий домен и домен олигомеризации, богатые лейцином повторы и белки, содержащие домен CARD
NAIP	– белок, ингибирующий апоптоз нейронов
NaVO3	– метаванадат натрия
NBD	– нуклеотид-связывающий домен
NF-κB	– ядерный фактор «каппа-би»
NK	– натуральные киллеры
NLR	– нуклеотид-связывающий домен и белки, содержащие богатые лейцином повторы
NLRP3	– криопирин
NMDA	– ионотропные рецепторы глутамата, селективно связывающих N-метил-D-аспартат
NOD	– домен олигомеризации, связывающий нуклеотиды
Nos2	– синтаза оксида азота 2
NRG2D	– лиганд белка 2 нектиноподобного рецептора
nT регуляторные клетки	– натуральные T-регуляторные клетки
PAMPs	– патоген-ассоциированные паттерны
Pb	– свинец
pH	– водородный показатель
PNA	– растительный гемагглютинин
PhosphateBufferSaline	– фосфатно-солевой буферный раствор
PBS	– фосфатно-солевой буферный раствор
PD-1	– рецептор программируемой клеточной гибели 1
PD-L1	– лиганд рецептора программируемой клеточной гибели 1
PI3K	– фосфоинозитид-3-киназа
PGE2	– простагландин E2
PLT	– общее число тромбоцитов
PPARγ	– Гамма-рецептор, активируемый пролифератором пероксисом
PYD	– пириновый домен

Ras	– семейство белков, известных как малые GTPазы
RBC	– общее число эритроцитов
RDW-CV	– ширина распределения эритроцитов по объему
sIL-6R	– растворимый рецептор интерлейкина-6
SMADs	– матери против декапентаплегических гомологов
SP3	– транскрипционный фактор
Stag2	– стромальный антиген 2
STAT	– активаторы транскрипции
Syk	– селезеночная тирозинкиназа
TCR	– Т-клеточный рецептор
Tetherin	– костномозговой стромальный антиген 2
TGF- $\beta$	– трансформирующий ростовой фактор бета
Th	– подтип Т-хелпера
TLR	– Толл-подобные рецепторы
T-regs	– Т-регуляторные клетки
TRIM5alpha	– белок 5 альфа, содержащий трехчастный мотив
TSP-1	– тромбоспондин-1
TNF	– фактор некроза опухоли
TNF $\alpha$	– фактор некроза опухоли альфа
ULBPs	– UL16-связывающие белки
V	– ванадий
V5+	– ортованадат
VO2+	– ванадиловый катион
Zn	– цинк
WBC	– общее число лейкоцитов
AB	– асептическое воспаление
АПК	– антиген-представляющие клетки
АФК	– активные формы кислорода
АДФ	– аденозиндифосфат
АМФ	– аденозинмонофосфат
АТФ	– аденозинтрифосфат
БК	– бихромат калия
ВА	– ванадат аммония
ВМК	– внутренняя меланома сетчатки
ВОЗ	– Всемирная организации здравоохранения
ДИ	– доверительный интервал
ДНК	– дезоксирибонуклеиновая кислота
КазНМУ	– Казахский Национальный медицинский университет
кДа	– килодальтон
ЛПС	– липополисахарид
ЛПНП	– липопротеины низкой плотности
ЛФ	– лимфоциты
ЛЭК	– локальная этическая комиссия
M2	– макрофаги типа 2
МАИР	– Международное агентство по изучению рака

мкМ	– микрометр
Мн	– моноциты
мРНК	– матричная рибонуклеиновая кислота
МСНС	– средняя концентрация гемоглобина в эритроците
МТ	– металлотионеин
МХФ18	– биологически активное соединение
НАДФН	– никотинамидадениндинуклеотидафосфат
НИИ ФимП	– научно-исследовательский институт фундаментальной и прикладной медицины
НФ	– нейтрофилы
ИЛ-1	– интерлейкин-1
ИЛ-1 $\alpha$	– интерлейкин-1 альфа
ИЛ-1 $\beta$	– интерлейкин-1 бета
ИЛ-2	– интерлейкин-2
ИЛ-6	– интерлейкин-6
ИЛ-10	– интерлейкин-10
ИЛ-11	– интерлейкин-11
ИЛ-12	– интерлейкин-12
ИЛ-18	– интерлейкин-18
ИЛ-27	– интерлейкин-27
ИЛ-31	– интерлейкин-31
ОАО	– открытое акционерное общество
ПО	– полиоксидоний
ПГЕ2	– простогландин E2
ПЦР	– полимеразная цепная реакция
РК	– Республика Казахстан
РНК	– рибонуклеиновая кислота
РФ	– Российская Федерация
СЖК	– свободные жирные кислоты
СО	– среднее значение
СОД	– супероксиддисмутаза
США	– Соединенные Штаты Америки
ТФ	– трансфер-фактор
УФ-излучение	– ультрафиолетовое излучение
ФНО	– фактор некроза опухоли
ФНО- $\alpha$	– фактор некроза опухоли альфа
ЦОК2	– циклооксигеназы-2
Э	– эозинофилы
ЭДТА	– этилендиаминотетраацетат
ЭПО	– эритропоэтин



## ВВЕДЕНИЕ

**Актуальность.** Среди медико-биологических проблем изучению патогенетических основ воспаления придается особое значение. Это обусловлено развитием при воспалении дизрегуляторных сдвигов в многочисленных функциональных системах, причем, как в системах, выполняющих интегративную регулируемую роль (нервной, эндокринной, иммунной), так и на местном, клеточном уровне, что проявляется сложной совокупностью перестроек в «динамическом гомеостазе» организма, следствием которых может стать формирование патологических состояний, характеризующихся выраженным ограничением функциональных возможностей организма. Контроль и регуляция всего комплекса вышеупомянутых реакций осуществляется как за счет отдельных узкоспецифичных и относительно автономных механизмов, так и посредством системных регуляторных механизмов, способных оказывать влияние на целый ряд различных органов и систем организма. В условиях воздействия изменяющихся факторов среды обитания человека (Aalami A.H., Hoseinzadeh M., Hosseini Manesh P., Jiryai Sharahi A. et al., 2022; Balali-Mood M., Naseri K., Tahergorabi Z., Khazdair M.R. et al., 2021; Muhammad Imtiaz, Muhammad Shahid Rizwan, Shuanglian Xiong, et al., 2015) состояние иммунной системы организма служит адекватным показателем надежности адаптации, т.к. иммунологические механизмы тонко реагируют на неблагоприятные изменения в окружающей среде (Fortoul T.I., Rojas-Lemus M. et al., 2014).

Общепризнано, что физиологическая функция Т регуляторных клеток важна для сдерживания фатальных аутоиммунных и воспалительных реакций. Необходимо определить нераспознанные пути, регулирующие развитие и функционирование Т регуляторных клеток. Аналогичным образом, мы также должны помнить, что соответствующие исследования не могут рассматриваться независимо. Скорее, они взаимодействуют друг с другом.

С позиции определения механизмов иммунологической реактивности перспективным представляется изучение Т регуляторных клеток, роль которых до последнего времени связывали с дисфункцией иммунной системы. Общепризнано, что физиологически Т регуляторные клетки необходимы для сдерживания агрессивных аутоиммунных и воспалительных реакций, среди которых CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup> являются наиболее физиологически значимыми. Между тем, следует принять во внимание тот факт, что регуляторные клетки не действуют изолированно, а скорее имеют множество связей друг с другом, создавая сложные манипуляции с иммунной системой (Zhang Xu, Xue Jiang, Xueyu Dai and Bing, 2022; Hai Zhao, Xuelian Liao, Yan Kang, 2017). Однако, еще необходимо определить нераспознанные пути, регулирующие развитие и функционирование Т регуляторных клеток (Merghoub T., Wolchok J.D., 2017, Ali N., Zirak B., Rodriguez R.S. et al., 2017, Arpaia N., Green J.A. et al., 2015).

Известно, что прогрессирование иммунодепрессии часто сопровождается снижением количества и функциональной активности Т-лимфоцитов (Zhan Xu, Xue Jiang, Xueyu Dai and Bin Li, 2022; Bold T.D., 2011). Между тем, одним из

основных звеньев патогенеза воспаления является лимфоцитарный дисбаланс (Th2/Th1) (Zhu J., 2015; Wang L.Q., Lin Z.Z., Zhang H.X., et al., 2014, Sidler C., Wóycicki R., Ilnytskyi Y., et al., 2013, Stojić-Vukanić Z., Bufan B., Arsenović-Ranin N., et al., 2013). Причины Т-клеточной анергии при экологенной иммунодепрессии до настоящего времени остаются непонятными. Предполагается, что CD4+CD25+eT регуляторных клеток подавляют пролиферацию и активацию других субпопуляций Т-лимфоцитов. Считается, что это механизм опосредован через снижение продукции ИЛ-2 Т-клетками, который является следствием межклеточного взаимодействия Т регуляторных клеток с антиген-презентирующей клеткой (Трошина Е.А., Сенюшкина Е.С., 2019; Торгашина А.В., Соловьев С.К., 2018; Shevyrev Daniil, Tereshchenko Valeriy, 2019). Однако механизмы накопления Т регуляторных клеток при воспалительных состояниях, развившихся на фоне иммунодепрессии, не изучены и до настоящего времени такие сведения в литературе отсутствовали.

Наряду с изучением системных изменений в организме при воспалении (уровней цитокинов, лимфоцитов, макрофагов, поврежденных структур), необходимо уделять особое внимание тканеспецифичным особенностям экспрессии генов. В частности, изучение влияния экспрессии генов на функционирование отдельных звеньев иммунитета у лиц, проживающих в экологически неблагоприятных регионах, практически не изучено. Наиболее перспективным представляется подход, основанный на изучении транскриптома тканеспецифичных клеток. Изучение транскриптома позволит выявить гены, ответственные за различную степень активации иммунной системы (Ding Wan, Jin Feng, Peng Wang, et al., 2022, Lin Wang, Dominik Aschenbrenner, Zhiyang Zeng, et al., 2021; Ena Oreskovic, Emily C. Wheeler, Kristen E. Mengwasser, et al., 2022). Для установления причинно-следственных связей между экспрессией мРНК соответствующих генов и изменением активации отдельных звеньев иммунитета существенно изучение экспрессии генов на уровне функциональной активности всего генома, а не только отдельных групп генов. Раскрытие механизмов, определяющих эти особенности, станет прорывом в понимании патогенеза заболеваний, связанных с экологией, иммунопатологией и воспалением, позволит разработать принципиально новые подходы к персонифицированной диагностике, профилактике и лечению экологенных иммунопатологий.

Поэтому поиски в этом направлении не могут быть замкнуты пределами одной только иммунной системы т.к. в патогенезе иммунных расстройств с развитием вторичных иммунодефицитных состояний немаловажную роль играет дисбаланс экспрессии генов-регуляторов, ответственных за врожденный и адаптивный иммунитет, в связи с чем возникают трудности в коррекции выявленных нарушений и подборе правильной лекарственной терапии.

Все вышеизложенное дало нам основание изучить особенности течения асептического воспаления, усугубленного предварительной интоксикацией соединениями ванадия и хрома, а также применить вновь синтезированное соединение в качестве патогенетической коррекции выявленных нарушений.

**Цель настоящего исследования:** изучить молекулярно-клеточные механизмы формирования иммунного ответа при асептическом воспалении в условиях интоксикации организма солями хрома и ванадия для создания новых методов патогенетической коррекции выявленных нарушений.

**Задачи:**

1. Изучить влияние хрома и ванадия на дифференциальную экспрессию тканеспецифичных генов, ассоциированных с манифестацией воспаления.
2. Оценить динамику изменений основных иммунологических показателей в периферической крови и селезенке экспериментальных животных с асептическим воспалением.
3. Определить наиболее информативные иммунологические показатели, отражающие ключевые механизмы регуляции воспаления.
4. Провести экспериментальную оценку корригирующего воздействия МХФ18 на течение асептического воспаления у опытных крыс по результатам количественной оценки селезеночных субклеточных популяций.
5. На основе полученного массива данных методом дискриминантного анализа установить отличительные особенности течения воспаления в экспериментальных группах.
6. Дать патофизиологическую оценку закономерности регуляции воспаления, вызванного после двухнедельного воздействия хрома и ванадия.

**Научная новизна работы.**

Соли тяжелых металлов вызывают нарушение иммунологических механизмов регуляции воспалительного процесса. Впервые установлена систематическая разница в экспрессии генов (тимус, селезенка, костный мозг, брыжеечные лимфатические узлы и кровь) в исследованных группах.

У животных с асептическим воспалением, вызванным на фоне предварительной затравки ванадатом аммония и бихроматом калия, впервые выявлены 20 белоккодирующих генов ответственных за регуляцию иммунного ответа, в том числе экстраклеточных сигнальных белков (цитокинов), взаимодействующих с клетками иммунной системы, дифференцировку и пролиферацию клеточных компонентов иммунной системы, адаптивный иммунитет. Благодаря определению соотношения регулируемых и нерегулируемых генов, были установлены предпосылки для снижения регуляции воспалительного ответа, приводящего к депрессии иммунной системы за счет угнетения эффекторного и индуцирования регуляторного звеньев иммунитета.

Установлено, что под влиянием солей хрома и ванадия течение асептического воспаления усугублялось прогрессирующим снижением клеточной численности селезенки экспериментальных животных, угнетением активности IFN $\gamma$  и IL-4 на фоне снижения дифференцировки эффекторных Т-лимфоцитов, что свидетельствовало о развитии Т-клеточной анергии.

Впервые установлено нарушение регуляции асептического воспаления, вызванного на фоне предварительной затравки ванадием и хромом, за счет индуцирования дифференцировки селезеночных субклеточных популяций с фенотипами CD4+CD25+, CD4+CD25+FoxP3+, CD4+FoxP3+CTLA+.

Впервые установлено, что МХФ18 оказывает иммуномодулирующую эффективность на показатели неспецифической резистентности и иммунологической реактивности. Впервые установлено, что в селезенке опытных крыс с асептическим воспалением, вызванном на фоне предварительной затравки ванадатом аммония и бихроматом калия, МХФ18 препятствуют накоплению CD4+FoxP3+ и CD4+FoxP3+CTLA4+ и предупреждает внутриклеточное накопление FoxP3+ на всем протяжении эксперимента.

#### **Практическая и теоретическая значимость.**

Решение задачи эпигенетической регуляции развития патологических процессов в организме имеет высокую значимость как для фундаментальной науки, так и для практических приложений в будущем. Исследование сосредоточено на раскрытии ключевой проблемы геномики — изучении молекулярных механизмов эпигенетической регуляции тканеспецифической экспрессии генов в условиях воспаления, с акцентом на выявление воздействия тяжелых металлов на важные регуляторные элементы этих процессов.

Значимость этого диссертационного исследования определяется междисциплинарным подходом. Оригинальность предлагаемого подхода заключается в комплексном иммунофенотипировании супрессорных клеток, показателей адаптивного и врожденного звеньев иммунитета. Запланированные результаты соответствуют мировому уровню исследований и в дальнейшем могут быть использованы для создания алгоритмов, предсказывающих характер течения воспалительных заболеваний и новых терапевтических средств с учетом экологически неблагоприятных условий проживания населения.

Результаты исследования существенно дополняют представления о механизмах патогенеза воспалительных процессов данными об участии в них экспрессии генов. Полученные в ходе исследования новые знания позволят рекомендовать необходимый дифференцированный подход к противовоспалительной терапии с учётом фазы, стадии и степени выраженности процесса, в том числе с учетом активации отдельных генов — индукторов на ранних этапах развития воспаления, что представляет огромное социальное и экономическое значение.

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

1. Асептическое воспаление, вызванное в условиях интоксикации метаванадатом аммония и бихроматом калия, вызывает нарушение регуляции тканеспецифичных генов, что прогнозирует неблагоприятный исход воспалительного процесса.

2. Ванадий и хром осложняют течение экспериментального воспаления развитием анемии, дефицитом лейкоцитарного звена и цитокиновой регуляции, а также нарушением дифференцировки Т-и В-клеточного иммунитета.

3. Ключевые механизмы ванадий- и хроминдуцированной иммунодепрессии ассоциированы с нарушением клеточного и гуморального иммунитета.

4. МХФ18 обладает иммуномодулирующим влиянием и при применении избирательно влияют на иммунотоксические проявления соединений ванадия и

хрома, о чем свидетельствуют гематологические и иммунологические показатели крови и селезенки экспериментальных животных с асептическим воспалением.

5. Эффективность МХФ18 в разные сроки экспериментального исследования избирательно сопоставима с полиоксидонием.

**Личный вклад соискателя.** Диссертант непосредственно участвовала в разработке идеи исследования, определении цели и задач, а также в проектировании и проведении экспериментов научно-технического проекта МНиВО РК «Молекулярно-биологические особенности течения асептического воспаления, ассоциированного с экологенной иммундепрессией». Диссертант внесла существенный вклад в выбор методов исследования, сбор и анализ данных, а также интерпретацию результатов.

Диссертант активно участвовала во всех этапах исследования, включая подготовку образцов, забор биологического материала, анализ полученных данных и статистическую обработку. Также автор участвовала в постановке и проведении транскриптомного и биоинформатического анализов.

Диссертант принимала активное участие в выдвижении научной гипотезы, формулировании выводов, публикации результатов исследования в профильных научных журналах и на конференциях.

#### **Апробация результатов исследований.**

Основные положения диссертации доложены на заседаниях кафедры патофизиологии НАО «КазНМУ им. С.Д. Асфендиярова».

**Основные положения диссертационной работы доложены и обсуждены на:**

– международной научно-практической конференции «Актуальные научные исследования в современном мире» (Переяслав-Хмельницкий, 2016 – 26-27 октября 2016);

– 8th European Immunology Conference 2017 (Мадрид, 2017 – 29 июня – 1 июля);

– ISER «International Conference on Science, Health and Medicine» 2017 (Афины, 2017 – 7-8 ноября).

**Опубликованные работы по результатам диссертационного исследования:**

*Статья - в издании, индексируемом в информационных базах Scopus и PubMed:*

Oral administration of ammonium metavanadate and potassium dichromate distorts the inflammatory reaction induced by turpentine oil injection in male rats // Drug and Chem. Toxic. – 2019 (S. CiteScore 2021 - 5,4. процентиль-87, IF-2,597).

*4 статьи - в изданиях, рекомендованных Комитетом по контролю в сфере образования и науки РК:*

1. Современный взгляд на механизмы формирования экологенной иммундепрессии // Вестник КАЗНМУ. – 2017. – С. 375-380 (Индекс цитирования РИНЦ 2018 г. – 403).

2. Роль врожденного иммунитета в регуляции воспаления // Вестник КАЗНМУ. – 2017. – С. 375-380.

3. Влияние полиоксидония на активность В-клеток и Т-регуляторных клеток опытных крыс в динамике экспериментального воспаления // Фтизиопульмонология. – 2024. – С. 150-155.

4. Анализ дифференциальной экспрессии генов в лимфоорганах экспериментальных крыс // Фтизиопульмонология. – 2024. – С. 156-161.

*4 тезиса – в сборниках зарубежных международных конференций индексируемых в базе Scopus и PubMed:*

1. Salts of heavy metals cause phenotypic changes of immune competent cells participants and regulators of aseptic inflammation // Molecular biology of the cell. – 2017. – Vol. 28 (Scopus CiteScore 2022 – 6,3. Перцентиль-92, IF-3, 612).

2. Expansion of His48+CD11b/c+ myeloid cells in rats after vanadium and chromium salts administration.

3. Vanadium and chromium mediated impairments in the immunological reactivity of rats with aseptic inflammation // J Clin Cell Im. – 2017. – №3, Suppl. 7.

4. Изучение клеточности лимфоорганов крыс в эксперименте // Международная научно-практическая конференция «Актуальные научные исследования в современном мире» (Переяслав-Хмельницкий, 2016. – С. 26-30).

*1 патент на полезную модель:*

1. Пат. №3006. Способ прогнозирования хронизации воспалительного процесса в условиях интоксикации солями ванадия и хрома (09.07.2018), (Приложение А).

*4 статьи в международных журналах (Россия).*

1. Динамика течения воспаления, вызванного на фоне металлиндуцированной иммунодепрессии // Современные проблемы науки и образования. – 2015 (ISSN 2070-7428. ИФ РИНЦ = 1,006).

2. Реакция периферической крови крыс в ответ на воспаление, вызванное на фоне интоксикации соединениями ванадия и хрома (эксперимент) 2015; Современные проблемы науки и образования (ИФ РИНЦ = 1,006).

3. Экспериментальные исследования влияния соединений ванадия и хрома на поведенческие реакции крыс // Современные проблемы науки и образования. – 2016 (ИФ РИНЦ = 1,006).

4. Effects of immune modulators at metall induced immunosuppression // International Journal of Applied and Fundamental Research. – 2017.

*Сертификаты:*

1. Прошла семинар «Стратегия и идеология современных биомедицинских исследований ориентированных на генетическую эпидемиологию» / под руководством профессора Лившица Г. (Израиль, 2016 – 12-23 сентябрь, в объеме 66 часов)

2. Участвовала в семинаре по геномной биоинформатике / под руководством А. Предеуса (Санкт-Петербург, 2016 – 9-11 ноября).

**Структура и объем диссертации.** Работа состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов исследования, разделы собственных исследований, выводов, и практических рекомендаций. Библиографический список содержит 319 источников. Диссертация изложена на 150 страницах, содержит 30 таблиц, 46 рисунков, 1 приложение.

# **1 СОВРЕМЕННОЕ СОСТОЯНИЕ ПРОБЛЕМЫ ВЛИЯНИЯ АНТРОПОГЕННОГО ЗАГРЯЗНЕНИЯ ОКРУЖАЮЩЕЙ СРЕДЫ НА ИММУННУЮ СИСТЕМУ**

## **1.1 Биологические эффекты соединений тяжелых металлов**

В последние годы наблюдается рост экологических рисков для здоровья населения, связанных с загрязнением окружающей среды тяжелыми металлами. Это связано с увеличением промышленного производства и использования технологий, которые включают в себя тяжелые металлы. По данным Всемирной организации здравоохранения (ВОЗ), загрязнение окружающей среды тяжелыми металлами является одним из главных факторов риска для здоровья человека (доклад "Burden of Disease from Environmental Noise - Quantification of Healthy Life Years Lost in Europe; 2011).

Горнодобывающие предприятия и литейные заводы могут значительно влиять на окружающую среду своей деятельностью. Например, при горнодобывающих операциях происходит выброс в атмосферу пыли и газов, содержащих тяжелые металлы, а также загрязнение водных ресурсов при извлечении руды. Литейные заводы могут выбрасывать в атмосферу опасные вещества при переработке металлов, а также загрязнять почву и воду при утилизации отходов производства. Поэтому важно контролировать и уменьшать негативное воздействие этих предприятий на окружающую среду и здоровье населения [1-4].

Тяжелые металлы, такие как свинец, кадмий, медь, цинк, марганец, никель и ртуть, являются естественными элементами, которые находятся в земной коре. Большинство загрязнений окружающей среды тяжелыми металлами являются результатом антропогенной деятельности человека, такой как промышленность, транспорт, сельское хозяйство и добыча полезных ископаемых [5].

Человеческая деятельность может вызывать выбросы тяжелых металлов в атмосферу, выбросы в водные ресурсы, загрязнение почвы и поверхностных вод, а также создавать несанкционированные свалки отходов, содержащих тяжелые металлы. В результате этого происходит накопление тяжелых металлов в окружающей среде и пищевых цепях, что может нанести вред здоровью человека и других организмов. Коррозия металла может приводить к выделению токсичных металлических ионов, которые попадают в почву и воду. Атмосферные осадки также могут содержать токсичные металлы, например, из-за выбросов промышленных предприятий или автотранспорта. Эрозия почвы может способствовать перемещению металлов, которые затем могут попадать в водные ресурсы. Выщелачивание тяжелых металлов из почвы и грунтовых вод может быть вызвано различными факторами, включая естественные процессы, такие как кислотные дожди или изменение pH почвы, а также антропогенные воздействия, например, использование химических удобрений и пестицидов [6].

Природные явления, такие как выветривание и вулканические извержения, также могут содержать тяжелые металлы [1, р. 133-163; 2, р. 793-806; 3, р. 2012-2026; 4, р. 125-139; 5, р. 811-866].

Среди промышленных источников загрязнения окружающей среды наиболее значимыми являются производство нефтепродуктов, электростанции, которые работают на угле или нефти, а также производство химических веществ и материалов. Эти источники могут выделять в окружающую среду большие количества токсичных веществ, включая тяжелые металлы [7, 8].

В Казахстане происходит постоянное увеличение масштабов добычи полезных ископаемых, а также повышение интенсивности этой деятельности. При этом сохраняются проблемы, связанные с экономико-географическими условиями. Особенно актуальна эта проблема для крупных горнопромышленных регионов, где освоение месторождений и экологическая обстановка тесно связаны между собой. Расширение экономики в Казахстане также влечет за собой увеличение загрязнения окружающей среды от промышленных отходов. Ежедневно до 20 миллиардов тонн отходов выделяют токсичные вещества в атмосферу [9-15].

Горнодобывающая промышленность является основным поставщиком сырья для металлургического производства, а также необходима для большинства отраслей народного хозяйства. Металлы находят применение в различных сферах жизни, начиная от железа и заканчивая ванадием и хромом. Например, для производства чугуна и стали используются хром, ванадий и другие металлы.

Казахстан является одной из крупных нефтедобывающих стран в мире, занимающей площадь около 1700 тысяч квадратных километров перспективных нефтегазоносных районов, что составляет более 62% всей территории. Уровень добычи нефти с помощью 160 нефтегазовых месторождений республики давно превысил отметку в 100 миллионов тонн в год. Естественно ожидать, что уровень загрязнения воздуха будет напрямую зависеть от интенсивности их эксплуатации [16].

Казахстан является одним из мировых лидеров по богатству своих недр минеральными ресурсами и состоянию минерально-сырьевой базы. В частности, Казахстан занимает лидирующую позицию по запасам хрома, доля которых составляет 10% от мировых запасов. Кроме того, на Казахстан приходится 16% от общемирового экспорта хрома, что является важным показателем экономического потенциала страны.

Некоторые металлы, такие как кобальт, медь, хром, железо, магний, марганец, молибден, никель, селен и цинк, являются важными микроэлементами, необходимыми для поддержания здоровья человека и функционирования организма. Недостаточное количество этих элементов может привести к различным проблемам со здоровьем, таким как дефицитные заболевания и синдромы [17].

Поэтому важно убедиться, что организм получает достаточное количество этих питательных веществ. Однако не следует забывать о том, что избыточное поступление некоторых микроэлементов может также вызвать



проблемы со здоровьем. Поэтому необходимо следить за балансом и употреблять необходимое количество этих важных элементов. Они являются ключевыми компонентами многих ферментов и необходимы для проведения различных биохимических реакций, таких как окислительно-восстановительные процессы. Одним из примеров таких металлов является цинк (Zn), который важен для белковой структуры и функции, а также для регуляции гена и иммунной функции [18].

Не следует забывать о том, что избыточное поступление некоторых микроэлементов может также вызвать проблемы со здоровьем. Поэтому необходимо следить за балансом и употреблять необходимое количество этих важных элементов. Диапазон концентраций, при которых хром и медь могут оказывать полезные эффекты, очень узок и близок к токсическим концентрациям [19-21].

Наличие тяжелых металлов в окружающей среде может иметь негативное влияние на биологические системы живых организмов. Эти металлы могут воздействовать на различные клеточные органеллы и компоненты, такие как митохондрии, лизосомы, эндоплазматический ретикулум, ядро и ферменты, ответственные за различные функции в метаболизме и детоксикации [22].

Наличие тяжелых металлов может также привести к нарушению белковых и нуклеиновых кислот, что может вызвать повреждение ДНК и ацетилирование белков. Кроме того, некоторые тяжелые металлы могут вызывать процессы окисления и индуцировать свободные радикалы, что может привести к окислительному стрессу. Ионы металлов могут вступать во взаимодействие с различными компонентами клеток, включая белки и нуклеиновые кислоты, и вызывать у них конформационные изменения. В свою очередь, такие изменения могут привести к повреждению ДНК и изменению клеточного цикла, что в конечном итоге может привести к развитию онкологических заболеваний [23]. В некоторых исследованиях установлено, что токсичность и канцерогенность тяжелых металлов, таких как мышьяк [24-26], кадмий [27], хром [28, 29], свинец [30, 31], и ртуть [32, 33], связаны с процессами, связанными с активными формами кислорода (АФК). Эти металлы взаимодействуют с компонентами клетки и вызывают образование АФК, что приводит к повреждению ДНК и конформационным изменениям, которые могут спровоцировать мутации, рак или некроз. Из-за высокой степени их токсичности, данные пять элементов являются особыми среди приоритетных металлов, так как все они являются системными токсикантами, вызывающими полиорганное повреждение даже при более низких уровнях воздействия. Согласно данным Агентства по охране окружающей среды США (US EPA) и Международного агентства по изучению рака (МАИР), эти металлы классифицируются как "известные" или "вероятные канцерогены для человека".

Ванадий и хром являются микроэлементами, которые играют важную роль в ряде биологических процессов, таких как регуляция углеводного обмена, рост и развитие костей, участие в образовании гормонов [34-39].

Металлический ванадий и хром не встречаются в природе, так как они очень реактивны и склонны к образованию соединений с другими элементами.

Они встречаются в природе в виде различных соединений, таких как оксиды, сульфиды, карбиды и другие. Ванадий и хром могут присутствовать в почвах и грунтах в виде минералов, таких как ванадинит и хромит. Различные соединения ванадия и хрома могут иметь различные валентные состояния, что может влиять на их токсичность и способность воздействовать на организм человека и окружающую среду [40].

Ванадий и хром могут попадать в организм человека через пищевые продукты, такие как мясо, рыба, овощи, фрукты, зерновые и т.д., которые выращиваются на почвах, содержащих эти металлы. Также возможно загрязнение воды, например, из-за использования удобрений и пестицидов, содержащих ванадий и хром, или из-за промышленных выбросов в водные источники. При вдыхании воздуха, загрязненного ванадием и хромом, эти металлы могут попадать в легкие и вызывать различные заболевания дыхательной системы [41].

Промышленные выбросы являются одним из основных источников выброса хрома в атмосферу, вместе с выбросами, вызванными потреблением топлива и транспортом. Заводы по выплавке цветных металлов, в том числе сталелитейные заводы, являются крупными источниками выбросов тяжелых металлов, в том числе хрома. Кожевенные производства также являются крупными источниками загрязнения окружающей среды хромом, так как этот металл используется в процессе обработки кожи. Городские ливневые стоки и сточные воды целлюлозно-бумажных комбинатов также могут содержать хром, поскольку этот металл может проникать в окружающую среду в результате выбросов и сбросов от таких предприятий. Сбросы тепловых электростанций также могут содержать хром, поскольку этот металл может проникать в окружающую среду в результате сжигания угля и других источников топлива [37, p. 126830].

Хром (Cr) – это химический элемент с атомным номером 24 и символом Cr, который является переходным металлом. Он является седьмым самым распространенным элементом в земной коре и встречается в различных минералах, таких как хромит, каменноугольный шист и другие. Хром имеет множество промышленных применений, включая производство нержавеющей стали, автомобильных деталей, аэрокосмических материалов и красок [42].

Хром является одним из наиболее распространенных загрязнителей окружающей среды, который может попадать в атмосферу из-за промышленных выбросов и других источников загрязнения. Из всех форм хрома, шестивалентный Cr (Cr<sup>6+</sup>) считается наиболее токсичным и канцерогенным. Он может наносить вред окружающей среде и здоровью человека, вызывая раковые опухоли, астму, аллергии, экзему и другие заболевания [42, p. 387-406].

В последние годы загрязнение окружающей среды хромом стала главным предметом озабоченности, и были приняты меры для сокращения его использования и утилизации отходов. Исследования в области токсикологии хрома продолжаются, чтобы понимать его воздействие на здоровье и разработать стратегии для его управления и предотвращения вредных

последствий. Хром может существовать в нескольких степенях окисления, от -2 до +6, причем наиболее стабильными и распространенными формами являются трехвалентный хром ( $\text{Cr}^{3+}$ ) и шестивалентный хром ( $\text{Cr}^{6+}$ ). Они имеют различные химические свойства и могут оказывать различные биологические эффекты на организм человека в зависимости от их концентрации и способа воздействия [43]. Хром является химическим элементом, который в природе встречается в различных формах окисления, от хрома (II) до хрома (VI) [44]. Трехвалентная форма хрома [Cr (III)] считается наиболее распространенной в природе и обычно встречается в рудах, таких как феррохром. Шестивалентная форма хрома [Cr (VI)], с другой стороны, является более стабильной и образуется при обработке трехвалентного хрома в промышленных процессах. Например, шестивалентный хром считается чрезвычайно токсичным для человеческого организма, так как его высокая степень растворимости способствует активному транспорту через биологические мембраны [45].

Основными источниками загрязнения хромом являются промышленные предприятия, такие как предприятия по обработке металла, кожевенные и хромовые производства, сварочные и огнеупорные производства, а также химическая промышленность. Соединения хрома используются в промышленности для различных целей, например, для хромирования и антикоррозионной защиты металла [46].

Хром также широко используется в качестве катализатора в химической промышленности. По данным исследований, около 33 тонн хрома выделяется ежегодно в окружающую среду. Более чем 300000 работников ежегодно подвергаются воздействию хрома и хром-содержащих соединений на рабочем месте [47].

Степень токсичности хрома зависит от его окисления, причем шестивалентный [Cr (VI)] считается более токсичным, чем трехвалентный [Cr (III)] [47, p. 65-71]. Шестивалентный хром может вызывать раздражение кожи и слизистых, а также проникать через легкие в организм, нанося вред печени, почкам, костям и костному мозгу. Он также является канцерогеном и может вызывать рак легких, носа, горла и пищевода [48].

Соединения хрома в шестивалентной форме [Cr (VI)] являются наиболее токсичными и опасными для здоровья человека. Они могут вызывать различные заболевания, включая аллергии, астму, кожные заболевания, рак и повреждения внутренних органов, таких как печень, почки и легкие. Некоторые исследования также связывают воздействие хрома с повышенным риском развития диабета и сердечно-сосудистых заболеваний. Однако, при низких концентрациях и коротком воздействии хрома, токсичность может быть незначительной или отсутствовать. Низкотоксичная форма хрома - трехвалентный [Cr (III)] - является необходимым микроэлементом для живых организмов и не имеет выраженной токсичности. Он участвует в метаболизме углеводов, белков и жиров, а также в синтезе гормонов и ферментов. Кроме того, Cr III считается полезным в качестве добавки к пище, которая может помочь контролировать уровень сахара в крови у людей с диабетом. Однако, при высоких концентрациях даже трехвалентный хром может вызвать

токсическое действие на организм, например, вызвать кожные заболевания или оказывать негативное воздействие на печень, почки и другие органы [49].

Длительное воздействие хрома на организм человека может привести к различным неблагоприятным последствиям для здоровья. Некоторые из них, которые были установлены научными исследованиями, включают [50]:

1. Астма: хром может вызывать аллергические реакции и развитие астмы у людей, которые часто контактируют с ним.

2. Раздражение и повреждение глаз: при попадании в глаза, хром может вызывать раздражение и повреждения роговицы.

3. Перфорация барабанных перепонок: хром, попадая в ушную раковину, может вызывать раздражение и повреждение барабанных перепонок, что может привести к ее перфорации.

4. Раздражение дыхательных путей: вдыхание хрома может вызывать раздражение и повреждение дыхательных путей, что может привести к болезням легких.

5. Повреждение почек и печени: хром может оказывать токсическое воздействие на почки и печень, что может привести к их повреждению.

6. Застой и отек легких: при длительном воздействии хрома на легкие может происходить нарушение кровообращения, что приводит к застою и отеку легких.

7. Боль в верхней части живота: употребление пищи, содержащей хром, может вызвать боль в верхней части живота и другие желудочно-кишечные расстройства.

8. Рак дыхательных путей и кожи: хром является канцерогеном, что означает, что его длительное воздействие может привести к развитию рака дыхательных путей и кожи.

9. Раздражение, эрозия и изменение цвета зубов: хром может вызвать раздражение и повреждение зубов, что может привести к их эрозии и изменению цвета.

10. Контактный дерматит: у некоторых людей может развиваться контактный дерматит в результате обращения с жидкостями или твердыми веществами, содержащими хром.

11. Хромовая язва – это форма дерматита, которая развивается в результате длительного контакта кожи с хромом. Она проявляется в виде безболезненных поражений кожи, которые покрываются коркой и могут вызывать зуд и жжение.

Эти поражения могут быть очень трудно и долго лечиться и могут привести к инфекции и другим осложнениям. Хромовая язва обычно возникает у людей, которые работают с хромом или его соединениями, например, в производстве кожаных изделий, химической промышленности или при обработке металлов [50, p. 2763-2272].

Хром имеет низкую устойчивость в организме и восстанавливается внутриклеточно до более стабильных форм, таких как трехвалентный хром. Эритроциты, которые содержат гемоглобин, обладают высокой способностью связывать хром и удерживать его внутри клетки. Хром может поступать внутрь

эритроцита (рисунок 1) через сульфат-ионный канал. После этого он быстро восстанавливается до реакционноспособных форм Cr(V) и Cr(IV) и связывается с бета-цепью гемоглобина и другими лигандами, такими как белки и глутатион. Этот комплекс хром-гемоглобин стабилен и остается секвестрированным внутри клетки на протяжении всей жизни эритроцитов [43, p. 55-64].

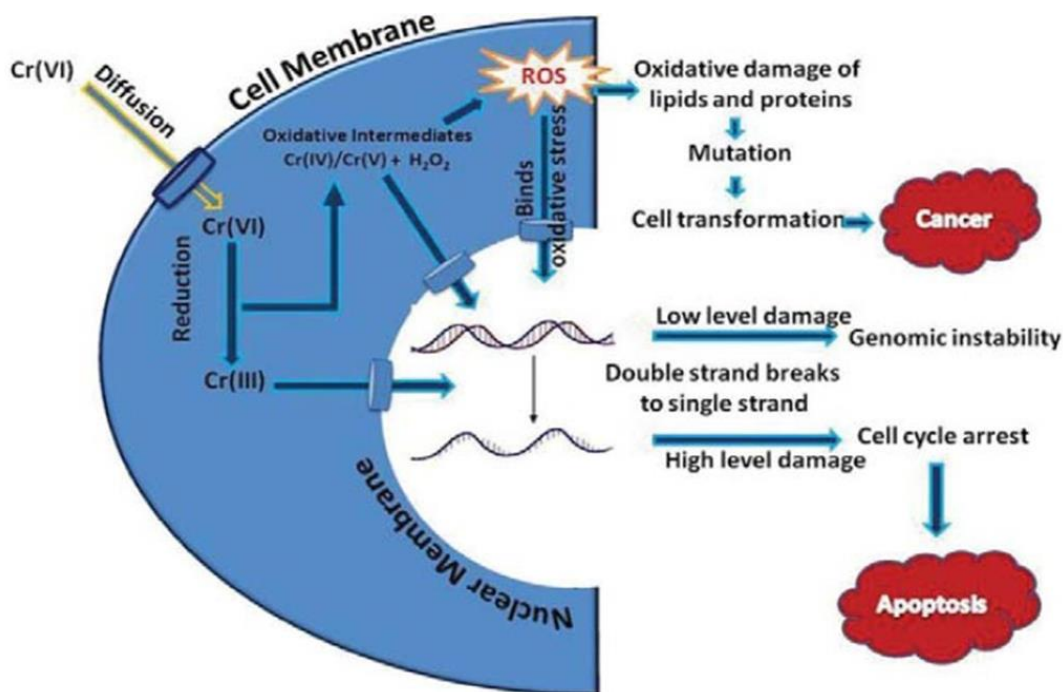


Рисунок 1 – Схематическое изображение клеточного поглощения шестивалентного хрома эритроцитами

Примечание – Составлено по источнику [43, p. 56]

Шестивалентный хром является известным канцерогеном для человека при вдыхании. По сведениям Thompson et al., 2011, поглощение хрома (VI) эпителием кишечника, окислительный стресс и воспаление, пролиферация клеток, прямая и/или непрямая модификация ДНК и мутагенез являются ключевыми факторами онкогенеза [51]. О повреждениях ДНК сообщалось во многих тестовых исследованиях воздействия шестивалентного хрома в условиях тестирования *in vitro* и *in vivo*. Эти повреждения включают прежде всего модификацию оснований и разрывы цепей ДНК [52].

Воздействие хрома, присутствующего в цементе, может вызывать различные кожные реакции, включая контактный дерматит. Это связано с тем, что шестивалентный хром [Cr (VI)] имеет высокую аллергенность и может вызывать чувствительность кожи [53]. При контакте с кожей Cr (VI) проходит через кожу и образует комплексы с белками кожи, что может приводить к иммунной реакции и развитию дерматита [53, p. 375-386]. Поэтому для защиты кожи от воздействия хрома рекомендуется использовать специальную защитную одежду и перчатки при работе с цементом и другими материалами, содержащими хром. Вдыхание большого количества хрома (VI) является опасным для здоровья человека и может вызвать раздражение слизистой носа и

горла, кашель, затруднение дыхания и даже бронхиальную астму. При длительном воздействии хрома (VI) на организм животных, могут возникнуть более серьезные проблемы, такие как язвы в желудке и кишечнике, анемия, нарушения репродуктивной системы, а также серьезные нарушения дыхательной, сердечно-сосудистой, пищеварительной, почечной и других систем организма. Дозы хрома (VI), необходимые для вызова таких эффектов, обычно являются экстремальными и могут встречаться только при профессиональном воздействии на протяжении длительного времени или в случаях инцидентов в промышленных объектах [54].

Шестивалентный хром известен своей миелосупрессивной активностью, то есть способностью снижать количество лейкоцитов в крови. Так, у взрослых мышей Swiss, получавших внутрибрюшинно шестивалентный хром, обнаружили лейкопению только через 2 недели. Подкожное введение шестивалентного хрома (50 мг/кг массы тела) самцам белых крыс Wistar приводило к лейкопении, лимфопении, моноцитозу и гранулоцитозу. Подкожное воздействие низкой дозы  $K_2Cr_2O_7$  у самок белых крыс линии Вистар вызывал практически аналогичные изменения лейкоцитарного профиля. Пероральное введение хрома (VI) через питьевую воду серьезно влияло на самцов крыс, вызывая лейкопению, лимфопению, моноцитоз и гранулоцитоз [51, p. 20-39].

Ванадий имеет широкий спектр применений в различных отраслях промышленности. Он используется в производстве стали и других металлов, а также в электрохимических процессах. Ванадийные соединения также находят применение в качестве катализаторов в различных химических реакциях, а также в производстве керамических материалов, стекла, катализаторов, магнетиков, батарей и других устройств хранения энергии, а также в производстве пигментов для красок и косметики [55].

Сегодняшний мир невозможно представить без использования различных материалов и технологий. Один из таких материалов - ванадий, обладающий рядом уникальных свойств. Благодаря своей твердости, упругости, способности образовывать сплавы и устойчивости к коррозии, ванадий находит широкое применение в производстве инструментов, машин и хирургических имплантатов. Этот металл используется в производстве фотопроявителей, аккумуляторов, полупроводников, а также в процессах переработки на основе катализаторов. Современные технологии также нашли применение в использовании ванадия в реактивных самолетах и космической технике. Его уникальные свойства позволяют использовать этот металл в производстве стекла с ультрафиолетовым фильтром, который защищает от радиационного поражения [56].

В целом, ванадий является неотъемлемой частью нашей жизни, и его применение продолжает расширяться вместе с развитием новых технологий и материалов.

Исследования показали, что соединения ванадия могут быть полезны при лечении сахарного диабета благодаря их способности улучшать утилизацию глюкозы и снижать уровень сахара в крови [57-63].

Ванадий может улучшать функцию бета-клеток, которые производят инсулин в организме. Однако, необходимы дополнительные исследования для определения дозы и продолжительности приема ванадия, а также для оценки долгосрочных эффектов его использования в лечении сахарного диабета. Интересно отметить, что соединения ванадия могут оказывать противораковое действие не только через прямое воздействие на опухолевые клетки, но и через улучшение функционирования иммунной системы. Существует множество механизмов, которые могут приводить к антираковому действию соединений ванадия, включая индукцию апоптоза, блокировку сигнальных путей роста опухоли, угнетение метастазирования и другие [66-68].

Перед использованием соединений ванадия в качестве лекарства для лечения рака, необходимо провести дополнительные исследования для определения их эффективности и безопасности. Тем не менее, исследования с использованием соединений ванадия для лечения опухолей все еще менее развиты, чем в лечении сахарного диабета [59, p. 943-948; 62, p. 219-222; 63, p. 408-410; 65, p. 1-11].

В биологических системах ванадий может присутствовать в различных окислительных состояниях. В физиологических условиях наиболее распространенной формой ванадия является ванадиловый катион ( $VO_2^+$ ), который обладает инсулиноподобными свойствами. В биологических системах могут присутствовать другие формы ванадия, такие как ванадат ( $V_5^+$ ) в форме ортованадата ( $H_2VO_4^-$ ), ванадий (III) в форме ионов  $V_3^+$  и т.д. [66, p. 849-901]. Ванадий в состоянии окисления +5 имеет более высокую аффинность к анионным каналам, которые присутствуют на клеточной мембране. Эти каналы предназначены для транспорта анионов внутрь клетки, и ванадий в состоянии окисления +5 может использовать их для проникновения внутрь клетки. В то же время, ванадий в состоянии окисления +4 не имеет специфических каналов для проникновения в клетку, поэтому он проникает пассивно через клеточную мембрану [67, p. 103-110]. Катионы ванадия в состоянии окисления +4 могут вызвать образование активных форм кислорода (АФК) в цитоплазме, что может привести к окислительному стрессу при высоких концентрациях [68, p. 65-71]. В результате реакции Фентона с  $H_2O_2$  образуются гидроксильные радикалы и ванадат-ионы, которые связываются с остатками белков, включая цистеин [69]. Этот процесс может иметь важное значение при одновременном воздействии соединений ванадия и веществ, вызывающих окислительный стресс [70]. Остатки цистеина могут играть важную роль в катализе многих ферментов. Они могут быть целевыми мишенями окислительного стресса и связываться с другими металлическими и не металлическими ионами, вызывая изменения в их функционировании и активности. Например, ванадат может связываться с остатками цистеина в тирозинфосфатазах и ингибировать их активность, вызывая изменения в сигнальных путях клетки [70, p. 464-468].

Действительно, ванадий может иметь двойственное действие на рост опухолевых клеток. Некоторые исследования показали, что при низких концентрациях ванадия (например, менее 1 мкМ) может наблюдаться стимуляция роста клеток и увеличение продукции простагландина E2 (ПГЕ2),

который может быть проканцерогенным. При более высоких концентрациях ванадия (например, 2-5 мкМ), он может ингибировать рост опухолевых клеток [71, 72].

Ванадий может способствовать генерации активных форм кислорода (АФК) в организме, что может приводить к различным заболеваниям. Активные формы кислорода являются свободными радикалами, которые могут повредить клетки и ткани организма, вызывая окислительный стресс. Данный процесс связан с развитием многих заболеваний, таких как нейродегенеративные заболевания (например, болезнь Альцгеймера и Паркинсона), сердечно-сосудистые заболевания, онкологические заболевания и другие [51, p. 20-39].

Роль ванадия в организме может быть как положительной, так и отрицательной, в зависимости от его концентрации и способности вызывать различные биологические эффекты.

Загрязнение окружающей среды ванадием может происходить из-за сжигания нефтепродуктов, включая мазут. Фактически, мазут и уголь содержат следующие концентрации ванадия: мазут содержит высокую концентрацию ванадия (от 0,2 до 1,60 мг/кг), уголь также может содержать значительное количество ванадия, в зависимости от его происхождения и геологической формации. Например, уголь из Западной Сибири содержит от 40 до 300 мг / кг ванадия, а уголь из Южной Африки содержит от 20 до 130 мг / кг. Кроме того, ванадий может быть высвобожден в окружающую среду из различных промышленных процессов, таких как производство стали, цемента, керамики и электролитического алюминия. Ванадий также может попадать в окружающую среду из грузовых и легковых автомобилей, так как он присутствует в некоторых топливах и катализаторах. Это может привести к загрязнению почвы, воды и воздуха, что может повлиять на здоровье человека и окружающую экосистему. Континентальная пыль и извержения вулканов могут содержать значительные концентрации ванадия. Морская соль также может содержать следы ванадия, хотя его концентрация обычно невысока. Кроме того, лесные пожары могут быть значительным источником ванадия, поскольку они могут вызывать высокую концентрацию твердых частиц в атмосфере [74, 75].

Литературные источники подтверждают, что ванадий может вызывать генерацию активных форм кислорода и приводить к нарушению сигнальных путей. Например, ванадий может активировать митоген-активированную протеин-киназу (МАРК) и фосфорилировать последующие ферменты, такие как ERK1/2. Кроме того, ванадий может вызывать повреждение генетического материала и различные токсические эффекты, такие как гематотоксические [76-78], иммунотоксические [79], гепатотоксические [80], нейротоксические [81-85] и гонадотоксические эффекты [86-88].

Повреждение ДНК может быть вызвано как внешними, так и внутренними факторами. Загрязнители окружающей среды, включая тяжелые металлы, радиоактивные вещества и химические вещества, могут вызывать повреждение ДНК путем индукции окислительного стресса и генерации свободных радикалов [89]. Свободные радикалы, такие как гидроксильные



радикалы, также могут быть образованы в организме в результате естественных метаболических процессов, что также может приводить к повреждению ДНК [90]. Окислительный стресс, вызванный свободными радикалами, может привести к повреждению ДНК, включая окисление азотистых оснований, разрывы одно- и двухнитевой цепи, а также образование адуктов (соединений между ДНК и другими молекулами) [91, 92]. При повреждении ДНК могут происходить различные виды изменений в структуре ДНК, включая абсциссию, аддуции, синглетные и двойные разрывы. Эти повреждения могут затруднить нормальную репликацию и транскрипцию ДНК, что может приводить к мутациям, генетической нестабильности и развитию рака [93].

Некоторые исследования, посвященные воздействию ванадия на генетический материал, являются противоречивыми и недостаточно изученными [94].

Существует скудная информация, имеющаяся в литературе, и потому нельзя сделать однозначный вывод о влиянии ванадия на генетический материал. Международное агентство по исследованию рака (МАИР) классифицирует ванадий в категории 2В, то есть как возможный канцероген человека, что говорит о необходимости продолжения исследований в данной области.

Одним из наиболее обсуждаемых вопросов является влияние ванадия на гематологические параметры организма.

Некоторые исследования свидетельствуют о том, что ванадий может вызывать гематотоксические эффекты, такие как развитие анемии, изменения содержания гемоглобина и гематокрита [95]. Мнение других исследователей противоречит этому, и они не обнаружили значимых изменений в гематологических показателях при воздействии ванадия [96, 97].

Эффекты ванадия на гематологические параметры организма остаются предметом дальнейших исследований и дискуссий, имеющиеся данные позволяют говорить о потенциальной опасности воздействия данного элемента на здоровье человека.

Из-за того, что ванадий присутствует в питьевой воде, ежедневном рационе и загрязненном воздухе, население в целом подвергается его воздействию [98]. Это становится особенно серьезной проблемой для здоровья людей, как работающих на производстве, так и не работающих. Исследования свидетельствуют о связи между высоким содержанием V-содержащих соединений в воздухе (как часть загрязнения воздуха) и увеличенным риском развития различных заболеваний, включая гипертонию, аритмию, системное воспаление, гиперкоагуляцию, рак и бронхиальную гиперреактивность [98, p. 1490316].

Были проведены токсикологические исследования, которые сообщают об иммунотоксичности, вызванной воздействием ванадия. В одном из исследований оценивалась связь между пренатальным и постнатальным воздействием ванадия и иммунной функцией детей. Анализировались субпопуляции Т-лимфоцитов и воспалительных цитокинов, а также измерялась концентрация ванадия. Результаты исследования показали, что содержание

ванадия в моче матери было обратно пропорционально проценту клеток CD3+CD4+ и абсолютному количеству клеток CD3+. У детей, которые подвергались воздействию ванадия, также было обнаружено снижение абсолютного количества клеток CD3+. Это говорит о том, что пренатальное и постнатальное воздействие ванадия оказывает подавляющее воздействие на клеточный иммунитет детей [99].

Другое исследование проводилось на однодневных птичьих бройлерах, которым давали рационы с различными количествами ванадия. Было установлено, что диетический ванадий в количестве, превышающем 30 частей на миллион, изменяет процент подмножеств Т-клеток селезенки и ингибирует пролиферацию Т-клеток селезенки, а также снижает содержание ИЛ-2 и ИЛ-6 в сыворотке [100, 101]. Было отмечено, что диетический ванадий в дозе, превышающей 30 мг/кг, снижает процент субпопуляций Т-клеток миндалин слепой кишки и содержание ИЛ-2, что приводит к нарушению функции миндалин слепой кишки и снижению локальной иммунной функции слизистой оболочки кишечника у бройлеров [102].

Проведенные исследования являются важным шагом в понимании воздействия хрома и ванадия на иммунную функцию организма. Полученные результаты позволяют выявить новые маркеры токсичности данных металлов, а также помогают в понимании механизмов их взаимодействия с иммунной системой, что может быть полезно при разработке методов защиты от токсического воздействия хрома и ванадия на человека. Необходимы дальнейшие исследования для получения более точной и полной картины воздействия этих металлов на иммунную систему.

## **1.2 Современное представление о патогенезе асептического воспаления**

### **1.2.1 Гены, регуляторы воспаления**

Генная экспрессия – это процесс, в результате которого активируются гены для синтеза белков. Токсическое воздействие тяжелых металлов на генную экспрессию может привести к изменению количества и качества белков, которые синтезирует организм. Как отмечают G. Pizzino, A. Bitto, M. Interdonato с соавт., 2014 [103], кадмий, свинец и мышьяк могут значительно изменить экспрессионный профиль генов. Это может привести к различным нарушениям, таким как увеличение восприимчивости к заболеваниям, развитие аллергических реакций и даже к развитию онкологических заболеваний [104, 105].

Ученые также обнаружили, что тяжелые металлы могут влиять на гены, которые участвуют в процессе детоксикации. Это может привести к снижению эффективности процессов детоксикации, что в свою очередь может увеличить токсичность тяжелых металлов и привести к развитию различных заболеваний.

Некоторые исследования свидетельствуют об изменении экспрессии генов при воздействии тяжелых металлов, в то время как другие не находят подобных изменений. Например, Jérôme Breton, Catherine Daniel, Cécile Vignal с

соавт., 2016., в своем исследовании не обнаружили существенных изменений экспрессии мРНК ферментов Nos2 и Gpx2 в толстой кишке у мышей, подвергающихся воздействию свинца и кадмия. Транскрипция генов Mt1 и Mt2 была повышена в двенадцатиперстной и толстой кишке у животных, подвергавшихся воздействию металлами. Было отмечено последовательное повышение уровней мРНК Cyp1a1 во всех частях кишечника облученных животных, а ген Hmox1 явно индуцировался в дистальной подвздошной кишке. Ученые сделали вывод, что все эти гены могут способствовать увеличению уровней антиоксидантов и, таким образом, ограничить развитие колита. Несмотря на различные мнения ученых, они все сходятся в одном – экзогенные воздействия могут изменить функцию генома через эпигенетические механизмы, что может повлиять на следующее поколение клеток [106].

В условиях экологического кризиса, проблема повышения устойчивости организма к патогенным факторам становится актуальной. Исследование состояния иммунной системы является важным, так как ее функционирование является необходимым для поддержания генетического постоянства организма. Нарушение работы иммунной системы может привести к возникновению патологических состояний как инфекционной, так и неинфекционной природы [107].

Оценка состояния иммунной системы может быть выполнена с помощью изучения воспаления. Состояние иммунной системы существенно влияет на течение и исход воспалительного процесса. Регуляция воспалительного процесса имеет огромное значение, так как ее нарушение может привести к хронизации процесса, переходу воспаления в гиперергическую или гипоергическую форму и снижению защитного потенциала организма. Изучение причин, механизмов и последствий дисрегуляции процессов регуляции воспаления представляет большой интерес для науки.

Изучение микроРНК (мРНК) для понимания механизмов регуляции генов является относительно новым направлением исследований. Сейчас ученые активно исследуют возможность измерения уровня мРНК в образцах сыворотки и клетках. МикроРНК представляют собой класс некодирующих молекул РНК, которые влияют на экспрессию 1/3 всех человеческих кодирующих белок генов. По сравнению с другими регуляторными механизмами гена, такими как эпигенетические и транскрипционные факторы, микроРНК оказывают сильное влияние на экспрессию генов, участвующих в различных клеточных процессах. Они также регулируют развитие, пролиферацию, апоптоз, кроветворение, ангиогенез, метаболизм, противовирусные и иммунные ответы. Исследования микроРНК получили широкое распространение при различных заболеваниях, таких как рак, неврологические, сердечно-сосудистые, метаболические, нейродегенеративные, инфекционные, хронические воспалительные и аутоиммунные заболевания [108].

Это позволяет исследователям получать детальную информацию о механизмах регуляции генов и их взаимодействии, а также определять изменения в экспрессии генов, которые связаны с различными биологическими процессами и патологиями.

Профилирование экспрессии генов широко используется в медицине и биологии для исследования механизмов развития заболеваний, поиска новых мишеней для лекарственных препаратов, определения диагностических и прогностических маркеров заболеваний и т.д. Одним из наиболее распространенных методов профилирования экспрессии генов является – секвенирование РНК (RNA-seq), при котором весь транскриптом исследуется с помощью секвенирования ДНК.

Профилирование экспрессии генов – это мощный инструмент для получения глобального представления о биологических процессах, происходящих в клетке, ткани или организме, и имеет огромный потенциал для диагностики и лечения заболеваний.

В нашем исследовании мы сфокусировались на изучении транскриптома тканеспецифичных клеток, так как это позволяет выявить гены, ответственные за активацию иммунной системы. Изучение экспрессии генов на уровне функциональной активности всего генома является необходимым для выявления причинно-следственных связей между изменением экспрессии генов и изменением активации иммунитета.

Прогрессивный характер воспаления связан с продукцией широкого спектра факторов, которые влияют на многие аспекты иммунитета. Изменения в экспрессии генов могут быть предсказательными признаками прогрессирования воспалительного процесса на разных этапах заболеваний [109].

Из-за разнообразия факторов, связанных с воспалительными заболеваниями, сравнение данных, полученных из разных источников, может быть сложным и недостаточно информативным. Методология и статистические данные, используемые при проведении экспериментов, также могут влиять на результаты исследований. Биологические характеристики воспалительных заболеваний могут существенно отличаться друг от друга, что затрудняет проведение точных и надежных сравнений. Важным фактором, влияющим на результаты исследований, является качество образцов, их выборка и количество входной РНК [110].

Поэтому для получения достоверных данных исследования необходимо проводить с помощью сопоставления групп с одинаковыми характеристиками и подходящей методологией. Для более полного понимания транскрипционной организации генов важно учитывать, что гены не работают в изоляции друг от друга, а взаимодействуют в сложной сети регуляции. Важно проводить анализ экспрессии генов в контексте функциональных путей и биологических сетей, чтобы понять, какие гены взаимодействуют между собой в ответ на изменения в окружающей среде. В связи с этим, важно использовать интегративные подходы, которые позволяют анализировать не только изменения в экспрессии генов, но и их взаимодействия, а также взаимодействия генов с метаболическими путями и белками. Для более точной оценки динамики экспрессии генов необходимо проводить эксперименты с использованием различных временных точек, чтобы получить полную картину изменений во

времени и понять, как гены регулируются в различных фазах биологического процесса.

Выбор стабильных эталонных генов в условиях нового эксперимента является важной задачей при количественной оценке динамической экспрессии генов в режиме реального времени. Для этого можно использовать подход, основанный на выборе генов на фоне генома и определении наиболее стабильных генов [111].

Обычно используемые кандидатные гены не подходят в качестве эталонных генов при анализе динамической экспрессии генов. Поэтому, для динамических исследований необходимо определить пул генов-кандидатов, среди которых будет выбран наиболее подходящий набор эталонных генов в экспериментальных условиях. Понимание динамического механизма транскрипционной организации генов в ответ на изменяющиеся условия окружающей среды также требует зависящих от времени данных, поэтому эксперименты с исследованием экспрессии генов в различные периоды времени полезны для выяснения динамического механизма, лежащего в основе биологического процесса.

Регуляция экспрессии генов – это сложный механизм, который включает в себя множество факторов, включая генетические, эпигенетические, метаболические и окружающую среду. Динамические изменения в экспрессии генов могут возникать в ответ на внешние факторы, такие как температура, свет, давление и наличие питательных веществ, а также внутренние факторы, такие как механизмы регуляции метаболизма и развития организма (рисунок 2) [112].

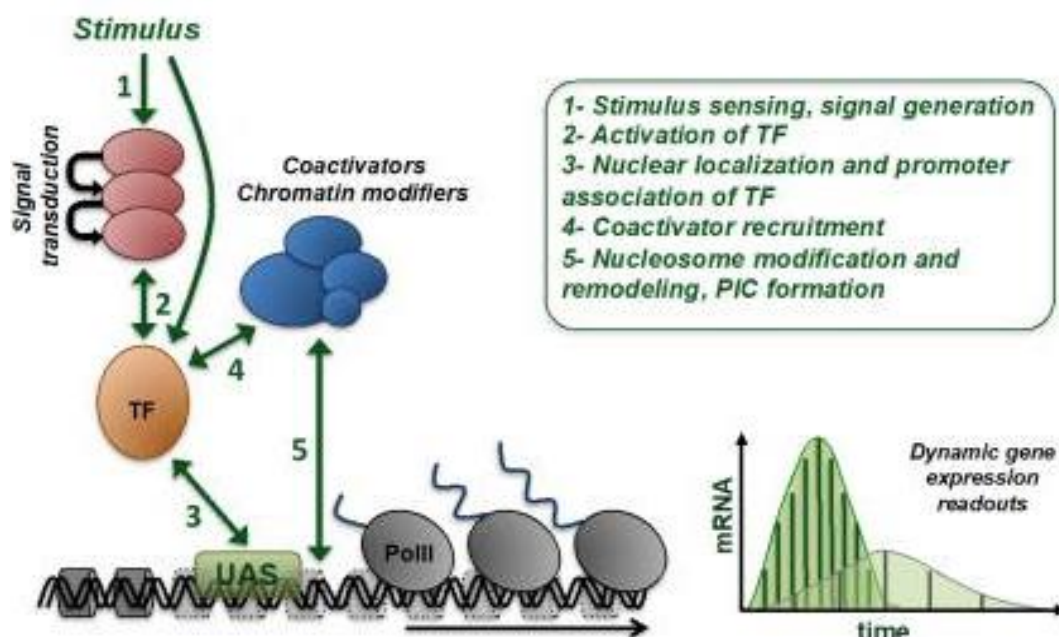
Регуляция экспрессии генов является ключевой особенностью всех живых организмов, которая позволяет им адаптироваться к изменяющимся условиям окружающей среды. Модуляция экспрессии генов происходит путем изменения белкового состава клетки, что может влиять на функции клетки, ткани и органа, а также на весь организм в целом [113-115].

Приспособление организма на внешние стимулы может приводить к изменению экспрессии многих генов одновременно в постоянно меняющейся окружающей среде. Длительность активации транскрипции может зависеть от силы стимула или стрессорного воздействия, а также от дозозависимой динамики ответов в случае непрерывно возрастающей стимуляции, как указывают недавние исследования [116, 117].

Динамические сигналы окружающей среды заставляют клетку регулировать свою жизнедеятельность путем изменения экспрессии генов, что является ключевой особенностью всех живых организмов [118].

ТФ способны выполнять различные функции, такие как удержание в ядре ДНК, ослабление ингибирующих факторов и привлечение модифицирующих хроматин коактиваторов. Эффективность ответа ТФ на стимуляцию будет влиять на динамику индукции генов, а результаты экспрессии генов зависят от конкретного ТФ, вовлеченного в ответ на стресс. Физиологические свойства клетки также играют важную роль в регуляции экспрессии генов, так как степень регуляции на момент компенсации зависит от состояния клетки.

Клетки сами участвуют в поддержании гомеостаза и возвращении в исходное состояние равновесия в активации экспрессии генов.



1 - восприятие стимулов, генерация сигналов; 2 – активация ТФ; 3 - ядерная локализация и промоторная ассоциация ТФ; 4 - рекрутирование коактиватора; 5 - Модификация и ремоделирование нуклеосом, формирование PIC (Pre-initiation complex)

Рисунок 2 – Детерминанты динамической регуляции транскрипции генов

Примечания:

1. Схематически показаны процессы, которые могут модулировать время и эффективность экспрессии активированного гена.
2. Данный стимул может вызывать различные паттерны экспрессии генов гено- и клеточно-специфическим образом
3. Составлено по источнику [112, p. 8278-2]

Один из основных аспектов выживания – это приспособление к постоянно меняющимся условиям окружающей среды. Важную роль играет защита от теплового стресса, которая имеет решающее значение в сохранении жизнеспособности клеток. Белки, которые являются ключевыми молекулами в клетке, особенно уязвимы к пагубному воздействию стресса из-за их нестабильной природы, что в свою очередь предопределяет структурную и функциональную динамику. В клеточной среде неправильное складывание белков может приводить к образованию агрегатов, что приводит к потере функциональности белка [119].

Для преодоления негативных последствий стресса на клеточном уровне происходит активация экспрессии стрессовых белков [120]. Одним из наиболее изученных классов таких белков являются белки теплового шока (HSP, heat shock proteins), экспрессия которых увеличивается при изменении температуры и других стрессирующих условиях, повышающих риск необратимых повреждений белков [121]. Название HSP связано с их молекулярной массой:

например, Hsp60, Hsp70 и Hsp90, наиболее изученные белки этого класса, имеют молекулярные массы 60, 70 и 90 кДа соответственно [122].

У эукариот, Hsp70 и Hsp90 являются наиболее известными членами этого семейства. Hsp70 обладает широким спектром субстратов, тогда как Hsp90 выполняет более специфические функции, действуя на более поздних этапах созревания белка и предоставляя дополнительный уровень регуляции. Белки Hsp90 играют важную роль в клеточной регуляции, являясь ключевыми факторами в сложных биологических путях [123].

Белки теплового шока (Hsp) могут играть важную роль в иммунной регуляции при различных воспалительных заболеваниях. Их наличие может вызывать иммунные ответы, направленные на снижение воспалительных процессов в организме. Например, Hsp70 может модулировать воспалительные реакции в различных моделях заболеваний, таких как артрит, колит и отторжение трансплантата. Исследования направлены на выявление механизмов, которые лежат в основе этого эффекта. Кроме того, было обнаружено, что микробный Hsp70 способен индуцировать толерантные дендритные клетки (DC) и способствовать супрессивному фенотипу в супрессорных клетках и моноцитах миелоидного происхождения. Эти DC могут в свою очередь индуцировать регуляторные T-клетки, независимо от того, какие антигены они представляют. Это подчеркивает важность роли Hsp в иммунной регуляции и открывает новые перспективы для исследования их потенциала в лечении воспалительных заболеваний [124, 125].

Hsp70 играет важную роль в адаптивном иммунитете против супрессии, осуществляемой T регуляторными клетками. Это связано, возможно, с тем, что Hsp70 презентует пептиды или модулирует врожденную среду, что ведет к активации T регуляторных клеток [126].

Несмотря на то, что детально не изучен фенотип Hsp-специфических T регуляторных клеток, некоторые из этих T-клеток, найденных в пуповинной крови, могут быть природными T регуляторными клетками CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup>, происходящими из тимуса [127]. Кроме того, Hsp-специфические T регуляторные клетки могут быть индуцированы на периферии, что может привести к возникновению нескольких индуцированных подмножеств T регуляторных клеток. Например, могут быть индуцированы клетки Foxp3-Tr1, которые реагируют на повторную стимуляцию антигеном в присутствии IL-10 [128].

Hsp-специфические T регуляторные клетки, скорее всего, применяют те же супрессивные механизмы, что и другие антиген-специфические T регуляторные клетки, такие как выработка противовоспалительных цитокинов, контактно-зависимое подавление или уничтожение эффекторных T-клеток, а также превращение APC в толерогенное состояние [129]. IL-10 является одним из наиболее часто используемых факторов подавления большинства подмножеств T регуляторных клеток [130].

Дополнительные исследования могут помочь более точно определить, какие конкретно подмножества T регуляторных клеток реагируют на Hsp70 и какие механизмы используют для супрессии иммунных ответов в различных

моделях заболеваний. В частности, следующие вопросы могут потребовать дальнейших исследований: Каковы относительные доли nT регуляторных клеток и iT регуляторных клеток среди Hsp70-специфических T регуляторных клеток? Какие механизмы супрессии используются Hsp70-специфическими T регуляторных клеток в различных контекстах заболеваний? Какова роль Hsp70-специфических T регуляторных клеток в различных типах воспалительных заболеваний? Ответы на эти вопросы могут помочь улучшить понимание механизмов регуляции иммунного ответа и разработать новые стратегии лечения воспалительных заболеваний, основанные на манипуляции с подмножествами T регуляторных клеток.

Stag2, или стромальный антиген 2, является когезином, или мультисубъединичным комплексом, который топологически связывает фрагменты ДНК [131] и играет важную роль в регуляции различных клеточных функций. Комплекс когезина необходим для стабильности репликационной вилки [132], репарации повреждений ДНК через гомологичную рекомбинацию [133] и для координированного сцепления сестринских хроматид в процессе хромосомной сегрегации [134].

Stag2 является опухолевым супрессором. Во многих исследованиях отмечается, что дефицит Stag2 улучшает прогноз при раке [135-137]. Это может объясняться тем, что потеря Stag2 приводит к изменениям в хромосомном наборе клеток, что может препятствовать развитию опухоли и ее прогрессированию. Степень влияния дефицита Stag2 на прогноз рака может различаться в зависимости от типа опухоли и других факторов [138].

Существует множество механизмов, через которые cohesin влияет на экспрессию генов, однако многие из них все еще остаются плохо изученными [135, p. 496-503]. Нарушение функции комплекса cohesin может привести к повышенной пролиферации и нарушению процессов дифференциации клеток, что в свою очередь способствует выживанию раковых клеток. Раковые клетки с нарушенной функцией cohesin могут приобретать способность ускользать от иммунной системы, что делает их еще более опасными. Раковые клетки могут приобретать способность уклоняться от иммунного ответа, что делает их уязвимыми для инфицирования и развития. Один из механизмов, связанных с этим, - подавление функции и инфильтрации T-клеток, что препятствует распознаванию и уничтожению клеток-мишеней. Кроме того, раковые клетки могут подавлять презентацию антигена, рекрутировать иммуносупрессивные клетки и выделять цитокины, которые способствуют уклонению от иммунного контроля [137, p. e2120540119].

Обнаружение инфицированных вирусом и раковых клеток осуществляется CD8+ T-клетками через взаимодействие между T-клеточным рецептором и антигенами, представленными на молекулах МНС. Однако, взаимодействие рецептора PD-1 с родственным лигандом PD-L1 на клетках-мишенях может привести к активации ингибирующих рецепторов, что снижает активность CD8+ T-клеток и предотвращает чрезмерную иммунную реакцию. Тормозные рецепторы, известные как молекулы контрольных точек, играют



важную роль в поддержании толерантности к себе и предотвращении повреждения тканей [137, p. e2120540119].

CLU – это уникальный гликопротеин, который, как предполагается, играет роль в многих физиологических процессах, включая транспорт липидов, регуляцию функции комплемента и запрограммированную гибель клеток [139]. Он также регулирует некоторые потенциальные пути, связанные с рециркуляцией мембран. Предыдущие исследования показали, что Clu активируется транскрипционным фактором HSF-1 [140, 141]. Кроме того, индукция экспрессии sCLU происходит через активацию NF-κB, что предполагает возможную петлю прямой связи между sCLU и NF-κB. Активация NF-κB также связана с онкогенезом, контролируя клеточную пролиферацию, миграцию, прогрессирование клеточного цикла и апоптоз [140, p. 119-129].

Syk (Spleen Tyrosine Kinase) – это тирозинкиназа, которая играет важную роль в развитии, выживании и активации В-лимфоцитов. Сигналы, исходящие от В-клеточного антигенного рецептора (BCR), контролируют эти процессы. BCR обеспечивает тоническую сигнализацию, которая является автономной и обеспечивает долгосрочное выживание В-клеток в иммунной системе. При связывании антигена с BCR, тонический сигнал усиливается и диверсифицируется, что приводит к изменению экспрессии генов и активации В-клеток [142].

Syk тесно взаимодействует с сигнальными субъединицами BCR и играет центральную роль в усилении и диверсификации сигналов BCR. Она действует не только как киназа, которая фосфорилирует нижележащие субстраты, но также и как адаптер, который может связываться с разнообразным набором сигнальных белков Syk является ключевым компонентом каскада сигнализации BCR и участвует в регуляции различных биологических функций, таких как адгезия, миграция, пролиферация и выживание клеток [143, 144].

SP3 – это транскрипционный фактор, который может участвовать в передаче сигналов интерлейкина и активации тромбоцитов для гемостаза [145]. Семейство транскрипционных факторов SP может играть роль в регуляции экспрессии генов гипоксии в гиппокампе через механизм, связанный с окислительным стрессом во время гипоксии [146]. SP3 участвует в молекулярном механизме регуляции индуцируемого гипоксией фактора 1α [147]. После воспалительных стимулов SP3 и NF-κB взаимодействуют для регуляции экспрессии воспалительного гена [148]. SP3 также участвует в индуцированном ЛПС клеточном воспалении [149]. У пациентов, у которых снижена экспрессия SP3, наблюдается увеличение передачи сигналов интерлейкинами, гемостаза, передачи сигналов активации тромбоцитов и их агрегации, а также путей митотической прометафазы. Эти пути могут указывать на то, что сниженная регуляция SP3 участвует в передаче сигналов интерлейкина, активации тромбоцитов и гемостазе. Поэтому подавление SP3 может влиять на прогрессирование и регрессию ВМК, а также на уровень воспаления, что в конечном итоге может повлиять на прогноз и качество жизни пациентов [145, p. 886329].

## 1.2.2 Воспаление как проявление врожденного иммунитета. Распознавание альтерации тканей

В течение последних нескольких десятилетий, воспалительные процессы стали рассматриваться как проявление реакций врожденного иммунитета, включающих этапы распознавания патогенов и поврежденных тканей, выделения цитокинов, фагоцитоза лейкоцитами, уничтожения инфекционного или неинфекционного агента, а также заживления [150-154].

Современные представления о воспалении связаны с реакциями врожденного иммунитета, которые включают распознавание и удаление инфекционных агентов, а также реагирование на повреждение тканей или внедрение неинфекционных веществ. При асептическом воспалении первым этапом является распознавание продуктов повреждения тканей или инородных частиц. К таким продуктам относятся молекулы, такие как мочевая кислота, АТФ, ДНК, модифицированные липиды, амилоид, белки теплового шока и другие, которые высвобождаются при повреждении клеток. Такие молекулы называются DAMPs (damage-associated molecular patterns) или опасными молекулами (danger-associated molecular patterns), так как они связаны с повреждением тканей или опасными ситуациями для жизни клеток [155, 156]. DAMPs имеют несколько функций включая передачу сигналов об опасности другим клеткам и запуск воспалительного ответа и активацию врожденного иммунитета. Они также участвуют в межклеточных взаимодействиях, запускают адаптивный иммунитет и помогают в формировании клеток памяти. Они могут участвовать в репарации тканей и заживлении ран. В целом, DAMPs играют важную роль в обеспечении эффективной защиты организма от вредных воздействий и восстановлении поврежденных тканей [157].

Классификация DAMPs (молекул, высвобождающихся при повреждении клеток и играющих роль в воспалительных и иммунных процессах):

1. HMGB1, HSPs, окисленные ЛПНП – распознаются TLR-рецепторами и активируют NLRP3 инфламмосомы.

2. Внеклеточный холестерин, амилин, бета-амилоид – напрямую распознаются NLRP3 инфламмосомами.

3. MICA, MICB, ULBPs – МНС-ассоциированные белки, распознаются NKG2D - рецептором естественных киллеров и  $\gamma\delta$  Т-лимфоцитов.

4. Неоантигены HMHC-IIA, актин цитоскелета, окисленные фосфолипиды – распознаются антителами IgM.

5. Неправильно упакованные белки, измененные белки, изменения кислотности, осмолярности, ионного состава, гипоксия [158].

DAMPs, как правило, распознаются цитозольными рецепторами, называемыми NLR (нуклеотид-связывающие домены, связанные с NOD-подобными рецепторами). Они были открыты недавно в результате анализа генома человека на основе гомологии с белком Araf-1, который регулирует апоптоз. NLR-рецепторы содержат три домена: центральный домен NACHT (NOD-подобный или NBD-нуклеотид-связывающий домен), который есть у всех NLR-рецепторов; C-терминальный домен, содержащий повторы богатые лейцином (LRR) и переменный N-терминальный домен. NACHT-домен

вызывает самоассоциацию, зависимую от АТФ, а LRR-домен распознает присутствие лигандов. N-терминальный домен обеспечивает взаимодействие между гомотипичными белками и может содержать домен для рекрутинга каспаз (CARD), пириновый домен (PYD) или домен BIR (бакаловирусные ингибиторные повторы) [159-161].

NOD-подобные рецепторы – это группа рецепторов, которые распознают определенные сигналы из внеклеточной среды и активируют иммунный ответ. Они классифицируются по их эффекторному домену, который определяет специфичность взаимодействия рецептора с другими белками:

1. Подсемейство NOD (NLRC) содержит рецепторы, которые имеют CARD-домен (домен, рекрутирующий каспазу), включая NOD1 и NOD2. У человека описано 22 типа рецепторов, а у мыши – 34.

2. Подсемейство NALP (NLRP) содержит рецепторы, которые имеют пириновый домен (PYR), такие как NALP1, NALP2, NALP3 и т.д. У человека описано 4 типа рецепторов, а у мыши – 14.

3. Подсемейство NAIP содержит рецепторы с BIR доменом, такие как NAIP [162].

### 1.2.3 Основные цитокины, модулирующие воспалительный ответ при асептическом воспалении

При локальной воспалительной реакции в организме происходит резкий ответ на воздействие различных вредных факторов, в результате чего происходит активация клеток микроокружения, эндотелиальных клеток, тромбоцитов, нейтрофилов, моноцитов и макрофагов, которые начинают выделять большое количество цитокинов [163].

Эти белковые молекулы выполняют важные функции в организме, однако избыток их производства может приводить к негативным последствиям, таким как повреждение тканей и развитие хронических заболеваний. Поэтому важно контролировать уровень цитокинов в организме и обеспечивать баланс между их производством и утилизацией.

Профиль цитокинов в инфекционном и стерильном воспалении отличается, потому что они вызываются разными механизмами. В случае инфекционного воспаления, секреция цитокинов запускается за счет PAMPs (патоген-ассоциированные паттерны), которые активируют TLR-рецепторы. Этот механизм защиты организма направлен на борьбу с инфекцией и предотвращение ее распространения. С другой стороны, при стерильном воспалении, выброс цитокинов вызывается DAMPs через NLR-рецепторы и активацию инфламмасом. Такой механизм ответа на повреждение направлен на активацию ремоделирования тканей и регенерации поврежденных тканей [164].

Активная каспаза-1, также известная как ИЛ-1 конвертаза, играет важную роль в процессе воспаления. Она способна превращать неактивные прекурсоры ИЛ-1 $\beta$  и ИЛ-18 в активные формы этих цитокинов, а также активировать секрецию IFN- $\gamma$ . ИЛ-1 $\beta$ , который относится к семейству интерлейкина-1, кодируется геном, расположенным на 2 хромосоме. Этот цитокин участвует в

регуляции многих процессов, таких как выживание и миграция клеток, адгезия клеток, продукция хемокинов, ангиогенез и модуляция иммунного ответа.

ПЦР анализ показал, что повышенный уровень ИЛ-1 $\beta$  может приводить к увеличению продукции хемокинов CCL5, CCL20, CXCL1, CXCL3, CXCL5, CXCL6, CXCL10, CXCL11, CX3CL1, интерлейкинов 6, 8, 23A, 32, Toll-подобных рецепторов TLR2, TLR4, CLDN1, металлопротеиназ MMP1 и MMP3, факторов роста CSF2, фактора некроза опухолей TNF- $\alpha$ , адгезивных молекул ICAM1 и ICAM4, циклооксигеназы-2 (ЦОК2), простагландин Е-синтазы, простагландинов PGE2 и других веществ, которые связаны с различными аспектами воспаления [165, 166]. Повышенный уровень ИЛ-1 $\beta$  может также свидетельствовать о тяжести повреждения, например, уровень этого цитокина был обнаружен в 70 раз выше нормы у больных с тяжелыми гнойно-воспалительными заболеваниями лица и шеи в работе Карзаковой Л.М. и соавт. [167].

Интерлейкин-18 (ИЛ-18) является цитокином. Он производится различными клетками организма, такими как моноциты, макрофаги, эндотелиальные клетки и другие. ИЛ-18 взаимодействует со своим рецептором и совместно с ИЛ-12 запускает клеточно-опосредованный иммунный ответ. Одной из важных функций ИЛ-18 является стимуляция продукции интерферона- $\gamma$  натуральными киллерами (НК клетки) и Т-лимфоцитами. Интерферон- $\gamma$  - цитокин, который играет роль в борьбе с инфекцией и регулирует иммунную систему. ИЛ-18 может ингибировать продукцию IgE и IgG1, которые играют важную роль в аллергических реакциях. ИЛ-18 увеличивает продукцию IgG2a В-лимфоцитами, что способствует иммунной защите организма [168].

Интерлейкины-1 и 18 (ИЛ-1 и ИЛ-18) действуя как провоспалительные цитокины. Они связываются со своими рецепторами и активируют сигнальные пути, которые вызывают экспрессию провоспалительных генов в разных типах клеток. Когда эти цитокины связываются с рецепторами, образуются комплексы, к которым присоединяются добавочные белки, такие как IL-1R $\alpha$  и IL-18R $\beta$ . Затем адаптерные молекулы, такие как миелоидный фактор дифференцировки 88, активируются, и сигнальные пути киназ, включая JNK, p38 MAPK и факторы транскрипции NF- $\kappa$ B и AP-1, включаются. Эти сигнальные пути вызывают экспрессию провоспалительных генов, что приводит к различным иммунным ответам в организме [169].

Интерлейкин-6 (ИЛ-6), с другой стороны, может действовать как провоспалительный или противовоспалительный цитокин в зависимости от контекста [170, 171]. Этот цитокин синтезируется различными клетками, такими как макрофаги, фибробласты, клетки эндотелия сосудов, Т-лимфоциты, глиальные и эпителиальные клетки, кератиноциты. Синтез ИЛ-6 происходит при активации TLR-рецепторов патоген-ассоциированными паттернами, а также под влиянием других цитокинов, таких как ИЛ-1 $\beta$ , интерферон- $\gamma$  и фактор некроза опухолей (ФНО). В очаге воспаления ИЛ-6 может быть высвобожден из поврежденных клеток. Результатом связывания ИЛ-6 с рецептором является активация различных сигнальных путей, таких как

JAK/STAT, PI3K/AKT и MAPK/ERK, что приводит к изменению экспрессии генов и модуляции различных биологических процессов, таких как пролиферация, дифференциация и выживание клеток, а также регуляции иммунного ответа. ИЛ-6 является членом семейства цитокинов, включающих несколько других цитокинов, таких как ИЛ-11, ИЛ-27, ИЛ-31 и т.д. Все они передают сигнал через общий рецептор gp130, который является обязательным компонентом рецепторных комплексов этих цитокинов. Рецептор ИЛ-6 (IL-6R; CD126) экспрессирован на ограниченном числе клеток, таких как нейтрофилы, моноциты, макрофаги, лимфоциты, гепатоциты и др. При связывании ИЛ-6 с рецептором IL-6R, гомодимер gp130 присоединяется к комплексу, образуя функциональный рецептор, который трансдуцирует сигнал внутрь клетки. Кроме того, в крови присутствует растворимый форма рецептора ИЛ-6 (sIL-6R), который образуется путем альтернативного сплайсинга mRNA, кодирующей IL-6R. sIL-6R может связываться с ИЛ-6, образуя комплекс, который способен активировать клетки, не экспрессирующие фиксированный рецептор IL-6R, и таким образом, запускать транс-сигнальный механизм передачи сигнала [172].

Интерлейкин-6 (ИЛ-6) способен вызывать пролиферацию и дифференцировку Т-лимфоцитов, что повышает уровень иммунитета и усиливает ответ на инфекцию. ИЛ-6 также может превращать В-лимфоциты в плазматические клетки, которые могут продуцировать антитела для борьбы с инфекцией. ИЛ-6 является одним из основных медиаторов ответа острой фазы воспаления, что означает, что он может вызывать воспалительный ответ организма на инфекцию или травму. В мышцах и жировой ткани он способен стимулировать мобилизацию энергии, что может привести к повышению температуры тела и ускоренному метаболизму. ИЛ-6 является главным стимулятором синтеза белков острой фазы печени, что может помочь в борьбе с инфекцией и восстановлении тканей. ИЛ-6 также может пройти через гематоэнцефалический барьер, что позволяет ему влиять на функцию центра терморегуляции и вызывать развитие лихорадки. Он способен стимулировать синтез простагландинов E<sub>2</sub>, которые усиливают воспалительный ответ организма. ИЛ-6 также играет важную роль в гемопоэзе, стимулируя процесс образования крови в красном костном мозге [173]. Он является миокином, который способен вызывать пролиферацию и дифференцировку мышечных клеток и участвовать в образовании миофибрилл [174].

ИЛ-6 может подавлять эффекты других противовоспалительных цитокинов, таких как ФНО и ИЛ-1 $\alpha$ , и активировать ИЛ-10 который является противовоспалительным цитокином. Это происходит через регуляцию экспрессии генов и изменение активности различных сигнальных путей. Например, ИЛ-6 может снижать экспрессию гена ФНО и снижать активность сигнального пути NF- $\kappa$ B, который играет важную роль в провоспалительной ответной реакции, а также, может стимулировать выработку ИЛ-10, который действует как противовоспалительный цитокин, снижающий продукцию провоспалительных цитокинов и уменьшающий воспалительный ответ [175, 176].

Обширные исследования ИЛ-6 продолжаются, и будущие открытия могут раскрыть еще больше его функций в организме.

Фактор некроза опухолей (TNF или TNF $\alpha$ ) - это цитокин семейства ФНО, которое включает 19 белков, и наиболее хорошо изученный из них. Он синтезируется различными типами клеток, такими как макрофаги, CD4+ лимфоциты, NK-клетки, нейтрофилы, тучные клетки, эозинофилы, адипоциты, миоциты, нейроны и другие. ФНО является мембранным белком с молекулярной массой 26 кДа, содержащим 233 аминокислоты. Его синтез происходит под влиянием патоген-ассоциированных паттернов и ИЛ-1 $\beta$ . Под действием металлопротеиназы ADAM17 мембрано-связывающий фрагмент ФНО отщепляется, и образуется растворимая форма ФНО с молекулярной массой 17 кДа, состоящая из 157 аминокислот. Активной формой белка является гомотример, который может связываться со своим рецептором. Ген ФНО расположен на хромосоме 6p21.3, и его кодирующая последовательность была клонирована в 1985 году [177-181].

Фактор некроза опухолей (ФНО, TNF) – это цитокин, который синтезируется различными клетками организма и существует в двух формах: мембранный и растворимый. После связывания с рецептором происходят конформационные изменения, с последующим отщеплением ингибиторного белка и активацией одного из трех сигнальных путей. Активация NF- $\kappa$ B приводит к транскрипции белков, необходимых для жизнеобеспечения клетки, пролиферации и воспалительного ответа, а также предотвращает апоптоз. Активация MAPK-киназного пути приводит к синтезу белков, включая те, которые участвуют в дифференцировке клеток, пролиферации и апоптозе. Индукция сигналов гибели клетки с активацией каспазы-8, затем эффекторных каспаз и апоптозом клеток [182].

ФНО – многофункциональный цитокин, который может выполнять различные функции в организме. Например, в гипоталамусе он стимулирует секрецию кортиколиберина, активируя гипоталамо-гипофизарно-надпочечниковую систему. В печени вызывает синтез белков ответа острой фазы. Он также может вызывать инсулинорезистентность, фосфорилируя рецептор инсулина, активировать липолиз, увеличивая уровень антагонистов инсулина – СЖК, и блокировать ядерные рецепторы PPAR $\gamma$ . ФНО также является хемокином для нейтрофилов, вызывает экспрессию адгезивных молекул на эндотелии, способствуя эмиграции лейкоцитов. Он также стимулирует фагоцитоз и синтез ИЛ-1 и простагландинов E2, а также подавляет аппетит и является эндогенным пирогеном [183, 184].

IFN $\gamma$  – это цитокин, который производит некоторые виды лимфоцитов, такие как натуральные киллеры, Th1 и CD8+ T-клетки. Он связывается с рецепторами IFNGR1 и IFNGR2, активируя JAK-STAT сигнальный путь и изменяя транскрипцию более 30 генов. IFN $\gamma$  стимулирует активность натуральных киллеров, макрофагов и индуцирует синтез иммуноглобулинов B-лимфоцитами. Кроме того, он способствует дифференцировке Th1 и CD8+ T-клеток, подавляет дифференцировку Th2, активирует гены процессинга антигенов и вызывает эмиграцию лейкоцитов. IFN $\gamma$  также вызывает индукцию

антивирусной защиты, активируя гены TRIM5alpha, APOBEC и Tetherin [185, 186].

Провоспалительные цитокины оказывают благотворное местное действие, когда они вырабатываются в небольших количествах. При значительных повреждениях и больших концентрациях этих цитокинов в крови, они могут оказать негативное воздействие на организм. При высоком уровне провоспалительных цитокинов происходит так называемый "цитокиновый шторм", который может привести к системному повреждению организма не только при инфекционном, но и при асептическом воспалении [187].

Некоторые цитокины, включая интерлейкин-10 (ИЛ-10) и трансформирующий фактор роста  $\beta$  (TGF- $\beta$ ), имеют способность уменьшать воспаление и предотвращать развитие "цитокинового шторма" [188, 189].

Интерлейкин-10 (ИЛ-10) - это белок, который у человека кодируется геном на хромосоме 1. Он вырабатывается в основном моноцитами и, в меньшей степени, другими клетками, такими как лимфоциты (Th2), тучные клетки и Т-регуляторные клетки (CD4+CD25+Foxp3+), при стимуляции TLR или Fc рецепторов. ИЛ-10 регулирует иммунный и воспалительный ответ, подавляя экспрессию генов цитокинов Th1-хелперов, антигенов главного комплекса гистосовместимости и костимуляторных молекул макрофагов, а также усиливает пролиферацию В-лимфоцитов и производство антител. Он блокирует NF- $\kappa$ B и нарушает передачу сигнала через сигнальный путь JAK-STAT [190].

Интерлейкин-10 (ИЛ-10) снижает выделение таких цитокинов, как TNF $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-12, IFN $\gamma$ . Также ИЛ-10 способствует активации CD8+ Т-клеток и иммунитета против опухолей путем стимуляции образования перфорина и гранзима В [191-194].

Трансформирующий фактор роста бета (TGF- $\beta$ ) – это регуляторный цитокин множественного действия, который принадлежит к семейству белков, включающих около 40 различных членов. Он оказывает влияние на функции клеток различных типов в нормальных условиях и при наличии патологий, таких как эмбриогенез, иммунный ответ, канцерогенез, сердечно-сосудистые заболевания, сахарный диабет, болезнь Паркинсона, синдром приобретенного иммунодефицита и другие [195-197].

Существует три изоформы TGF- $\beta$ : TGF- $\beta$ 1, TGF- $\beta$ 2 и TGF- $\beta$ 3, причем TGF- $\beta$ 1 оказывает наибольшее влияние на иммунную систему.

Механизм выделения активного TGF- $\beta$  включает несколько этапов. Изначально TGF- $\beta$  выделяется в неактивной форме, связанной с двумя полипептидами: латентным TGF- $\beta$ -связывающим белком (LTBP) и LAP (latency-associated protein). Для получения активного TGF- $\beta$  необходимо отделить его от этих полипептидов, что происходит при действии сывороточных протеиназ. Это происходит на поверхности макрофага, который является местом связывания латентного комплекса TGF- $\beta$  с рецептором CD36, связанным с лигандом тромбоспондин-1 (TSP-1). Активация макрофагов в результате воспалительных процессов увеличивает высвобождение активного

TGF- $\beta$ . Также макрофаги могут поглощать латентные TGF- $\beta$  комплексы, связанные с IgG, выделяемые плазмочитами, и выделять активный TGF- $\beta$  в межклеточную жидкость с помощью эндоцитоза [198].

Активация TGF- $\beta$  происходит при помощи протеаз и матриксных металлопротеиназ, которые способны освободить TGF- $\beta$  из его неактивной формы, связанной с LAP и LTBP. Функцию и структуру связывающих белков могут изменять активные формы кислорода, сдвиги pH и тромбоспондин [199]. В эпителиальных клетках активация TGF- $\beta$  происходит при связывании его с  $\alpha$ V-содержащими интегринами, что приводит к изменению конформации латентного комплекса и высвобождению активного TGF- $\beta$ . Интегрины также могут активировать MMP, что усиливает активацию TGF- $\beta$  [200].

TGF- $\beta$  активирует внутриклеточные сигнальные белки SMADs, которые передают сигналы от TGF- $\beta$  к ядру клетки и активируют транскрипцию различных генов [201]. TGF- $\beta$  может активировать сигнальный путь, связанный с апоптозом. В этом случае киназа рецептора TGF- $\beta$  взаимодействует с DAXX (белком, связанным с апоптозом), активируется киназа ASK1 и индуцируется апоптоз [202].

TGF- $\beta$  сигнализирует, чтобы ингибировать пролиферацию В-лимфоцитов. Он активирует транскрипционный фактор, который стимулирует выражение ингибитора циклин-зависимой киназы 21, который контролирует переход клетки из фазы G1 в фазу S, и подавляет гены c-myc и ATM CD40 - активаторы врожденного иммунного ответа. Это приводит к уменьшению синтеза антител и вызывает апоптоз незрелых или покоящихся В-лимфоцитов.

TGF- $\beta$  имеет следующие эффекты на макрофаги и моноциты:

1. Активирует покоящиеся макрофаги.
2. Подавляет функцию активных макрофагов.
3. Является хемоаттрактантом для моноцитов.
4. Понижает продукцию цитокинов моноцитами и макрофагами, ингибируя NF- $\kappa$ B [203].

TGF- $\beta$  принимает участие в регуляции функций Т-лимфоцитов. Регуляторные Т-лимфоциты высвобождают TGF- $\beta$ , который подавляет функцию Т-эффекторных клеток, Т-хелперов и цитотоксических Т-лимфоцитов. TGF- $\beta$  также может уменьшать выделение провоспалительных цитокинов, таких как ИФН- $\gamma$ , ФНО и интерлейкины. Однако функции TGF- $\beta$  зависят от контекста, в котором она действует [204].

Интерлейкин 4 (ИЛ-4) – это цитокин с молекулярной массой 19 кД, который продуцируется CD4<sup>+</sup> Т-лимфоцитами (Th2), тучными клетками и эозинофилами. Он стимулирует дифференцировку Th0 в Th2 клетки и В-лимфоцитов в плазматические клетки, которые продуцируют IgE, и также вызывает экспрессию низкоаффинного рецептора CD23 для IgE на В-лимфоцитах и тучных клетках. ИЛ-4 снижает провоспалительную активность макрофагов и их секрецию ИЛ-1, ФНО, ИЛ-6, IFN- $\gamma$ . Под действием ИЛ-4, ИЛ-10 и TGF- $\beta$  формируются макрофаги M2, которые участвуют в завершении воспалительных процессов [205, 206].



#### 1.2.4 Нейтрофилы как первая линия иммунной защиты

Паттерны и цитокины стимулируют первыми нейтрофилов к миграции в очаг воспаления, где они выполняют роль первой защитной линии иммунитета [207, 208].

Нейтрофилы – это клетки, которые первыми приходят в очаг воспаления, реагируя на паттерны и цитокины. Они содержат 3 типа гранул (азурофильные, специфические и желатиновые), каждый из которых содержит свои характерные протеины [209].

В азурофильных гранулах содержатся миелопероксидаза, бактерицидный белок ВР1 (белок, увеличивающий проницаемость), дефензины, сериновые протеазы, эластазы и катепсин G. Вторичные гранулы содержат щелочную фосфатазу, лизоцим, НАДФН-оксидазу, коллагеназу, лактоферрин, гистаминазу, калелицидин. Третичные гранулы содержат катепсин и желатиназу. Содержимое гранул нейтрофилов формируется в процессе их созревания, и секреторные везикулы образуются позднее, во время эндоцитоза, содержащие белки плазмы, такие как альбумины. Нейтрофилы активно реагируют на антигенные воздействия респираторным взрывом и обладают наибольшей способностью генерировать активные формы кислорода и хлора, используемые для киллинга микробов в зависимости от кислорода. Кроме того, нейтрофилы имеют кислород-независимую бактерицидную систему, которая включает в себя катионные белки, ферменты, лактоферрин и другие субстанции, содержащиеся в гранулах [210].

Нейтрофилы играют ключевую роль в первой линии клеточной защиты и оказывают регуляторное воздействие на активность других клеток врожденного и адаптивного иммунитета. Они способны активировать дендритные клетки как путем непосредственного взаимодействия с рецепторами на их поверхности, так и путем выделения цитокинов, что влияет на их способность представлять антигены [211, 212].

Нейтрофилы могут выполнять функцию помощников (NBH-клетки) и стимулировать производство антител В-лимфоцитами маргинальной зоны селезенки. Такие помощниковые нейтрофилы отличаются от циркулирующих по своему фенотипу и функциям. Они выражают на своей поверхности молекулы CD40L, CD86, CD95, а также выделяют фактор, активирующий В-лимфоциты (BAFF/BLyS) и лиганд, индуцирующий их пролиферацию (APRIL). Под воздействием этих цитокинов происходит дифференциация В-лимфоцитов в плазматические клетки без участия Т-хелперов и переключение синтеза секретлируемых ими антител с IgM на IgG и IgA [213]. Недостаток этих иммунорегуляторных цитокинов приводит к уменьшению числа В-лимфоцитов и недостаточному иммунному ответу на инфекции, а увеличение секреции BAFF/BLyS и APRIL может привести к нарушению толерантности иммунной системы и развитию аутоиммунных заболеваний [214].

Рассматривается роль нейтрофилов в контроле функций различных субпопуляций Т-лимфоцитов, которые, в зависимости от их соотношения, определяют тип иммунного ответа, такой как клеточный, гуморальный или иммунологическая толерантность.

Клеточный иммунный ответ осуществляется за счет активации цитотоксических Т-лимфоцитов (CD8+), которые уничтожают инфицированные клетки и опухолевые клетки. Гуморальный иммунный ответ реализуется благодаря активации В-лимфоцитов, которые продуцируют антитела. Иммунологическая толерантность обеспечивается за счет регуляторных Т-лимфоцитов (CD4+25+FoxP3+), которые контролируют активацию других иммунных клеток и предотвращают развитие аутоиммунных заболеваний.

Нейтрофилы могут направлять миграцию различных субпопуляций Т-лимфоцитов путем продукции хемокинов, поскольку каждая субпопуляция имеет свои уникальные рецепторы. Например, для Th1 используются рецепторы CXCR3, CCR1, CCR2 и CCR5, для Th2 - CCR3 и CCR4, для Th17 - CCR6, для Т-регуляторных клеток - CCR8, а для цитотоксических CD8+ - CCR5. Под воздействием цитокинов IFN $\gamma$  и GM-CSF нейтрофилы могут изменять экспрессию множества генов, включая реструктуризацию хроматина, а также приобретать свойства антиген-представляющих клеток (АПК) путем экспрессии антигенов МНС II класса на своей поверхности. Под влиянием цитокинов, таких как IFN $\gamma$  и GM-CSF, нейтрофилы могут приобретать свойства антиген-представляющих клеток (АПК) и вырабатывать костимулирующие молекулы CD80 и CD86, которые усиливают пролиферацию Т-лимфоцитов [215, 216].

Нейтрофилы также могут оказывать ингибиторное воздействие на Т-лимфоциты. Например, они могут вырабатывать иммуномодулирующие цитокины, такие как IL-10 и TGF- $\beta$ , которые способствуют снижению активности иммунной системы. Кроме того, нейтрофилы могут участвовать в процессе апоптоза активированных Т-лимфоцитов, что способствует контролю иммунного ответа и предотвращению его неадекватности.

#### 1.2.5 Эффекторные и регулирующие функции иммунной системы

Иммунная система состоит из клеток и медиаторов, которые работают вместе для регулирования иммунного ответа в зависимости от требуемой силы и продолжительности [217].

Т-лимфоциты развиваются из стволовых клеток костного мозга и затем мигрируют в тимус для созревания [218, 219]. Наивные Т-клетки, неэкспрессирующие CD3, CD4 и CD8 рецепторы, затем превращаются либо в CD3+/CD4-/CD8- клетки, либо в CD3+/CD4+/CD8+ клетки. Большинство из этих клеток умирают от апоптоза, и менее 5% превращаются в CD4+/CD8- и CD4-/CD8+ клетки. Затем клетки патрулируют ткани, чтобы бороться с возбудителями болезней [220, 221].

Для активации двух основных классов Т-лимфоцитов требуется различный стимул. Один класс, цитотоксические Т-клетки, активируются при дифференциации и становятся CD8+ клетками, которые могут уничтожать клетки, инфицированные вирусами. Другой класс Т-клеток характеризуется наличием поверхностной молекулы CD4, а также разнообразными рецепторами на их поверхности, которые позволяют им распознавать антиген. У человека

лимфоциты имеют рецепторы, способные распознавать только конкретный антиген, причем для Т-клеток этот антиген должен быть связан с молекулами МНС [222-224].

Существует несколько подтипов Т-хелперов, включая Th1, Th2, Th9, Th17, Th22, Tfh и др. Каждый подтип характеризуется уникальным профилем продуцируемых цитокинов и имеет свою роль в регуляции иммунного ответа.

CD4+ Т-хелперные (Th) клетки инициируют антигенспецифические клеточные и гуморальные иммунные ответы. Специфические Т-клеточные антигенные рецепторы (TCR) распознают антигенные пептиды, связанные с молекулами, кодируемыми генами главного комплекса гистосовместимости (МНС) класса II, что способствует активации иммунной системы. Эта взаимосвязь приводит к запуску каскада передачи сигнала, который начинается с фосфорилирования тирозина нескольких цитозольных белков и заканчивается активацией фосфолипазы C- $\gamma$ 1. Это активирует образование вторичных мессенджеров и внутриклеточного свободного кальция, а также активирует несколько факторов транскрипции через сигнальные пути Ras и кальция/кальмодулина. Когда Т-клетки получают стимуляцию от антигена, это приводит к активации генов, кодирующих интерлейкин-2 (IL-2) и другие цитокины, что приводит к процессу дальнейшей активации клеточного цикла. CD4, мембранный гликопротеин, взаимодействует с консервативными областями МНС класса II во время антигенной стимуляции Т-клеток и работает как корецептор для TCR. Костимулирующие молекулы, такие как CD28 и CD40L, взаимодействуют со своими лигандами на антигенпрезентирующих клетках (АРС) и инициируют отдельный путь передачи сигнала. Эти взаимодействия вносят свой вклад в активацию Т-клеток как в количественном, так и в качественном отношении [225].

В-клетки происходят из лимфоидных клеток-предшественников в костном мозге. Самая ранняя форма В-клеток называется "про-В" клетками, так как они имеют ограниченную способность к самообновлению. Про-В клетки происходят от плюрипотентных кроветворных стволовых клеток, которые имеют определенные белки на своей поверхности, или антитела [226]. В-клетки получают антиген-специфические молекулы путем производства антител в ответ на инфекцию [227, 228].

Этот процесс является главным вкладом В-клеток в адаптивный иммунитет.

В-клетки, которые прошли процесс дифференциации, могут производить разнообразные типы антител. Эти антитела могут быть либо выделяемыми на поверхности клетки, либо выделяемыми в окружающую среду. Гены, кодирующие иммуноглобулины (Ig), подвергаются перегруппировке, что позволяет клеткам производить антитела разных типов. Существует пять основных типов антител: IgG, IgM, IgE, IgD и IgA. IgG является наиболее распространенным типом иммуноглобулинов в человеческом организме [229-231].

Молекула IgG состоит из двух различных полипептидных цепей, каждая из которых содержит тяжелую цепь весом примерно 50 кДа и легкую цепь с

приблизительным весом 25 кД. Две цепи связаны между собой дисульфидными связями, а каждая тяжелая цепь связана с легкой цепью дисульфидной связью.

У антител есть две основные функции. Во-первых, они распознают и связываются со специфическими антигенами, что приводит к иммунной реакции. Во-вторых, они могут активировать другие клетки и молекулы для уничтожения возбудителей болезней. Хотя антитела специфичны к определенным антигенам, они могут признать множество различных антигенов. Регион антитела, который играет роль в эффекторной функции, называется постоянной или С-областью [232]. Антитела играют важную роль в уничтожении бактерий и других возбудителей болезней с помощью комплемент-опосредованного уничтожения клеток. Антитела также могут распознавать антигены на поверхности вирусом зараженных клеток.

НК-клетки способны уничтожать клетки, которые покрыты определенными антителами. Этот процесс, при котором НК-клетки разрушают клетки-мишени, связанные с антителами, называется антителозависимой клеточной цитотоксичностью [233-235].

Цитокины являются ключевыми молекулами, которые регулируют иммунную реакцию и играют центральную роль в ее сборке. Их селективная продукция может определить результат иммунного ответа, стимулируя защитный механизм. Когда цитокины производятся в избытке, они могут стать патогенными и вызвать перепроизводство воспалительных клеток, лихорадку, повреждения тканей и даже смертельный шок. Поэтому существует несколько уровней генетической регуляции, чтобы ограничить синтез цитокинов во времени и пространстве [236].

Понимание влияния различных токсичных металлов на иммунные изменения осложнено их сложностью и недостатком ясного понимания многих иммунологических функций, особенно механизмов их регулирования и усиления. Однако использование экзогенных тяжелых металлов в биологических исследованиях предоставляет новые возможности для понимания механизмов, которые лежат в основе их разрушительного воздействия [237].

Металлы обладают способностью модулировать активность иммунокомпетентных клеток с использованием различных механизмов. В зависимости от конкретного металла, его концентрации и доступности в организме, результатом может быть либо иммуностимуляция, либо иммуносупрессия. Существует общая озабоченность относительно того, что металлы могут нарушать иммунный гомеостаз путем вмешательства в иммунорегуляторную активность, что может привести как к иммунодефициту, так и к развитию аутоиммунных заболеваний [238, 239].

Иммунотоксичность, которая представляет собой неблагоприятные иммунные эффекты химических веществ, широко используется как чувствительный биомаркер для оценки потенциальных последствий присутствия различных химических веществ в окружающей среде на здоровье населения [240].

Это позволяет оценить, насколько данные химические вещества могут оказывать влияние на иммунную систему и ее функции, а также выявить потенциальные риски для здоровья, связанные с их экспозицией.

Иммунотоксическое воздействие тяжелых металлов, особенно таких, как кадмий (Cd), в значительной мере изучается в контексте их способности индуцировать иммунодепрессию. Исследования, проведенные Anunciaci'on Lafuente и соавторами в 2004 году, показали, что экспозиция крыс хлоридом кадмия (CdCl<sub>2</sub>) в концентрациях 0, 5, 10, 25, 50 или 100 частей на миллион в питьевой воде в течение одного месяца приводит к уменьшению относительного и абсолютного количества лимфоцитов в периферической крови. Даже при низких дозах кадмия наблюдалось снижение содержания CD4<sup>+</sup> и CD8<sup>+</sup> лимфоцитов. Это позволяет сделать вывод о том, что кадмий подавляет гуморальный и клеточный иммунный ответ, и это наблюдается при более низких дозах. Исследования указывают на то, что кадмий может вызывать иммунодепрессию и иммунотоксичность, что может иметь негативные последствия для иммунной системы [241].

Исследования также указывают на то, что кадмий оказывает аналогичное воздействие на распределение В-лимфоцитов в лимфоидных органах [242]. Результаты показывают, что селезенка является более чувствительной к воздействию кадмия, чем тимус. Несмотря на это, наблюдается большее накопление кадмия в тимусе по сравнению с селезенкой. Это указывает на то, что кадмий может влиять на распределение и концентрацию металла в различных лимфоидных органах, что может иметь последствия для их функциональности и иммунного ответа.

Исследования, проведенные Brahmankar MG и соавторами в 2011 году и Kim MG и соавторами в 2015 году, показали, что свинец (Pb) ингибирует гуморальный иммунный ответ, что приводит к образованию низкого уровня антител [243, 244].

Другие исследования указывают на то, что при добавлении ацетата свинца в различных дозировках в питьевую воду мышей происходит значительное снижение общего количества лейкоцитов и лимфоцитов. Авторы предполагают, что это снижение может быть вызвано либо уменьшением производства этих клеток в зародышевых центрах лимфоидных органов, либо увеличением их лизиса вследствие наличия свинца в организме. Установлено, что ацетат свинца в дозировке и продолжительности воздействия, использованных в этих исследованиях, не смог значительно подавить гуморальный иммунный ответ [245].

В дополнение к предыдущим исследованиям, следует отметить, что некоторые другие исследователи показали значительное снижение гуморального иммунного ответа под влиянием свинца. Эти исследования подтверждают, что свинец может иметь иммуносупрессивное действие и приводить к уменьшению уровня антител в организме [243, p. 35-36; 246, 247].

Важно отметить, что результаты исследований могут варьироваться в зависимости от различных факторов, таких как дозировка, длительность воздействия, вид свинца и условия эксперимента.

Исследования Dangleben N.L., Skibola C.F., Smith M.T., 2013 свидетельствуют о том, что мышьяк существенно влияет на врожденный и адаптивный иммунитет. Авторы отмечают, что возможные механизмы иммуотоксического влияния мышьяка включают изменение экспрессии ключевых иммунных регуляторов, индукцию апоптоза, окислительный стресс и воспаление, нарушение активации лимфоцитов и функции макрофагов, а также изменения в клеточном и гуморальном иммунитете. Эти механизмы могут привести к снижению иммунного ответа и ухудшению защитных функций организма [248].

Уровень и функциональная активность В-лимфоцитов играют важную роль в развитии воспалительных процессов и иммунного ответа. Зрелые В-клетки, встречая чужеродный антиген, проходят селективную пролиферацию и дифференциацию в плазматические клетки, которые вырабатывают антитела, или в В-клетки памяти. Ответ зрелых В-клеток на антиген осуществляется через взаимодействие антигена с В-клеточным рецептором (BCR), а затем презентацию антигена Т-клеткам. Процесс распознавания антигена BCR приводит к быстрой передаче и связыванию антигена с белковым связывающим участком (IPPLC) молекулы главного комплекса гистосовместимости (МНС) II типа. Экспрессия МНСII наблюдается на ранних этапах дифференцировки В-клеток и играет роль не только в презентации антигена, но и в формировании долгоживущих зрелых В-клеток. Это важный механизм, который обеспечивает эффективное взаимодействие между В-клетками и Т-клетками, и играет роль в адаптивном иммунном ответе на инфекции и другие патологические состояния [249].

Ранее проведенные исследования указывают на различные эффекты ванадия, кобальта-хрома и хрома на активность В-клеток и их функции. Ванадий был связан с увеличением пролиферации спленоцитов, расширением пула В-клеток и повышением продукции IFN- $\gamma$  и IgG у спленоцитов облученных мышей. Увеличение популяции В-клеток CD45R+B220+ наблюдалось как у необлученных, так и у облученных мышей, которым вводили метаванадат натрия (NaVO<sub>3</sub>) [250].

При введении кобальта-хрома внутрибрюшинно мышам или при культивировании лимфоцитов *in vitro* в присутствии кобальта-хрома [251], наблюдалось существенное подавление пролиферации В-клеток и продукции иммуноглобулинов стимулированными липополисахаридом В-клетками. Аналогично, соединение хрома Cr(NO<sub>3</sub>)<sub>3</sub> подавляло липополисахарид-индуцированную пролиферацию В-клеток и продукцию IFN- $\gamma$ , IL-2 и IL-6 у мононуклеарных клеток периферической крови человека, стимулированных РНА, в *in vitro* условиях [252].

Эти результаты говорят о том, что различные металлы могут оказывать различное влияние на активность и функции В-клеток, и их эффекты могут быть как стимулирующими, так и подавляющими.

За последние 20 лет наблюдается возрождение интереса к Т-клеткам с супрессорными функциями, известными как Т-супрессоры, которые были

повторно открыты в экспериментальных условиях. Эти клетки получили новое обозначение как "регуляторные Т-лимфоциты" [253].

Регуляторные Т-клетки играют ключевую роль в иммунной системе, так как они обладают уникальной способностью контролировать иммунные ответы. Они выполняют ряд важных функций, направленных на предотвращение аутоиммунных заболеваний, аллергических реакций, отторжения трансплантата, а также поддержание пищевой и трансплацентарной толерантности [254].

Исследования, проведенные на мышах, впервые позволили установить роль регуляторных Т-клеток в поддержании иммунологического гомеостаза и предотвращении развития аутоиммунных заболеваний. Недостаток или удаление Т регуляторных клеток у мышей приводили к развитию различных аутоиммунных патологий, таких как гастрит, тиреоидит, диабет и воспалительная болезнь кишечника. Дальнейшие исследования подтвердили, что дефекты в Т регуляторных клетках CD4+CD25+FOXP3+ могут способствовать развитию аутоиммунных заболеваний, и что эти процессы могут быть исправлены через адоптивный перенос Т регуляторных клеток. В человеческих исследованиях было обнаружено, что мутации в гене FOXP3, который является ключевым регулятором развития и функции Т регуляторных клеток, связаны с развитием иммунодисрегуляции, полиэндокринопатии и тяжелого воспаления у пациентов. Это подтверждает важную роль CD4+CD25+FOXP3+ Т регуляторных клеток в регуляции иммунного ответа у людей. Регуляторные Т-клетки также могут играть негативную роль в организме. Например, они могут подавлять противоопухолевый иммунитет, способствуя прогрессии опухолей. Эти клетки могут быть вовлечены в развитие хронических инфекций.

Регуляторные Т-клетки выполняют основную функцию контроля силы и продолжительности сложных иммунных реакций в организме. Они осуществляют иммуносупрессию путем выработки определенных молекул, таких как интерлейкин-10 (IL-10) и трансформирующий фактор роста бета (TGF-β). Эти молекулы способствуют подавлению возникновения и развития аутоиммунных заболеваний путем обеспечения доминантной иммунологической толерантности к собственным антигенам [255].

Исследование молекулы CD25, α-цепи рецептора интерлейкина-2 (IL-2), позволило более точно определить Т-регуляторные клетки [256]. IL-2 является ключевым фактором роста и выживаемости Т-регуляторных клеток. При нейтрализации IL-2 с помощью моноклональных антител количество CD4+CD25+ Т-регуляторных клеток снижается, что может привести к развитию аутоиммунной патологии у грызунов [257]. Таким образом, молекула CD25 считается маркером функциональной активности Т-регуляторных клеток.

На рисунке 3 показан процесс дифференцировки Т-регуляторных клеток в лимфоидных органах [258]. Этот процесс является важной частью формирования и функционирования регуляторной системы иммунитета.

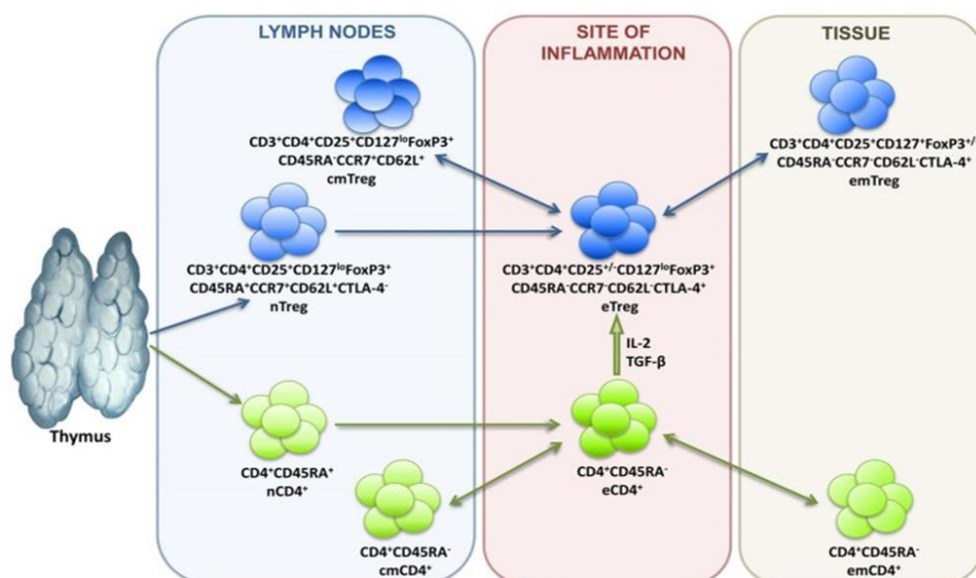


Рисунок 3 – Динамика дифференцировки Т регуляторных клеток-лимфоцитов

Примечания:

1. Т регуляторные клетки подразделяются на наивные клетки (nТ регуляторные клетки), центральные клетки памяти (cmТ регуляторные клетки), эффекторные клетки памяти (emТ регуляторные клетки) и эффекторные Т регуляторные клетки (eТ регуляторные клетки) лимфоциты. Молекулы CCR7 и CD62L обеспечивают хоуминг Т регуляторных клеток во вторичные лимфоидные органы, в то время как экспрессия CTLA-4 отражает супрессивную активность Т регуляторных клеток. Трег-лимфоциты функционируют в разных тканях и очагах воспаления, поэтому их дифференцировка связана с приобретением соответствующих хемокиновых рецепторов и молекул адгезии, ответственных за направленный хоуминг. Так, CCR4 предназначен для миграции в кожу, GPR-15 – для миграции в кишечник, а CXCR3, LFA-1, VLA- 4, CCR2, CCR5 , CCR6, CCR8 – для миграции в зоны воспаления.
2. Составлено по источнику [258, p. 3100-2]

В субпопуляции CD4<sup>+</sup> Т-лимфоцитов можно выделить два типа клеток с супрессорной активностью [259]. Первый тип – индуцированные CD4<sup>+</sup> Т-клетки (Трег 1 и Т-хелперы 3). Они обладают супрессорной активностью после активации *in vivo* или *in vitro* и могут быть идентифицированы на основе их цитокинового профиля. Индуцированные Т-клетки могут ингибировать ответы других CD4<sup>+</sup> Т-клеток, таких как Т-хелперы 1 (Th1) и Т-хелперы 2 (Th2), с помощью интерлейкин-10 (ИЛ-10)-зависимого механизма [260].

Второй тип – натуральные регуляторные Т-клетки, которые имеют фенотип CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup>. Они являются классическими регуляторными Т-клетками и играют важную роль в контроле иммунного ответа и поддержании иммунологической толерантности. Эти клетки обладают высокой экспрессией молекулы CD25 и фактора транскрипции Foxp3, что является характерным для натуральных регуляторных Т-клеток.

Клетки Th3 являются подтипом регуляторных Т-клеток и характеризуются способностью секреции трансформирующего фактора роста β1 (TGF-β1), который обладает супрессорной активностью. Они также могут вырабатывать супрессорные цитокины, такие как интерлейкин-4 (ИЛ-4) и



интерлейкин-10 (ИЛ-10). Эти цитокины способствуют подавлению иммунного ответа и контролю воспалительных реакций.

Т-регуляторные клетки выполняют супрессорные функции путем подавления активации и пролиферации различных клеток иммунной системы, таких как CD4<sup>+</sup> и CD8<sup>+</sup> Т-лимфоциты, натуральные киллеры, В-лимфоциты и антиген-презентирующие клетки. Этот супрессорный эффект осуществляется главным образом путем контакт-зависимого взаимодействия между Т регуляторных клеток-клетками и другими клетками.

Т регуляторные клетки вырабатывают цитокины, такие как интерлейкин-10 (ИЛ-10) и трансформирующий ростовой фактор I (TGF-I), которые снижают активность макрофагов и пролиферацию лимфоцитов. Они также могут выделять гранзимы А и В, а также перфорин, которые вызывают лизис эффекторных клеток [255, с. 458-464].

При взаимодействии с другими клетками, Т регуляторные клетки могут уничтожать Т-клетки с помощью механизмов, зависящих от гранзимов или перфорина [261].

Т регуляторные клетки способны снижать цитотоксичность натуральных киллеров, уменьшать продукцию интерферона  $\gamma$  и снижать продукцию антител В-лимфоцитами.

Т регуляторные клетки играют важную роль в поддержании иммунологической толерантности, контроле воспалительных реакций и предотвращении избыточных иммунных ответов. Они выполняют свои функции через разнообразные механизмы, включая цитокиновую супрессию, контакт-зависимое подавление и прямую цитотоксичность.

Регуляторные Т-клетки экспрессируют несколько функциональных молекул, которые используются в качестве маркеров для их идентификации. Вот некоторые из этих маркеров:

1. CD25 (также известный как  $\alpha$ -цепь рецептора IL-2 или IL-2R $\alpha$ ): CD25 является одним из наиболее характерных маркеров для Т регуляторных клеток. Он играет важную роль в поддержании их функций и считается ключевым маркером для идентификации Т регуляторных клеток.

2. CTLA-4 (также известный как CD152): CTLA-4 является регуляторным рецептором, экспрессия которого на Т регуляторных клетках помогает им подавлять активацию других иммунных клеток. Он также используется в качестве маркера для Т регуляторных клеток.

3. GITR (глюкокортикоид-индуцированный туморальный некроз-фактор-рецептор): GITR является еще одним молекулярным маркером, обнаруживаемым на Т регуляторных клетках. Его экспрессия связана с регуляторными функциями Т регуляторных клеток.

4. CD95 (также известный как Fas): CD95 является рецептором, который может играть роль в индуцировании клеточной гибели. Его экспрессия на Т регуляторных клетках помогает им контролировать активацию других клеток иммунной системы.

5. CD127 $\alpha$  (также известный как IL-7R $\alpha$ ): CD127 является субединицей рецептора для интерлейкина-7 (IL-7). Экспрессия CD127 на Т регуляторных

клетках низкая (CD127<sup>lo</sup>), что помогает отличить их от других клеток иммунной системы.

Эти молекулы, вместе с другими, помогают идентифицировать и изучать регуляторные Т-клетки и их функции в иммунной регуляции.

Экспрессия CD25 ( $\alpha$ -цепи рецептора к ИЛ-2) и фактора транскрипции Foxp3 являются уникальными маркерами натуральных регуляторных Т-клеток. Эти клетки развиваются в тимусе, где проходят отбор по способности распознавать свой МНС комплекс и не реагировать на его антигенные детерминанты. После этого они покидают тимус и расселяются в периферических лимфоидных органах, где контролируют иммунный ответ и поддерживают иммунологическую толерантность [259, с. 45-50].

Ген FOXP3 является ключевым регулятором развития и функции регуляторных Т-клеток. Высокая экспрессия FOXP3 обнаружена в CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> Т регуляторных клетках как в периферии, так и в тимусе мышей. FOXP3 является наиболее специфическим внутриклеточным маркером для идентификации Т регуляторных клеток. Некоторые исследования указывают на то, что после активации некоторые эффекторные Т-клетки также могут выражать FOXP3, но без сопровождающей этого супрессорной функции и стабильного регуляторного фенотипа. Это подчеркивает необходимость поиска уникальных маркеров, которые были бы специфичны исключительно для Т регуляторных клеток. Исследования в этой области активно продолжаются [254, с. 3-16].

FOXP3<sup>+</sup> Трег клетки выполняют несколько механизмов для поддержания иммунного гомеостаза (см. рисунок 4) [262].

Трег-клетки могут выделять ингибирующие цитокины, такие как ИЛ-10, ИЛ-35 и TGF- $\beta$ . Кроме того, Трег-клетки с высоким уровнем экспрессии FOXP3 также экспрессируют CD25, что позволяет им конкурировать за доступ к эндогенному ИЛ-2 и приводит к апоптозу эффекторных клеток путем депривации цитокинов [263].

Еще одним молекулярным механизмом, использованным Трег-клетками, является экспрессия CD39, который разрушает АТФ до АМФ и тем самым угнетает зрелость дендритных клеток, зависящую от АТФ [263]. Совместная экспрессия маркеров CD39 и CD73 на Трег-клетках может преобразовывать АДФ в аденозин, который связывается с аденозиновым рецептором A2A на эффекторных Т-клетках и ингибирует их активацию [264]. Активация аденозинового рецептора A2A способствует секреции TGF- $\beta$  и снижает экспрессию ИЛ-6, способствуя образованию Трег-клеток [267].

Трег-клетки могут подавлять экспрессию костимулирующих молекул CD80 и CD86 на дендритных клетках [266]. Экспрессия молекулы CTLA-4 на Трег-клетках приводит к снижению уровня CD86 путем трансэндоцитоза и нарушает активацию антиген-презентирующих клеток (АПК) [267]. Кроме того, Трег-клетки могут повышать уровень экспрессии индоламин-2,3-диоксигеназы в дендритных клетках посредством индуцированной CTLA-4 передачи сигналов, что приводит к истощению эффекторных Т-клеток. Третьим механизмом является экспрессия гена активации лимфоцитов (LAG-3) на Трег-

клетках, который конкурентно связывается с молекулами МНС-II и сдерживает созревание дендритных клеток [268, 269].

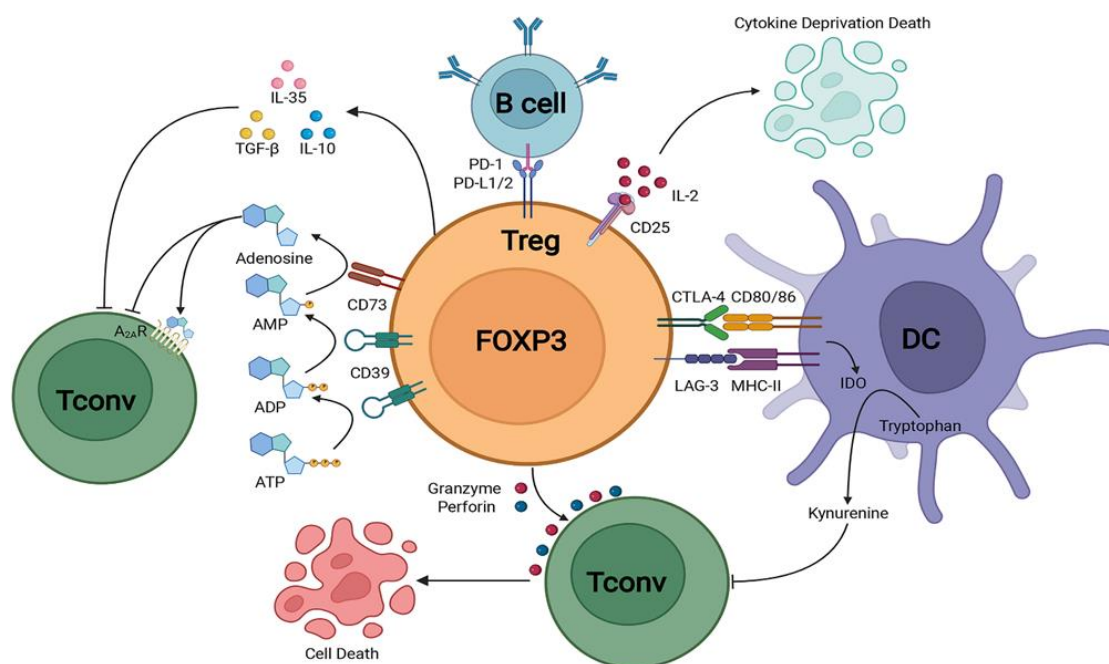


Рисунок 4 – Механизмы иммуносупрессии Т регуляторных лимфоцитов

Примечания:

1. Супрессивные механизмы Т регуляторных клеток. Т регуляторные клетки могут секретировать иммуносупрессивные цитокины, включая IL-10, TGF-β и IL-35. Кроме того, Т регуляторные клетки могут индуцировать цитолиз по гранзим-зависимому и перфорин-зависимому механизмам. CD25 на Т регуляторных клетках конкурентно связывается с IL-2 и опосредует апоптоз эффекторных иммунных клеток посредством депривации цитокинов. Взаимодействие LAG-3 и МНС-II опосредует подавление созревания ДК, взаимодействие CTLA-4 и CD80/86 опосредует продукцию иммунодепрессивной молекулы IDO в ДК. CD39 и CD73 облегчают выработку перичеселлюлярного аденозина, супрессивная функция которого опосредована A<sub>2A</sub>R. Т регуляторные клетки ингибируют активность В-клеток посредством взаимодействия PD-L1/2 и PD-1.
2. Составлено по источнику [262, p. 916411-3]

Кроме того, Трег-клетки экспрессируют ген активации лимфоцитов (LAG-3), который конкурентно связывается с молекулами МНС-II и сдерживает созревание дендритных клеток (DC) [270]. Ещё одним важным механизмом супрессии, осуществляемой Трег-клетками, является гранзим-зависимый и перфорин-зависимый цитолиз CD8<sup>+</sup> Т-клеток и естественных киллеров [271]. Когда речь идет о В-клетках, связывание между лигандами запрограммированной смерти-1 (PD-L1) на Трег-клетках и запрограммированной смертью-1 (PD-1) на аутореактивных В-клетках нарушает их пролиферацию и функцию, помимо апоптоза, осуществляемого с помощью перфорина и гранзимов [272].

Несмотря на значительный прогресс в изучении механизмов токсического воздействия различных ксенобиотиков, влияние хрома и ванадия на воспалительные процессы и механизмы регуляции иммунного ответа до сих

пор остается малоизученным. Недостаточно данных о связи между воздействием хрома и ванадия на активность Трег-клеток и В-клеток.

Цель данного исследования состояла в изучении влияния метаметанадата аммония и бихромата калия, асептического воспаления и их сочетанного действия на количество и экспрессию функциональных маркеров Трег- и В-клеток у крыс, а также оценке эффектов полиоксидония и соединения МХФ18. Иммунотоксичность ванадия и хрома пока недостаточно изучена в научной литературе, а существующие данные не соответствуют современным требованиям и методам исследований. В связи с этим, мы планируем продолжить патентно-информационный поиск по данной проблеме.

В последние годы иммунология сделала значительные прорывы в методологии и исследованиях. Развитие новых методов, таких как геномный и транскриптомный анализ, позволяет исследователям изучать экспрессию множества белков в отдельных клетках, расширяя наши возможности в понимании клеточных взаимодействий. Также, использование интеллектуального анализа данных и машинного обучения позволяет получать более глубокое понимание сложных иммунологических процессов.

Эти новые подходы предоставляют исследователям уникальные возможности для исследования и лечения различных заболеваний. Мы можем использовать специфические антигены и направленные воздействия на различные компоненты иммунной системы для восстановления нарушенного иммунитета и восстановления баланса. Это открывает перспективы для разработки новых терапевтических подходов и персонализированной медицины, где лечение будет более точным и эффективным.

Прогресс в методологии исследований иммунологии создает обширные возможности для дальнейшего понимания и лечения различных заболеваний, основанных на глубоком понимании клеточных взаимодействий и восстановлении иммунного баланса.

В данном обзоре были освещены важные аспекты иммунотоксического воздействия тяжелых металлов, а также обсуждены механизмы иммунорегуляции воспаления. Особое внимание уделено рассмотрению потенциального повреждающего действия ванадия и хрома, а также возможным защитным механизмам их нейтрализации.

В свете этого, проведение исследования асептического воспаления на модели крыс с предварительной экспозицией ванадата аммония и бихромата калия представляет значимый научный интерес и поможет расширить наше знание о воздействии этих соединений на иммунную систему и воспалительные процессы. Это было обоснованием для той проблемы, которое мы будем решать в нашем исследовании.

## 2 МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

### 2.1 Условия и характер экспериментов

Доклинические исследования на животных проводились 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 от 29 декабря 2006 года №575 и №557. В исследовании учитывались рекомендации, изложенные в «Руководстве по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ» / под ред. Р.У. Хабриева, Москва, 2005 г. При проведении экспериментов руководствовались рекомендациями, изложенными в «Европейской конвенции о защите позвоночных животных, используемых в экспериментальных и научных целях», Страсбург 18 марта 1986 г. (таблица 1).

Таблица 1 – Лабораторные животные и условия их содержания

Вид	– крысы ( <i>Rat norvegicus</i> )
Порода	– неинбредные, белые
Пол	– самцы
Возраст	– 6-10 мес.
Масса тела крысы	– 200 г ± 10 % (половозрелые)
Общее количество крыс	– 100
Источник получения	– собственный виварий, коммерческий источник
Контроль здоровья животных	– перед карантином животных осматривали, больных: с нездоровой окраской шерсти, вялых, с ранами отбраковывали
Дата получения	– по необходимости
Период акклиматизации	– 14 дней до начала эксперимента
Индивидуальная идентификация	– маркировка шерсти с помощью красителей (фуксин) различных частей тела
Метод распределения по группам	– случайная выборка из животных одного веса и пола
Количество животных в клетке	– по 10 крыс
Кормовой рацион	– овес, соя, пшеница, овощи, стандартные брикеты, содержащие минеральные пищевые ингредиенты и витамины
Размеры клетки	– (дл.×шир.×выс.) –55,0×40,0×25,0 см
Материал клетки	– безопасный пластик, сетки из нержавеющей стали.
Температура воздуха	– 21-24°C
Влажность воздуха	– 65-70%
Тип анестезии при заборе крови	– хлороформ
Способ гуманного умерщвления животных после забора крови	– естественная смерть от кровопотери

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

В работе использованы следующие приборы: весы торсионные (дискретность 0,001 г), Россия, весы аналитические «ВЛКТ-500», РФ (дискретность 0,01 мг), весы технические «Ufesa», P.R.C (дискретность 0,1 г) для взвешивания животных, зонды желудочные (шприц для внутригортанных вливаний Ш-14 ск, ОАО «МИЗ-Ворсма» РФ). Анализ массы тела животных осуществлялся при помощи весов технических.

## 2.2 Дизайн эксперимента

Исследования выполнены на 220 беспородных крысах самцах средней массой 180-240 г.

Экспериментальные исследования проводили по следующим сериям:

- 1 серия – половозрелые крысы (контроль);
- 2 серия – половозрелые крысы с асептическим воспалением;
- 3 серия – половозрелые крысы+ванадат аммония (ВА) и бихромат калия (БК);
- 4 серия – половозрелые крысы+металлы+асептическое воспаление (опыт);
- 5 серия - половозрелые крысы с асептическим воспалением + МХФ18;
- 6 серия - половозрелые крысы с асептическим воспалением + ПО;
- 7 серия - опыт + МХФ18;
- 8 серия - опыт + ПО.

Животных 2-8 серий делили по 3 подгруппы по 10 крыс в каждой.

Асептическое воспаление моделировали путем подкожного введения в межлопаточную область 0,3 мл скипидара на вазелиновом масле. Перед этим у крыс в межлопаточной области выстригали шерсть и подкожно вводили 0,5 мл воздуха [273].

Комбинированную затравку ванадатом аммония и бихроматом калия производили ежедневно (кроме воскресенья) в течение двух недель из расчета по 5 мг/кг м.т. перорально при помощи металлического зонда. Сразу после двухнедельной затравки ВА и БК у крыс второй и четвертой серий эксперимента моделировали асептическое воспаление. Забой всех серий эксперимента производили через 1, 7 и 14 суток от начала моделирования асептического воспаления (таблица 2).

Таблица 2 – План эксперимента

Серии	Затравка ВА и БК	Моделирование асептического воспаления	Забой животных всех серий эксперимента производили после затравки ВА и БК (3 и 4 серии) и моделирования асептического воспаления (2 и 4 серии)		
1	2	3	4		
Контроль (10 крыс)	физ. раствор	-	Однократный забой		
АВ (30 крыс)	-	на 14 день	через 1 сутки (10 крыс)	через 7 суток (10 крыс)	через 14 суток (10 крыс)
ВА И БК (30 крыс)	14 дней	-	через 1 сутки (10 крыс)	через 7 суток (10 крыс)	через 14 суток (10 крыс)

Продолжение таблицы 2

1	2	3	4	5	6
AB+ (BA и BK) Опыт (30 крыс)	14 дней	на 14 день	через 1 сутки (10 крыс)	через 7 суток (10 крыс)	через 14 суток (10 крыс)
AB+MXФ18	14 дней	на 14 день+MXФ18	через 1 сутки (10 крыс)	через 7 суток (10 крыс)	через 14 суток (10 крыс)
AB+ПО	14 дней	на 14 день+ПО	через 1 сутки (10 крыс)	через 7 суток (10 крыс)	через 14 суток (10 крыс)
Опыт+MXФ18	14 дней	на 14 день+MXФ18	через 1 сутки (10 крыс)	через 7 суток (10 крыс)	через 14 суток (10 крыс)
Опыт+ПО	14 дней	на 14 день+ПО	через 1 сутки (10 крыс)	через 7 суток (10 крыс)	через 14 суток (10 крыс)

После забоя у всех крыс забирали тимус, селезенку, брыжеечные лимфатические узлы, костный мозг, кровь для проведения иммунологических, гематологических и геномных исследований. Животных до и после эксперимента взвешивали. Забранные органы опытных животных до транспортировки в лабораторию Института молекулярной биологии и биохимии им. М.А. Айтхожина и геномную лабораторию НИИ ФиПМ им. Б.А. Атчабарова предварительно взвешивали. В журнале протоколов регистрации эксперимента производили запись всех полученных параметров, а также визуальные показатели состояния внутренних органов опытных крыс. Кроме того, проводили фото- и видеосъемку эксперимента.

### 2.3 Лабораторные методы

Гематологические исследования. Количество форменных элементов крови определяли на гематологическом анализаторе (Sysmex 1000i, Япония, 2010 г.) общий анализ крови, содержание гемоглобина, эритроцитов, ретикулоцитов, лейкоцитов, тромбоцитов; цитология костного мозга.

Иммунологические исследования. Проводились в лаборатории Института молекулярной биологии и биохимии им. М.А. Айтхожина согласно Договора №34 от 07.07.2015 г. с «Институтом молекулярной биологии и биохимии им. М.А. Айтхожина Комитета науки Министерства образования и науки Республики Казахстан».

Транскриптомный анализ. Проводился в лаборатории коллективного пользования НИИФиПМ им. Б.А. Атчабарова для выделения образцов мРНК и дальнейшего секвенирования.

Биоинформатический анализ проведен на основании Договора №3 от 25 октября 2016 г. с Институтом Биоинформатики г. Санкт-Петербург (РФ).

#### 2.3.1 Реагенты

В ходе постановки экспериментов использовали следующие реактивы: фосфатно-солевой буферный раствор (Phosphate Buffer Saline, PBS) (Sigma-Aldrich, Германия), реагент для лизиса эритроцитов FACS Lysing Solution, реагент для фиксации клеток CytoFix Fixation Buffer (BD Biosciences, США),

набор реагентов для пермеабиллизации клеток Foxp3 Transcription Factor Staining Buffer Kit (LifeTechnologies, США), а также флуоресцентно-меченные моноклональные антитела к CD3-APC (BD Pharmingen, США), B220-PE-Cyanine7, CD4-PE-Cy5, CD152 (CTLA-4)-PE, FOXP3-FITC, CD25-PE, CD45-PE и RT1-FITC (eBioscience, США). В ходе постановки экспериментов использовали коммерческие наборы для иммуноферментного анализа цитокинов, выпускаемые фирмой R&D Systems (Англия): для интерлейкина-1b - Rat IL-1-beta/IL-F2 Quantikine ELISA kit, для интерлейкина-6 - Rat IL-6 Quantikine ELISA kit, для фактора, трансформирующего рост-b - Mouse/Rat/Porcine/Canine TGF-beta Quantikine ELISA kit, для интерлейкина-10 - Rat IL-10 Quantikine ELISA kit.

### 2.3.2 Оборудование

Инвертированный микроскоп (Leica, Германия), центрифуга SIGMA 3k30, рН-метр (Sartorius, Германия), аквадистиллятор 2008 (GFL, Германия), магнитная мешалка ММ2А (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 Preseparation Filters (MiltenyiBiotec, Германия). Ламинарный стерильный бокс Airstream AC2-3E1 (ESCO, Сингапур), центрифуга SIGMA 3k30, центрифуга SIGMA 2-16k; (Sigma, Германия), деионизатор воды (Elgastat, Англия), рН-метр (Sartorius, Германия), аквадистиллятор 2008 (GFL, Германия), магнитная мешалка ММ2А (Чехия), сушильный шкаф КС-65 (Германия), стерилизатор воздушный ГП-80 (Россия), 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 -80оС MDF (Sanyo, Япония), проточный цитофлуориметр FACS Calibur (BD, США), иммуноферментный анализатор Stat-Fax 2100 (Awareness Technology Inc., США), Высокопроизводительная чип-система для анализа SNP QuantStudio 12K Flex (Applied Biosystems, США), 2011, Высокопроизводительная чип-система для анализа SNP QuantStudio 12K Flex (Applied Biosystems, США), 2011, Бокс биологической безопасности, II класса AC2-4E1 «ESCO MICRO PTE LTD», Сингапур, 2011, Универсальная лабораторная центрифуга большого объема с охлаждением 4-16К фирмы Sigma (Германия), 2011, Генетический анализатор 24-капиллярный секвенатор3500XL (AppliedBiosystems, США), 2011, Система высокопроизводительного секвенирования MiSeq (Illumina), 2012, Автоматическая комплексная система для анализа нуклеиновых кислот, белков, проточной цитофлуориметрии клеток Биоанализатор Agilent 2100, «Agilent Technologies» (США), 2011, Синтезатор олигонуклеотидов Синтезатор ДНК ASM-800, 2013,



### 2.3.3 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.

### 2.3.4 Приготовление буферных растворов

PBS, используемый для приготовления отмывочного и колоночного буферного растворов, готовили, растворяя 0,005M  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  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

Буферный раствор для лизиса эритроцитов готовили, растворяя в 100 мл дистиллированной воды 83 мг  $\text{NH}_4\text{Cl}$ , 100 мг  $\text{KHCO}_3$ , 3 мг ЭДТА.

### 2.3.5 Получение суспензии клеток из лимфоорганов и их подсчет

Суспензию клеток селезенки, тимуса, брызжеечных лимфоузлов получали, гомогенизируя данные органы с помощью стеклянного гомогенизатора, используя PBS для ресуспендирования.

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.

Клетки костного мозга получали из бедренной кости после отделения мышц и отрезания дистальных отделов эпифизов, вымывая буферным раствором PBS содержимое диафизов 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.

### 2.3.6 Вычисление клеточной численности лимфоорганов

Для вычисления клеточной численности селезенки 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.

### 2.3.7 Культивирование клеток

Для стимуляции продукции IL-4 и IFN- $\gamma$ , спленоциты инкубировали в культуральной среде RPMI-1640, содержащей 10% FBS, 4 mM L-глутамина, 100 мг/мл стрептомицина и 100 МЕ/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 1 ч.

### 2.3.8 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.

### 2.3.9 Проточная цитофлуориметрия

Подготовка клеточной суспензии: клетки должны быть изолированы из ткани или крови путем лизиса эритроцитов и промывки средством, содержащим белок, например, Фосфат-буферный раствор (PBS) с 2% фетальной сердечной сыворотки (FBS). Клетки должны быть ресуспендированы в среде с высоким содержанием белка, чтобы избежать неспецифического связывания антител.

Инкубация с антителами: клетки инкубируются с антителами против T регуляторных клеток, такими как CD4, CD25 и FOXP3, при комнатной температуре в течение 30 минут в темноте. Промывка клеток: после инкубации клетки промываются холодным PBS с 2% FBS.

Фиксация и пермеабелизация: клетки фиксируются при помощи фиксатива и пермеабелизируются при помощи раствора, содержащего тритон X-100 или сапонин, что позволяет антителам проникнуть внутрь клетки и распознать внутриклеточные белки, такие как FOXP3.

Инкубация с антителами вторичных меток: клетки инкубируются с антителами вторичных меток, которые связываются с первичными антителами, чтобы обеспечить детекцию.

Анализ клеток на цитометре: клетки анализируются на потоочном цитометре, используя длину волны лазера и фильтры, чтобы обнаружить

флуоресценцию, связанную с антителами вторичных меток. Результаты анализа можно интерпретировать, используя программное обеспечение для цитометрии, которое определяет процент Т регуляторных клеток в общей популяции клеток.

#### 2.3.10 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.

На пластинки для ELISA-тестов добавляют калибровочные стандарты и образцы. Пластинки инкубируются, чтобы антитела связались с цитокинами в образцах. После этого пластинки промываются, чтобы удалить непривязанные антитела. На пластинки добавляют вторичные антитела, размеченные ферментом. Пластинки инкубируются, чтобы образовались иммунокомплексы.

После этого пластинки промываются, чтобы удалить непривязанные вторичные антитела. На пластинки добавляют разметитель фермента, который будет реагировать с ферментом, размеченным на вторичных антителах. Пластинки инкубируются, чтобы образовался колориметрический сигнал. Измеряют колориметрический сигнал при помощи спектрофотометра. С помощью калибровочных стандартов определяют концентрацию цитокинов в образцах.

#### 2.3.11 Секвенирование на MiSeq (Illumina)

Все забранные органы после предварительного взвешивания были переданы в геномную лабораторию НИИ ФиПМ им. Б.А. Атчабарова для получения образцов мРНК соответственно этапу исследования. Основой метода является секвенирование (определение нуклеотидной последовательности) всех синтезируемых мРНК в целевом объекте. На начальном этапе выделили РНК из биологического материала. Поскольку зрелая мРНК содержит поли(А) хвост (от 100 до 200 нуклеотидов аденина), с помощью специального зонда, комплементарного к поли(А) хвосту, отделили мРНК от рибосомальной, транспортной и других не кодирующих РНК, которые занимают большую часть РНК в клетке (более 90%). Далее синтезировали одноцепочечную кДНК из мРНК, с последующим синтезом двух цепочечной ДНК. Для того, чтобы синтезированные фрагменты ДНК комплементарно прикрепилась к подложке, на которой непосредственно будет проходить процедура секвенирования, к синтезированным фрагментам лигировали специальные ДНК адаптеры. К каждому образцу добавляли баркод, для идентификации образцов после секвенирования. Всего 50 образцов.

## 2.4 Статистическая обработка результатов исследования

Полученные в ходе экспериментов данные статистически обработаны при помощи программы STATISTIKA 6,0, SPSS версия 15. Количественные показатели представлены в виде  $M (CO)$ , где  $M$  – среднее значение, а  $CO$  – стандартное отклонение.

Для проверки совпадения распределения исследуемых количественных показателей с нормальным в группах использован критерий согласия Колмогорова-Смирнова. Если закон распределения исследуемых числовых показателей отличался от нормального, то значимость различий была проверена при помощи  $U$ -критерия Манна-Уитни (в случае парных независимых совокупностей), критерия Краскала-Уоллиса (в случае множественных независимых совокупностей). Различия считались значимыми при  $p < 0,05$ . Для определения существования функциональных связей между параметрами был вычислен коэффициент корреляции  $R$  Спирмана, который считался значимым при  $p < 0,05$ .

Дискриминантный анализ проведен с использованием критерия Хи-квадрат Пирсона с последовательным включением и исключением независимых переменных. Проведен канонический анализ с вычислением дискриминантных функций и использованием стандартизованных коэффициентов. Используются коэффициенты факторной структуры для вычисления корреляции между переменными дискриминирующих функций.

## 3 РЕЗУЛЬТАТЫ СОБСТВЕННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ

### 3.1 Контроль качества (FastQC) запусков номер 1-5

Объединение биоинформатики с экспериментальной геномикой открывает путь для многих достижений, которые приведут к коренным изменениям за счет повышения устойчивости индивидуума к определенным болезням и патогенам, уменьшения затрат на лечение вследствие повышения эффективности терапии и предупреждения рецидивов заболевания [274]. Сегодня ген понимается как часть генома, который может рассматриваться как транскрипционная единица и которая может транскрибироваться в различные транскрипт-варианты, в том числе благодаря альтернативному сплайсингу. В связи с этим к задачам транскриптомики относятся: выявление всех транскрипционных единиц, включая мРНК, некодирующие РНК и малые РНК; анализ транскрипционной структуры генов - сайтов инициации транскрипции, 5'- и 3'-концов генов; анализ паттернов сплайсинга и других посттранскрипционных модификаций. Основная идея, позволяющая проводить такой анализ, заключается в том, что одновременно экспрессирующиеся или репрессированные гены могут быть совместно регулируемые или функционально связанными.

Транскриптомный анализ позволяет определить какие клеточные процессы были активны в тот или иной момент времени, т.е. определить уровень экспрессии генов в анализируемом объекте (культура клеток, ткань). В человеческом организме имеется приблизительно 20,000-25,000 белоккодирующих генов. В различных тканях, а также в зависимости от физиологического состояния организма, профиль экспрессии генов может быть разным. Результаты данного анализа, могут наглядно показать, какие именно гены находятся в активном состоянии в данной культуре клеток либо ткани.

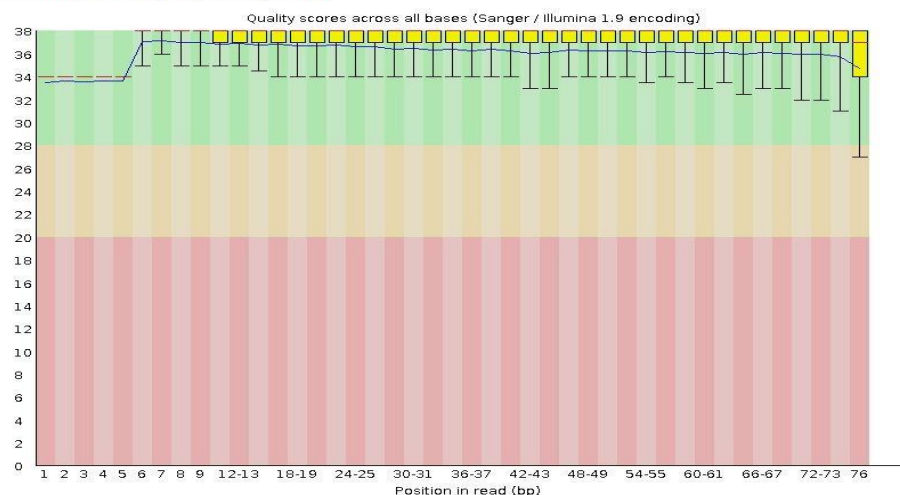
Для проведения транскриптомного анализа были отобраны следующие образцы тканей:

- тимус, селезенка, лимфатический узел, ткань воспаления, костный мозг;
- четыре условия: контроль, воспаление, металл, металл+воспаление;
- прогоны на MiSeq, 20 проб (5 органов, 4 гр.) и 5 прогонов в целом.

Использована аннотация Ensembl с геномом *rn6*. Следовательно, на первом этапе проведения биоинформатического анализа был имплементирован и проведен контроль качества (FastQC) запусков номер 1-5 (рисунок 5).

Процент выравнивания на крысиный геном довольно высокий и составляет примерно 96,7%. Процент неотображенных данных в графе «Pct\_unmapped» составил 3,3%. Выявлен достаточно высокий процент выравнивания в 1 локусе. Так, в 4 запусках процент выравнивания в одной локации колебался в районе 81,2%.

### Per base sequence quality



a

### Overrepresented sequences

Sequence	Count	Percentage	Possible Source
GATCGGAAGAGCACACGTCTGAACTCCAGTCACCTGAAGCTATCTCGTATGCGCTCTCTGCTTGAAAAAAAAA	32150	0.9334419590725623	TruSeq Adapter, Index 19 (97% over 38bp)
ATCGGAAGAGCACACGTCTGAACTCCAGTCACCTGAAGCTATCTCGTATGCGCTCTCTGCTTGAAAAAAAAA	19573	0.5682817874005369	TruSeq Adapter, Index 19 (97% over 37bp)
GTGAGCATTCGACACTTCTGTATACCTCCAGCATGCTCAGACACACCTTC	13833	0.4016268310995569	No Hit
CCCCCTTCGCGAGTAACACCAAGTACAGGAATATTAACCTGTTCCCATCGACTACGCTTTCGGCTCGCTT	11885	0.3450686682294682	No Hit
CCCCACTGCTGCTCCCGTAGGAGTCTGGACCGTGTCTCAAGTTCAGTGTGGCTGGTCACTCTCAGACCAGCT	11274	0.32732891591241264	No Hit
CCCCCTTCGCGAGTAACACCAAGTACAGGAATATTAACCTGTTCCCATCGA	10586	0.30735354832790496	No Hit
CTCCATCAGGCAGTTTCCAGACATTACTACCCGTCGCGCACTCGTCAG	10286	0.2986433589741952	No Hit
CCCCACTGCTGCTCCCGTAGGAGTCTGGACCGTGTCTCAAGTTCAGTGTGGCTGGTCACTCTCAGACCAGCT	10084	0.2927784981426973	No Hit
CTTCGCGAGTAACACCAAGTACAGGAATATTAACCTGTTCCCATCGACTA	9854	0.28610068630485314	No Hit
CTCCGTCCTCCCTTCGCGAGTAACACCAAGTACAGGAATATTAACCTGTTT	9813	0.28491029375984617	No Hit
CCTCCATCAGGCAGTTTCCAGACATTACTACCCGTCGCGCACTCGTCAGCAAGAAGCAAGCTTCTCCTGTT	9456	0.2745451684289315	No Hit
CCCCCTTCGCGAGTAACACCAAGTACAGGAATATTAACCTGTTCCCATCG	8648	0.2510857251029399	No Hit
CCCATATTCAGACAGGATACACAGTGTCCCGCTACTCATCGAGCTCAC	7489	0.21743536023310792	No Hit

б

Рисунок 5 – Контроль качества FastQC

Процент рибосомальной РНК низкий, т.к. библиотека проводилась при помощи полиселекции, что является хорошим признаком, т.к. для наших исследований представляет собой лишний «шум». Средняя глубина около 2М.

Если за один запуск будет анализировано несколько образцов, к каждому образцу добавляется так называемый баркод, для идентификации образцов после секвенирования. В зависимости от того, сколько транскриптов определенного гена было в данной клетке, столько и будет прочтений данной мРНК на секвенаторе (таблица 3).

Т.е. если экспрессия какого-либо гена в клетке была на высоком уровне, соответственно это можно будет наблюдать по большому количеству прочтений данного транскрипта после секвенирования.

Либо наоборот, если определенный ген не экспрессировался либо уровень экспрессии был слишком низкий в клетке, прочтение данного транскрипта

будет невозможным, в связи с его отсутствием. В связи с чем, процент кодирующего и транскрибируемого участка генома, отображенного в графах «Pct\_coding» и «Pct\_UTR», в общей сумме превышавший 79%, указывал на высокий процент прочтений. Среднее количество ридов на 4 запуска после процедуры нормализации составило порядка двух миллионов.

Таблица 3 – Контроль качества секвенирования 1-5

Образец	N_reads	Pct_map ped	Pct_mapped_lloc	Pct_unmap ped	Pct_r RNA	Pct_coding	Pct_UTR	Pct_intro nic	Pct_inter genic
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
1 ран									
АВ-лимф	1393029	96,76	85,66	3,24	0,07	50,71	20,47	13,78	14,97
АВ-селезенка	6710411	96,31	83,16	3,7	0,11	58,43	20,91	7,97	12,58
АВ-селезенка	4351977	96,3	84,78	3,69	0,08	57,41	18,44	11,58	12,5
АВ-Ме-селезенка	2716432	96,79	84,64	3,21	0,42	55,64	23,93	6,58	13,43
АВ-Ме-селезенка	7954839	96,88	84,15	3,13	0,18	53,89	22	10,46	13,47
АВ-Ме-тимус	2858311	97,67	86,75	2,32	0,29	52,14	19,42	12,89	15,26
Ме-лимф	4208066	97,17	84,37	2,84	0,86	51,92	23,63	9,43	14,16
Ме-тимус	862058	96,74	86,29	3,25	0,13	49,71	18,32	16,77	15,07
М	3881890	96,83	84,98	3,17	0,27	53,73	20,89	11,18	13,93
2 ран									
Контроль-лимф	2312641	98,24	86,52	1,76	0,09	45,83	23,92	13,02	17,14
Контроль-тимус	1915785	97,94	88,33	2,06	0,39	43,22	24,37	14,31	17,71
АВ-Ме-лимф	2168347	96,8	80,66	3,2	0,07	52,87	21,46	10,98	14,63
АВ-Ме-лимф	2577890	95,94	80,67	4,06	0,07	53,59	19,1	13,28	13,95
АВ-Ме-тимус	2809805	96,24	79,83	3,77	0,32	55,59	18,53	11,7	13,87
АВ-Ме-тимус	2891575	96,84	83,02	3,16	0,1	52,48	20,68	12,58	14,16
Ме-лимф	2021810	97,25	85,24	2,76	0,04	53,78	19,99	11,92	14,26
Ме-лимф	2987094	96,34	81,86	3,66	0,09	62,18	19,32	5,81	12,6
Ме-селезенка	1884374	97,55	84,69	2,44	0,04	53,82	24,51	5,65	15,98
Ме-тимус	2773333	97,07	85,05	2,94	0,05	58,26	15,61	12,81	13,27
Ме-тимус	3065786	96,92	84,12	3,08	0,07	58,49	19,19	7,57	14,67
М	2491676	97,01	83,64	2,99	0,12	53,65	20,61	10,88	14,749 09091
3 ран									
АВ-лимф	4301079	94,1	76,83	5,89	0,03	55,6	15,54	15,45	13,38
АВ-селезенка	2509912	91,56	80,41	8,43	2,54	52,39	22,38	8,93	13,78
АВ-тимус	4141938	97,69	84,09	2,3	0,03	59,68	18,94	7,15	14,2

Продолжение таблицы 3

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
АВ-тимус	3084116	98,38	86,98	1,62	0,03	54,13	20,31	10,73	14,8
АВ-тимус	2989838	98,21	86,33	1,79	0,05	50,01	22,06	11,25	16,63
АВ-Ме-селезенка	3500557	96,15	82,48	3,85	0,36	52,01	25,82	7,21	14,61
АВ-Ме-лимф	2315547	92,91	72,4	7,08	0,12	57,47	22,96	7,42	12,03
Ме-селезенка	3105191	95,48	82,6	4,51	0,44	56,68	22,65	7,26	12,98
Ме-селезенка	2886597	97,22	86,25	2,77	0,07	51,46	21,05	12,99	14,44
М	3203863	95,74	82,04	4,25	0,41	54,381	21,30	9,82	14,09
4 ран									
Контроль-кровь	2494741	97,33	74,98	2,68	0,3	75,03	21,05	0,16	3,47
АВ-кровь	2894455	98,58	70,24	1,42	0,06	81,93	12,21	0,43	5,37
АВ-кровь	2848349	97,57	83,96	2,43	0,13	57,08	20,8	10,71	11,28
АВ-кровь	1821534	96,56	76,55	3,44	0,55	70,35	24,94	0,17	3,99
АВ-лимф	2305881	91,78	77,34	8,22	0,45	51,25	26,42	6,7	15,18
Ме-кровь	2222649	97,81	73,35	2,19	0,22	78,86	16,78	0,2	3,93
Ме-кровь	3230751	98,7	71,61	1,3	0,11	81,62	13,9	0,21	4,16
Ме-кровь	2462802	96,17	73,14	3,83	0,43	73,98	21,2	0,17	4,23
АВ-Ме	2885549	98,18	74,96	1,83	0,37	72,85	22,33	0,18	4,27
АВ-Ме	3036697	98	69,31	1,99	0,15	80,23	14,18	0,18	5,25
АВ-Ме	2739788	98,14	71,46	1,86	0,08	81,9	13,66	0,17	4,18
М	2631199	97,16	74,26	2,84	0,26	73,19	18,86	1,75	5,94
М	3052157	96,69	81,23	3,31	0,26	58,74	20,41	8,41	12,18

Для оценки экспрессии генов в разных тканях просчитывали процент объясненной вариации. На рисунке б представлены отличия экспрессии генов на транскриптомном уровне.

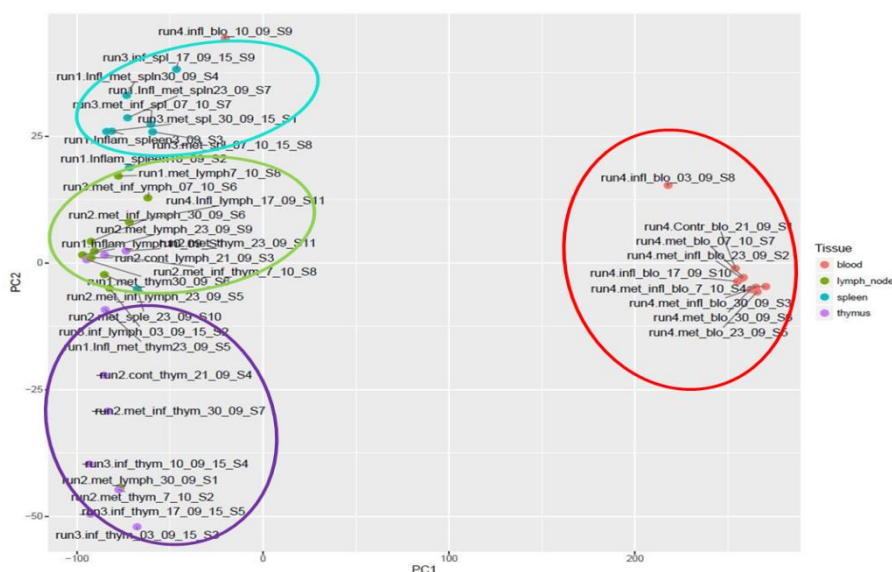


Рисунок б – Систематическая разница в экспрессии генов между лимфоорганами



С помощью процента объясненной вариации стало видно, что все точки по своей цветовой гамме группируются вместе, что отличает их друг от друга.

Далее четкие групповые различия экспрессии генов (для групп: контроль; АВ; ВА+БК; АВ+ВА+БК) также обнаружены в тимусе (рисунок 7).

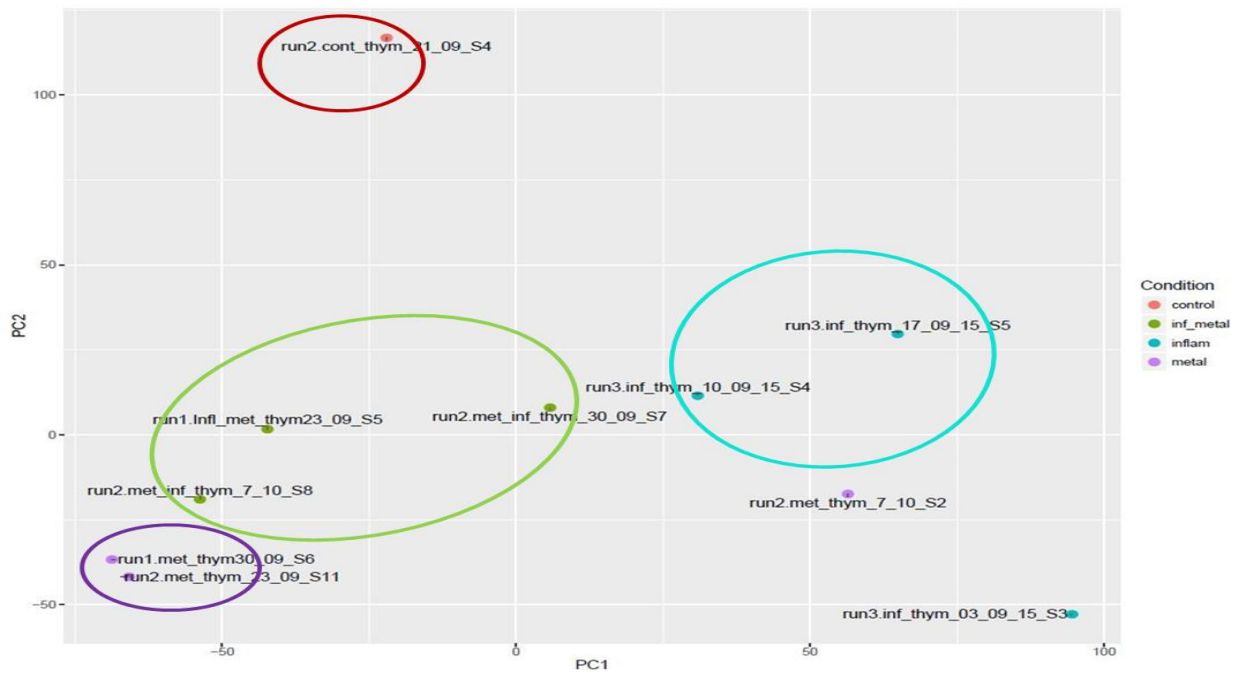


Рисунок 7 – Систематическая разница в экспрессии генов в тимусе

Для лимфоузлов по результатам предварительного анализа систематической разницы в экспрессии генов не выявлено (рисунок 8).

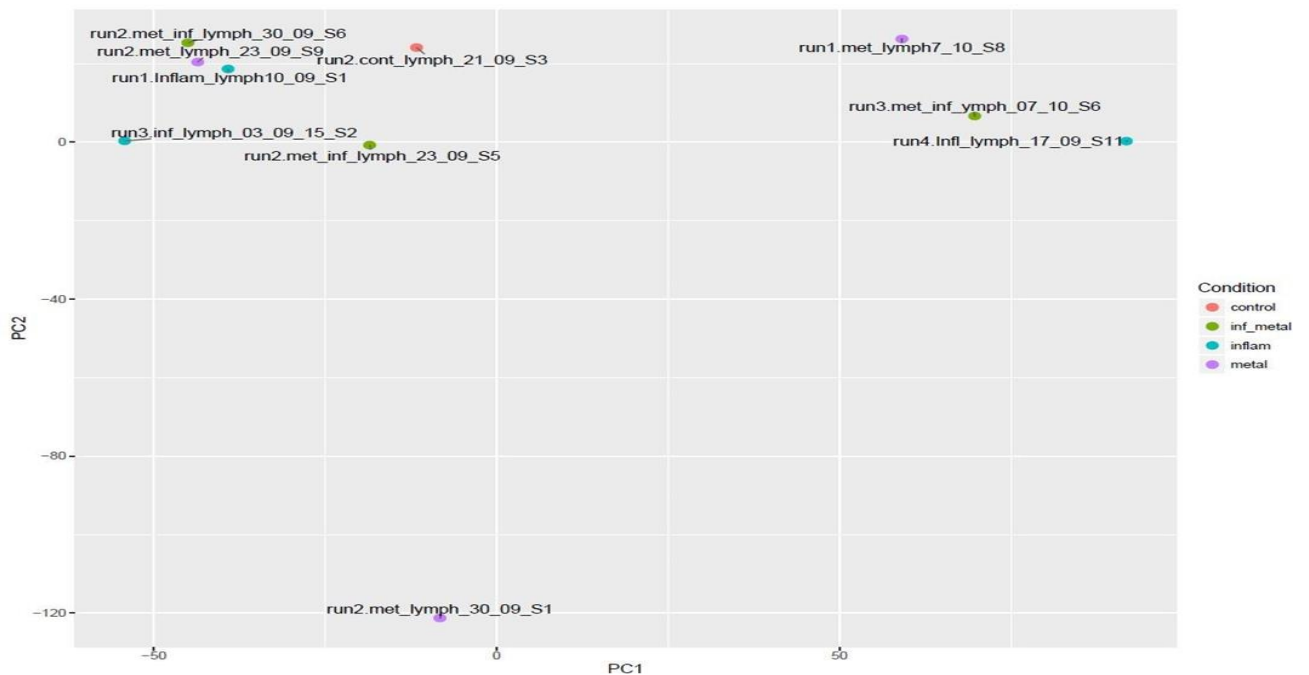


Рисунок 8 – Систематическая разница в экспрессии генов в брыжеечном лимфоузле

В картине экспрессии генов в образцах крови было обнаружено два статистических выброса (рисунок 9).

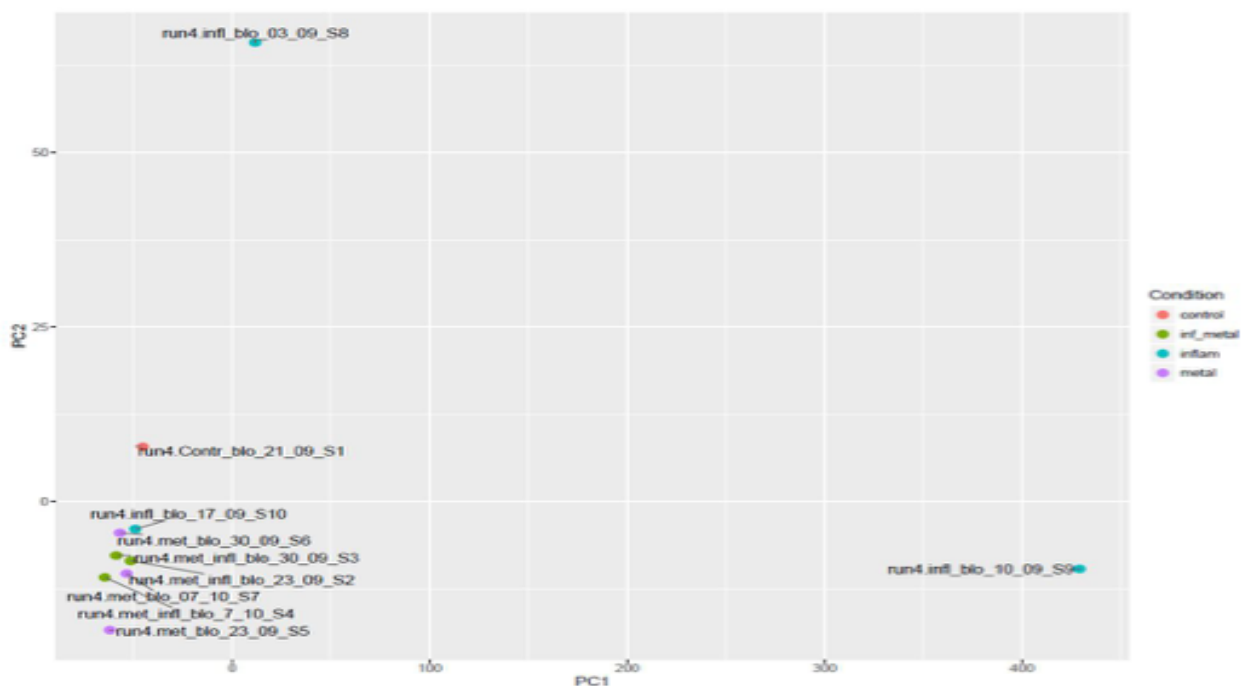


Рисунок 9 – Систематическая разница в экспрессии генов в крови

Для селезенки по результатам предварительного анализа систематической разницы в экспрессии генов также не выявлено (рисунок 10).

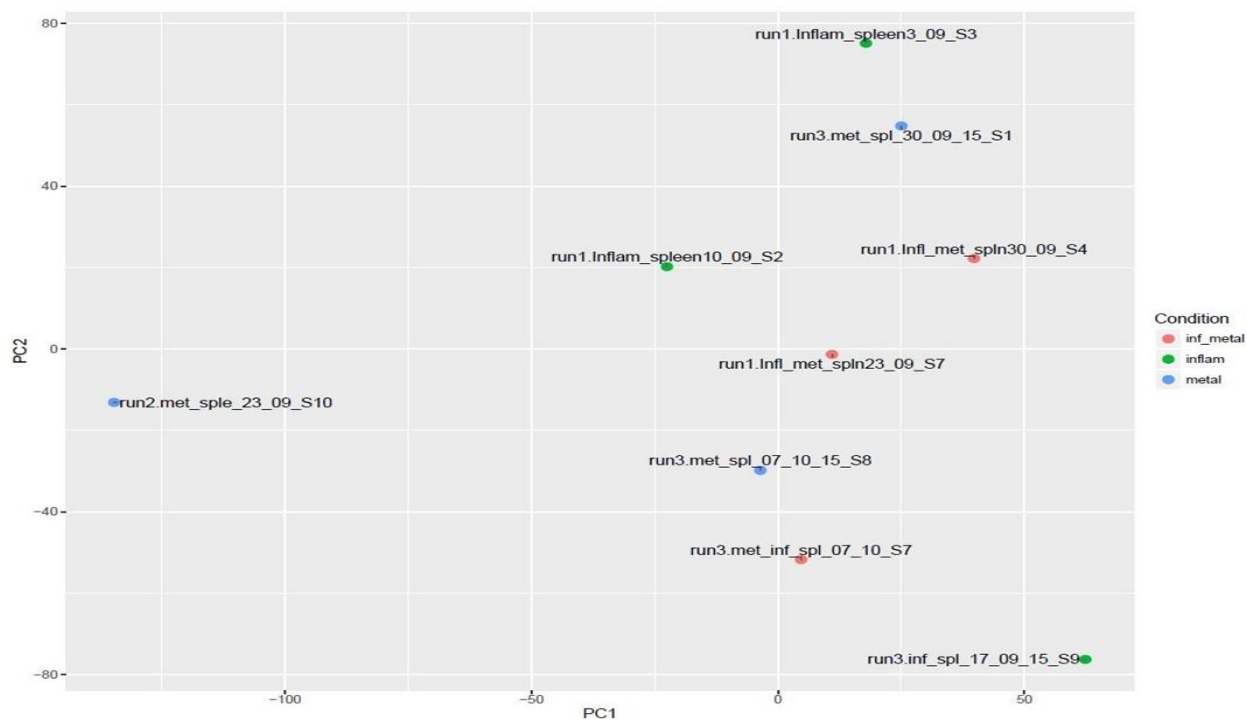


Рисунок 10 – Систематическая разница в экспрессии генов в селезенке

В экспрессии генов образцов контрольной группы наблюдалось явное отличие от показателей групп «Металл» и «Металл+воспаление».

Ниже на рисунке 11 представлена таблица с просчитанной наибольшей экспрессионной активностью генов образцов лимфоорганов опытных крыс.



Рисунок 11 – Экспрессионная активность генов образцов лимфоорганов опытных крыс

Таким образом, наглядные групповые различия были представлены в тимусе.

Далее в геномном браузере IGV была произведена сборка гпб, где графики покрытия в формате tdf совпали с нужными генами. При ближайшем рассмотрении многие органы имели контаминацию глобином. Все белки глобина были идентифицированы и удалены (рисунок 12).

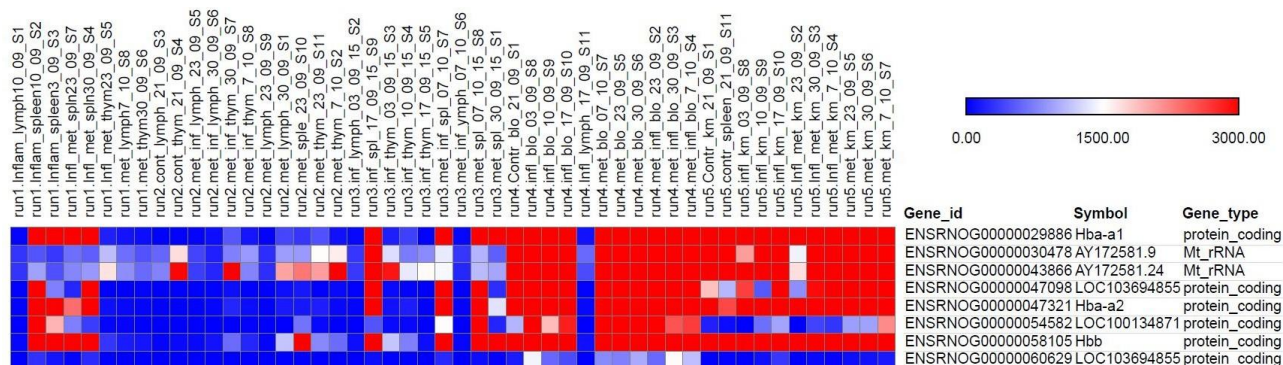


Рисунок 12 – Очистка данных

Примечание – Из-за присутствия геномной ДНК в экстракте РНК был использован модифицированный протокол с использованием раствора ДНКазы I компании Epicentre для удаления загрязнения геномной ДНК

После применения autoscale была выравнена высота трека в соответствии с локальным максимумом, в результате чего было достигнуто покрытие

экспрессируемого гена от 0 до 1500. Из образцов run1 и run2 первого запуска были отобраны треки с наибольшей экспрессионной активностью гена. Так, результаты покрытия в треках «run1.infl-met-spln-30-09\_s4.tdf», «run1.inflam-spleen-10-09\_s2.tdf», «run2.met-lymph-30-09\_s1.tdf» достигали локального максимума покрытий соответственно 916, 1063 и 1054. Образцы селезенки и брыжеечных лимфатических узлов принадлежали группам «АВ», «Ме», «Ме+АВ» на 7 сутки эксперимента (рисунок 13).

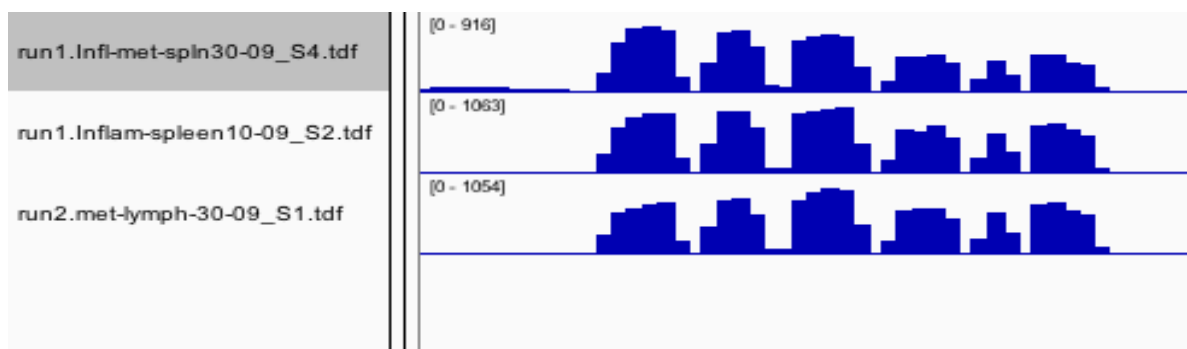


Рисунок 13 – Экспрессионная активность GAPDH в образцах селезенки и брыжеечных лимфатических узлов опытных крыс

Дальнейшая задача состоит в том, чтобы визуализировать дифференциальную экспрессию генов в геномном браузере, что позволит увидеть интронно-экзонную структуру и количество ридов, которое падает на конкретный ген. На примере одного гена была изучена его экспрессия. Так, на 4 хромосоме была обнаружена высокая экспрессионная активность гена GAPDH (Glyceraldehyde-3-Phosphate Dehydrogenase) в лимфоорганах крыс: селезенке и брыжеечных лимфатических узлах всех групп на 7 сутки исследования (рисунок 13).

Результаты аминокислотной последовательности и экзонная структура гена представлена на рисунке 14.



Рисунок 14 – Структура экзона, содержащего GAPDH с последовательностью аминокислот в образцах селезенки и брыжеечных лимфатических узлов опытных крыс

Ген GAPDH относят к генам «домашнего хозяйства» (англ. housekeeping genes). Они необходимы для поддержания важнейших жизненных функций организма, экспрессируются практически во всех тканях и клетках на относительно постоянном уровне. Гены домашнего хозяйства функционируют

повсеместно, на всех стадиях жизненного цикла организма. Ген GAPDH расположен на 4 хромосоме.

Глицеральдегид-3-фосфат-дегидрогеназа (сокращенно GAPDH или, реже, как G3PDH) представляет собой фермент ~ 37kDa, катализирующий шестой этап гликолиза. Кроме того, он участвует в регуляции неметаболических процессов, таких как активация транскрипции, инициация апоптоза, регуляция аксонного транспорта, модулирует организацию и сборку цитоскелета. Было установлено, что GAPDH участвует в регуляции врожденного и адаптивного иммунитета. GAPDH является компонентом комплекса GAIT (Gamma interferon-activated inhibitor of translation), который опосредует торможение воспалительных процессов путем интерферон-гамма индуцированной селективной трансляции.

Сложным этапом дальнейших исследований является тщательное изучение результатов транскриптомного анализа, правильная трактовка возможных регуляторных механизмов и проведение систематического молекулярного анализа, связанного с выявлением множества многопрофильных генов, таких как GAPDH и расшифровкой их сигнальных и метаболических путей. Однако нельзя исключать различий видоспецифических адаптаций иммунной системы и альтернативного сплайсинга ортологичных генов крыс.

Таким образом, на данном этапе исследований была проведена первичная обработка транскриптомного анализа.

Выводы биоинформатического анализа:

– наблюдаются существенные различия между транскриптомом лимфоорганов;

– существенные межгрупповые различия обнаружены в тимусе.

Дальнейший анализ экспрессионного профиля генома приведет к прогрессу в понимании молекулярных механизмов, регулирующих течение воспаления.

### 3.1.2 Анализ дифференциальной экспрессии генов в лимфоорганах экспериментальных крыс

Для выравнивания ENCODE Transcriptome RNA-seq было использовано программное обеспечение Spliced Transcripts Alignment to Reference (STAR) [275].

Проверку контроля качества необработанных данных последовательности, поступающих из высокопроизводительных последовательностей - FastQC проводили по программе <https://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/>.

Для количественного определения транскрипта из данных РНК-Seq использовали программный пакет RSEM [276].

Для визуализации использовали интегративный анализатор геномики (IGV) – высокопроизводительный инструмент визуализации для интерактивного исследования больших интегрированных геномных наборов данных. Он поддерживает широкий спектр типов данных, включая массивные и последующие данные последовательности и геномные аннотации [277].

Дифференциальную экспрессию генов определяли в пакете DESeq2 [278].

Было обработано 9 сравнений и только тимус вызывал устойчивые различия экспрессии на геномном уровне (таблица 4).

Таблица 4 – Различия экспрессии на геномном уровне между группами

Ткань/орган	Состояние 1	Состояние 2	Регулируемые гены (FDR 10%)	Нерегулируемые гены (FDR 10%)
Кровь	Воспаление	Металл+воспаление	0	0
Кровь	Воспаление	Металл	2	1
Костный мозг	Металл	Металл+воспаление	0	0
Лимфатические узлы	Воспаление	Металл+воспаление	1	0
Лимфатические узлы	Воспаление	Металл	1	0
Селезенка	Воспаление	Металл+воспаление	0	0
Селезенка	Воспаление	Металл	0	0
Тимус	Воспаление	Металл+воспаление	1181	937
Тимус	Воспаление	Металл	13	167

В результате проведенного биоинформатического анализа были идентифицированы 20 белоккодирующих генов (таблица 5).

Таблица 5 – Анализ дифференциальной экспрессии генов

Группа_ID	Символ	Локация	Количество экзонов	Полное название	Значение	Описание	p value
1	2	3	4	5	6	7	8
ENSRNOG0000013820	Tnfrsf4	5q36	9	TNF receptor superfamily member 14	300,9	Апоптоз, иммунный воспалит. ответ	9,96E-05
ENSRNOG0000034164	Cr2	13q27	27	complement C3d receptor 2	600,2	-	3,43E-06
ENSRNOG0000060479	Sp3	3q23	7	Sp3 transcription factor	332,0	В-клеточная дифференциация	8,45E-06
ENSRNOG0000029885	Stag2	Xq35	36	stromal antigen 2	1102,9	негативная регуляция эндонукликации ДНК	1,03E-05
ENSRNOG0000003220	H3f3a	13q26		H3 histone, family 3A	527,4	Связывание гистонов	6,96E-06
ENSRNOG0000030763	Dpp4	3q21	27	dipeptidylpeptidase 4	359,0	катализирует деградацию глюкогоноподобного пептида-Glp-1; участвует в протеолизе и пептидолизе	6,52E-06

Продолжение таблицы 5

1	2	3	4	5	6	7	8
ENSRNOG0000014846	Anp32a	8q	6	acidic nuclear phosphoprotein 32 family member A	401,1	Пролиферация, дифференцировка, апоптоз, подавление трансформации	1,24E-05
ENSRNOG0000004864	Prpf40a	3q12	27	pre-mRNA processing factor 40 homolog A	472,8	-	1,50E-05
ENSRNOG0000059714	Hsp90a1	6q32	11	heat shock protein 90, alpha (cytosolic), class A member 1	3398,4	участвует в секвестрировании поврежденных белков и в АТФ-зависимом сворачивании белков	1,69E-05
ENSRNOG0000012455	Tardbp	5q36	8	TAR DNA binding protein	743,9	Отрицательная регуляция экспрессии генов	2,32E-05
ENSRNOG0000007029	Dnaj1	5q22	10	DnaJ heat shock protein family (Hsp40) member A1	871,9	Взаимодействует с N-концевым фрагментом hsc70; участвует в восстановлении и повреждениях ДНК	2,27E-05
ENSRNOG0000016448	Eef2k	1q36	20	eukaryotic elongation factor-2 kinase	30,2	катализирует фосфорилирование фактора элонгации 2 эукариот (eEF2)	1,30E-02
ENSRNOG0000017510	Mfge8	1q31	10	milk fat globule-EGF factor 8	287,7	участвует в O-ацетилировании ганглиозида GD3 сиаловой кислоты	6,13E-03
ENSRNOG0000016047	Macf1	5q36	106	microtubule-actin crosslinking factor 1	449,2	Играет ключевую роль в заживлении ран и миграции эпидермальных клеток	9,67E-04
ENSRNOG0000015026	Arhgef11	1q21	28	Rho guanine nucleotide exchange factor 11	12,8	может модулировать активность переносчика глутамата	1,20E-02

Продолжение таблицы 5

1	2	3	4	5	6	7	8
ENSRNOG0000013469	Txndc5	17p12	10	thioredoxin domain containing 5	357,4	апоптоз	1,73E-04
ENSRNOG0000058561	Srrm2	10q12	16	serine/arginine repetitive matrix 2	503,49	Молекулярная функция	2,53E-05
ENSRNOG0000012160	Syk	17p14	15	spleen associated tyrosine kinase	100,9	Регулирует врожденный и адаптивный иммунитет	1,02E-06
ENSRNOG0000016460	Clu	15p12	11	clusterin	459,5	Апоптоз, прогрессирование опухоли	1,40E-05
ENSRNOG0000018311	Cd19	1q36	15	CD19 molecule	152,0	Сигнализация В-клеточного рецептора	1,54E-08

Повышение экспрессии генов в микрочипах определяли в случае изменения экспрессии генов более чем в 2 раза определяли как гены с повышенной экспрессией, тогда как гены, экспрессия которых снижалась более чем в 2 раза на микрочипах, определяли как гены с подавленной экспрессией. Таким образом, гены с изменениями экспрессии при  $|\log_2FC| > 1$  и  $p < 0,05$  определяли как дифференциально экспрессируемые гены.

### 3.1.3 Анализ генных комплексов с использованием базы данных MSigDB на основе анализа генного обогащения (GSEA)

Дальнейшая задача состояла в исследовании полученных результатов в рамках сигнальных и метаболических путей. Анализ сигнальных и метаболических путей проводили с использованием базы данных MSigDB с программным обеспечением GSEA [279].

Мы использовали точный тест Фишера для изучения того, были ли категории генов обогащены среди идентифицированных генов опытных крыс. Мы использовали категории генов из Киотской энциклопедии генов и генома (KEGG), биологического процесса онтологии генов (GOBP), какнонических путей и Hallmark.

Набор генов, тестировали на обогащение (отдельно для upregulated и downregulated генов) в категориях с перекрытием более одного гена. *P*-значение от точного теста - вероятность того, что перекрытие между набором генов и категорией гена не будет больше, чем для случайных наборов генов такого размера в контрольном наборе. Для значений *P*, полученных из этих тестов, вычисляли FDR.

Поскольку существенные групповые различия экспрессии на геномном уровне были обнаружены в тимусе, дальнейшие результаты будут представлены только для этого органа. Было проведено два отдельных сравнения групп: воспаление против металл+воспаление.



Благодаря анализу метаболических и сигнальных путей, в которых участвуют гены, обнаруженные в образцах тимуса крыс, выявлены существенные изменения функционирования врожденного и адаптивного иммунитета. Мы представляем выявленные биологические пути двух интересующих нас групп: животных с асептическим воспалением (АВ) и животных с асептическим воспалением, вызванным на фоне интоксикации соединениями металлов (Me+AB). Дифференциальные модели экспрессии генов у сравниваемых групп обширны и сгруппированы по нескольким основным путям. Ниже приведены сведения, полученные из базы данных MsigDB с программным обеспечением GSEA.

Для проверки результатов проведенных исследований использованы две из семи коллекций MsigDB: C2 – гены, сгруппированные по каноническим путям, C3 – гены, разделяющие цис-регулятивные мотивы выше или ниже их кодирующих последовательностей.

Сначала мы идентифицировали группы схожих наборов генов в соответствии с их индивидуальными перекрытиями на основе генов, используя консенсусную кластеризацию. Начиная с наборов генов из коллекции C2, консенсусная группировка сгруппировала их в 953 кластера, из коллекции C3 – в 258. Далее эти гены были протестированы на обогащение путей GOBP, KEGG, Halmark.

Таблица 6 – Аннотации MsigDB upregulated: GO biological process. Тимус: сравнение групп АВ и Me+AB

Название набора генов	# Genes in Gene Set (K)	# Genes in Overlap (k)	k/K	p-value	FDR q-value
GO_КЛЕТОЧНЫЙ_ЦИКЛ	1316	201	0.1527	1.28E-111	5.68E-108
GO_ПРОЦЕСС_КЛЕТОЧНОГО_ЦИКЛА	1081	168	0.1554	9.72E-94	2.16E-90
GO_МИТОТИЧЕСКИЙ_КЛЕТОЧНЫЙ_ЦИКЛ	766	142	0.1854	1.58E-89	2.33E-86
GO_ХРОМОСОМНАЯ ОРГАНИЗАЦИЯ	1009	135	0.1338	1.66E-66	1.84E-63
GO_МОДИФИКАЦИЯ_БЕЛКА_ПУТЕМ_МАЛОГО_БЕЛКОВОГО_КОНЬЮГИРОВАНИЯ_ИЛИ_УДАЛЕНИЯ	873	124	0.142	5.17E-64	4.59E-61
GO_РЕГУЛЯЦИЯ_КЛЕТОЧНОГО_ЦИКЛА	949	122	0.1286	4.89E-58	3.62E-55
GO_УСТАНОВЛЕНИЕ_ЛОКАЛИЗАЦИИ_В_КЛЕТКЕ	1676	151	0.0901	1.45E-51	9.20E-49
GO_ОБРАБОТКА_РНК	835	105	0.1257	5.70E-49	3.16E-46
GO_ЛОКАЛИЗАЦИЯ_БЕЛКА	1805	153	0.0848	6.72E-49	3.31E-46
GO_КЛЕТОЧНЫЙ_ОТВЕТ_НА_СТРЕСС	1565	140	0.0895	2.40E-47	1.07E-44
Итого:	11875				

В соответствии с таблицей 6, анализ отдельно для upregulated показал 10 значительно обогащенных наборов генов из категории GOBP.

Так, 11875 регулируемых генов были обогащены для 10 категорий GOBP (FDR <0,05), включая процесс клеточного ответа на стресс (1565 генов, из которых 140 генов перекрываются с этой категорией, FDR=1,07E-44).

Таблица 7 – Аннотации MsigDB upregulated: Canonical pathways. Тимус: сравнение групп АВ и Me+AB

Название набора генов [# Genes (K)]	Описание	# Genes in Gene Set (K)	Genes in Overlap (k)	p-value	FDR q-value
Регулируемые канонические пути					
РЕАСТОМЕ_КЛЕТОЧНЫЙ ЦИКЛ [421]	Гены, вовлеченные в клеточный цикл	421	85	1,46 e <sup>-56</sup>	1,95 e <sup>-53</sup>
РЕАСТОМЕ_ИММУННАЯ СИСТЕМА [933]	Гены, вовлеченные в иммунную систему	933	91	1,30 e <sup>-33</sup>	3,46 e <sup>-31</sup>
РЕАСТОМЕ_АДАПТИВНАЯ ИММУННАЯ СИСТЕМА [539]	Гены, участвующие в адаптивной иммунной системе	539	61	5,317 e <sup>-26</sup>	5,17 e <sup>-24</sup>
Итого:		1893	237		

В соответствии с таблицей 7, 1893 регулируемых гена были обогащены для 3 канонических путей (клеточный цикл, иммунная система и адаптивная иммунная система) (237 перекрытий генов, FDR= 5,17E-24).

Воспаление является частью защитных механизмов врожденного иммунитета, возникающих после повреждения тканей. В месте воспаления каскад медиаторов, таких как цитокины, инициирует активацию воспалительных клеток [280]. Затем белые кровяные клетки мигрируют через стенку кровеносных сосудов и проникают в окружающие ткани. Все это объясняет выявленные пути, связанные с воспалением у контрольных крыс с асептическим воспалением. При воспалении широко изучено производство как про-, так и противовоспалительных цитокинов при сепсисе [281, 282].

Хотя провоспалительные цитокины необходимы для инициирования эффективного воспалительного процесса против инфекции, противовоспалительные цитокины, по-видимому, являются предпосылкой для снижения регуляции воспалительного ответа, приводящего к депрессии иммунной системы, что наблюдалось у животных группы Me+AB [283].

По сравнению с регулируемыми генами, наборов с нерегулируемыми генами (с пониженной экспрессией) значительно больше. Так, из базы GO biological process мы идентифицировали 6 метаболических путей, включая процессы, связанные с развитием или функционированием иммунной системы

(162 перекрытия генов, FDR= 1,32E-56), процессы, поддерживающие скорость ответа на стимул, производства ферментов, экспрессии генов (146 перекрытий генов, FDR= 5,98E-47) и процессы, модулирующие иммунную систему (112 перекрытий генов, FDR= 1,82E-37), (таблица 8).

Таблица 8 – Аннотации MsigDB downregulated: Canonical pathways. Тимус: сравнение групп АВ и Me+AB

Название набора генов	Genes in Gene Set (K)	Genes in Overlap (k)	k/K	p-value	FDR q-value
GO_ПРОЦЕСС_ИММУННОЙ_СИСТЕМЫ	1984	162	0.0817	4.35E-60	1.32E-56
GO_ПОЛОЖИТЕЛЬНАЯ_РЕГУЛЯЦИЯ_МОЛЕКУЛЯРНОЙ_ФУНКЦИИ	1791	154	0.086	5.95E-60	1.32E-56
GO_ВНУТРИКЛЕТОЧНАЯ_ПЕРЕДАЧА_СИГНАЛОВ	1572	140	0.0891	3.88E-56	5.74E-53
GO_ПОЛОЖИТЕЛЬНАЯ_РЕГУЛЯЦИЯ_КАТАЛИТИЧЕСКОЙ_АКТИВНОСТИ	1518	133	0.0876	2.04E-52	2.26E-49
GO_РЕГУЛЯЦИЯ_ВНУТРИКЛЕТОЧНОЙ_ПЕРЕДАЧИ_СИГНАЛОВ	1656	137	0.0827	4.20E-51	3.73E-48
GO_ПОЛОЖИТЕЛЬНОЕ_РЕГУЛИРОВАНИЕ_ОТВЕТА_НА_СТИМУЛ	1929	146	0.0757	8.09E-50	5.98E-47
GO_КЛЕТОЧНЫЙ_ОТВЕТ_НА_ОРГАНИЧЕСКОЕ_ВЕЩЕСТВО	1848	138	0.0747	2.57E-46	1.63E-43
GO_МЕТАБОЛИЧЕСКИЙ_ПРОЦЕСС_СОЕДИНЕНИЯ_СОДЕРЖАЩЕГО_ФОСФАТ	1977	137	0.0693	2.53E-42	1.40E-39
GO_ТРАНСПОРТ,_ОПОСРЕДОВАННЫЙ_ВЕЗИКУЛАМИ	1239	106	0.0856	1.19E-40	5.87E-38
GO_REGULATION_OF_IMMUNE_SYSTEM_PROCESS	1403	112	0.0798	4.09E-40	1.82E-37

Из базы Hallmark мы выбрали 4 набора генов, регулирующих иммунную систему, среди них гены, повышающиеся в ответ на IFNG (26 перекрытий генов, FDR= 2,40E-13), гены, регулирующие STAT5 в ответ на стимуляцию IL2 (22 перекрытия генов, FDR= 2,96E-10), гены, регулирующие воспалительный ответ (18 перекрытий генов, FDR= 2,08E-07), гены, регулирующие NF-κB в ответ на TNF (18 перекрытий генов, FDR= 2,08E-07). Естественно ожидать, что регуляция этих процессов оказалась нарушенной в связи с понижением экспрессии этих генов. Известно, что NF-κB сигнальный путь приводит к транскрипции белков, участвующих в жизнеобеспечении клетки, пролиферации, воспалительном ответе, предотвращении апоптоза [284]. Исследованиями субпопуляционного состава лимфоцитов у опытных крыс с асептическим воспалением было установлено снижение содержания как CD4+, так и CD8+-лимфоцитов. Мы предполагаем, что активации лимфопоэза не

происходило вследствие снижения костномозгового лимфопоэза, а также апоптоза лимфоцитов.

Анализ downregulated из категории канонических путей выявил 9 значительно обогащенных наборов генов, 8 из которых характеризовали существенную дисфункцию иммунной системы (таблица 9).

Таблица 9 – Аннотации MsigDB downregulated: Canonical pathways. Тимус: сравнение групп АВ и Me+AB

Название набора генов [# Genes (K)]	Количество генов	Описание	Genes in Overlap (k)	p-value	FDR q-value
Нерегулируемые					
Канонические пути					
РЕАСТОМЕ_ИММУННАЯ СИСТЕМА	933	Гены, вовлеченные в иммунную систему	82	2,64 e <sup>-32</sup>	3,51 e <sup>-29</sup>
PID_VCR_5 ПУТЬ	65	VCR сигнальный путь	23	6,26 e <sup>-24</sup>	4,16 e <sup>-21</sup>
KEGG_ПУТЬ СИГНАЛИЗАЦИИ В-КЛЕТОЧНОГО РЕЦЕПТОРА	75	Путь передачи сигналов рецептора В-клеток	22	6,74 e <sup>-21</sup>	2,98 e <sup>-18</sup>
РЕАСТОМЕ_АДАПТИВНАЯ ИММУННАЯ СИСТЕМА	539	Гены, участвующие в адаптивной иммунной системе	47	8,39 e <sup>-19</sup>	2,79 e <sup>-16</sup>
АНТИГЕН, АКТИВИРУЮЩИЙ В-КЛЕТОЧНЫЙ РЕЦЕПТОР	29	Гены, вовлеченные в антиген, активируют рецептор В клеток, ведущих к поколению вторых посланников	12	4,24 e <sup>-14</sup>	9,39 e <sup>-12</sup>
РЕАСТОМЕ_ЦИТОКИНОВАЯ СИГНАЛИЗАЦИЯ В ИММУННОЙ СИСТЕМЕ	270	Гены, вовлеченные в цитокиновую сигнализацию в иммунной системе	28	1,39 e <sup>-13</sup>	2,65 e <sup>-11</sup>
РЕАСТОМЕ_СИГНАЛИЗАЦИЯ ДЛЯ NGF	217	Гены, участвующие в сигнале NGF	25	2,63 e <sup>-13</sup>	4,37 e <sup>-11</sup>
KEGG_ЛИЗОСОМЫ	121	Лизосомы	19	7,29 e <sup>-13</sup>	1,08 e <sup>-10</sup>
SIG_VCR_СИГНАЛЬНЫЕ ПУТИ	46	Участники канала сигнализации VCR	13	1,13 e <sup>-12</sup>	1,50 e <sup>-10</sup>
Итого:	2295				

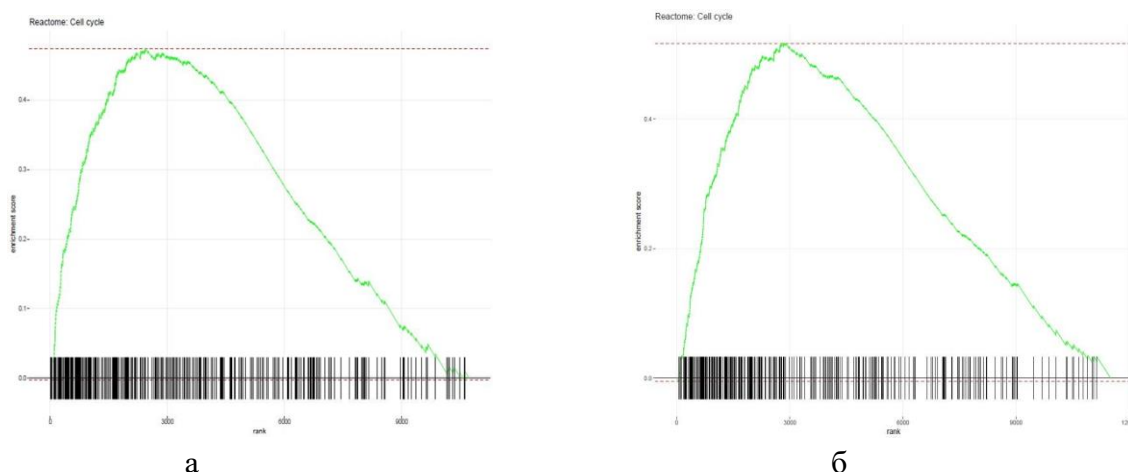
Так, 2295 нерегулируемых гена обогащали 9 канонических путей, включая гены, вовлеченные в иммунную систему (82 перекрытия генов, FDR= 3,51E-29), гены, регулирующие VCR сигнальный путь (23 перекрытия генов, FDR= 4,16E-21), путь передачи сигналов рецептора В-клеток (22 перекрытия генов, FDR= 2,98E-18), гены, участвующие в адаптивной иммунной системе (47 перекрытий генов, FDR= 2,79E-16), гены вовлеченные в антиген и активирующие рецептор В-клеток (12 перекрытий генов, FDR= 9,39E-12), гены, вовлеченные в цитокиновую сигнализацию в иммунной системе (28

перекрытий генов, FDR= 2,65E-11), гены, участвующие в сигнале NGF (25 перекрытий генов, FDR= 4,37E-11), гены, регулирующие лизосомы (19 перекрытий генов, FDR=1,08 e<sup>-10</sup>), участники канала сигнализации BCR (13 перекрытий генов, FDR= 1,50E-10).

Полная таблица GSEA доступна в виде файлов Excel. Наборы данных доступны в MSigDB: <http://software.broadinstitute.org/gsea/msigdb/annotate.jsp> (требуется регистрация).

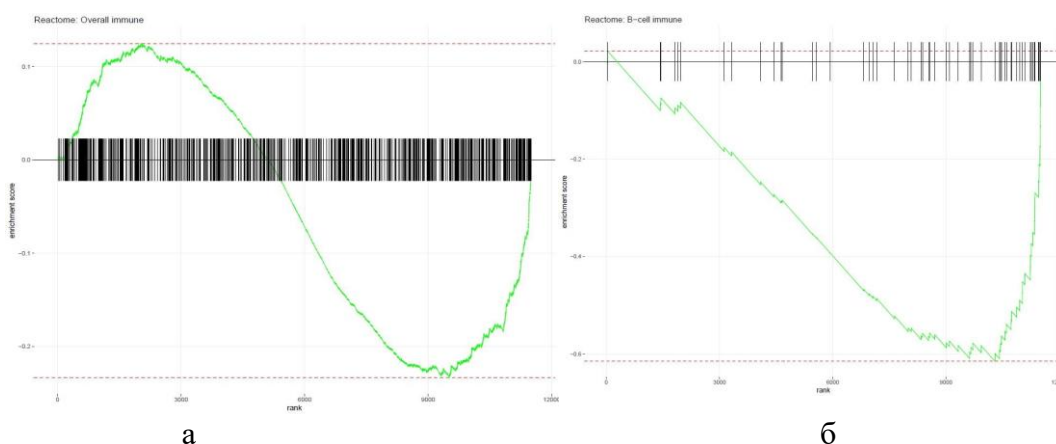
Таким образом, анализ обогащения набора генов (GSEA) позволяет найти пути, которые мягко регулируются (не в 2 раза и более, а в 10-50%). Например, если все генные пути активируются на 10 %, большинство из них не будут признаны значимыми по отдельности. В то же время GSEA считает этот путь очень важным.

На основе проведенного анализа генных модулей с использованием базы данных MSigDB и анализа генного обогащения (GSEA) было установлено, что соединения металлов вызывают нарушения сигнальных и метаболических путей. Так, металлы активируют гены, вовлеченные в клеточный цикл, в сравниваемых группах: АВ против Me+AB и АВ против Me (рисунки 15, 16).



а – Inflammation vs Metal+Inflammation; б – Inflammation vs Metal

Рисунок 15 – Гены, вовлеченные в клеточный цикл, регулируемые металлами



а – Reactome: Overall Immune; б – Reactome: B-cell Immune

Рисунок 16 – Гены, вовлеченные в клеточный цикл, регулируемые металлами  
Кроме того, металлиндуцированная иммуносупрессия проявлялась в отношении к В-клеток.

В соответствии с рисунком 17, представлены статистически значимые различия сравниваемых групп АВ и Me+AB.

## GSEA plots

- below are examples of 1) up- 2) down- 3) not regulated pathways

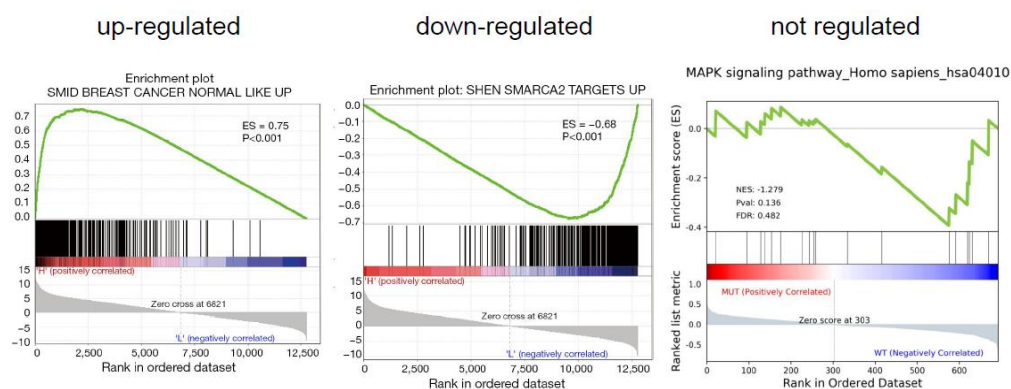


Рисунок 17 – Уровни значимости положительно и отрицательно регулируемых генных подмножеств

Проведенными исследованиями были обнаружены дифференциально экспрессирующиеся гены со средней силой экспрессии (up - down), которые были дифференциально регулируются в тимусе. Из всех тканей, наиболее выраженные различия под воздействием разных стимулов (металла, воспаления, или обоих одновременно) были именно в тимусе. Для анализа функциональных аннотаций, связанных с воспалением, мы рассматривали термины генных онтологий (GO) биологического процесса, пути Kegg и базу данных Hallmark. Лишь в кластере «Canonical pathways» объединились гены с повышенной экспрессией, вовлеченные в иммунную систему и в адаптивный иммунный ответ. Между тем, остальные вышепредставленные кластеры объединили значительно большее количество генов, характеризующие состояние иммунной системы как иммуносупрессия. Как и ожидалось в реакции воспаления, активируются иммунные и провоспалительные реакции для группы животных с асептическим воспалением «AB», тогда как иммуносупрессия в чистом виде, предположительно характеризует функциональное состояние иммунной системы животных группы «AB+Me». Эти результаты подтверждают нашу экспериментальную стратегию, в частности, согласуется с выводами, полученными в иммунологической части эксперимента.

При оценке естественных иммунных ответов генетические факторы и факторы окружающей среды играют согласованную роль. Транскриптомная информация, полученная от лимфоорганов экспериментальных животных, дает

фундаментальное представление об иммунных реакциях, характерных для течения воспаления в условиях воздействия солей хрома и ванадия.

Таким образом, на основании проведенного биоинформатического анализа были сделаны следующие *выводы*:

- анализ дифференциальной экспрессии показал наиболее выраженные эффекты в тимусе и небольшие систематические эффекты в других тканях;

- в тимусе гены клеточного цикла систематически повышаются под влиянием металлов;

- металлы оказывают иммуносупрессивный эффект на многие иммуноопосредованные метаболические пути;

- иммуносупрессивный эффект проявляется и в отношении В-клеток.

Были идентифицированы 20 белоккодирующих генов: Tnfrsf14, Cr2, Sp3, Stag2, H3f3a, Dpp4, Anp32a, Prpf40a, Hsp90aa1, Tardbp, Dnaj1, Eef2k, Mfge8, Macf1, Arhgef11, Txndc5, Srrm2, Syk, Clu, Cd19.

Поиск идентифицированных генов в выявленных метаболических путях, будет продолжен. Международный опыт подобного рода геномных исследований показывает необходимость проведения валидации (проверки) этих генов в условиях нового эксперимента. Это позволит выявить среди десятков идентифицированных генов именно те гены, которые могли бы служить прогностическими критериями в оценке тяжести воспалительного процесса. Между тем, на основании доказательства прогностической роли идентифицированных генов в регуляции воспалительного процесса становится очевидным поиск новых способов коррекции их экспрессионной активности, что позволит добиться конечной цели наших исследований – благоприятного исхода воспалительного процесса на фоне интервенции тяжелыми металлами.

### **3.2 Изучение гематологических показателей у крыс с асептическим воспалением после предварительного воздействия метаванадата аммония и бихромата калия**

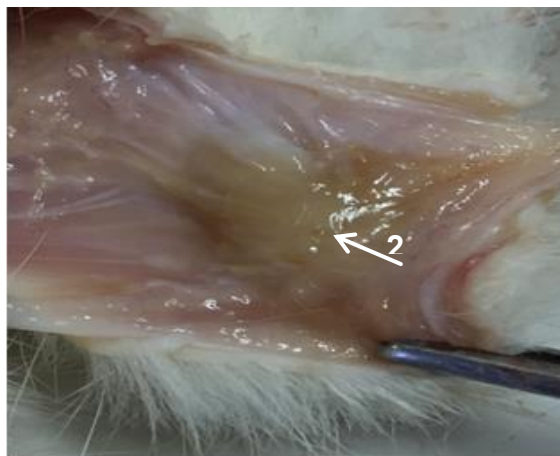
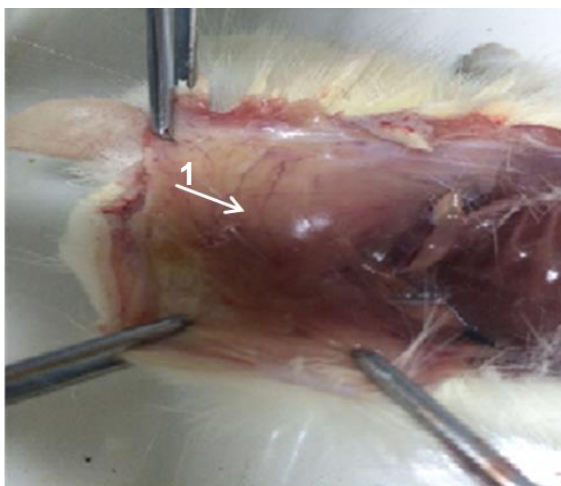
С целью решения поставленных задач нами проведен ряд экспериментальных исследований. В ходе постановки экспериментов наряду с визуальным наблюдением за клинической картиной воспаления у животных, нами проводились гематологические исследования периферической крови. В свете вышесказанного, в данной серии экспериментов у животных групп Me+AB (после предварительной двухнедельной интоксикации солями ванадия и хрома) и AB (контроль) моделировали скипидар-индуцированное воспаление. На соответствующих этапах эксперимента (через 1, 7 и 14 суток) у животных под хлороформовым наркозом производили визуальную оценку асептической раны с последующим забором крови, ткани воспаления и лимфоорганов.

Проведенные исследования позволили сформировать представление о влиянии соединений ванадия и хрома на регенеративные процессы в области асептической раны.

На рисунке 18 представлены результаты исследований ткани воспаления в динамике наблюдений в сравниваемых группах животных.



Так, через 1 сутки после моделирования скипидар-индуцированного воспаления у крыс группы АВ+Ме при пальпации кожи прощупывалось уплотнение мягкой консистенции без четких границ. При вскрытии под кожей определялся участок размягченной ткани синюшно-бордового цвета (рисунок 18а). Все внутренние органы крыс и кровь также имели темно-бордовый оттенок, что являлось признаком тяжелой степени гипоксии.



а

б

группы АВ+Ме: а – через 1 сутки: 1 - размягченная ткань синюшного цвета (указано стрелкой), б – через 7 суток: 2 - ограниченный очаг воспаления в виде удлиненного валика

Рисунок 18 – Картина скипидар-индуцированного воспаления у экспериментальных животных (через 1 и 7 суток)

Через 7 суток на месте введения скипидара размягченный участок ткани, наблюдавшийся в предыдущий срок исследования, уплотнился. При пальпации прощупывались четкие границы уплотнения размером 1,5-4,0 см. При вскрытии под кожей предстал ограниченный очаг воспаления в виде удлиненного валика, при надавливании с серозным отделяемым (рисунок 18б).



групп АВ и АВ+Ме через 14 суток после начала эксперимента: а – АВ: обнаружено небольшое уплотнение без отделяемого (3 – место разреза), б – АВ+Ме: обнаружено валикообразное уплотнение с отделяемым серовато-белого цвета (4 – гнойный экссудат)



Рисунок 19 – Картина асептического воспаления у экспериментальных животных (через 14 суток)

В соответствии с рисунком 19а, через 14 суток визуально у крыс группы АВ обнаруживалась небольшая припухлость.

При вскрытии на внутренней поверхности кожи обнаружено уплотнение мягкой консистенции и бледно-розового цвета, при иссечении без отделяемого [285, 286]. Под влиянием соединений металлов на 14 сутки исследования на коже у крыс наблюдали небольшую корочку размером 0,5-1,0 см, при пальпации прощупывали валикообразное уплотнение, при надавливании которого выступало отделяемое серовато-белого цвета (рисунок 19б). При вскрытии отмечался ограниченный очаг воспаления с распространением в глублежащую ткань, при иссечении которого появлялся экссудат густой консистенции и серовато-белого цвета.

В результате проведенного нами биоинформатического анализа среди 20 белоккодирующих генов был идентифицирован *Masf1*. Наши данные согласуются с исследованиями [287], где было показано, что при повреждении кожи мышей с дефицитом *Masf1* была обнаружена значительная задержка заживления раны из-за дефектов миграции эпидермальных клеток. Предполагаем, что в ряду факторов, приводящих к иммуносупрессии, снижение экспрессии *Masf1* вносит определенный вклад.

Известно, что наиболее ранние проявления изменений, происходящих в организме, отображаются в периферической крови. Лейкоциты одними из первых реагируют на любые внешние воздействия, от которых зависит течение и исход воспалительного процесса. Параллельное исследование крови экспериментальных крыс позволило оценить реакцию периферической крови как на интоксикацию ванадием и хромом, так и на воздействие скипидара. Результаты исследований гематологического анализа крови у крыс, получавших соли ванадата аммония и бихромата калия в течение двух недель, представлены в таблице 10.

Таблица 10 – Распределение среднего содержания лейкоцитов крови опытных животных в сравнении

Элементы крови * abs (x10 <sup>3</sup> /μL)	Контроль, n=10 M (CO)	Me, n=10 M (CO)	p**	AB, n=10 M (CO)	p	Me+AB, n=10 M (CO)	p
1	2	3	4	5	6	7	8
Через 1 сутки							
ЛЕЙКОЦИТЫ (WBC)	8,9 (1,3)	10,5 (3,6)	-	3,0 (1,3)	-	3,8 (2,0)	-
НЕЙТРОФИЛЫ (NEUT)	1,5 (0,3)	2,3 (1,0)	-	0,4 (0,3)	-	1,6 (1,1)	-
ЛИМФОЦИТЫ (LYMPH)	6,6 (1,0)	7,4 (2,6)	-	2,3 (1,0)	-	3,9 (1,9)	0,0022 <sup>a</sup>
МОНОЦИТЫ (MONO)	0,6 (0,1)	1,1 (0,6)	-	0,2 (0,1)	0,0001 <sup>a</sup>	0,3 (0,2)	0,0196 <sup>a</sup>

ЭОЗИНОФИЛЫ (ЕО)	0,2 (0,1)	0,3 (0,1)	0,0410 <sup>a</sup>	0,05 (0,04)	0,0065 <sup>a</sup>	0,1 (0,1)	
--------------------	-----------	--------------	---------------------	----------------	---------------------	-----------	--

Через 7 суток

Продолжение таблицы 10

1	2	3	4	5	6	7	8
ЛЕЙКОЦИТЫ (WBC)	8,9 (1,3)	9,7 (2,4)	-	15,1 (5,2)	0,0313 <sup>a</sup> 0,0018 <sup>c</sup>	7,1 (1,0)	0,0024 <sup>c</sup> 0,0118 <sup>b</sup>
НЕЙТРОФИЛЫ (NEUT)	1,5 (0,3)	3,0 (2,2)	-	3,8 (1,6)	0,0266 <sup>a</sup> 0,0062 <sup>c</sup>	2,4 (0,7)	0,0451 <sup>a</sup>
ЛИМФОЦИТЫ (LYMPH)	6,6 (1,0)	5,8 (0,9)	-	10,5 (3,6)	0,0431 <sup>a</sup> 0,0018 <sup>c</sup>	4,4 (0,7)	0,001 <sup>a</sup> 0,0076 <sup>b</sup>
МОНОЦИТЫ (MONO)	0,6 (0,1)	0,8 (0,1)	0,0253 <sup>a</sup>	0,7 (0,3)	0,011 <sup>c</sup>	0,4 (0,2)	-
ЭОЗИНОФИЛЫ (ЕО)	0,2 (0,1)	1,7 (1,0)	-	0,06 (0,03)	-	0,1 (0,1)	-

Через 14 суток

ЛЕЙКОЦИТЫ (WBC)	8,9 (1,3)	14,2 (3,5)	0,0526 <sup>a</sup>	14,2 (3,5)	0,0112 <sup>a</sup> 0,0002 <sup>c</sup>	10,3 (1,6)	0,0414 <sup>b</sup> 0,0001 <sup>c</sup> 0,0075 <sup>d</sup>
НЕЙТРОФИЛЫ (NEUT)	1,5 (0,3)	5,2 (1,6)	0,0181 <sup>a</sup>	3,9 (1,5)	0,011 <sup>a</sup> 0,0022 <sup>c</sup>	2,8 (0,7)	0,0083 <sup>a</sup>
ЛИМФОЦИТЫ (LYMPH)	6,6 (1,0)	8,4 (2,2)	-	9,1 (2,1)	0,0347 <sup>a</sup> 0,0002 <sup>c</sup>	6,4 (0,7)	0,0245 <sup>b</sup> 0,0037 <sup>c</sup> 0,0021 <sup>d</sup>
МОНОЦИТЫ (MONO)	0,6 (0,1)	0,5 (0,3)	-	1,1 (0,2)	0,0019 <sup>a</sup>	0,8 (0,3)	0,0212 <sup>c</sup>
ЭОЗИНОФИЛЫ (ЕО)	0,2 (0,1)	1,6 (0,8)	0,0325 <sup>a</sup> 0,0443 <sup>c</sup>	0,4 (0,4)	-	0,2 (0,1)	0,010 <sup>c</sup>

\* - WBC (общее число лейкоцитов), NEUT (абсолютное количество нейтрофилов), LYMPH (абсолютное количество лимфоцитов), MONO (абсолютное количество моноцитов), EO (абсолютное количество эозинофилов);

\*\* - по t – критерию Стьюдента статистически значимо по отношению: а – к контролю; b – к АВ; с – к 1 суткам; d – к 7 суткам

Как известно, течение воспалительного процесса сопровождается включением иммунологических механизмов защиты организма, в основном за счет клеточных компонентов крови. Так, через 7 суток в группе АВ наблюдали статистически значимое увеличение общих лейкоцитов на 69,7% по сравнению с контролем, чему способствовало увеличение нейтрофилов<sub>абс</sub> и лимфоцитов<sub>абс</sub> на 153,3 и 59,1% соответственно. Через 14 суток эти показатели оставались выше контрольного уровня.

Отличительная особенность в картине крови группы Me+AB заключалась в более низких показателях лейкоцитарной фракции. Так, значения общих лейкоцитов оставались на уровне контроля, тогда как абсолютное значение лимфоцитов через 7 суток оказалось ниже АВ на 58,1% (p=0,0076) и на 29,7% (p=0,0245) через 14 суток.

В сравнительной характеристике нейтрофильной фракции крови для групп АВ и Me+AB отмечалась следующая тенденция: содержание

нейтрофилов в группе Me+AB, лишь на 60 и 86,7% статистически значимо превысив значения контроля, так и не достигало значений АВ.

Снижение моноцитов в 1-е сутки исследования в группе Me+AB сменилось их возвращением до контрольного уровня в последующие сутки, тогда как для группы АВ 14-е сутки эксперимента сопровождались статистически значимым приростом моноцитов на 83,3% по отношению к контролю ( $p=0,0019$ ).

Наши данные согласуются с выводами литературных источников. Так, по данным [288] шестивалентный хром оказывает более выраженное миелосупрессивное, чем лимфопеническое действие. Так, у взрослых мышей Swiss, получавших внутрибрюшинно шестивалентный хром, обнаружили лейкопению только через 2 недели (среднее число лейкоцитов: 4,91 тыс. см<sup>3</sup>/мм). Подкожное введение шестивалентного хрома (50 мг/кг массы тела) самцам белых крыс Wistar приводило к лейкопении, лимфопении, моноцитозу и гранулоцитозу. Подкожное воздействие низкой дозы K<sub>2</sub>Cr<sub>2</sub>O<sub>7</sub> у самок белых крыс линии Вистар вызывал практически аналогичные изменения лейкоцитарного профиля. Пероральное введение Cr (VI) через питьевую воду серьезно влияло на самцов крыс, вызывая лейкопению, лимфопению, моноцитоз и гранулоцитоз.

Таким образом, в развитии асептического воспаления на фоне предварительной затравки солями ванадия и хрома (Me+AB) в картине лимфоцитарной фракции крови тенденции прироста не наблюдалось, из чего сделано заключение, что ванадий и хром оказывают повреждающее влияние на лимфоциты крови.

При визуальной оценке картины воспаления был обнаружен цианоз, характерный для выраженной гипоксии. Результаты исследования содержания эритроцитов и гемоглобина в периферической крови представлены в таблице 11. Снижение эритроцитов в группах АВ и Me+AB со статистически значимыми значениями через 7 суток от начала эксперимента исследования ( $p=0,0083$ ,  $p=0,0856$  соответственно), сменилось их возвращением до контрольного уровня через 14 суток. Между тем, содержание гемоглобина во всех группах оставалось статистически значимо ниже контроля во все сроки исследования. Предварительное введение солей тяжелых металлов в группах Me и Me+AB снижало средний объем гемоглобина в эритроците, о чем судили по значениям МСН через 14 суток, которые оказались статистически значимо ниже контрольного уровня соответственно на 6 и 4,1%.

Таблица 11 – Распределение среднего содержания эритроцитов и гемоглобина в крови опытных животных в сравнении

Элементы крови *	Контроль, n=10 М (СО)	Me, n=10 М (СО)	p**	АВ, n=10 М (СО)	p	Me+AB, n=10 М (СО)	p
1	2	3	4	5	6	7	8
Через 1 сутки							
Эритроциты	8,3 (0,9)	7,7 (0,1)		7,1 (0,5)	0,015 <sup>a</sup>	7,7 (0,7)	-

(RBC), (x10 <sup>6</sup> /μL)							
----------------------------------	--	--	--	--	--	--	--

Продолжение таблицы 11

1	2	3	4	5	6	7	8
Гемоглобин (HGB), (g/L)	143,9 (8,7)	127,3 (4,0)	0,0038 <sup>a</sup>	132,0 (5,0)	0,012 <sup>3a</sup>	121,9 (5,6)	0,0002 <sup>a</sup> 0,0039 <sup>b</sup>
Гематокрит (HCT), %	42,1 (4,1)	36,6 (2,0)	0,0233 <sup>a</sup>	36,2 (2,0)	0,011 <sup>a</sup>	35,9 (2,8)	0,0068 <sup>a</sup>
MCV, fL	48,5 (1,8)	47,7 (2,3)	-	51,1 (2,5)	-	47,0 (3,0)	0,0162 <sup>b</sup>
MCH, pg	16,9 (0,6)	16,6 (0,4)	-	17,2 (0,9)	-	16,1 (0,9)	-
MCHC, g/dL	34,8 (0,4)	34,8 (0,8)	-	33,5 (0,8)	0,0095 <sup>a</sup>	34,8 (2,2)	-
Через 7 суток							
Эритроциты (RBC), (x10 <sup>6</sup> /μL)	8,3 (0,9)	8,2 (0,7)	-	6,9 (0,6)	0,0083 <sup>a</sup>	7,5 (0,5)	0,0856 <sup>a</sup>
Гемоглобин (HGB), (g/L)	143,9 (8,7)	132,3 (5,5)	0,0442 <sup>a</sup>	119,2 (12,9)	0,004 <sup>a</sup>	123,6 (3,8)	0,0004 <sup>a</sup>
Гематокрит (HCT), %	42,1 (4,1)	37,9 (1,2)	0,04 <sup>a</sup>	35,1 (3,6)	0,007 <sup>a</sup>	35,5 (1,2)	0,0044 <sup>a</sup>
MCV, fL	48,5 (1,8)	46,5 (2,3)	-	50,8 (4,1)	-	47,3 (2,9)	-
MCH, pg	16,9 (0,6)	16,3 (0,7)	-	17,3 (1,2)	-	16,5 (0,7)	-
MCHC, g/dL	34,8 (0,4)	34,9 (0,4)	-	34,0 (0,7)	0,049 <sup>a</sup>	34,9 (0,7)	-
Через 14 суток							
Эритроциты (RBC), (x10 <sup>6</sup> /μL)	8,3 (0,9)	8,0 (0,3)	-	7,3 (0,8)		8,0 (0,3)	
Гемоглобин (HGB), (g/L)	143,9 (8,7)	128,0 (5,9)	0,0064 <sup>a</sup>	120,5 (16,4)	0,015 <sup>6a</sup>	129,4 (7,9)	0,0146 <sup>a</sup>
Гематокрит (HCT), %	42,1 (4,1)	37,3 (2,0)	0,0284 <sup>a</sup>	35,5 (4,5)	0,021 <sup>a</sup>	37,6 (2,1)	0,0336 <sup>a</sup>
MCV, fL	48,5 (1,8)	46,3 (1,6)	-	48,6 (2,6)	-	47,0 (0,9)	-
MCH, pg	16,9 (0,6)	15,9 (0,4)	0,0073 <sup>a</sup>	16,5 (0,8)	-	16,2 (0,4)	0,0339 <sup>a</sup>
MCHC, g/dL	34,8 (0,4)	34,4 (0,5)	-	34,0 (0,9)	-	34,4 (0,7)	-
<p>* – RBC (общее число эритроцитов), HGB (концентрация гемоглобина), HCT (показатель гематокрита), MCV (сред. объем эритроц. в общем объеме пробы), MCH (средний объем гемоглобина в эритроците), MCHC (средняя конц. Нв в эритроците);</p> <p>** – по Ttest статистически значимо по отношению: а – к контролю; b – к АВ; с – к 1 суткам; d – к 7 суткам</p>							

Показатель гематокрита во всех группах исследования на протяжении всего эксперимента оставался ниже контрольного уровня, на что повлияло снижение лейкоцитов и эритроцитов крови экспериментальных животных.

Из вышеизложенного сделано заключение, что соли ванадия и хрома способствуют развитию анемии в группах животных, предварительно затравленных ванадатом аммония и бихроматом калия.

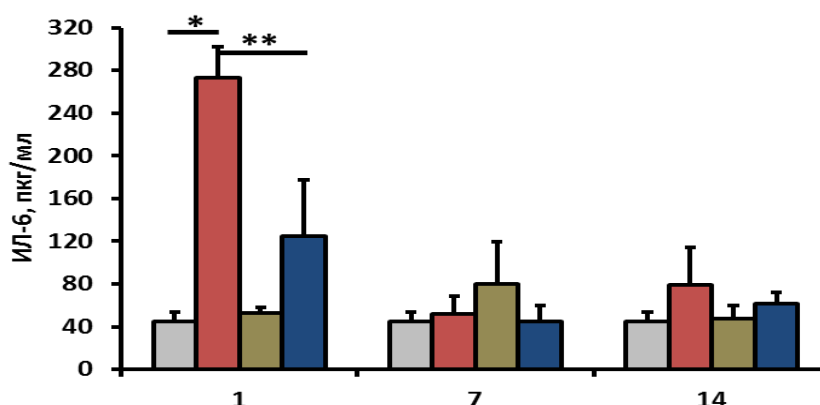
Таким образом, проведенная визуальная характеристика очага воспаления и анализ результатов исследований крови позволяют заключить, что под влиянием ванадата аммония и бихромата калия к последнему сроку эксперимента очаг воспаления имеет тенденцию к распространению в глублежащие ткани с явлениями экссудации гнойно-некротического характера.

В периферической крови отмечается дефицит лейкоцитов преимущественно за счет их лимфоцитарной и нейтрофильной фракций. Отмечается гипоксическое повреждение ткани за счет сопутствующего развития анемии.

### 3.3 Оценка цитокинового профиля у крыс с асептическим воспалением после предварительного воздействия метаванадата аммония и бихромата калия

Про- и противовоспалительные цитокины относят к ключевым регуляторам воспаления, участвующим в остром [289] и хроническом воспалении через сложную сеть взаимодействий [290].

*Интерлейкин-6 (IL-6).* Хотя IL-6 является плейотропным цитокином, обладающим как провоспалительной, так и противовоспалительной активностью, его основной эффект связывают с участием в острой фазе воспаления, поэтому по повышению его уровня в крови судят о развитии острого воспаления. Однако его продукцию отмечают и при хроническом воспалении. На рисунке 20 представлены результаты анализа содержания IL-6 в сыворотке крови крыс, подвергавшихся различным воздействиям, в динамике развития воспаления.



\* –  $p \leq 0,05$  к контролю; \*\* –  $p \leq 0,05$  к АВ

Рисунок 20 – Содержание IL-6 в сыворотке периферической крови крыс до (К) и после воздействия солей тяжелых металлов (Ме), асептического воспаления (АВ), их сочетания (Ме+АВ) в динамике наблюдений

Примечания:

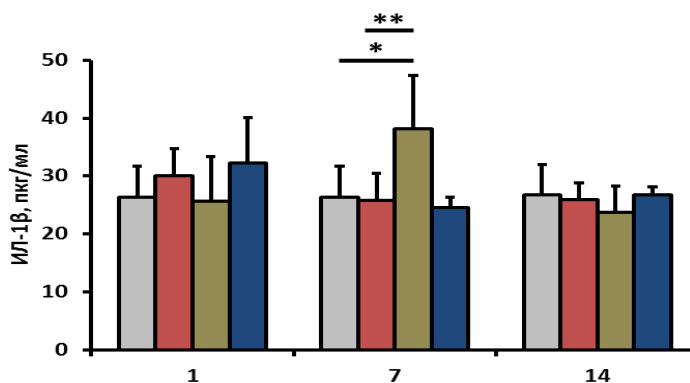
1. Показаны результаты исследований клеточной численности селезенки для групп К – контроль; АВ – асептическое воспаление; Ме – ванадат аммония и бихромат калия; Ме+АВ через 1; 7 и 14 суток.
2. Показаны средние значения (М) и стандартные отклонения (СО)

Как видно из рисунка 20, затравка животных солями тяжелых металлов абсолютно не влияла на уровень IL-6, тогда как асептическое воспаление сопровождалось 6-кратным повышением уровня цитокина в 1 сутки наблюдений ( $M=273$ ,  $CO=28$  пкг/мл,  $p_K=0,004$ ), который нормализовался в последующие сроки (7 сут., 14 сут). Однако развитие асептического воспаления

на фоне затравки солями тяжелых металлов снижало выброс в кровотоки IL-6 в 1-й день наблюдения ( $M=144$ ,  $CO=24$  пкг/мл,  $p_{AB}=0,004$ ) с нормализацией уровня цитокина в последующие сроки. Очевидно, воздействие Me тормозило продукцию IL-6 в 1-е сутки.

**Интерлейкин-1 $\beta$**  (IL-1 $\beta$ /IL-1F2). IL-1 $\beta$  – ярко выраженный провоспалительный цитокин, участвующий в патогенезе острого воспаления. При хроническом воспалении его продукция сохраняется. На рисунке 21 представлены данные иммуноферментного анализа этого цитокина в сыворотке крови крыс различных опытных групп в сравнении с контролем.

Как видно из рисунка 21, уровень IL-1  $\beta$  достоверно не изменялся во всех вариантах эксперимента.



\* –  $p \leq 0,05$  к контролю; \*\* –  $p \leq 0,05$  к АВ

Рисунок 21 – Содержание IL-1 $\beta$  в сыворотке периферической крови крыс до (К) и после воздействия солей тяжелых металлов (Me), асептического воспаления (AB), их сочетания Me+AB) в динамике наблюдений

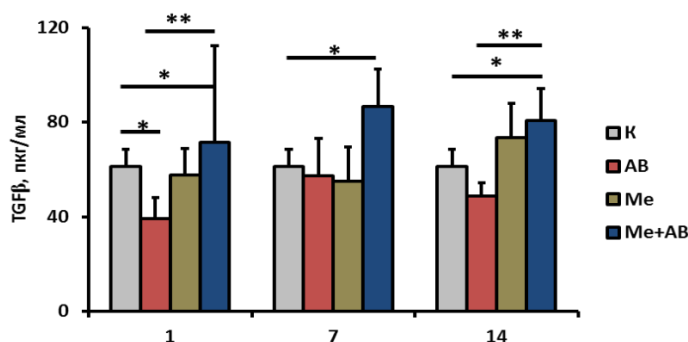
Примечания:

1. Показаны результаты исследований клеточной численности селезенки для групп К – контроль; АВ – асептическое воспаление; Me – ванадат аммония и бихромат калия; Me+AB через 1; 7 и 14 суток.
2. Показаны средние значения (M) и стандартные отклонения (CO)

#### *Трансформирующий ростовой фактор бета (TGF $\beta$ )*

TGF $\beta$  – относится к противовоспалительным цитокинам, однако его продукцию отмечают при хроническом воспалении. Данные по содержанию этого цитокина в крови опытных животных представлены на рисунке 22.

Как видно из рисунка 22, уровень TGF  $\beta$  существенно не отличался от контроля ( $61 \pm 7$  нг/мл) при воздействии Me или АВ, но достоверно повышался ( $M=80$ ,  $CO=6$  нг/мл,  $p_k=0,023$ ,  $M=75$ ,  $CO=5$  нг/мл,  $P=0,05$ , соответственно) при сочетанном их воздействии на 7-й и 14-й дни наблюдения.



\* –  $p \leq 0,05$  к контролю; \*\* –  $p \leq 0,05$  к АВ

Рисунок 22 – Содержание TGF  $\beta$  в сыворотке периферической крови крыс до (К) и после воздействия солей тяжелых металлов (Me), асептического воспаления (АВ), их сочетания (Me+АВ) в динамике наблюдений

Примечания:

1. Показаны результаты исследований клеточной численности селезенки для групп К – контроль; АВ – асептическое воспаление; Me – ванадат аммония и бихромат калия; Me+АВ через 1; 7 и 14 суток.
2. Показаны средние значения (M) и стандартные отклонения (CO)

*Интерлейкин-10 (IL-10)*. IL-10 – противовоспалительный цитокин, относящийся к цитокинам Th2-типа. Данные о динамике содержания этого цитокина в сыворотке крови опытных животных представлены на рисунке 23.

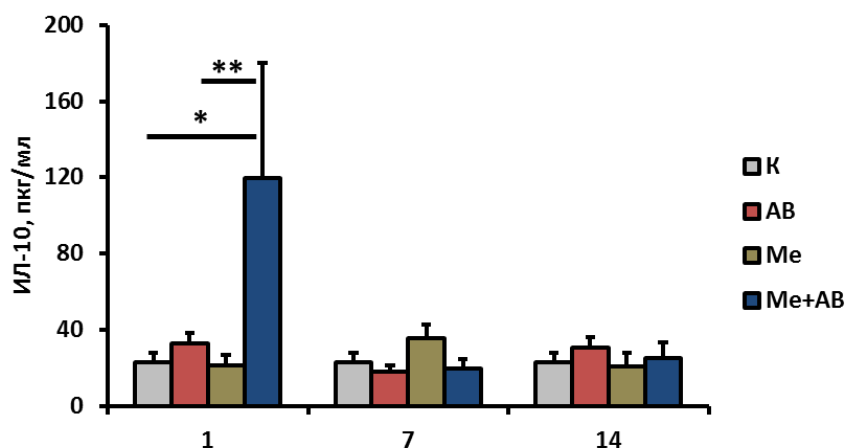


Рисунок 23 – Содержание ИЛ-10 в сыворотке периферической крови крыс до (К) и после воздействия солей тяжелых металлов (Me), асептического воспаления (АВ), их сочетания (Me+АВ) в динамике наблюдений

Как видно из рисунка 23, существенных изменений уровня содержания IL-10 во всех исследуемых группах, кроме группы Me+АВ, не наблюдалось. У животных группы Me+АВ в 1-й день наблюдения имело место существенное повышение содержания IL-10 в периферической крови ( $M=142$ ,  $CO=\pm 24$  пкг/мл,  $p=0,013$ ). В последующие сроки наблюдения уровень IL-10 возвращался к норме и не превышал среднего уровня в контроле ( $M=23$ ,  $CO=2$  пкг/мл).

### 3.4 Изучение клеточной численности, селезеночных субпопуляций крыс в динамике течения асептического воспаления после предварительного воздействия метаванадата аммония и бихромата калия

Основная роль иммунной системы заключается в защите организма от инфекций [291]. Она способна вызывать ответную защитную реакцию организма той силы, которая достаточна для борьбы с угрозой. При этом сила ответной реакции не должна наносить ущерб организму. Регуляторные Т-клетки отключают иммунный ответ сразу после того, как угроза была успешно уничтожена.

Поскольку селезенка играет немаловажную роль в депонировании и в последующем обеспечении организма гранулоцитарными и моноцитарными лейкоцитами, а также лимфоцитами, наша дальнейшая цель заключалась в изучении степени вовлеченности селезеночных субклеточных популяций в воспалительный процесс. Для этого изучили клеточность селезенки у опытных животных.

Результаты, представленные на рисунке 24, наглядно демонстрируют, что под воздействием соединений ванадия и хрома клеточность селезенки, начиная с 7 суток эксперимента, снижается и не восстанавливается до конца эксперимента. Так, динамика изменений клеточной численности селезенки выглядела следующим образом: воздействие солей тяжелых металлов уже через 1 сутки после последнего введения приводило к более чем двукратному снижению клеточной численности селезенки по сравнению с контролем (с  $0,78 \pm 0,2$  млн. кл./мг до  $0,31 \pm 0,03$  5 млн. кл./мг,  $p=0,002$ ), что свидетельствовало об их цитотоксическом действии на селезенку. Через 7 суток наблюдалось статистически значимое ( $p=0,007$ ) увеличение клеточной численности до  $0,5 \pm 0,05$  млн. кл./мг, что можно объяснить развитием компенсаторной реакции селезенки в ответ на токсическое воздействие тяжелых металлов. Однако, такая гиперпролиферация селезенки оказалась транзиторной, так как на 14-е сутки наблюдалось такое же значение клеточной численности ( $0,48 \pm 0,02$  млн. кл./мг) как и на 7-е сутки эксперимента и сохранялась статистически значимая разница по сравнению с контролем ( $p=0,01$ ) (рисунок 24). Возможно, здесь имеет место истощение компенсаторных пролиферативных процессов в селезенке.

Иная картина наблюдалась при введении скипидара, индуцирующего асептическое воспаление под кожей. Через 7 суток мы не наблюдали разницы в данном показателе по сравнению с контролем, тогда как через 14 суток клеточность селезенки достоверно снижалась до  $0,47 \pm 0,08$  млн. кл./мг ( $p=0,01$ ), что свидетельствовало о вызванном воспалении в модели.

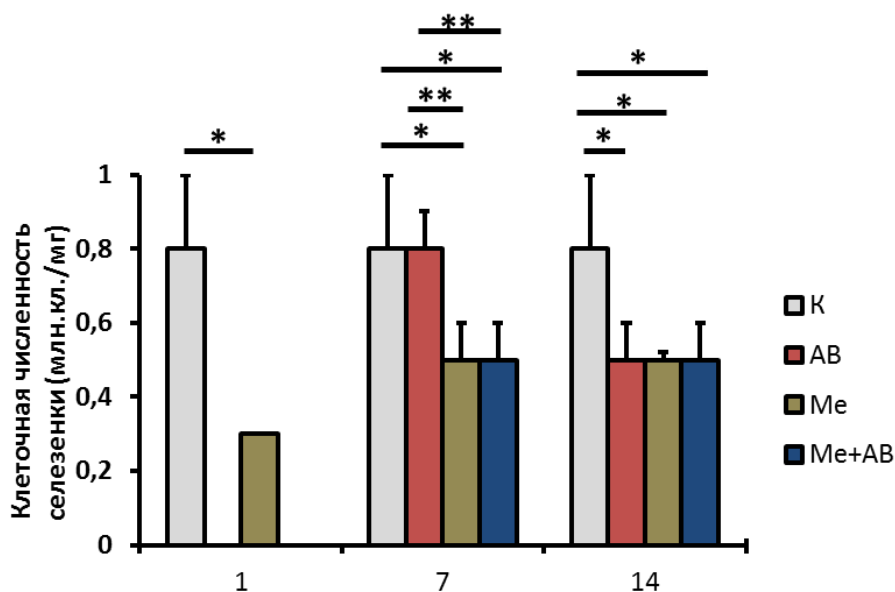
Сочетанное воздействие тяжелых металлов и воспаления на селезенку характеризовалось резким снижением клеточной численности до  $0,48 \pm 0,05$  млн. кл./мг ( $p_{\text{контр.}}=0,01$ ) через 7 суток и  $0,5 \pm 0,06$  млн. кл./мг ( $p_{\text{контр.}}=0,02$ ) через 14 суток эксперимента, не отличающимся от воздействия только металлов.

Таким образом, соли ванадия и хрома способны снижать клеточность селезенки опытных крыс с асептическим воспалением.

Следующим направлением нашего исследования послужили популяции Т- и В-лимфоцитов. Их решающая роль в регуляции воспаления очевидна,



поскольку от степени их вовлеченности и активности зависит исход воспалительных процессов.



\* –  $p \leq 0,05$  к контролю; \*\* –  $p \leq 0,05$  к АВ

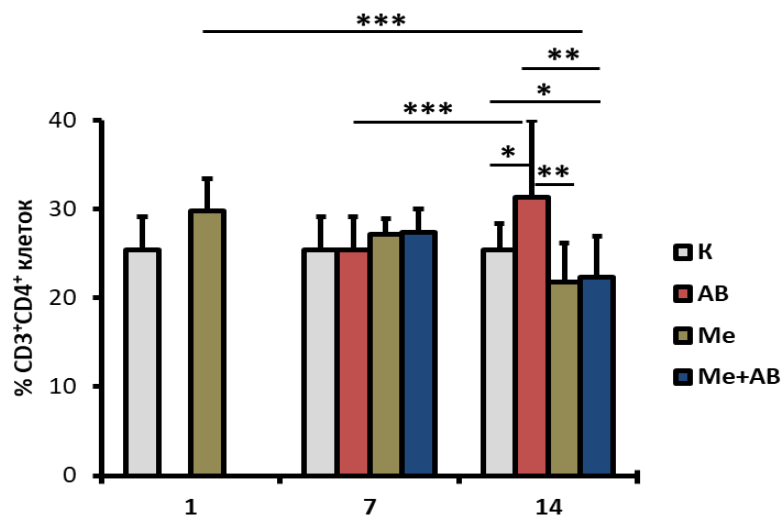
Рисунок 24 – Клеточная численность селезенки экспериментальных животных после воздействия солей ванадия и хрома и скипидаара в динамике наблюдения

Примечания:

1. Показаны результаты исследований клеточной численности селезенки для групп *K* – контроль; *AB* – асептическое воспаление; *Me* – ванадат аммония и бихромат калия; *Me+AB* через 1; 7 и 14 суток.
2. Показаны средние значения (*M*) и стандартные отклонения (*CO*)

CD4 Т-лимфоциты индуцируют, либо ингибируют иммунный ответ, регулируют дифференцировку В-лимфоцитов и образование антител. Т-лимфоциты участвуют в активации макрофагов, тем самым способствуя заживлению повреждений, образованию новых капилляров, регенерации тканевых волокон [292].

Исследование Т-клеточного звена иммунитета опытных животных определяли моноклональными антителами к CD4 структурам (рисунок 25). Проведенные экспериментальные исследования показали, что пролиферативная активность CD3+CD4+ Т-лимфоцитов в течение недели оставалась на уровне контрольных величин (рисунок 25). Через 14 суток в группе АВ доля CD3+CD4+ возрастала на 23,2% ( $M=31,3$ ,  $CO=8,7$ ;  $p_{\text{сум}}=0,014$ ) по сравнению с предыдущим сроком исследования ( $M=25,4$ ,  $CO=3,8$ ). Между тем, в этот срок исследования в группах Me и Me+AB доля CD3+CD4+ статистически значимо отставала от АВ соответственно на 8% ( $M=28,8$ ,  $CO=3$ ;  $p_{AB}=0,002$ ) и 28,4% ( $M=22,4$ ,  $CO=4,6$ ;  $p_{AB}=0,008$ ).



\* –  $p \leq 0,05$  к контролю; \*\* –  $p \leq 0,05$  к АВ; \*\*\* –  $p \leq 0,05$  к 7 суткам

Рисунок 25 – Доля CD3+CD4+-спленоцитов экспериментальных животных после воздействия солей ванадия, хрома и скипидаара в динамике наблюдения

Примечания:

1. Показаны результаты исследований CD3+CD4+ для групп *K* – контроль; *AB* – асептическое воспаление; *Me* – ванадат аммония и бихромат калия; *Me+AB*: 1 – через 1 сутки; 7 – через 7 суток; 14 – через 14 суток.
2. Показаны средние значения (M) и стандартные отклонения (CO)

Известно, что регуляторные Т-лимфоциты способны подавлять пролиферативную активность эффекторных Т-лимфоцитов. По сведениям Торгашиной А.В., Соловьева С.К., 2018 [256, с. 9-14], Т регуляторные лимфоциты как *in vitro*, так и *in vivo* обладают супрессорным действием. Под их действием активация и пролиферация CD4+, CD8+ Т-лимфоцитов, В-лимфоцитов и антиген-презентирующих клеток подавляются контакт-зависимым образом за счет межклеточных взаимодействий. Активность макрофагов и пролиферация лимфоцитов подавляются секретируемыми Т регуляторными клетками цитокинами ИЛ10 и трансформирующим ростовым фактором I (TGFI), а гранзим А и В и перфорин вызывают лизис эффекторных клеток. Т регуляторные клетки способны подавлять продукцию интерферона  $\gamma$  и антител В-лимфоцитами [293].

С этой целью было определено содержание субклеточных популяций селезенки с фенотипом CD3+CD4+ по количеству продуцируемых ими IFN $\gamma$  и ИЛ-4 (таблица 12).

Тенденцию к пролиферативной активности эффекторных Т-лимфоцитов определяли по продуцируемому IFN $\gamma$ , характерного для Тх1, и ИЛ-4, характерного для Тх2. В группе АВ для субпопуляций Тх1 установлен статистически значимый прирост IFN $\gamma$  как через 1 сутки на 29,3%, так и через 7 и 14 суток на 95 и 63,1% соответственно. Уровень определяемого ИЛ-4 (Тх2) через 1 и 7 суток исследования превышал контрольные значения на 41,4%, через 14 суток на 76%.

Таблица 12 – Результаты иммунофенотипирования клеток селезенки крыс с асептическим воспалением, вызванным на фоне двухнедельной интоксикации ванадием и хромом, pg/ml (M (CO), n=10)

Серии	Показатели			
	контроль	АВ	Ме	Ме+АВ
Через 7 суток				
IFNg	19,8 (2,7)	38,6 (6,1) <sup>a</sup>	14,3 (2,9) <sup>a</sup>	12,1 (2,9) <sup>a,b,d</sup>
IL-4	2,9 (0,6)	4,1 (1,0) <sup>a,d</sup>	2,7 (0,4)	1,1 (0,6) <sup>a,b,d</sup>
Через 14 суток				
IFNg	19,8 (2,7)	32,3 (4,5) <sup>a</sup>	15,6 (2,6)	11,0 (2,4) <sup>a,b,d</sup>
IL-4	2,9 (0,6)	5,1 (0,7) <sup>a,d</sup>	1,3 (0,4) <sup>a</sup>	1,2 (0,6) <sup>a,b,d</sup>
* – p – по Mann-Whitney U-test, достигнутый уровень статистической значимости (p≤0,05) по отношению: a – к контролю; b - к АВ; c – к Ме; d –к 1 суткам; e – к 7 суткам				

Иную картину застали в группе крыс, затравленных солями ванадия и хрома. Так, в группе Ме соли ванадия и хрома вызывали стабильно низкую и, соответственно, отличную от контроля продукцию IFNg и IL-4 во все сроки исследования. Развитие воспаления на этом фоне (Ме+АВ) вызвало сохранение IFNg и IL-4 в первый срок исследования на контрольном уровне, тогда как от аналогичной группы АВ, не подвергавшейся воздействию солей ванадия и хрома, их содержание отставало соответственно на 25% ( $p \leq 0,05$ ) и 17,1%. В последующие сроки содержание IFNg и IL-4 прогрессивно отставало от показателей АВ на 68,6 и 73,2% через 7 суток и на 66 и 76,5% через 14 суток соответственно.

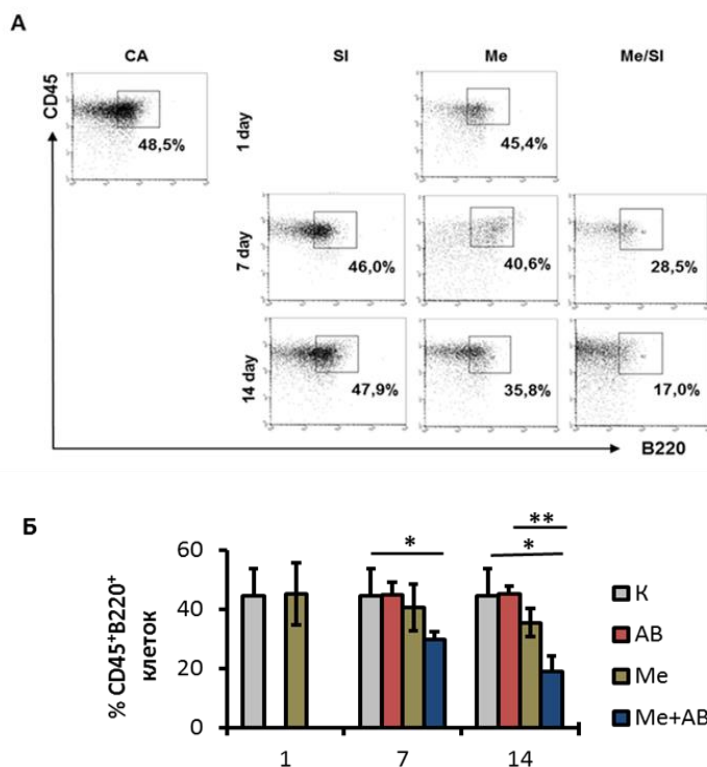
Содержание CD8<sup>+</sup> для АВ оказалось в 1,3 раза ( $p \leq 0,05$ ) статистически значимо выше по отношению к контролю через 1 и 14 суток исследования. В группе Ме+АВ через 14 суток содержание CD8<sup>+</sup> статистически значимо отставало от показателей АВ на 29%.

В-лимфоциты имеют решающее значение для эффективного иммунитета; они продуцируют антитела и цитокины, представляют антигены Т-лимфоцитам и регулируют иммунные ответы. Рецептор В-клеток (BCR) представляет собой трансмембранный сигнальный комплекс, который экспрессируется большинством нормальных В-лимфоцитов и играет ключевую роль в регулировании роста, дифференцировки и функции этих клеток. Распознавание антигена рецептором В-клеток (BCR) инициирует активацию В-клеток, что в конечном итоге приводит к выработке защитных антител против патогенов [294].

В свете вышесказанного представляется важным анализ клеточных популяций селезенки опытных животных с асептическим воспалением (рисунок 26а, 26б). Чтобы определить возможное влияние соединений ванадия и хрома на субклеточные популяции селезенки, методом проточной цитофлуориметрии определили количественное содержание В-лимфоцитов в общем лимфоцитарном гейте по фенотипу CD45<sup>+</sup>B220<sup>+</sup>.

Развитие асептического воспаления в группе АВ не оказывало влияния на пролиферативную активность В-лимфоцитов ни через 7, ни через 14 суток исследования (рисунок 26б).

Тенденция к снижению доли CD45+B220+ спленоцитов намечалась через 7 суток для группы предварительно затравленных животных (Me) (M=40,5%, CO=7,8 против M=44,5%, CO=9,1 контроля), которая к 14 суткам эксперимента достигла значимых различий как по отношению к контролю (M=35,5, CO=4,8 против 44,5, CO=9,1;  $p_{\text{контр.}}=0,0003$ ), так и по отношению к АВ (M=45,3, CO=2,5;  $p_{\text{AB}}=0,01$ ).



\* –  $p \leq 0,05$  к контролю; \*\* –  $p \leq 0,05$  к АВ

А – репрезентативные данные; Б – показаны результаты исследований CD45+B220+ спленоцитов для групп К – контроль; АВ – асептическое воспаление; Me – ванадат аммония и бихромат калия; Me+AB: 1 – через 1 сутки; 7 – через 7 суток; 14 – через 14 суток

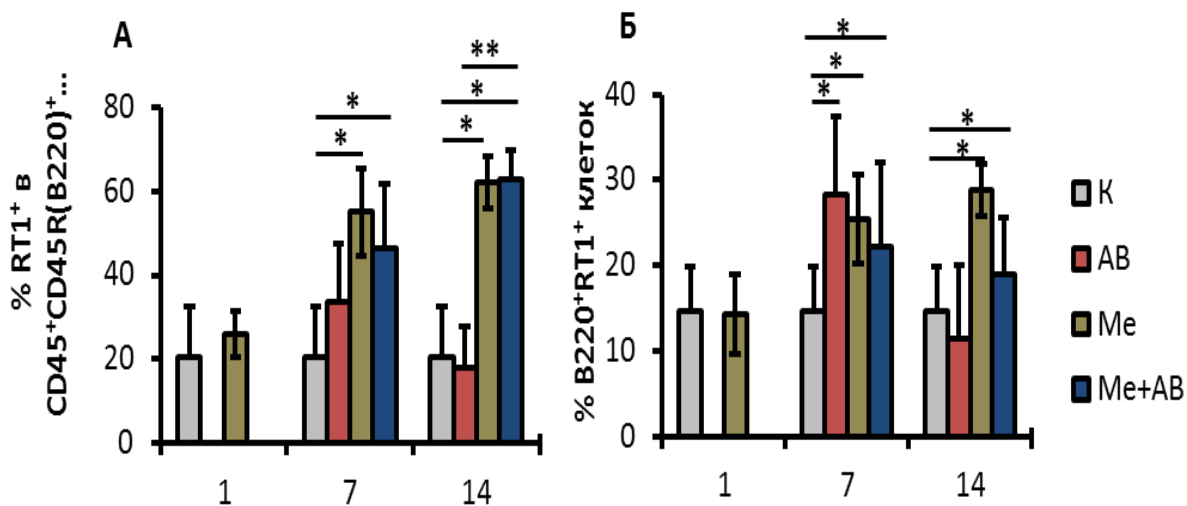
Рисунок 26 – Доля CD45+B220+ спленоцитов экспериментальных животных после воздействия солей ванадия и хрома и скипидара в динамике наблюдения

Примечание – Показаны средние значения (M) и стандартные отклонения (CO)

Сочетанное воздействие металлов и вызванного асептического воспаления значительно снижало долю CD45+B220+ спленоцитов по отношению к контрольному уровню на 33,1% (M=29,8, CO=2,8 против M=44,5, CO=9,1 контроля,  $p_{\text{контр.}}=0,009$ ) через 7 суток и на 57,1% (M=19,1, CO=5,1 против M=44,5, CO=9,1 контроля,  $p_{\text{контр.}}=0,0003$ ) через 14 суток. При этом, предварительная затравка крыс солями металлов приводила к снижению данного показателя и по сравнению с группой АВ по истечению 7 и 14 суток соответственно на 33,5% (M=29,8, CO=2,8 против M=44,8, CO=4,2 АВ,

$p_{AB}=0,00008$ ) и на 60% ( $M=19,1$ ,  $CO=5,1$  против  $M=45,3$ ,  $CO=2,5$  АВ,  $p_{AB}=0,00007$ ) (рисунок 27б).

Чтобы проверить влияет ли снижение  $CD45^+B220^+$ -спленоцитов на экспрессию рецепторов, определяли %  $RT1^+$  в  $CD45^+CD45R(B220)^+$  гейте. Соответственно, мы изучали процент свободных или связанных рецепторов по уровню экспрессии  $RT1^+$  в В-клеточных субпопуляциях спленоцитов. Как представлено на рисунке 27А, уровень экспрессии  $RT1^+$  во всех сериях эксперимента значительно превышал контрольный уровень.



\* –  $p \leq 0,05$  к контролю; \*\* –  $p \leq 0,05$  к АВ; А – %  $RT1^+$  в  $CD45^+CD45R(B220)^+$  гейте; Б –  $B220^+RT1^+$  в лимфоцитарном гейте: 1 – через 1 сутки; 7 – через 7 суток; 14 – через 14 суток; показаны результаты исследований субпопуляций спленоцитов для групп: К – контроль; АВ – асептическое воспаление; Ме – ванадат аммония и бихромат калия; Ме+АВ

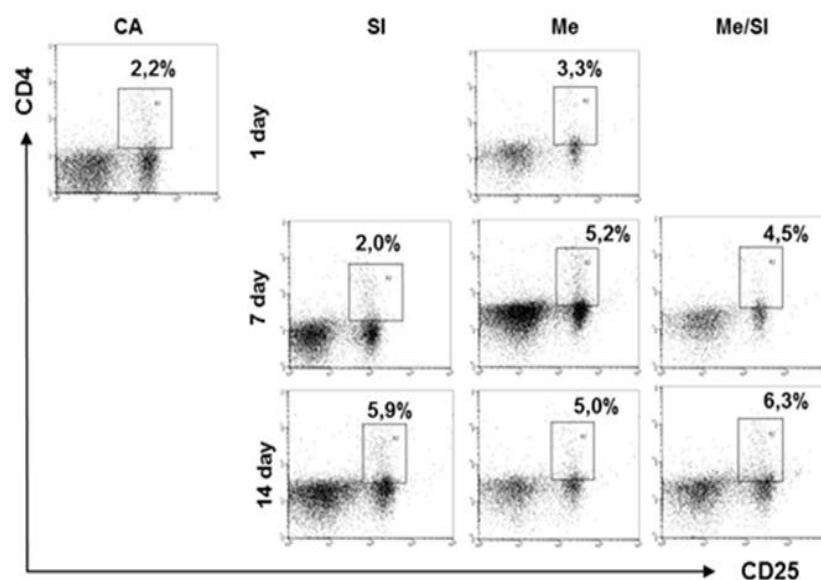
Рисунок 27 – Доля  $RT1^+$  в  $CD45^+CD45R(B220)^+$  и  $B220^+RT1^+$ -спленоцитов экспериментальных животных после воздействия солей ванадия и хрома и скипидара в динамике наблюдения

Примечание – Показаны средние значения (M) и стандартные отклонения (CO)

В ответ на антигенную стимуляцию очага воспаления крысы групп Ме и Ме+АВ демонстрировали повышение экспрессии  $RT1^+$  соответственно в 2,7 ( $M=55,0$ ;  $CO=15,3$  против  $M=20,6$ ;  $CO=11,8$  контроля,  $p_{контр}=0,007$ ) и 2,2 раза ( $M=46,3$ ;  $CO=15,3$  против  $M=20,6$ ;  $CO=11,8$  контроля,  $p_{контр}=0,016$ ) на 7-е сутки эксперимента по отношению к контролю. Умеренное накопление доли  $RT1^+$  в  $CD45^+CD45R(B220)^+$  гейте у крыс группы АВ не имело статистически значимой разницы с контролем. К 14-м суткам эксперимента для этой группы животных экспрессия  $RT1^+$  снижалась до контрольного уровня, что свидетельствовало, по-видимому, о снижении антигенной стимуляции из очага воспаления. Между тем, к этому сроку исследования экспрессионная активность  $RT1^+$  в группах Ме ( $M=62,0$ ;  $CO=6,2$ ,  $p_{контр}=0,0001$ ) и Ме+АВ ( $M=62,8$ ;  $CO=6,8$ ,  $p_{контр}=0,0001$ ) достигла одинакового уровня, превышавшего в 3 раза значения контроля ( $M=20,6$ ;  $CO=11,8$ ). Аналогичная разница достигнута у группы Ме+АВ и по отношению к АВ.

Об активности В-клеток в экспериментальных группах судили по экспрессии молекулы МНС-II, анализируя долю В220<sup>+</sup>RT1(МНС-II)<sup>+</sup>-спленоцитов в гейте CD45<sup>+</sup> лимфоцитов (рисунок 27Б). На 7-е сутки после индукции асептического воспаления наблюдалось статистически значимое увеличение В220<sup>+</sup>RT1<sup>+</sup>-спленоцитов ( $M=28,2$ ;  $CO=9,3$ ;  $p_{\text{контр}}=0,15$ ) по сравнению с контрольными значениями ( $M=14,7$ ;  $CO=5,1$ ), что свидетельствовало о нормальном провоспалительном фоне. На 14-е сутки данный показатель имел значения, сопоставимые с контролем. В группе Me количество В220<sup>+</sup>RT1<sup>+</sup>-спленоцитов по сравнению с контролем было повышено через 7 суток эксперимента ( $M=25,4$ ,  $CO=5,2$ ;  $p_{\text{контр}}=0,044$ ), что, возможно, связано со стимулирующим влиянием соединений ванадия на пролиферацию В-лимфоцитов, показанную ранее в экспериментах с применением метаванадата натрия (NaVO<sub>3</sub>) [18, р. 3-410]. Доля В-клеток, экспрессирующих RT1<sup>+</sup>, в группе Me через 14 суток эксперимента была в 2,5 раза ( $M=28,8$ ,  $CO=3,0$ ;  $p_{AB}=0,003$ ) по сравнению с АВ ( $M=11,4$ ,  $CO=8,7$ ) и в 1,5 раза статистически значимо выше ( $M=28,8$ ,  $CO=3,0$ ;  $p_{Me+AB}=0,025$ ) по сравнению с Me+АВ ( $M=18,9$ ,  $CO=6,6$ ).

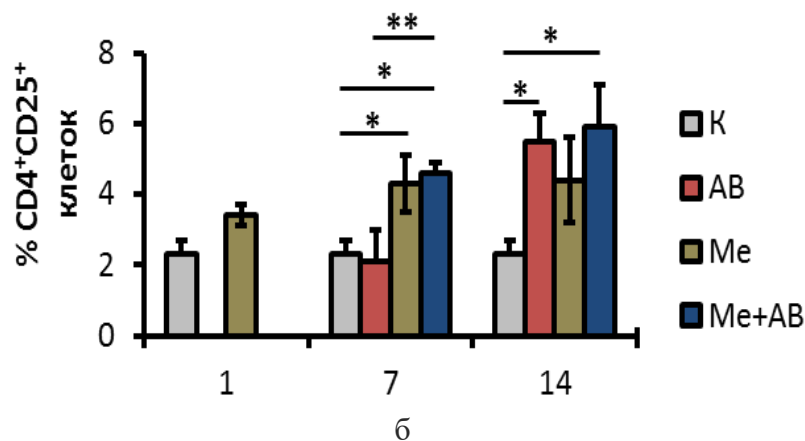
Доля спленоцитов с фенотипом Т регуляторных клеток-клеток (CD4+CD25<sup>+</sup>) не изменялась в группе АВ в течение 7 суток от начала развития асептического воспаления, а на 14-е сутки отмечалось более чем двукратным повышением этих клеток ( $M=5,5$ ,  $CO=0,8$ ;  $p_{\text{контр}}=0,001$ ) по сравнению с контролем ( $M=2,3$ ,  $CO=0,4$ ) (рисунок 28б).



а

а – пример распределения лимфоцитов по количеству CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> на поверхности лимфоцитов через 1, 7 и 14 суток после моделирования асептического воспаления, вызванного на фоне интоксикации солями ванадия и хрома

Рисунок 28 – Доля CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>-спленоцитов экспериментальных животных после воздействия солей ванадия и хрома и скипидара в динамике наблюдения, лист 1

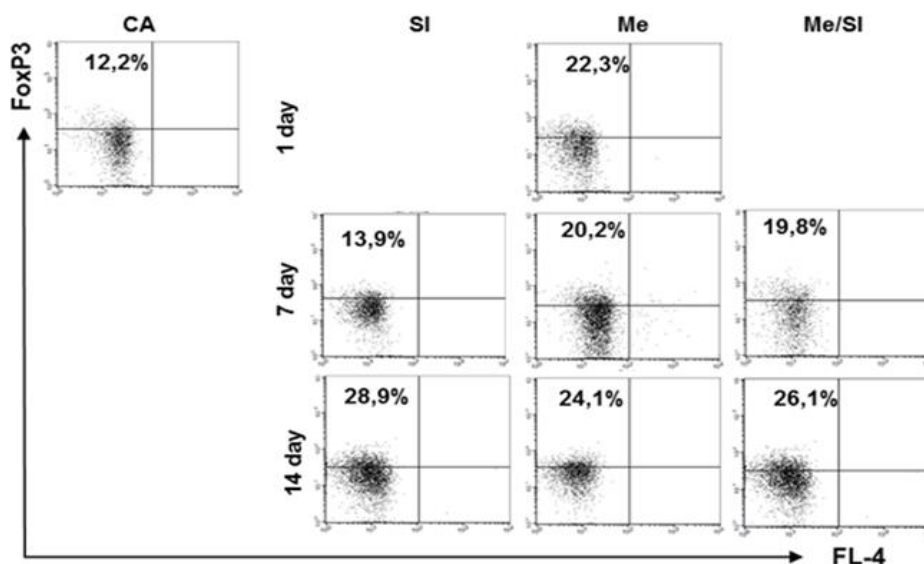


\* -  $p \leq 0,05$  к контролю; \*\* -  $p \leq 0,05$  к АВ; б – показаны результаты исследований  $CD4^+CD25^+$ -спленоцитов для групп К – контроль; АВ – асептическое воспаление; Me – ванадат аммония и бихромат калия; Me+AB: 1 – через 1 сутки; 7 – через 7 суток; 14 – через 14 суток

Рисунок 28, лист 2

Примечание – Показаны средние значения (M) и стандартные отклонения (CO)

Напротив, в группах Me и Me+AB уже на 7-е сутки исследования установили повышение доли  $CD4^+CD25^+$  от контрольного уровня ( $M=2,3$ ,  $CO=0,4$ ) соответственно на 87% ( $M=4,3$ ,  $CO=0,8$ ;  $p_{контр}=0,03$ ) и 100% ( $M=4,6$ ,  $CO=0,3$ ,  $p_{контр} < 0,0001$ ). Тенденция к увеличению продолжилась и на 14-е сутки, где разница с контролем составила для Me 91,3% ( $M=4,4$ ,  $CO=1,7$ ;  $p_{контр}=0,033$ ), для Me+AB 156,5% ( $M=5,9$ ,  $CO=1,2$ ;  $p_{контр}=0,001$ ).

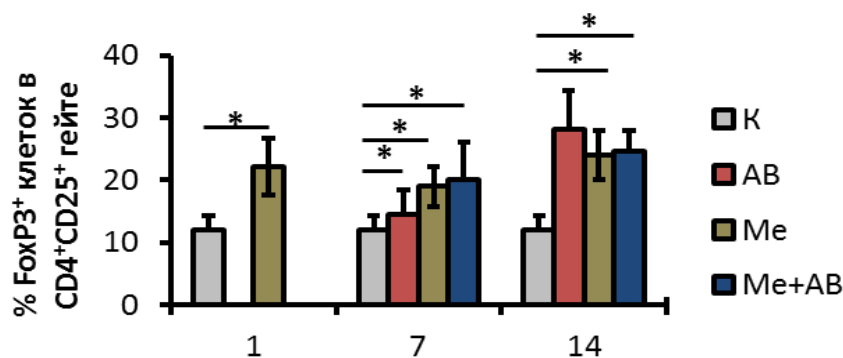


а

а - пример распределения лимфоцитов по количеству  $CD4^+CD25^+FoxP3^+$  на поверхности лимфоцитов через 1, 7 и 14 суток после моделирования асептического воспаления, вызванного на фоне интоксикации солями ванадия и хрома

Рисунок 29 – Доля FoxP3 экспрессирующих  $CD4^+CD25^+$ -спленоцитов экспериментальных животных в динамике наблюдения, лист 1





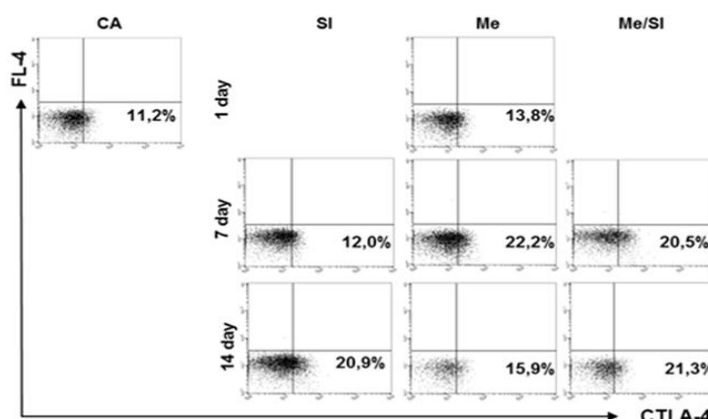
\* –  $p \leq 0,05$  к контролю; \*\* –  $p \leq 0,05$  к АВ; б - показаны результаты исследований  $CD4^+CD25^+$ -спленоцитов для групп К – контроль; АВ – асептическое воспаление; Ме – ванадат аммония и бихромат калия; Ме+АВ: 1 – через 1 сутки; 7 – через 7 суток; 14 – через 14 суток

Рисунок 29, лист 1

Примечание – Показаны средние значения (М) и стандартные отклонения (СО)

В соответствии с рисунком 29, известно, что экспрессия Foxp3 позволяет Т-клеткам CD25 приобретать регуляторную активность [295, 296]. Доля FoxP3 экспрессирующих  $CD4^+CD25^+$ -спленоцитов в динамике наблюдения.

Транскрипционный фактор Foxp3 критически важен для развития и функционирования регуляторных Т-лимфоцитов. Экспрессия FoxP3, играющего основную роль в супрессорной активности Т регуляторных клеток-клеток, анализируемого нами в  $CD4^+CD25^+$  гейте (рисунок 29), и супрессорной молекулы CTLA-4  $CD4^+FoxP3^+$ -спленоцитами (рисунок 30) имела аналогичную динамику в группе АВ через 14 суток, что говорит о позитивной роли расширения пула Т регуляторных клеток-клеток в разрешении воспаления.

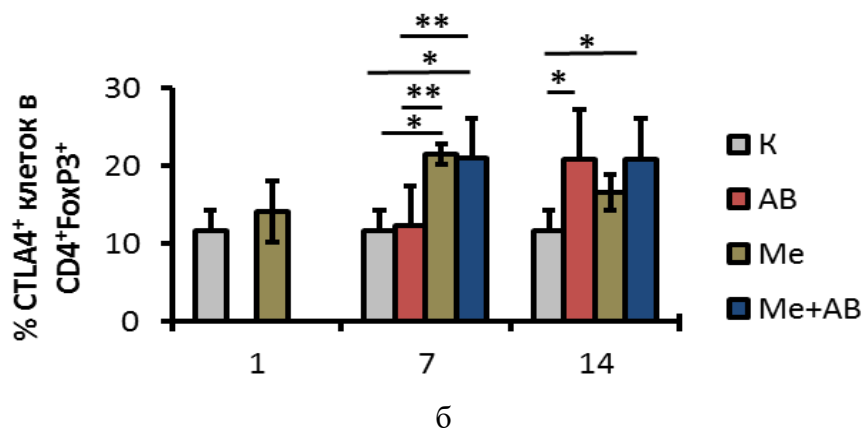


а

а – пример распределения лимфоцитов по количеству  $CD4^+FoxP3^+CTLA^+$  на поверхности лимфоцитов через 1, 7 и 14 суток после моделирования асептического воспаления, вызванного на фоне интоксикации солями ванадия и хрома

Рисунок 30 – Доля  $CD4^+FoxP3^+CTLA^+$  спленоцитов экспериментальных животных после воздействия солей ванадия и хрома и скипидара в динамике наблюдения, лист 1





\* -  $p \leq 0,05$  к контролю; \*\* -  $p \leq 0,05$  к АВ; б - показаны результаты исследований  $CD4^+CD25^+$  CTLA4<sup>+</sup>-спленоцитов для групп К – контроль; АВ – асептическое воспаление; Me – ванадат аммония и дихромат калия; Me+AB: 1 – через 1 сутки; 7 – через 7 суток; 14 – через 14 суток

Рисунок 30, лист 2

Примечание – Показаны средние значения (M) и стандартные отклонения (CO)

Так, через 7 суток в группе АВ доля FoxP3 экспрессирующих  $CD4^+CD25^+$  ( $M=14,4$ ,  $CO=3,2$ ) (рисунок 29) и  $CD4^+FoxP3^+CTLA4^+$  спленоцитов ( $M=12,3$ ,  $CO=5,0$ ) (рисунок 30) колебалась на уровне соответствующих контролей ( $M=12,0$ ,  $CO=4,0$ ;  $M=11,6$ ,  $CO=2,6$ ). Лишь к 14 суткам исследования наблюдали выраженный прирост активности  $CD4^+CD25^+FoxP3$  и  $CD4^+FoxP3^+CTLA4^+$  соответственно в 2,3 раза ( $M=28,1$ ,  $CO=6,2$ ;  $p_{контр} < 0,001$ ) и 1,8 раза ( $M=20,8$ ,  $CO=6,4$ ;  $p_{контр} = 0,015$ ) по сравнению с контролем. При этом, мы наблюдали повышение доли  $CD4^+CD25^+$ -спленоцитов и экспрессии FoxP3 данными клетками в группе Me (рисунок 29) по сравнению с контролем уже в первый день после окончания введения Me и сохранялось до конца эксперимента. Через 7 суток доля  $CD4^+CD25^+FoxP3$  статистически значимо превышала контрольный уровень на 58,3% ( $M=19,0$ ,  $CO=3,2$ ;  $p_{контр} = 0,041$ ) и продолжала нарастать и на 14-е сутки, превышая контроль уже в 2 раза ( $M=24,0$ ,  $CO=4,0$ ;  $p_{контр} = 0,021$ ).

Аналогичную картину наблюдали и в группе Me+AB. Экспрессия CTLA4  $CD4^+FoxP3^+$ -спленоцитами в группах Me и Me+AB по сравнению с контролем статистически значимо повышалась на 7-е сутки в 2 раза ( $M_{Me} = 21,5$ ,  $CO = 1,3$ ;  $M_{Me+AB} = 21,0$ ,  $CO = 5,0$ ;  $p_{контр} \leq 0,05$ ) и сохранялась до конца эксперимента (рисунок 30).

### 3.5 Математический анализ массива данных с применением статистических методов факторного и дискриминантного анализа

#### 3.5.1 Факторный анализ массива данных, исследованных показателей крови

Нами был проведен анализ проведенных исследований для групп с асептическим воспалением и групп животных, предварительно затравленных

солями ванадия и хрома. Одной из задач, стоящих перед нами, являлась оценка ответной реакции организма животных на воспаление. Воспаление характеризуется как сложная комплексная защитно-приспособительная реакция организма в ответ на повреждение. Трудность заключается в том, что организм представляет собой структурную и функциональную взаимосвязь, а возникающие нарушения гомеостаза требуют системной оценки.

Учитывая то, что параметры, характеризующие состояние иммунного ответа, в ответ на воспаление, вызванное как у интактных животных, так и у животных, предварительно затравленных солями ванадия и хрома, характеризовали разный исход, факторному анализу с выделением главных компонент были подвергнуты результаты исследований параметров иммунного ответа в группах АВ и Me+AB (таблицы 13).

Таблица 13 – Результаты распределения факторных нагрузок для переменных после процедуры вращения Варимакс

Переменные	Факторные нагрузки (Варимакс исх.) (AB)					
	Выделение: Главные компоненты (отмечены нагрузки > ,700000)					
	через 1 сутки		через 7 суток		через 14 суток	
	фактор 1	фактор 2	фактор 1	фактор 2	фактор 1	фактор 2
Л	0,277861	-0,960621	-0,99631	0,085770	-0,87608	-0,48217
Э	0,125202	0,992131	0,82449	-0,565883	-0,93922	0,34332
Нв	-0,987589	0,157061	0,73428	-0,678843	0,69670	0,71736
НФ	0,514114	-0,857722	-0,86914	0,494568	0,50488	-0,86319
ЛФ	0,225656	-0,974207	-0,99765	-0,068446	-0,99970	-0,02462
Мо	0,776746	-0,629813	-0,99434	0,106240	-0,75709	0,65332
ЭО	-0,629813	-0,776746	-0,95238	0,304909	0,96960	-0,24469
B220	-	-	0,88892	0,458055	0,08617	-0,99628
RT1+	-	-	0,31443	0,949281	-0,30869	-0,95116
B220+RT1+	-	-	-0,19447	0,980909	-0,27472	-0,96152
CD4+	-	-	-0,96166	-0,274258	-0,17969	-0,98372
CD4+CD25	-	-	0,11943	0,992842	0,96960	-0,24469
FoxP3+	-	-	-0,33934	0,940665	-0,25347	0,96734
CD4+FoxP3	-	-	-0,99972	-0,023628	0,24469	0,96960
CTLA4+	-	-	0,41214	0,911120	0,64087	0,76765
Клеточн. селезенки	-	-	0,96705	-0,254571	-0,08617	0,99628
Th	0,527155	0,849769	0,97152	0,236947	0,99982	-0,01897
Th1	0,999976	-0,006933	-0,77660	-0,629990	-0,99127	0,13185
TH2	0,998029	0,062748	0,94067	0,339336	0,08617	-0,99628
CTL	-0,990794	0,135376	-0,52032	0,853969	0,99594	0,09001
ИЛ-1	0,938685	-0,344777	0,99902	-0,044277	0,96204	0,27290
ИЛ-6	0,973649	0,228054	-0,95238	0,304909	0,82181	0,56977
TGF	0,935703	-0,352790	0,91776	-0,397146	-0,54763	0,83672
ИЛ-10	0,947794	0,318884	0,76688	-0,641792	0,92452	0,38114
Expl.Var	9,242002	5,757998	15,98162	8,018384	12,33260	11,66740
Prp.Totl	0,616133	0,383867	0,66590	0,334099	0,51386	0,48614

С целью уточнения наиболее существенных сдвигов иммунной системы при асептическом воспалении факторный анализ проведен для двух сроков исследования (через 7 и 14 суток), для которых при классическом течении воспаления характерны разворачивание и разрешение патологического процесса. Оценка факторных нагрузок проводилась по коэффициентам 0,7 и более. Из таблицы 13 следует, что при неосложненном течении асептического воспаления через 7 суток ведущими, среди звеньев патогенеза, факторами являлись низкое содержание эритроцитов, гемоглобина и моноцитов, CD4+FoxP3+CTLA4+ и клеточной численности селезенки. Во втором факторе наибольшую информативную ценность представляли параметры с высокими значениями лейкоцитов, нейтрофилов и лимфоцитов и низкими значениями CD4+FoxP3+. Из вышеизложенного следует, что в разворачивании воспалительного ответа имеет значение клеточное звено иммунитета.

Через 14 суток выделены такие ведущие факторы как: прирост лейкоцитарной фракции крови за счет нейтрофилов, лимфоцитов и моноцитов, повышение пролиферативной активности CD4+, CD4+FoxP3+CTLA4+, B220+RT1+ и RT1+ in CD45+CD45R(B220). Во втором факторе имели высокие векторные нагрузки такие переменные как эритроциты и гемоглобин, значения которых по результатам исследования оставались на низком уровне. Кроме того, во втором факторе через 14 суток исследования существенным в разрешении воспаления представлены дифференцировка В-клеток (CD45+CD45R(B220)), а также регуляторных Т-лимфоцитов (CD4+FoxP3+).

Таким образом, к 14 суткам исследования в течении асептического воспаления наблюдается активация неспецифической резистентности. Значительная роль гуморального звена иммунитета заключалась в увеличении антигенпрезентирующей активности В-лимфоцитов, а также супрессорной роли CD4+FoxP3+CTLA4+, способствовавшей завершению воспалительной реакции.

Таблица 14 – Результаты распределения факторных нагрузок для переменных после процедуры вращения Варимакс

Переменные	Факторные нагрузки (Варимакс исх.) (Me+AB)					
	Выделение: Главные компоненты (отмечены нагрузки >,700000)					
	через 1 сутки		через 7 суток		через 14 суток	
	фактор 1	фактор 2	фактор 1	фактор 2	фактор 1	фактор 2
Л	-0,490344	-0,871529	0,99164	-0,12904	0,99829	-0,058511
Э	0,215885	0,976419	-0,05095	0,99870	0,27460	0,961558
Нв	0,352428	0,935839	0,22639	0,97404	0,34813	0,937446
НФ	0,973682	0,227910	0,22536	-0,97428	0,99669	0,081344
ЛФ	0,998450	-0,055660	0,99754	0,07016	0,97576	-0,218838
Мо	-0,696805	-0,717261	0,98352	-0,18083	0,99215	0,125044
ЭО	-0,179684	-0,983724	-0,11090	-0,99383	0,97113	-0,238570
B220	-	-	-0,89110	-0,45382	-0,07203	0,997402
RT1+	-	-	-0,48355	0,87532	0,80411	-0,594474
B220+RT1+	-	-	-0,68638	0,72725	-0,23001	0,973189
CD4+	-	-	0,97404	-0,22639	-0,09272	0,995692

Продолжение таблицы 14

1	2	3	4	5	6	7
CD4+CD25	-	-	0,03823	0,99927	-0,96732	0,253562
FoxP3+	-	-	0,88170	0,47182	-0,02210	-0,999756
CD4+FoxP3	-	-	0,96504	-0,26210	0,99779	0,066438
CTLA4+	-	-	0,96709	0,25444	0,73933	0,673339
Клеточн. селезенки	-	-	-0,69892	-0,71520	-0,98592	-0,167232
Th	0,854212	0,519925	0,51102	0,85957	0,99190	-0,127012
Th1	0,884095	0,467307	-0,09392	-0,99558	-0,97119	0,238301
Th2	0,899036	0,437876	0,41631	0,90922	-0,02210	-0,999756
CTL	0,905516	0,424311	-0,97404	0,22639	0,99983	-0,018254
ИЛ-1	0,834454	0,551078	0,73107	0,68230	0,98592	0,167232
ИЛ-6	0,394075	0,919078	-0,88451	-0,46652	0,87862	0,477530
TGF	0,839135	0,543924	0,92612	0,37722	-0,45391	0,891050
ИЛ-10	0,305619	0,952154	0,88821	0,45944	0,96032	0,278898
Expl.Var	7,662717	7,337283	12,99976	11,00024	15,02932	8,970682
Prp.Totl	0,510848	0,489152	0,54166	0,45834	0,62622	0,373778

Как видно из матрицы факторных нагрузок (таблица 14), состав переменных первого фактора в группе Me+AB показывает, что через 7 суток самые высокие нагрузки пришлись на лейкоциты крови, характеризующие прямую корреляционную связь между количественным составом лейкоцитов и лимфоцитов.

Кроме того, признаки, характеризующие расстройства гуморального звена иммунитета, представлены довольно значительными нагрузками для переменных, связанных с супрессорной ролью лимфоцитов. Вторыми по значимости можно рассматривать переменные, характеризующие развитие анемии, нарушение фагоцитарного звена иммунитета и расширение пула В-клеток.

Через 14 суток под влиянием солей ванадия и хрома течение асептического воспаления ассоциировано с нарушениями в системе крови, представленные низкими значениями эритроцитов, гемоглобина, лимфоцитов и моноцитов. Следующими по значимости (фактор II) стали изменения в системе фагоцитарного звена иммунитета, с высокой корреляционной взаимосвязью низких значений лейкоцитов и нейтрофилов.

Что же касается непосредственных маркеров иммуносупрессии, то фактор I выделяет низкую пролиферативную активность эффекторных лимфоцитов, тогда как фактор II выделяет перекоп дифференцировки в сторону CD4+CD25+ (Т регуляторные клетки). Фактор I выделяет высокую экспрессию FoxP3 и CTLA4+, фактор II - CD4+FoxP3.

Из вышеизложенного следует, что ключевые показатели металлиндуцированной иммунодепрессии с началом развития воспаления в крови ассоциированы с развитием анемии, расстройством гуморального звена иммунитета и неспецифической резистентности организма с проявлением супрессорной роли селезеночных субпопуляций Т-регуляторных лимфоцитов.

### 3.5.2 Математическое моделирование массива данных с применением статистических методов дискриминантного анализа

Дальнейшим проведенным дискриминантным анализом важно было установить главные отличительные признаки, которые бы позволили оптимальным способом разделить изучаемые группы между собой. В качестве группирующей переменной были взяты группы «Опыт» и «АВ». 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 таблице 15.

Таблица 15 – Показатели заключительного пошагового анализа (7 суток)

Переем. ввода/исключ.	Пошаговые статистики									
	шаги	F вв/искл.	df 1	df 2	p-level	Лямбда Уилкса	F-value	df 1	df 2	p-level
CD4+CD25+	1	27,84872	2	14	0,000013	0,200868	27,849	2	14	<00001
Нв	2	10,23774	2	13	0,002138	0,078006	16,773	4	26	<00001
CD45+CD45R(B220)	3	4,20864	2	12	0,041219	0,045847	14,681	6	24	<00001
Л	4	3,88438	2	11	0,052937	0,026870	14,026	8	22	<.00001
CD4+FoxP3+	5	4,39944	2	10	0,042593	0,014293	14,729	10	20	<00001
ЭО	6	1,50263	2	9	0,273477	0,010715	12,991	12	18	<00001

Таблица 16 – Стандартизованные дискриминантные коэффициенты (7 суток)

Переменные	Стандартизованные коэффициенты для канонических переменных	
	Root 1	Root 2
CD4+CD25+	0,79244	-0,240072
Нв	-0,11031	-0,711710
CD45+CD45R(B220)	-0,74942	-0,101924
Л	-1,21254	0,135749
CD4+FoxP3+	0,98011	0,317694
ЭО	-0,15398	-0,672790
Eigenval	23,68946	2,779907
Cum.Prop	0,89498	1,000000

В соответствии с таблицей 16, для вычисления весов дискриминантной функции (вклада каждой переменной) были применены стандартизованные коэффициенты, в результате чего были получены 2 группы (корня).

В таблице 16 наглядно продемонстрированы 6 переменных, имеющих наибольшие стандартизованные коэффициенты. Классификационный матрикс (таблица 17) показал, что наибольшее значение дискриминантной функции принадлежит группам «Опыт» и «Контроль» (% вклада 100,0). Группе АВ соответствует значение 83,3%.

Таблица 17 – Классификационная матрица дискриминантных групп (7 суток)

Группы	Classification Matrix; Rows: Observed classifications Columns: Predicted classifications			
	percent correct	AB p=,35294	опыт p=,29412	контроль p=,35294
AB	83,3333	5	0	1
Опыт	100,0000	0	5	0
Контроль	100,0000	0	0	6
Total	94,1176	5	5	7

Как видно из таблицы 16, наиболее существенный вклад в разделение первой дискриминантной функции внесли показатели лейкоцитов и CD4+FoxP3+. Вместе с тем, на рисунке 31 наглядно продемонстрировано, что расстояния между центроидами по первой дискриминантной функции (Root 1) различны: группы «AB» и «Контроль» представлены левее от центра, т.е. ей соответствуют меньшие значения корня 1.

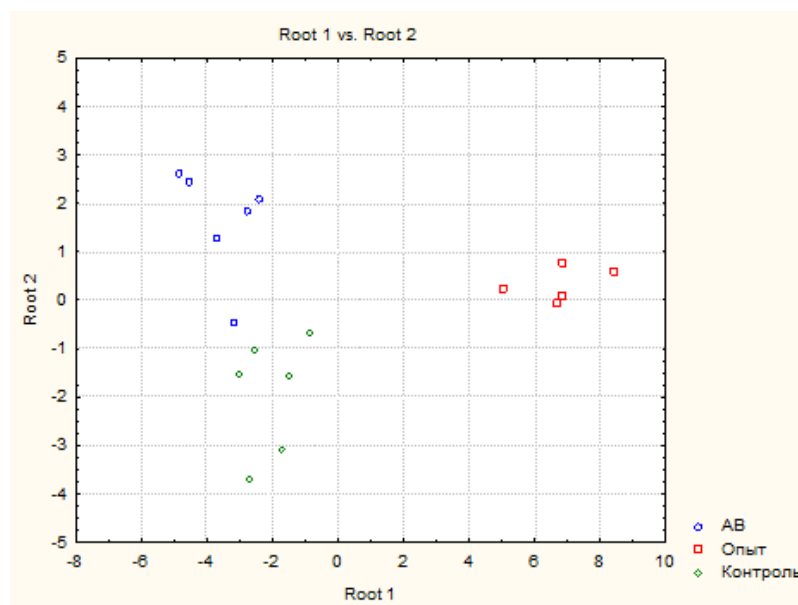


Рисунок 31 – Диаграмма рассеяния значений канонических переменных, установленных дискриминантной функцией, для групп «Контроль», «Опыт» и «AB»

Таблица 18 – Показатели заключительного пошагового анализа (14 суток)

Переем. Ввода/ исключ.	Пошаговые статистики									
	шаги	F вв/ искл.	df 1	df 2	p-level	Лямбда Уилкса	F- value	df 1	df 2	p- level
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
CD4+CD25+	1	36,0362	2	13	0,000005	0,152811	36,036	2	13	<00001
CD45+CD45 R(B220)	2	21,6754	2	12	0,000104	0,033129	26,964	4	24	<00001
CD4+FoxP3+	3	13,3018	2	11	0,001159	0,009691	33,579	6	22	<00001

Продолжение таблицы 18

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
CD4+CD25+ FoxP3+	4	4,97343	2	10	0,031669	0,004858	33,367	8	20	<00001
НФ	5	4,81574	2	9	0,037842	0,002347	35,356	10	18	<00001
CD4+	6	6,22249	2	8	0,023443	0,000918	42,665	12	16	<00001
Нв	7	3,81687	2	7	0,075701	0,000439	46,712	14	14	<00001
ЭО	8	2,74913	2	6	0,142088	0,000229	48,787	16	12	<00001
CD4+FoxP3 +CTLA4+	9	8,82594	2	5	0,022891	0,000051	77,547	18	10	<00001

Пошаговая статистика 14 суток исследования включала 9 шагов, после которой было выявлено 9 информативных показателей, основные статистические показатели которых представлены в таблице 18.

Для вычисления весов дискриминантной функции (вклада каждой переменной) были применены стандартизованные коэффициенты, в результате чего были получены 2 группы (корня) (таблица 19).

Таблица 19 – Стандартизованные дискриминантные коэффициенты (14 суток)

Переменные	Стандартизованные коэффициенты для канонических переменных	
	Root 1	Root 2
CD4+CD25+	2,1349	-1,16384
CD45+CD45R(B220)	2,4597	1,17626
CD4+FoxP3+	-1,3322	-1,83818
CD4+CD25+ FoxP3+	4,4552	0,46731
НФ	6,0616	1,08829
CD4+	2,1904	0,79027
Нв	-3,8300	-1,36582
ЭО	4,0647	0,47018
CD4+FoxP3+CTLA4+	-2,7162	-0,01745
Eigenval	537,4157	68,50939
Cum.Prop	0,8869	1,00000

В таблице 19 наглядно продемонстрированы 9 переменных, имеющих наибольшие стандартизованные коэффициенты. Классификационный матрикс (таблица 20) показал, что значения дискриминантных функций всех групп оказались равнозначными (% вклада 100,0).

Таблица 20 – Классификационная матрица дискриминантных групп (14 суток)

Группы	Classification Matrix; Rows: Observed classifications Columns: Predicted classifications			
	Percent Correct	АВ p=,31250	опыт p=,31250	контроль p=,37500
АВ	100	5	0	0
Опыт	100	0	5	0
Контроль	100	0	0	6
Total	100	5	5	6

Как видно из таблицы 19, наиболее существенный вклад в разделение первой дискриминантной функции внесли показатели нейтрофилов и CD4+CD25+FoxP3+. Вместе с тем, на рисунке 32 наглядно продемонстрировано, что расстояния между центроидами по первой дискриминантной функции (Root 1) различны: группа «АВ» представлена правее от центра, т.е. ей соответствуют большие значения корня 1.

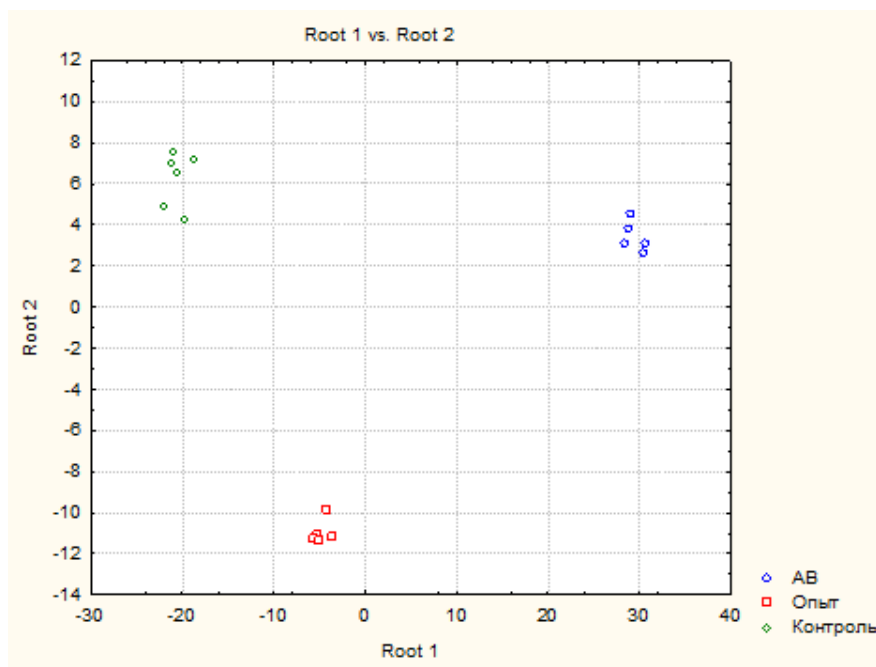


Рисунок 32 – Диаграмма рассеяния значений канонических переменных, установленных дискриминантной функцией, для групп «Контроль», «Опыт» и «АВ»

Из вышеизложенного заключено, что на 14 сутки исследования группа «АВ» дискриминирует с группой «Опыт» значительной по сравнению с собственными результатами предыдущего срока исследования активацией регуляторных Т-лимфоцитов, способствовавших завершению воспалительного процесса.

### 3.6 Изучение гематологических показателей у крыс с асептическим воспалением в условиях коррекции МХФ18 и ПО

Изменения в системе крови, вероятно, важны для объяснения динамики воспаления и прогнозирования его исхода [297]. Биомаркеры крови являются сигнальным признаком состояния воспалительного процесса, поэтому количественное и качественное изучение параметров крови позволят определить наиболее ранние проявления патологического процесса и оценить эффективность применяемой корригирующей терапии на всех этапах его развития.

В соответствии с таблицей 21, результаты исследований гематологического анализа крови у крыс с асептическим воспалением, получавших МХФ18 и ПО.



Таблица 21 – Распределение среднего содержания лейкоцитов крови опытных животных в сравнении

Элементы крови * abs (x10 <sup>3</sup> /μL)	Контроль, n=10 М (СО)	АВ, n=10 М (СО)	p**	АВ+ПО, n=10 М (СО)	p	АВ+МХФ18, n=10 М (СО)	p
Через 1 сутки							
ЛЕЙКОЦИТЫ (WBC)	8,9 (1,3)	3,0 (1,3)	-	5,3 (1,9)	0,004 <sup>a</sup> 0,0002 <sup>b</sup>	6,0 (1,8)	0,011 <sup>a</sup> 0,009 <sup>b</sup>
НЕЙТРОФИЛЫ (NEUT)	1,5 (0,3)	0,4 (0,3)	-	1,1 (0,6)	0,003	1,4 (0,4)	0,0003 <sup>b</sup>
ЛИМФОЦИТЫ (LYMPH)	6,6 (1,0)	2,3 (1,0)	-	3,6 (1,2)	0,0006 <sup>a</sup> <0,0001 <sup>b</sup>	4,4 (1,4)	0,003 <sup>a</sup> 0,008 <sup>b</sup>
МОНОЦИТЫ (MONO)	0,6 (0,1)	0,2 (0,1)	0,0001 <sup>a</sup>	0,4 (0,1)	0,020 <sup>a</sup> 0,005 <sup>b</sup>	0,5 (0,2)	0,012 <sup>b</sup>
ЭОЗИНОФИЛЫ (EO)	0,2 (0,1)	0,05 (0,04)	0,0065 <sup>a</sup>	0,07 (0,03)	0,020 <sup>a</sup> 0,025 <sup>b</sup>	0,091 (0,03)	0,040 <sup>a</sup>
Через 7 суток							
ЛЕЙКОЦИТЫ (WBC)	8,9 (1,3)	15,1 (5,2)	0,0313 <sup>a</sup>	18,7 (5,5)	0,006 <sup>a</sup> 0,001 <sup>d</sup>	21,2 (5,0)	0,0003 <sup>a</sup>
НЕЙТРОФИЛЫ (NEUT)	1,5 (0,3)	3,8 (1,6)	0,0266 <sup>a</sup>	4,6 (1,9)	0,009 <sup>a</sup> 0,005 <sup>d</sup>	5,5 (1,9)	0,0052 <sup>a</sup>
ЛИМФОЦИТЫ (LYMPH)	6,6 (1,0)	10,5 (3,6)	0,0431 <sup>a</sup>	12,5 (3,2)	0,005 <sup>a</sup> 0,0005 <sup>d</sup>	13,9 (3,2)	0,0004 <sup>a</sup>
МОНОЦИТЫ (MONO)	0,6 (0,1)	0,7 (0,3)	0,011 <sup>c</sup>	1,4 (0,5)	0,008 <sup>a</sup> 0,018 <sup>b</sup> 0,003 <sup>d</sup>	1,6 (0,4)	0,0004 <sup>a</sup> 0,003 <sup>b</sup>
ЭОЗИНОФИЛЫ (EO)	0,2 (0,1)	0,06 (0,03)	-	0,2 (0,1)	0,045 <sup>b</sup>	0,1 (0,1)	-
Через 14 суток							
ЛЕЙКОЦИТЫ (WBC)	8,9 (1,3)	14,2 (3,5)	0,0112 <sup>a</sup>	16,5 (6,4)	0,034 <sup>a</sup> 0,007 <sup>d</sup>	13,2 (5,4)	0,020 <sup>a</sup> 0,024 <sup>e</sup>
НЕЙТРОФИЛЫ (NEUT)							
ЛИМФОЦИТЫ (LYMPH)	1,5 (0,3)	3,9 (1,5)	0,011 <sup>a</sup>	4,7 (1,6)	0,004 <sup>a</sup> 0,002 <sup>d</sup>	3,8 (1,7)	0,020 <sup>a</sup>
МОНОЦИТЫ (MONO)	6,6 (1,0)	9,1 (2,1)	0,0347 <sup>a</sup>	10,3 (4,7)	0,016 <sup>d</sup>	8,4 (3,1)	0,024 <sup>a</sup>
ЭОЗИНОФИЛЫ (EO)	0,6 (0,1)	1,1 (0,2)	0,0019 <sup>a</sup>	1,1 (0,3)	0,011 <sup>a</sup> 0,002 <sup>d</sup>	0,9 (0,7)	-
ЛЕЙКОЦИТЫ (WBC)	0,2 (0,1)	0,4 (0,4)	-	0,4 (0,2)	0,021 <sup>d</sup>	0,2 (0,1)	-
<p>* - WBC (общее число лейкоцитов), NEUT (абсолютное количество нейтрофилов), LYMPH (абсолютное количество лимфоцитов), MONO (абсолютное количество моноцитов), EO (абсолютное количество эозинофилов);</p> <p>** - по t – критерию Стьюдента статистически значимо по отношению: а – к контролю; b – к АВ; с – к АВ+ПО; d – к 1 суткам, e – к 7 суткам</p>							

На 7 сутки после моделирования асептического воспаления и проведенной коррекции МХФ18 и ПО мы обнаружили повышенный уровень

лейкоцитов, лимфоцитов, нейтрофилов и моноцитов, в 2-3 раза статистически значимо превышавший аналогичные показатели в группе АВ. 14-е сутки исследования охарактеризовались полутора-двукратным снижением исследуемых показателей в группах АВ+МХФ18 и АВ+ПО от предыдущего уровня, но превышавшие показатели АВ. Статистически значимых различий между АВ+МХФ18 и АВ+ПО не наблюдалось.

В дальнейшем проанализированы элементы красной крови (таблица 22).

Таблица 22 – Распределение среднего содержания эритроцитов и гемоглобина в крови опытных животных в сравнении

Элементы крови *	Контроль, n=10 М (СО)	АВ, n=10 М (СО)	p**	АВ+ПО, n=10 М (СО)	p	АВ+МХФ18, n=10 М (СО)	p
Через 1 сутки							
ЭРИТРОЦИТЫ (RBC) (X10 <sup>6</sup> /ML)	8,3 (0,9)	7,1 (0,5)	0,0151 <sup>a</sup>	6,8 (0,8)	0,008 <sup>a</sup> 0,0002 <sup>b</sup>	7,0 (1,1)	0,036 <sup>a</sup>
ГЕМОГЛОБИН (HGB) (G/L)	143,9 (8,7)	132,0 (5,0)	0,0123 <sup>a</sup>	129,8 (6,2)	0,006 <sup>a</sup> <0,0001 <sup>b</sup>	130,7 (5,3)	0,007 <sup>a</sup>
ГЕМАТОКРИТ (HCT) %	42,1 (4,1)	36,2 (2,0)	0,0108 <sup>a</sup>	36,5 (1,9)	0,011 <sup>a</sup> 0,0008 <sup>b</sup>	36,7 (2,1)	0,013 <sup>a</sup>
Через 7 суток <0,0001 <sup>b</sup>							
ЭРИТРОЦИТЫ (RBC) (X10 <sup>6</sup> /ML)	8,3 (0,9)	6,9 (0,6)	0,0083 <sup>a</sup>	7,5 (0,4)	-	6,7 (0,3)	0,003 <sup>c</sup>
ГЕМОГЛОБИН (HGB) (G/L)	143,9 (8,7)	119,2 (12,9)	0,0036 <sup>a</sup>	123,5 (7,4)	0,0008 <sup>a</sup>	112,3 (7,5)	0,0009 <sup>a</sup> 0,027 <sup>c</sup>
ГЕМАТОКРИТ (HCT) %	42,1 (4,1)	35,1 (3,6)	0,007 <sup>a</sup>	35,9 (1,9)	0,006 <sup>a</sup>	33,5 (2,8)	0,051 <sup>a</sup>
Через 14 суток							
ЭРИТРОЦИТЫ (RBC) (X10 <sup>6</sup> /ML)	8,3 (0,9)	7,3 (0,8)		7,4 (0,3)	-	7,9 (0,4)	0,0002 <sup>e</sup>
ГЕМОГЛОБИН (HGB) (G/L)	143,9 (8,7)	120,5 (16,4)	0,0156 <sup>a</sup>	124,8 (5,3)	0,0007 <sup>a</sup>	135,0 (0,6)	<0,0001 <sup>a</sup>
ГЕМАТОКРИТ (HCT) %	42,1 (4,1)	35,5 (4,5)	0,021 <sup>a</sup>	36,2 (1,6)	0,0007 <sup>a</sup>	39,3 (1,5)	0,031 <sup>a</sup> 0,006 <sup>c</sup> 0,002 <sup>e</sup>
* - RBC (общее число эритроцитов), HGB (концентрация гемоглобина), HCT (показатель гематокрита);							
** - по Ttest статистически значимо по отношению: a – к контролю; b – к АВ; c – к ПО; d – к 1 суткам; e - к 7 суткам							

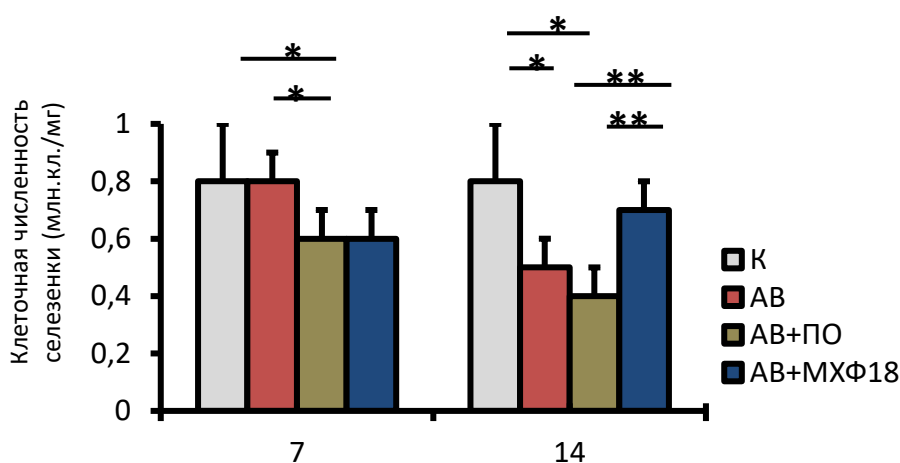
Проведенными исследованиями установлено, что МХФ18 и ПО не восстанавливают показатели эритроцитов, гемоглобина и гематокрита, которые во все сроки исследования оказались статистически значимо ниже контрольного уровня (таблица 22).

### 3.7 Изучение клеточной численности, селезеночных субпопуляций крыс в динамике течения асептического воспаления и коррекции МХФ18 и ПО

Для сохранения иммунного гомеостаза, важна не столько стимуляция и иммуносупрессия в чистом виде, сколько коррекция т.е. исправление нарушенных иммунных функций, поскольку иммунокоррекция приводит измененные показатели до уровня первоначальных значений.

Целью следующих исследований явилось изучение корригирующей эффективности МХФ18 в сравнении с известным иммуномодулятором – полиоксидонием (рисунок 33).

Исследование клеточной численности селезенки показало, что через 7 суток под влиянием ПО и МХФ18 клеточная численность селезенки не достигала уровня контроля и АВ. Через 14 суток клеточная численность селезенки в группе АВ+ПО продолжала снижаться, тогда как МХФ18 восстановил клеточную численность селезенки ( $M=0,7$ ,  $CO=0,1$ ), превысив на 40% значения АВ ( $M=0,5$ ,  $CO=0,1$ ;  $p_{AB+MХФ18}=0,002$ ) и на 75% АВ+ПО ( $M=0,4$ ,  $CO=0,1$ ;  $p_{AB+MХФ18}=0,0008$ ), а также на 16,7% ( $M=0,7$ ,  $CO=0,1$  против  $M=0,6$ ,  $CO=0,1$ ;  $p_{7сут}=0,034$ ) собственные значения предыдущего срока.



\* -  $p \leq 0,05$  к контролю; \*\* -  $p \leq 0,05$  к АВ; \*\*\* -  $p \leq 0,05$  к ПО; \*\*\*\* - к 7 суткам

Рисунок 33 – Клеточная численность селезенки животных с асептическим воспалением, получавших ПО и МХФ18

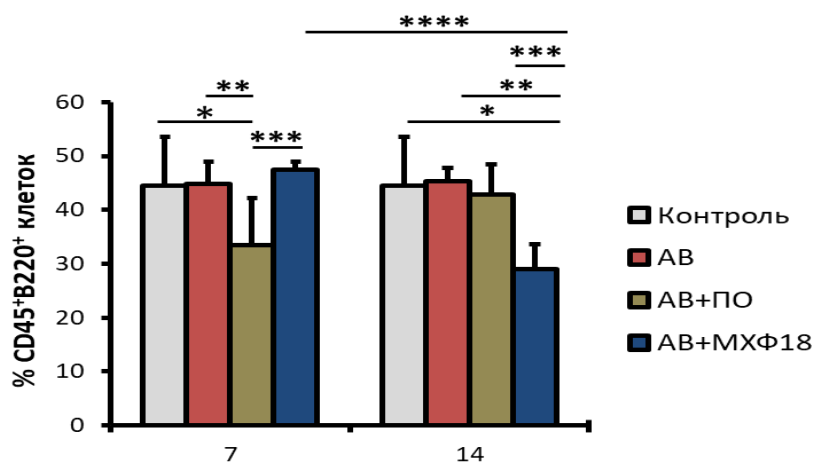
Примечания:

1. Показаны результаты исследований клеточной численности селезенки для групп К – контроль; АВ – асептическое воспаление; АВ+ПО – асептическое воспаление + полиоксидоний; АВ+МХФ18 - асептическое воспаление + МХФ-18 через 7 и 14 суток.
2. Показаны средние значения (M) и стандартные отклонения (CO)

Таким образом, МХФ18 к 14 суткам исследования по сравнению с ПО восстанавливает клеточную численность селезенки, возвращая ее значения до контрольного уровня.

Результаты исследований CD45+B220+спленоцитов представлены на рисунке 34.

Проведенные исследования показали, что полиоксидоний в течение недели не стимулировал расширение пула В-клеток, а значения CD45+B220+ оказались ниже уровня АВ на 25,3% ( $p_{AB}=0,024$ ). Пролиферативная активность CD45+B220+спленоцитов под влиянием МХФ18 в этот срок исследования превосходила значения АВ+ПО на 42% ( $p_{ПО}=0,011$ ). Через 14 суток значения АВ+ПО вернулись к контрольному уровню, тогда как МХФ-18 статистически значимо снижал CD45+B220+ по отношению к контролю на 34,8% ( $p_K=0,006$ ), к АВ на 36% ( $p_{AB}=0,00008$ ), к АВ+ПО на 32,4% ( $p_{ПО}=0,0008$ ) и к собственным значениям предыдущего срока на 38,8% ( $p_{7\text{суток}}=0,00008$ ). По-видимому, МХФ18 снижает антигенную стимуляцию с очага воспаления, что и способствовало ингибированию пролиферативной активности CD45+B220+.



\* -  $p \leq 0,05$  к контролю; \*\* -  $p \leq 0,05$  к АВ; \*\*\* -  $p \leq 0,05$  к АВ+ПО; \*\*\*\* -  $p \leq 0,05$  к 7 суткам

Рисунок 34 – Доля CD45+B220+-спленоцитов животных с асептическим воспалением, получавших ПО и МХФ18

Примечания:

1. Показаны результаты исследований CD45+B220+ для групп К – контроль; АВ – асептическое воспаление; АВ+ПО – асептическое воспаление + полиоксидоний; АВ+МХФ18 – асептическое воспаление + МХФ18: 7 – через 7 суток; 14 – через 14 суток.
2. Показаны средние значения (М) и стандартные отклонения (СО)

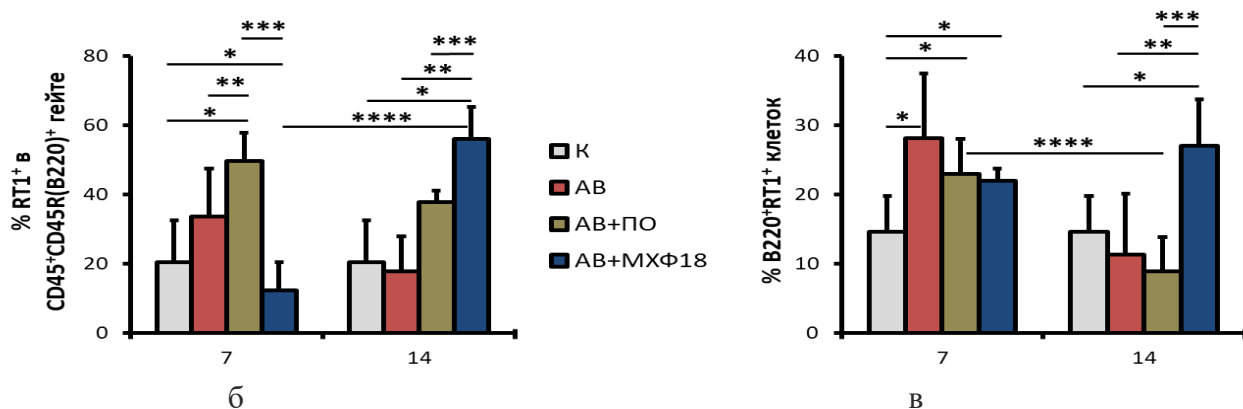
Процентное содержание активных В-лимфоцитов, способных к экспрессии молекулы МНС-II, через 7 суток после применения ПО и МХФ18 колебалось на уровне АВ, превышая контрольный уровень соответственно на 56,5% ( $p_{\text{контр}}=0,018$ ) и 49,6% ( $p_{\text{контр}}=0,016$ ). Через 14 суток под влиянием МХФ18 доля B220+RT1 оставалась на уровне предыдущего исследования, но существенно превышало их долю в группах контроль, АВ и АВ+ПО соответственно на 84,4% ( $p_{\text{контр}}=0,005$ ), 137,7% ( $p_{AB}=0,006$ ) и 204,5% ( $p_{AB+ПО}=0,0004$ ).

Через 7 суток экспрессия RT1+ в активированных В-лимфоцитах существенно возросла под влиянием ПО, значения которого на 48% и 141,3% превышала АВ ( $p_{AB}=0,041$ ) и контроль ( $p_{\text{контр}}=0,0008$ ) соответственно. Через 14

суток МХФ18 стимулировал экспрессию RT1+, значения которых в 2,7 раза превышали значения контроля ( $p_{\text{контроль}}=0,0002$ ), 3,1 раза АВ ( $p_{\text{АВ}}=0,006$ ), 4,6 раза АВ+ПО ( $p_{\text{АВ+ПО}}<0,05$ ) и собственные значения предыдущего срока в 1,5 раза ( $p_{7\text{сут}}=0,003$ ), (рисунок 35).

Серии	Контроль	АВ	АВ+ПО	АВ+МХФ18
Показатели	через 7 суток			
RT1+ в CD45+CD45R (B220)+	20,6 (11,8)	33,6 (14,0)	49,7 (8,2)	37,8 (3,4)
B220+RT1	14,7 (5,1)	28,5 (9,3)	23,0 (5,0)	22,0 (1,8)
	через 14 суток			
RT1+ в CD45+CD45R (B220)+	20,6 (11,8)	17,9 (10,1)	12,3 (8,3)	56,1 (9,2)
B220+RT1	14,7 (5,1)	11,4 (6,0)	8,9 (5,0)	27,1 (6,6)

а



\* -  $p \leq 0,05$  к контролю; \*\* -  $p \leq 0,05$  к АВ; \*\*\* - к АВ+ПО; \*\*\*\* -  $p \leq 0,05$  к 7 суткам

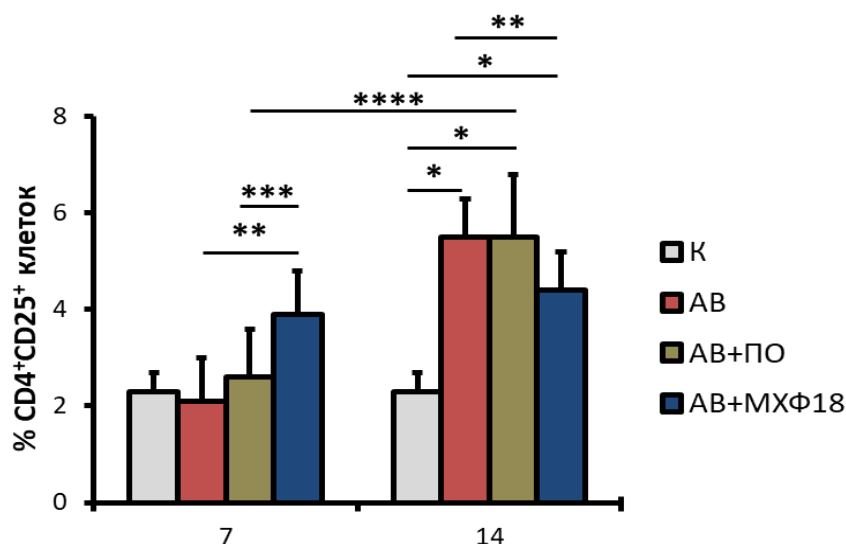
а – таблица данных процентного содержания субпопуляций спленоцитов; б, в – показаны результаты исследований RT1+ в CD45+CD45R(B220)+гейте, B220+RT1 для групп К – контроль; АВ – асептическое воспаление; АВ+ПО – асептическое воспаление + полиоксидоний; АВ+МХФ18 – асептическое воспаление + МХФ18: 7 – через 7 суток; 14 – через 14 суток

Рисунок 35 – Доля RT1+ в CD45+CD45R (B220) +, B220+RT1 спленоцитов животных с асептическим воспалением, получавших ПО и МХФ18

Примечание – Показаны средние значения (М) и стандартные отклонения (СО)

Доля спленоцитов CD4+CD25+, обозначающих фенотип Т регуляторных клеток-клеток, представлена на рисунке 36.

Через 7 суток доля CD4+CD25+ спленоцитов под влиянием МХФ18 ( $M=3,9$ ,  $CO=0,9$ ) статистически значимо превышала значения групп АВ ( $M=2,1$ ,  $CO=0,9$ ) и АВ+ПО ( $M=2,6$ ,  $CO=1,0$ ) соответственно на 85,7% ( $p_{\text{АВ}}=0,005$ ) и 50% ( $p_{\text{АВ+МХФ18}}=0,051$ ). Через 14 суток под влиянием МХФ18 тенденция к приросту CD4+CD25+ спленоцитов была несущественной. Между тем, эти значения существенно возросли в группах АВ ( $M=5,5$ ,  $CO=0,8$ ) и АВ+ПО ( $M=5,5$ ,  $CO=1,3$ ), превышая собственные значения предыдущего срока в 2,6 ( $p_{7\text{сут}}<0,0001$ ) и 2,1 раза ( $p_{7\text{сут}}=0,002$ ).

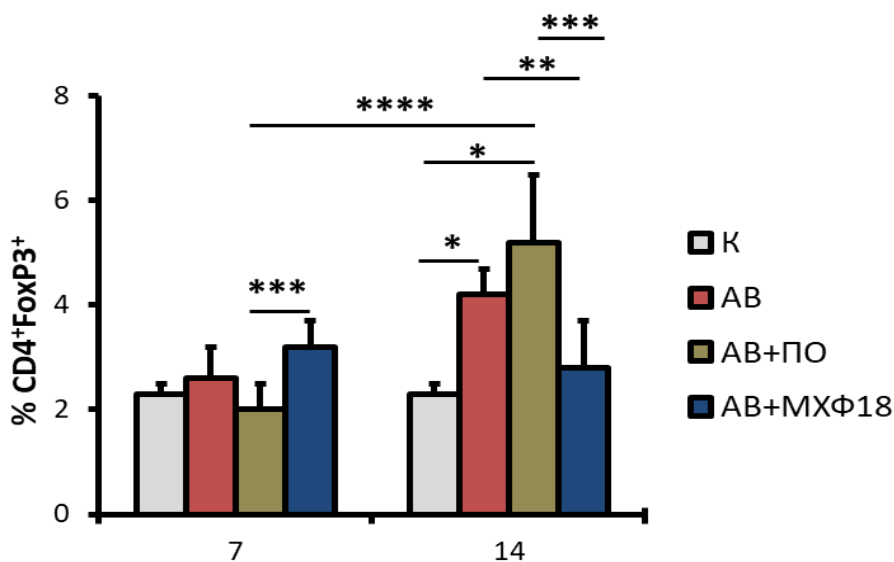


\* -  $p \leq 0,05$  к контролю; \*\* -  $p \leq 0,05$  к АВ; \*\*\* -  $p \leq 0,05$  к АВ+ПО; \*\*\*\* -  $p \leq 0,05$  к 7 суткам

– показаны результаты исследований CD4+CD25+ клеток селезенки для групп К – контроль; АВ – асептическое воспаление; АВ+ПО – асептическое воспаление + полиоксидоний; АВ+МХФ18 - асептическое воспаление + МХФ18 через 7 и 14 суток

Рисунок 36 – Доля CD4+CD25+ спленоцитов животных с асептическим воспалением, получавших ПО и МХФ18

Примечание – Показаны средние значения (М) и стандартные отклонения (СО)



\* -  $p \leq 0,05$  к контролю; \*\* -  $p \leq 0,05$  к АВ; \*\*\* -  $p \leq 0,05$  к АВ+ПО; \*\*\*\* -  $p \leq 0,05$  к 7 суткам

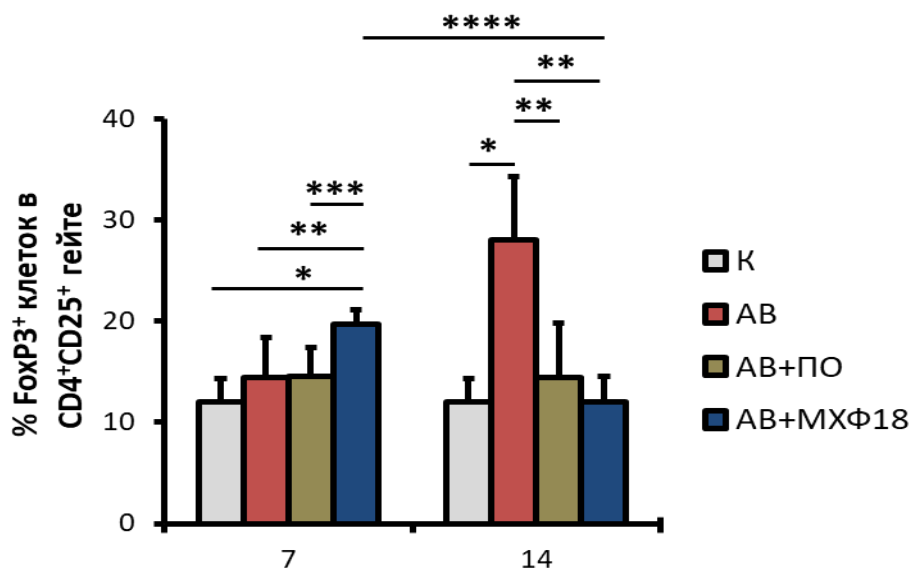
– показаны результаты исследований CD4+FoxP3+ клеток селезенки для групп К – контроль; АВ – асептическое воспаление; АВ+ПО – асептическое воспаление + полиоксидоний; АВ+МХФ18 - асептическое воспаление + МХФ18 через 7 и 14 суток

Рисунок 37 – Доля CD4+FoxP3+ спленоцитов животных с асептическим воспалением, получавших ПО и МХФ18

Примечание – Показаны средние значения (М) и стандартные отклонения (СО)

В соответствии с рисунком 37, в дальнейшем изучали корректирующее влияние ПО и МХФ18 на иммуносупрессивную активность CD4+FOXP3+ Т-регуляторных клеток. Так, наряду с другими субпопуляциями супрессорных спленоцитов недавно были описаны и CD4+FOXP3+ Т-регуляторные клетки, отнесенные к Т-регуляторным клеткам 1-го типа. Они экспрессируют ИЛ10 и обладают высокой иммуносупрессорной активностью [256, с. 9-14]. В результате проведенных нами исследований было установлено, что через 7 суток доля CD4+FoxP3+ под влиянием МХФ18 ( $M=3,2$ ,  $CO=0,5$ ) оказалась на 60% ( $p_{AB+ПО}=0,025$ ) больше ПО ( $M=2,0$ ,  $CO=0,5$ ). Через 14 суток отмечалось существенное повышение супрессорной активности в группе АВ и АВ+ПО. Так, в группе АВ доля CD4+FoxP3+ по сравнению с контролем ( $M=2,3$ ,  $CO=0,2$ ) повышалась на 82,6% ( $M=4,2$ ,  $CO=0,5$ ;  $p_{контр}<0,0001$ ), а в группе АВ+ПО на 126,1% ( $M=5,2$ ,  $CO=1,3$ ;  $p_{контр}=0,002$ ), что превышало собственные результаты предыдущего исследования ( $M=2,0$ ,  $CO=0,5$ ) в 2,6 раза ( $p_{7сут}=0,001$ ) (рисунок 37). Между тем, доля CD4+FoxP3+ группы АВ+МХФ18 в этот срок исследования ( $M=2,8$ ,  $CO=0,9$ ) практически колебалась на уровне предыдущего срока, но оказалась в 2 раза меньше группы АВ+ПО ( $p_{AB+ПО}=0,006$ ).

Изучение CD4+ Т-регуляторных клеток, экспрессирующих FoxP3+, показало, что через 7 суток их доля под влиянием МХФ18 ( $M=19,7$ ,  $CO=1,4$ ) превышала контроль ( $M=12,0$ ,  $CO=2,3$ ) на 64,2% ( $p_{контр}=0,0006$ ), АВ ( $M=14,4$ ,  $CO=4,0$ ) на 36,8% ( $p_{AB}=0,022$ ), АВ+ПО ( $M=14,6$ ,  $CO=2,8$ ) на 35% ( $p_{AB+ПО}=0,008$ ) (рисунок 38).



\* -  $p \leq 0,05$  к контролю; \*\* -  $p \leq 0,05$  к АВ; \*\*\* -  $p \leq 0,05$  к АВ+ПО; \*\*\*\* -  $p \leq 0,05$  к 7 суткам

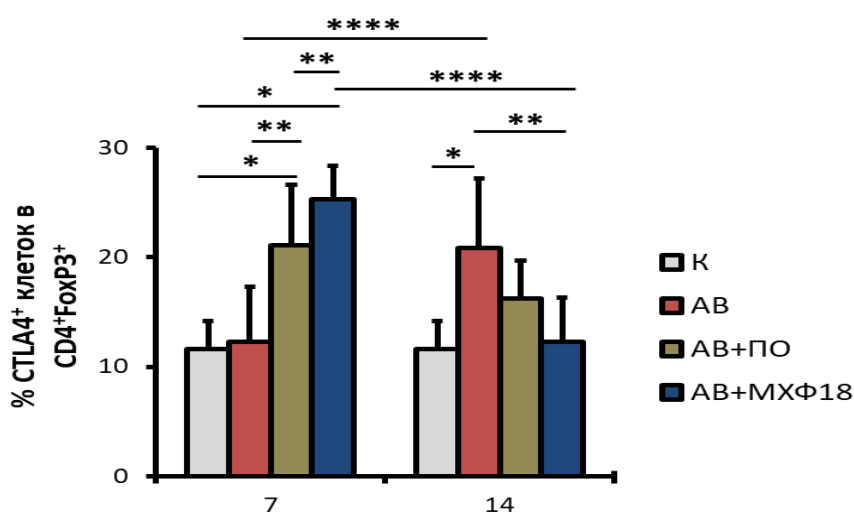
показаны результаты исследований FoxP3+ клеток среди CD4+CD25+ лимфоцитов для групп К – контроль; АВ – асептическое воспаление; АВ+ПО – асептическое воспаление + полиоксидоний; АВ+МХФ18 - асептическое воспаление + МХФ18 через 7 и 14 суток

Рисунок 38 – Доля FoxP3+ клеток среди CD4+CD25+ лимфоцитов животных с асептическим воспалением, получавших ПО и МХФ18

Примечание – Показаны средние значения (M) и стандартные отклонения (CO)

Через 14 суток в группе АВ+МХФ18 доля FoxP3+ клеток среди CD4+CD25+ лимфоцитов вернулась к контрольному уровню.

В дальнейшем изучали долю экспрессируемых CTLA4+ среди CD4+FoxP3+ лимфоцитов и изменяемых под влиянием МХФ18 и ПО. Как видно из рисунка 39 их доля через 7 суток резко повышалась, тогда как на 14 сутки исследования наблюдали спад экспрессионной активности. Так, доля CTLA4+ среди CD4+FoxP3+ лимфоцитов под влиянием МХФ18 ( $M=25,3$ ,  $CO=3,0$ ) повышалась на 118,1% ( $p_{\text{контроль}}=0,004$ ) больше по сравнению с контролем ( $M=11,6$ ,  $CO=2,6$ ) и на 105,7% ( $p_{\text{АВ}}=0,002$ ) больше по сравнению с АВ ( $M=12,3$ ,  $CO=5,0$ ). Аналогичные результаты получены и под влиянием ПО.



\* -  $p \leq 0,05$  к контролю; \*\* -  $p \leq 0,05$  к АВ; \*\*\* -  $p \leq 0,05$  к АВ+ПО; \*\*\*\* -  $p \leq 0,05$  к 7 суткам

показаны результаты исследований CTLA4+ клеток среди CD4+FoxP3+ лимфоцитов для групп К – контроль; АВ – асептическое воспаление; АВ+ПО – асептическое воспаление + полиоксидоний; АВ+МХФ18 - асептическое воспаление + МХФ18 через 7 и 14 суток

Рисунок 39 – Доля CTLA4+ клеток среди CD4+FoxP3+ лимфоцитов животных с асептическим воспалением, получавших ПО и МХФ18

Примечание – Показаны средние значения (M) и стандартные отклонения (CO)

Через 14 суток активность CTLA4+ клеток среди CD4+FoxP3+ лимфоцитов под влиянием МХФ18 и ПО снижается до контрольного уровня.

### 3.8 Изучение гематологических показателей у крыс с асептическим воспалением после предварительного воздействия метаванадата аммония и бихромата калия в условиях коррекции МХФ18 и ПО

Предварительно, в течение двух недель, затравленным животным, проводили коррекцию при помощи ПО и МХФ18. Через 1, 7 и 14 суток проводили забор крови для исследования гематологических показателей. Результаты исследования представлены в таблицах 23 и 24.



Таблица 23 – Распределение среднего содержания лейкоцитов крови опытных животных в сравнении

Элементы крови * abs (x10 <sup>3</sup> /μL)	Конт роль, n=10 М (СО)	Опыт (Ме+АВ), n=10 М (СО)	p**	Опыт+ПО, n=10 М (СО)	p	Опыт+МХФ 18, n=10 М (СО)	p
Через 1 сутки							
ЛЕЙКОЦИТЫ (WBC)	8,9 (1,3)	3,8 (2,0)	-	6,2 (2,0)	0,001 <sup>a</sup> 0,014 <sup>b</sup>	7,4 (1,2)	0,037 <sup>a</sup> 0,001 <sup>b</sup>
НЕЙТРОФИЛЫ (NEUT)	1,5 (0,3)	1,6 (1,1)	-	1,8 (1,1)	-	1,7 (0,4)	-
ЛИМФОЦИТЫ (LYMPH)	6,6 (1,0)	3,6 (1,9)	0,002 <sup>a</sup>	5,2 (1,9)	0,019 <sup>a</sup>	7,0 (1,2)	0,001 <sup>b</sup> 0,008 <sup>c</sup>
МОНОЦИТЫ (MONO)	0,6 (0,1)	0,3 (0,2)	0,020 <sup>a</sup>	0,4 (0,2)	-	0,5 (0,2)	-
ЭОЗИНОФИЛЫ (EO)	0,2 (0,1)	0,1 (0,1)	-	0,2 (0,1)	0,013 <sup>b</sup>	0,1 (0,1)	0,015 <sup>c</sup>
Через 7 суток							
ЛЕЙКОЦИТЫ (WBC)	8,9 (1,3)	7,1 (1,0)	0,019 <sup>a</sup>	11,1 (5,2)	-	18,8 (2,4)	<0,0001 <sup>a</sup> <0,0001 <sup>b</sup> 0,013 <sup>c</sup>
НЕЙТРОФИЛЫ (NEUT)	1,5 (0,3)	2,4 (0,7)	0,045 <sup>a</sup>	2,0 (1,7)	-	3,4 (0,9)	0,003 <sup>a</sup> 0,005 <sup>d</sup>
ЛИМФОЦИТЫ (LYMPH)	6,6 (1,0)	4,4 (0,7)	0,001 <sup>a</sup>	8,5 (3,6)	0,036 <sup>b</sup>	14,2 (2,0)	<0,0001 <sup>a</sup> <0,0001 <sup>b</sup> 0,009 <sup>c</sup>
МОНОЦИТЫ (MONO)	0,6 (0,1)	0,4 (0,2)	-	0,5 (0,3)	-	1,0 (0,3)	0,026 <sup>a</sup> 0,004 <sup>b</sup> 0,009 <sup>c</sup> 0,015 <sup>d</sup>
ЭОЗИНОФИЛЫ (EO)	0,2 (0,1)	0,1 (0,1)	-	0,3 (0,1)	-	0,1 (0,1)	0,024 <sup>c</sup>
Через 14 суток							
ЛЕЙКОЦИТЫ (WBC)	8,9 (1,3)	10,3 (1,6)	0,053 <sup>a</sup>	22,1 (3,9)	0,001 <sup>a</sup> 0,001 <sup>b</sup> 0,003 <sup>e</sup>	21,1 (4,4)	0,0007 <sup>a</sup> 0,001 <sup>b</sup> 0,0004 <sup>d</sup>
НЕЙТРОФИЛЫ (NEUT)	1,5 (0,3)	2,8 (0,7)	0,008 <sup>a</sup>	5,5 (0,8)	0,0001 <sup>a</sup> 0,0004 <sup>b</sup> 0,003 <sup>e</sup>	3,9 (1,8)	0,020 <sup>a</sup> 0,028 <sup>d</sup>
ЛИМФОЦИТЫ (LYMPH)	6,6 (1,0)	6,4 (0,7)	-	15,1 (2,9)	0,002 <sup>a</sup> 0,002 <sup>b</sup> 0,008 <sup>e</sup>	16,0 (2,8)	0,0002 <sup>a</sup> 0,0002 <sup>b</sup> 0,0002 <sup>e</sup>
МОНОЦИТЫ (MONO)	0,6 (0,1)	0,8 (0,3)	-	1,1 (0,3)	0,013 <sup>a</sup> 0,004 <sup>e</sup>	1,2 (0,3)	0,002 <sup>a</sup> 0,041 <sup>b</sup> 0,001 <sup>d</sup>
ЭОЗИНОФИЛЫ (EO)	0,2 (0,1)	0,2 (0,1)	-	2,6 (1,9)	0,051 <sup>a</sup> 0,054 <sup>b</sup>	0,3(0,1)	0,009 <sup>d</sup>
<p>* - WBC (общее число лейкоцитов), NEUT (абсолютное количество нейтрофилов), LYMPH (абсолютное количество лимфоцитов), MONO (абсолютное количество моноцитов), EO (абсолютное количество эозинофилов);</p> <p>** - по t – критерию Стьюдента статистически значимо по отношению: а – к контролю; b – к Опыт; с – к Опыт+ПО; d – к 1 суткам; e – к 7 суткам</p>							

В соответствии с таблицей 23, через 1 сутки коррекции МХФ18 и ПО среднее значение лейкоцитов и лимфоцитов оказалось статистически значимо выше значений Опыта соответственно на 94,7 и 94,4%. После недельной коррекции МХФ18 нарастание показателей крови продолжалось, значения которых имели отличия от контроля и Опыта соответственно в 2,1 и 2,6 раза для лейкоцитов, в 2,1 и 3,2 раза для лимфоцитов, в 1,7 и 2,5 раза для моноцитов. Уровень нейтрофилов превышал как контрольный уровень, так и уровень предыдущего срока более чем в 1,5 раза. Статистически значимые отличия между МХФ18 и ПО наблюдали в недельный срок исследования, когда эффективность МХФ18 превышала ПО на 69,4% в отношении лейкоцитов, на 67% в отношении лимфоцитов, на 100% в отношении моноцитов.

Таблица 24 – Распределение среднего содержания эритроцитов и гемоглобина в крови опытных животных в сравнении

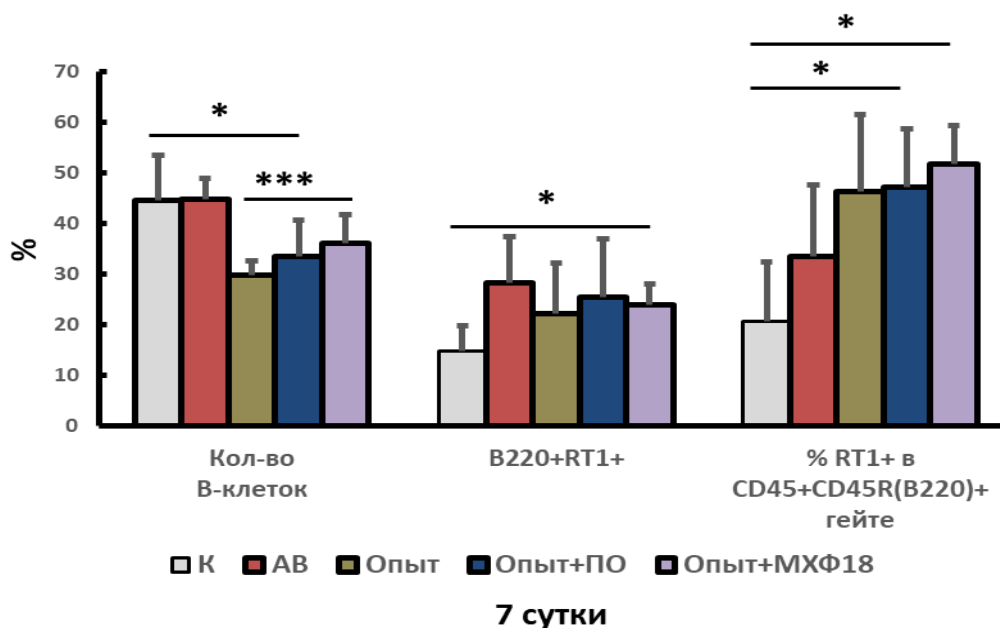
Элементы крови *	Конт роль, n=10 М (СО)	Опыт (Ме+АВ), n=10 М (СО)	p**	Опыт+ПО	p	Опыт+МХФ 18	p
Через 1 сутки							
ЭРИТРОЦИТЫ (RBC) (X10 <sup>6</sup> /ML)	8,3 (0,9)	7,7 (0,7)	-	7,5 (0,7)	-	8,0 (0,3)	-
ГЕМОГЛОБИН (HGB) (G/L)	143,9 (8,7)	121,9 (5,6)	0,0002 <sup>a</sup> 0,004 <sup>b</sup>	121,9 (5,6)	0,0002 <sup>a</sup>	130,0 (4,0)	-
ГЕМАТОКРИТ (HCT) %	42,1 (4,1)	35,9 (2,8)	0,007 <sup>a</sup>	37,8 (2,8)	0,039 <sup>a</sup>	37,0 (1,0)	0,015 <sup>a</sup>
Через 7 суток							
ЭРИТРОЦИТЫ (RBC) (X10 <sup>6</sup> /ML)	8,3 (0,9)	7,5 (0,5)	0,086 <sup>a</sup>	7,8 (0,2)	-	7,5 (0,5)	-
ГЕМОГЛОБИН (HGB) (G/L)	143,9 (8,7)	123,6 (3,8)	0,0004 <sup>a</sup>	127 (2,0)	<0,0001 <sup>a</sup> <0,0001 <sup>b</sup> <0,0001 <sup>d</sup>	124,0 (4,0)	<0,0001 <sup>a</sup> 0,001 <sup>b</sup>
ГЕМАТОКРИТ (HCT) %	42,1 (4,1)	35,5 (1,2)	0,004 <sup>a</sup>	36,3 (0,9)	0,009 <sup>a</sup>	35,5 (1,2)	0,004 <sup>a</sup> 0,050 <sup>d</sup>
Через 14 суток							
ЭРИТРОЦИТЫ (RBC) (X10 <sup>6</sup> /ML)	8,3 (0,9)	8,0 (0,3)		8,1 (0,5)	-	8,0 (0,3)	<0,0001 <sup>a</sup>
ГЕМОГЛОБИН (HGB) (G/L)	143,9 (8,7)	129,4 (7,9)	0,015 <sup>a</sup>	129 (5,0)	<0,0001 <sup>a</sup>	129,0 (8,0)	-
ГЕМАТОКРИТ (HCT) %	42,1 (4,1)	37,6 (2,1)	0,034 <sup>a</sup>	36,5(1,2)	0,010 <sup>a</sup>	37,6 (2,1)	0,034 <sup>a</sup>
* - RBC (общее число эритроцитов), HGB (концентрация гемоглобина), HCT (показатель гематокрита);							
** - по Ttest статистически значимо по отношению: a – к контролю; b – к Опыт; c – к Опыт+ПО; d - к 1 суткам; e – к 7 суткам							

В соответствии с таблицей 24, статистически значимой корректирующей эффективности МХФ18 и ПО в отношении эритроцитов и гемоглобина в обозначенные сроки исследования установлено не было.

### 3.9 Изучение клеточной численности, селезеночных субпопуляций у крыс с асептическим воспалением после предварительного воздействия метаванадата аммония и бихромата калия в условиях коррекции МХФ18 и ПО

В предыдущих исследованиях нами было изучено влияние солей ванадия и хрома на течение асептического воспаления. Результаты проведенного исследования субклеточных популяций селезенки указывали на развитие иммуносупрессивного состояния.

Целью дальнейших исследований была оценка корректирующей эффективности МХФ18 и ПО на иммунофенотипические параметры селезеночных популяций лимфоцитов опытных животных. Так, через 7 суток после моделирования асептического воспаления опытным животным под влиянием МХФ18 доля В-клеток ( $M=36,2$ ,  $CO=5,6$ ) оказалась на 21,5% больше по сравнению с группой Опыт ( $M=29,8$ ,  $CO=2,8$ ; ) ( $p_{оп}=0,040$ ) (рисунок 40).



\* -  $p \leq 0,05$  к контролю; \*\* -  $p \leq 0,05$  к АВ; \*\*\* -  $p \leq 0,05$  к Опыту

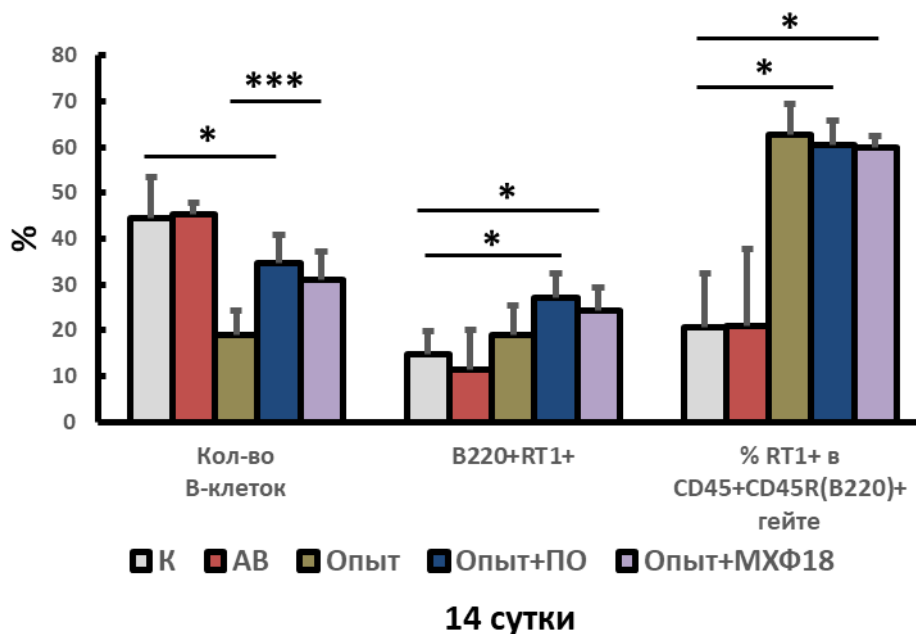
– показаны результаты исследований  $CD45+CD45R(B220)+$ ,  $B220+RT1+$ ,  $RT1+$  среди  $CD45+CD45R(B220)+$  лимфоцитов для групп К – контроль; АВ – асептическое воспаление; Опыт –  $Me+AB$ ; Опыт+ПО –  $Me+AB$  + полиоксидоний; Опыт+МХФ18 -  $Me+AB$  + МХФ18 через 7 суток

Рисунок 40 – Доля  $CD45+CD45R(B220)+$ ,  $B220+RT1+$ ,  $RT1+$  среди  $CD45+CD45R(B220)+$  лимфоцитов животных с асептическим воспалением, получавших ПО и МХФ18

Примечание – Показаны средние значения (M) и стандартные отклонения (CO)

Доля B220+RT1+ после воздействия МХФ18 и ПО оставалась на уровне нелеченных животных, что наглядно продемонстрировано на рисунке 40.

Экспрессионная активность В-лимфоцитов (графа «% RT1+ среди CD45+CD45R(B220)+» под влиянием МХФ18 ( $M=51,8$ ,  $CO=7,6$ ;) и ПО ( $M=47,2$ ,  $CO=11,6$ ) выросла, превысив контрольный уровень соответственно на 151,4% ( $p_{контр}=0,006$ ) и 129,1% ( $p_{контр}=0,05$ ). Однако эти же значения соответствовали и группе Опыт.



\* -  $p \leq 0,05$  к контролю; \*\* -  $p \leq 0,05$  к АВ; \*\*\* -  $p \leq 0,05$  к Опыту  
 – показаны результаты исследований CD45+CD45R(B220)+, B220+RT1+, RT1+ среди CD45+CD45R(B220)+ лимфоцитов для групп К – контроль; АВ – асептическое воспаление; Опыт – Me+AB; Опыт+ПО – Me+AB + полиоксидоний; Опыт+МХФ18 - Me+AB + МХФ18 через 14 суток

Рисунок 41 – Доля CD45+CD45R(B220)+, B220+RT1+, RT1+ среди CD45+CD45R(B220)+ лимфоцитов животных с асептическим воспалением, получавших ПО и МХФ18

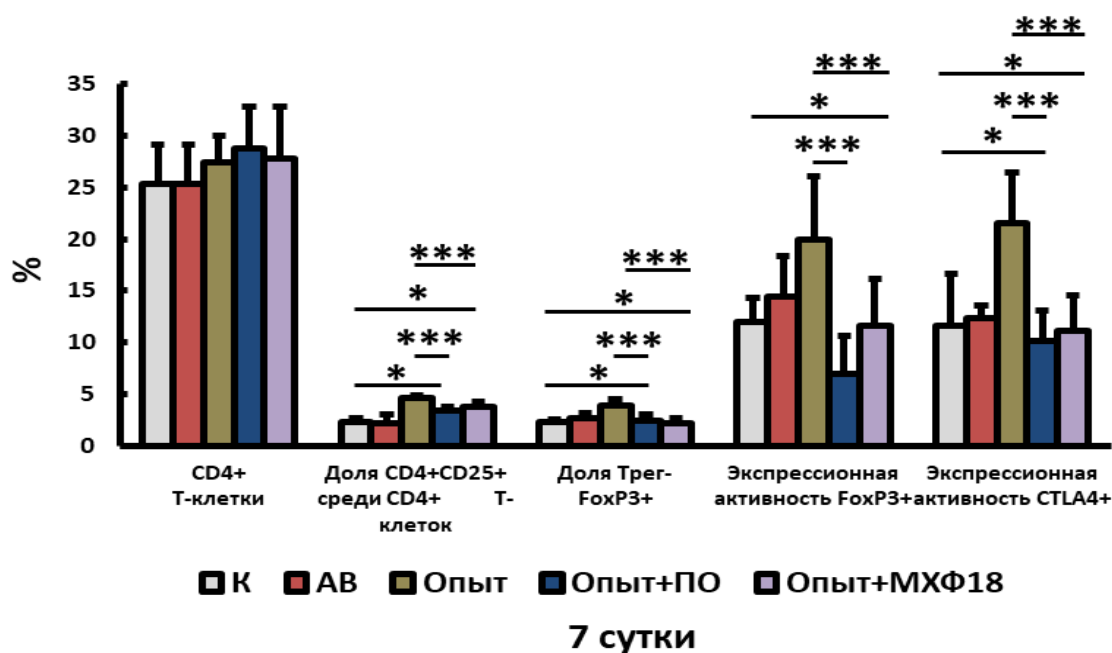
Примечание – Показаны средние значения (M) и стандартные отклонения (CO)

Как через 7, так и через 14 суток наблюдалось статистически значимое повышение доли В-клеток под влиянием МХФ18 (рисунок 42). Так, доля CD45+CD45R(B220)+ (графа «кол-во В-клеток») в группе Опыт+МХФ18 ( $M=31,1$ ,  $CO=6,0$ ;) повышалась на 62,8% больше ( $p_{опыт}=0,006$ ) по сравнению с опытной группой. Аналогичные результаты установлены и в отношении ПО.

Таким образом, МХФ18 повышает долю В-клеток, среди которых отмечался существенный прирост клеток с фенотипом B220+RT1+. Однако ПО, также как и МХФ18 не изменяют долю RT1+ среди CD45+CD45R(B220)+ лимфоцитов опытных крыс.

К не менее важным аспектам в регуляции воспаления относят Т-регуляторные клетки. Результаты изучения субклеточных популяций селезенки

опытных животных с фенотипами эффекторных и регуляторных лимфоцитов и влияние на их пролиферативную активность МХФ18 и ПО представлены на рисунке 42.



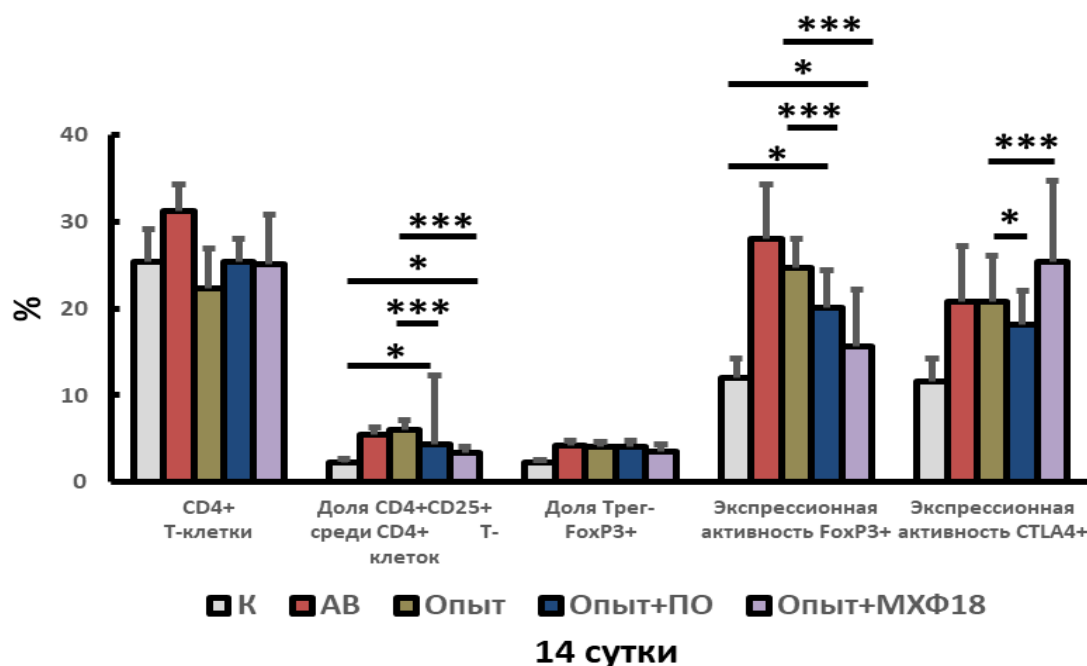
\* -  $p \leq 0,05$  к контролю; \*\*\* -  $p \leq 0,05$  к Опыту  
показаны результаты исследований CD4+, CD4+CD25+, CD4+CD25+FoxP3+, CD4+FoxP3+CTLA4+ лимфоцитов для групп К – контроль; АВ – асептическое воспаление; Опыт – Me+AB; Опыт+ПО – Me+AB + полиоксидоний; Опыт+МХФ18 - Me+AB + МХФ18 через 7 суток

Рисунок 42 – Доля CD4+, CD4+CD25+, CD4+CD25+FoxP3+, CD4+FoxP3+CTLA4+ лимфоцитов животных с асептическим воспалением, получавших ПО и МХФ18

Примечание – Показаны средние значения (M) и стандартные отклонения (CO)

Через 7 суток определение в каждой группе поверхностной экспрессии 4-х кластеров дифференцировки (CD4+, CD4+CD25+, CD4+CD25+FoxP3+, CD4+FoxP3+CTLA4+) показало, что оба препарата влияли на иммунофенотип лимфоцитов однонаправлено: снижая экспрессию CD4+CD25+, CD4+CD25+FoxP3+, CD4+FoxP3+CTLA4+ по сравнению с группой Опыт. Так, под влиянием МХФ18 и ПО экспрессия CD4+CD25+ составила соответственно 3,7% ( $CO=0,6$ ) и 3,4% ( $CO=0,4$ ), что оказалось ниже группы Опыт ( $M=4,6$ ,  $CO=0,3$ ) на 19,6% ( $p_{опыт}=0,017$ ) и 26,1% ( $p_{опыт}=0,0003$ ). Экспрессия CD4+CD25+FoxP3+ снижалась под влиянием МХФ18 ( $M=11,6$ ,  $CO=4,6$ ) на 42% ( $p_{опыт}=0,036$ ) и под влиянием ПО ( $M=6,9$ ,  $CO=3,7$ ) на 65,5% ( $p_{опыт}=0,005$ ) по сравнению с опытом ( $M=20,0$ ,  $CO=6,1$ ). Экспрессия CD4+FoxP3+CTLA4+ как под влиянием МХФ18, так и под влиянием ПО оказалась в 2 раза статистически значимо ниже опытной группы (рисунок 42).

Через 14 суток статистически значимых групповых различий в относительном содержании CD4+ Т-лимфоцитов не наблюдалось (рисунок 43).



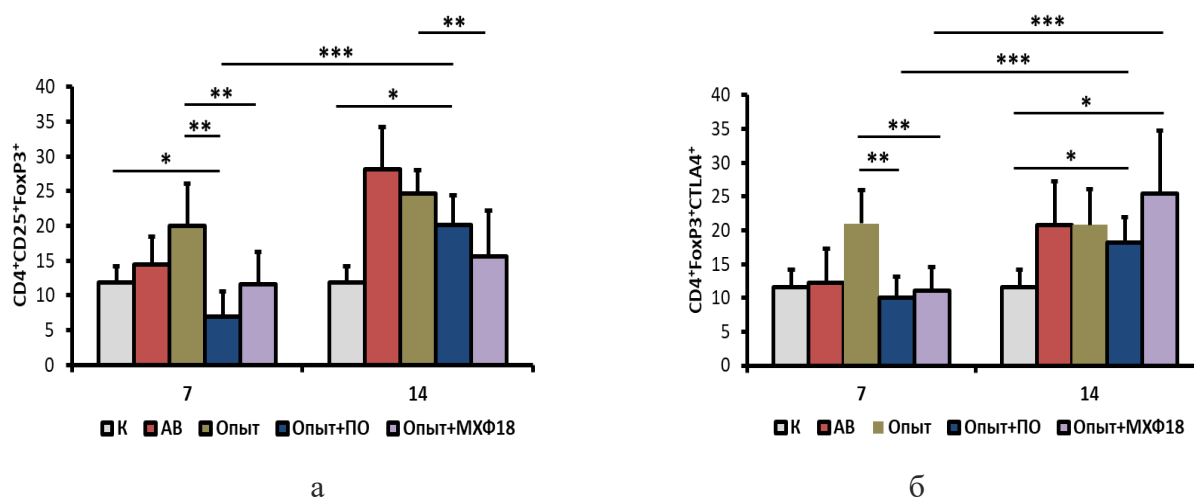
\* -  $p \leq 0,05$  к контролю; \*\*\* -  $p \leq 0,05$  к опыту; показаны результаты исследований CD4+, CD4+CD25+, CD4+CD25+FoxP3+, CD4+FoxP3+CTLA4+ лимфоцитов для групп К – контроль; АВ – асептическое воспаление; Опыт – Me+AB; Опыт+ПО – Me+AB + полиоксидоний; Опыт+МХФ18 – Me+AB + МХФ18 через 14 суток

Рисунок 43 – Доля CD4+, CD4+CD25+, CD4+CD25+FoxP3+, CD4+FoxP3+CTLA4+ лимфоцитов животных с асептическим воспалением, получавших ПО и МХФ18

Примечание – Показаны средние значения (M) и стандартные отклонения (CO)

Дифференцировка CD4+CD25+ клеток в пуле CD4+ Т-лимфоцитов под влиянием МХФ18 и ПО оставалась таковой, как и через 7 суток исследований. Между тем, наблюдался существенный прирост экспрессионной активности CD4+CD25+FoxP3+, CD4+FoxP3+CTLA4+ лимфоцитов под влиянием МХФ18 и ПО, что наглядно продемонстрировано на рисунке 43. Так, установлено, что через 14 суток под влиянием ПО экспрессия CD4+CD25+FoxP3+ ( $M=20,1$ ,  $CO=4,3$ ) превышала предыдущий уровень экспрессии ( $M=6,9$ ,  $CO=3,7$ ) и контрольный уровень ( $M=11,9$ ,  $CO=2,3$ ) соответственно на 191,3% ( $p_{7\text{суток}}=0,0007$ ) и 68,9% ( $p_{\text{контр}}=0,0007$ ), но оставалась в диапазоне опытных значений (рисунок 44а).

Через 14 суток под влиянием МХФ18 отмечался незначительный прирост CD4+CD25+FoxP3+ ( $M=15,6$ ,  $CO=6,6$  против  $M=11,6$ ,  $CO=4,6$ ), что на 34,5% превышало собственные значения предыдущего срока ( $p_{7\text{суток}}=0,0007$ ), но их уровень в 1,6 раза отставал от опыта ( $M=24,7$ ,  $CO=3,3$ ;  $p_{\text{опыт}}=0,019$ ) (рисунок 44а).



\* - к контролю  $p \leq 0,05$ , \*\* -  $p \leq 0,05$  к Опыт, \*\*\* -  $p \leq 0,05$  к 7 суткам; а – результаты исследований  $CD4+CD25+FoxP3+$ ; б – результаты исследований  $CD4+FoxP3+CTLA4+$ ; – результаты исследований лимфоцитов для групп: К – контроль; АВ – асептическое воспаление; Опыт – Ме+АВ; Опыт+ПО – Ме+АВ + полиоксидоний; Опыт+МХФ18 – Ме+АВ + МХФ18 через 14 суток

Рисунок 44 – Доля  $CD4+$ ,  $CD4+CD25+$ ,  $CD4+CD25+FoxP3+$ ,  $CD4+FoxP3+CTLA4+$  лимфоцитов животных с асептическим воспалением, получавших ПО и МХФ18

Примечание – показаны средние значения (М) и стандартные отклонения (СО)

Как показано на рисунке 44б, через 7 суток доля  $CD4+FoxP3+CTLA4+$  лимфоцитов почти в 2 раза отставала от опыта ( $M=21,0$ ,  $CO=5,0$ ) как под влиянием ПО ( $M=10,1$ ,  $CO=3,0$ ), так и под влиянием МХФ18 ( $M=11,1$ ,  $CO=3,5$ ;  $p_{опыт} < 0,05$ ). Через 14 суток отмечалось повышение доли  $CD4+FoxP3+CTLA4+$  как по отношению к контролю, так и по отношению к предыдущему сроку под влиянием ПО ( $M=18,2$ ,  $CO=3,8$  против контроля:  $M=11,6$ ,  $CO=2,6$ , против 7 суток;  $M=10,1$ ,  $CO=3,0$ ) соответственно на 56,9% % ( $p_{контр}=0,014$ ) и на 80,2% ( $p_{7суток}=0,006$ ), а под влиянием МХФ18 ( $M=25,4$ ,  $CO=9,3$  против контроля:  $M=11,6$ ,  $CO=2,6$ , против 7 суток;  $M=11,1$ ,  $CO=3,5$ ) соответственно более, чем в 2 раза ( $p_{контр}=0,014$ ,  $p_{7суток}=0,012$ ).

Таким образом, сравнимость уровней экспрессии маркеров иммуносупрессии на поверхности лимфоцитарных клеток при воспалении, вызванном на фоне затравки ванадием и хромом, под влиянием МХФ18 и ПО приводит к повышению экспрессии иммунофенотипических маркеров  $CD4+CD25+FoxP3+$ ,  $CD4+FoxP3+CTLA4+$  к 14 суткам исследования, что способствует резолюции воспалительного процесса.

### 3.10 Математическое моделирование массива данных с применением статистических методов 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 препаратами и металлами (нелеченные животные).

В качестве группирующей переменной были взяты группы «Опыт» (Me+AB), «Опыт+МХФ18» и «Опыт+ПО». В исходную совокупность дискриминантных переменных были включены иммунологические и гематологические показатели групп.

Дискриминантный анализ проводился для 24 наблюдений 7 суток исследования. Пошаговая статистика включала 7 шагов, после которой было выявлено 7 информативных показателей, основные статистические показатели которых представлены в таблице 25.

Таблица 25 – Показатели заключительного пошагового анализа (7 суток)

Перемен. Ввода/ исключ.	Пошаговые статистики									
	шаги	F вв/ искл.	df 1	df 2	p-level	Лямбда Уилкса	F- value	df 1	df 2	p- level
Гемоглобин	1	4241,915	2	13	<.00001	0,001530	4241,9	2	13	<00001
Эритроциты	2	6,134	2	12	0,014615	0,000757	212,14	4	24	<00001
Клеточная численность селезенки	3	5,318	2	11	0,024218	0,000385	183,29	6	22	<00001
Эозинофилы	4	2,786	2	10	0,109230	0,000247	156,57	8	20	<00001
Моноциты	5	3,307	2	9	0,083790	0,000142	149,05	10	18	<.00001
CD4+FoxP3+	6	1,350	2	8	0,312421	0,000106	127,91	12	16	<00001
CD4+FoxP3 +CTLA4+	7	1,465	2	7	0,294126	0,000075	114,45	14	14	<00001

Таблица 26 – Стандартизованные дискриминантные коэффициенты

Переменные	Стандартизованные коэффициенты для канонических переменных	
	Root 1	Root 2
Гемоглобин (Hb)	-1,463	-0,09171
Эритроциты	1,109	-0,60496
Клеточная численность селезенки	-0,417	0,06788
Эозинофилы	-0,598	1,09138
Моноциты	0,973	-1,86814
CD4+FoxP3+	2,476	-5,64511
CD4+FoxP3+CTLA4+	-1,823	4,55111
Eigenval	1508,035	7,83198
Cum.Prop	0,995	1,00000

В соответствии с таблицей 26, с целью вычисления весов дискриминантной функции (вклада каждой переменной) были применены стандартизованные коэффициенты, в результате чего были получены 2 группы (корня).

В таблице 26 наглядно продемонстрированы 7 переменных, имеющих наибольшие стандартизованные коэффициенты. Классификационный матрикс

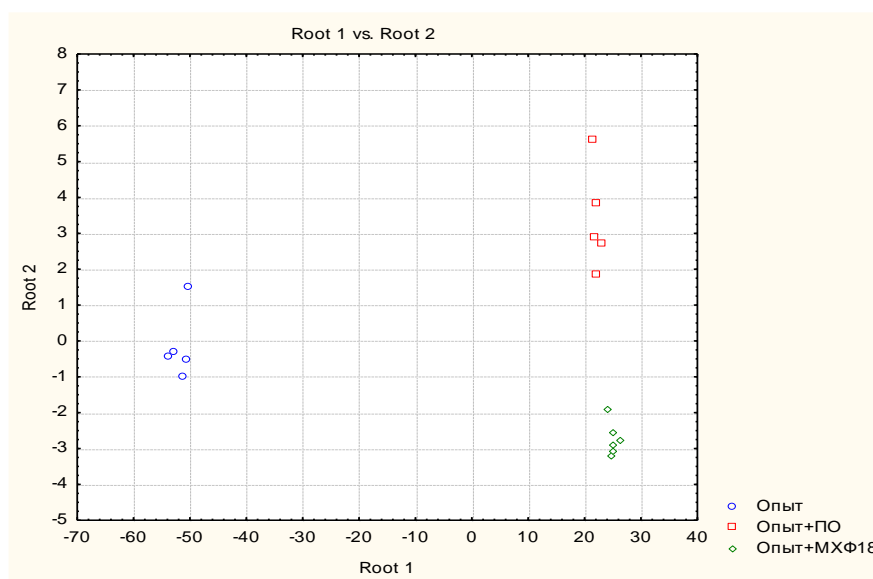


(таблица 27) показал, что значения дискриминантной функции у всех групп равнозначны (% вклада 100).

Таблица 27 – Классификационная матрица дискриминантных групп

Группы	Классификационная матрица			
	percent correct	опыт p=,31250	опыт+ПО p=,31250	опыт+МХФ18 p=,37500
Опыт	100,0000	5	0	0
Опыт+ПО	100,0000	0	5	0
Опыт+МХФ18	100,0000	0	0	6
Total	100,0000	5	5	6

Как видно из таблицы 26, наиболее существенный вклад в разделение первой дискриминантной функции внесли показатели CD4+FоxP3+ (%CD4+FоxP3+, 2,476), CD4+FоxP3+CTLA4+ (%CD4+FоxP3+CTLA4+, -1,823), Нв (Нв<sub>абс.</sub>, -1,463). Вместе с тем, на рисунке 45 наглядно продемонстрировано, что расстояния между центроидами по первой дискриминантной функции (Root 1) различны: группа «Препараты» представлена правее от центра, т.е. ей соответствуют меньшие значения корня 1.



– синие кружочки – Опыт; – красные квадратики – Опыт+ПО; – зеленые ромбы – Опыт+МХФ18

Рисунок 45 – Диаграмма рассеяния значений канонических переменных, установленных дискриминантной функцией, для групп «Опыт+МХФ18» и «Опыт+ПО» и «Опыт»

Это свидетельствовало о том, что группы «Опыт+МХФ18» и «Опыт+ПО» дискриминирует с группой «Опыт» по показателям, характеризующим степень ингибирования активации CD4+FоxP3+ и CD4+FоxP3+CTLA4+. Из вышеизложенного следует, что на 7 сутки течения асептического воспаления

МХФ18 и ПО равнозначно препятствуют накоплению CD4+FoxP3+ и CD4+FoxP3+CTLA4+.

По вертикальной оси Root 2 распределены значения второй дискриминантной функции, где наибольшие стандартизованные коэффициенты имели те же переменные, что и для корня 1 CD4+FoxP3+ (%CD4+FoxP3+, -5,64511), CD4+FoxP3+CTLA4+ (%CD4+FoxP3+CTLA4+, 4,55111). По ним у основания центроида распределялся Опыт (выделены синими кружочками). Это означало, что главным отличием препаратов и с группой «Опыт» являлась более выраженная способность МХФ18 и ПО предотвращать преждевременную супрессорную активность CD4+FoxP3+ и CD4+FoxP3+CTLA4+.

Далее дискриминантный анализ проводился для 14 суток исследования по тем же 24 наблюдениям. Пошаговая статистика включала 8 шагов, после которой было выявлено 8 информативных показателей, основные статистические показатели которых представлены в таблице 28.

Таблица 28 – Показатели заключительного пошагового анализа (14 суток)

Переем. Ввода/ исключ.	Пошаговые статистики									
	шаги	F вв/ искл.	df 1	df 2	p-level	Лямбда Уилкса	F- value	df 1	df 2	p- level
Гемобглобин (Hb)	1	852,413	2	13	<.00001	0,007568	852,41	2	13	<.00001
Эритроциты	2	8,7845	2	12	0,004467	0,003071	102,27	4	24	<.00001
CD45+CD45R(B220)	3	8,9015	2	11	0,005020	0,001173	103,4	6	22	<.00001
CD4+CD25+	4	6,0550	2	10	0,018926	0,000530	106,04	8	20	<.00001
Лимфоциты	5	3,0164	2	9	0,099406	0,000318	99,203	10	18	<.00001
CD4+FoxP3+	6	1,6455	2	8	0,252023	0,000225	87,550	12	16	<.00001
Моноциты	7	1,2216	2	7	0,350688	0,000167	76,427	14	14	<.00001
B220+RT1+	8	1,8274	2	6	0,240009	0,000104	72,913	16	12	<.00001

Таблица 29 – Стандартизованные дискриминантные коэффициенты (14 суток)

Переменные	Стандартизованные коэффициенты для канонических переменных	
	Root 1	Root 2
Гемоглобин (Hb)	-1,7395	-0,24411
Эритроциты	0,9453	1,35051
CD45+CD45R(B220)	0,4775	-2,19832
CD4+CD25+	-0,0448	1,29569
ЛФ	0,3379	-1,06028
CD4+FoxP3+	-1,0837	1,86411
Мо	1,1538	-1,32333
B220+RT1+	-0,8237	1,16299
Eigenval	426,8900	21,54479
Cum.Prop	0,9520	1,00000

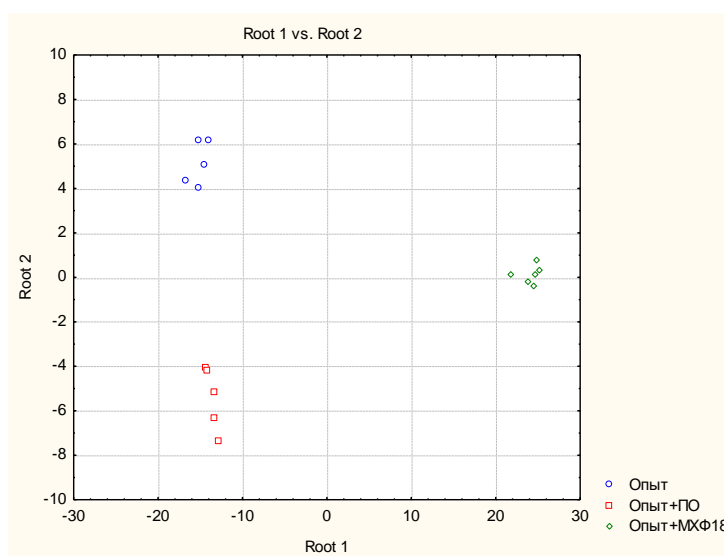
С целью вычисления весов дискриминантной функции (вклада каждой переменной) были применены стандартизованные коэффициенты, в результате чего были получены 2 группы (корня) (таблица 29).

В таблице 29 наглядно продемонстрированы 8 переменных, имеющих наибольшие стандартизованные коэффициенты. Классификационный матрикс (таблица 30) показал, что значения дискриминантной функции у всех групп равнозначны (% вклада 100).

Таблица 30 – Классификационная матрица дискриминантных групп (14 суток)

Группы	Классификационная матрица			
	percent correct	опыт p=,31250	опыт+ПО p=,31250	опыт+МХФ18 p=,37500
Опыт	100	5	0	0
Опыт+ПО	100	0	5	0
Опыт+МХФ18	100	0	0	6
Total	100	5	5	6

Как видно из таблицы 30, наиболее существенный вклад в разделение первой дискриминантной функции внесли показатели CD4+FoxP3+ (%CD4+FoxP3+, -1,0837), моноцитов Mo<sub>абс.</sub>, 1,1538), Нв (Нв<sub>абс.</sub>, -1,463). Вместе с тем, на рисунке 46 наглядно продемонстрировано, что расстояния между центроидами по первой дискриминантной функции (Root 1) различны: группа «Опыт+МХФ18» представлена правее от центра по корню 1.



– синие кружочки – Опыт; – красные квадратики Опыт+ПО; – зеленые ромбы Опыт+МХФ18

Рисунок 46 – Диаграмма рассеяния значений канонических переменных, установленных дискриминантной функцией, для групп «Опыт+МХФ18» и «Опыт+ПО» и «Опыт»

По-видимому, МХФ18 дискриминирует с ПО по его эффективности предупреждать внутриклеточное накопление FoxP3+ на всем протяжении эксперимента. Кроме того, МХФ18 в отличие от ПО лучше стимулирует пролиферативную активность, и тем самым, фагоцитарную активность моноцитов с нарастающим эффектом на протяжении всего эксперимента.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Актуальность выбранной нами проблемы загрязнения окружающей среды несомненна, даже ввиду того, что исследования токсического действия экотоксикантов на организм продолжаются и по сей день [298-302].

Исследованиями, проведенными *in vitro*, показано, что загрязнение воздуха может подавлять врожденный и адаптивный иммунитет и повышать восприимчивость к бактериальным и вирусным инфекциям в клинических моделях как на людях, так и на животных после кратковременного или длительного воздействия [303].

Иммунологические изменения, полученные на экспериментальных моделях, показывают, что длительное воздействие низких доз загрязнителей лучше всего имитируют их реальное воздействие. Поэтому, модель асептического воспаления является привлекательным инструментом для изучения иммунопатологических изменений у животных, подвергавшихся двухнедельному воздействию низких доз хрома и ванадия.

Тяжелые металлы нарушают клеточные процессы, включая рост, пролиферацию, дифференцировку, процессы восстановления повреждений и апоптоз [299, p. 643972]. Эти ключевые процессы являются важными в функционировании иммунной системы, потому нарушение регуляции воспалительного процесса приводит к существенному изменению его течения.

Основной причиной высокой заболеваемости воспалением является неясность его патогенеза, что приводит к отсутствию эффективного лечения. Поэтому мы систематически изучали патофизиологический механизм возникновения и развития воспаления, чтобы найти новые методы эффективной профилактики и снижения связанной с ним заболеваемости.

Асептическое воспаление у опытных крыс вызывали путем подкожного введения в межлопаточную область 0,3 мл скипидара на вазелиновом масле после двухнедельной затравки бихроматом калия и ванадатом аммония. После моделирования асептического воспаления проводили коррекцию вновьсинтезированным соединением МХФ18 в сравнении с препаратом полиоксидонием в течение одной недели. Забой животных производили через 1, 7 и 14 суток от начала моделирования асептического воспаления. У животных забирали кровь, костный мозг, тимус, селезенку, брыжеечные лимфатические узлы и ткань воспаления.

В нашем исследовании был проведен транскриптом тимуса, лимфатического узла, селезенки, костного мозга и крови экспериментальных крыс, секвенированный с помощью платформы Illumina MiSeq. В результате проведенных исследований мы сравнили профили экспрессии генов в клетках тимуса у крыс группы АВ и у крыс группы Me+AB, чтобы идентифицировать дифференциально экспрессируемые гены, участвующие в воспалении. Изменения в тимусе в ответ на внешние факторы (соли тяжелых металлов и скипидариндуцированное воспаление) и продукция хемотаксических факторов привлеченными или местными клетками способствовали фенотипическим различиям между двумя группами.

С результатами полученных исследований проведен биоинформатический анализ в результате которого были идентифицированы 20 белоккодирующих генов: *Tnfrsf14*, *Cr2*, *Sp3*, *Stag2*, *H3f3a*, *Dpp4*, *Anp32a*, *Prpf40a*, *Hsp90aa1*, *Tardbp*, *Dnaj1*, *Eef2k*, *Mfge8*, *Macf1*, *Arhgef11*, *Txndc5*, *Srrm2*, *Syk*, *Clu*, *Cd19*. Было установлено, что металлы оказывают иммуносупрессивный эффект на многие иммуноопосредованные метаболические пути. Особо было выделено, что иммуносупрессивный эффект проявляется и в отношении В-клеток. Следовательно, иммунная система может распознавать измененную экспрессию этих белков и реагировать на нее.

Категории биологических процессов, связанные с дифференциально экспрессируемыми генами, были идентифицированы с помощью анализа GSEA. Регуляция клеточного процесса, клеточные процессы и клеточный ответ на стресс были наиболее значимыми функциональными категориями среди генов с повышенной активностью, тогда как гены, вовлеченные в регуляцию иммунного ответа были подавлены.

Высокие уровни белков теплового шока (Hsp) в клетке наблюдают после воздействия различных стрессирующих факторов – при инфекциях, воспалительных процессах, внешних воздействиях токсинов (этанол, мышьяк, тяжелые металлы), при ультрафиолетовом облучении, голодании, гипоксии, недостатке азота (у растений) или нехватке воды [304]. Точный механизм, по которому происходит активация экспрессии генов белков теплового шока, не выяснено, однако, некоторые исследования свидетельствуют о том, что активация белков теплового шока происходит неправильно сложенными или поврежденными белками. Экспрессия Hsp повышается практически при каждом воспалительном заболевании.

Нами была установлена сверхэкспрессия *Hsp90aa1* ( $M=3398,4$ ,  $p=1,69E-05$ ) в группе Me+AB против AB. Hsp и Treg тесно связаны, следствием чего является индукция Treg на периферии. Результаты проведенных нами исследований подтверждают этот постулат. Так, доля спленцитов с фенотипом T регуляторных клеток-клеток ( $CD4+CD25+$ ) не изменялась в группе AB в течение 7 суток от начала развития асептического воспаления, а на 14-е сутки отмечалось более чем двукратным повышением этих клеток. Напротив, в группах Me и Me+AB уже на 7-е сутки исследования установили повышение доли  $CD4+CD25+$  от контрольного уровня соответственно на 87% и 100%. Тенденция к увеличению продолжилась и на 14-е сутки, где разница с контролем составила для Me 91,3%, для Me+AB 156,5%.

Транскрипционный фактор Foxp3 критически важен для развития и функционирования регуляторных T-лимфоцитов. Foxp3 в настоящее время является наиболее специфическим фактором ядерной транскрипции для T-регуляторных клеток, и было обнаружено, что он обогащен  $CD4 + CD25^{hi}$  T-клетками [305]. Экспрессия FoxP3, играющего основную роль в супрессорной активности T регуляторных клеток, анализируемого нами в  $CD4+CD25+$  гейте и супрессорной молекулы CTLA-4  $CD4+FoxP3+$ -спленцитами имела аналогичную динамику в группе AB через 14 суток, что говорит о позитивной роли расширения пула T регуляторных клеток в разрешении воспаления. При

этом, мы наблюдали повышение доли CD4+CD25+-спленоцитов и экспрессии FoxP3 данными клетками в группе Me по сравнению с контролем уже в первый день после окончания введения Me и сохранялось до конца эксперимента. Через 7 суток доля CD4+CD25+FoxP3 статистически значимо. Аналогичную картину наблюдали и в группе Me+AB. Экспрессия CTLA-4 CD4+FoxP3+-спленоцитами в группах Me и Me+AB по сравнению с контролем повышалась на 7-е сутки в 2 раза и сохранялась до конца эксперимента.

T регуляторные клетки также могут ослаблять ответ T-клеток за счет продукции хемокинов и ингибирующих цитокинов [306], таких как IL-10, TGF- $\beta$  и IL-35. Так, в наших исследованиях у животных группы Me+AB в 1-й день наблюдения имело место существенное повышение содержания IL-10 в периферической крови (M=142, CO= $\pm$ 24 пкг/мл, рк=0,013). В последующие сроки наблюдали повышение TGF  $\beta$  на 7-й и 14-й дни наблюдения. Известно, что уровень Трег отрицательно коррелирует с уровнем ИЛ-6, что согласуется с вышеприведенными результатами об увеличении уровня Трег и низкой концентрации сывороточного ИЛ-6 в группе Me+AB во все сроки исследования.

Трег играют решающую роль в подавлении эффекторного иммунного ответа. В наших исследованиях тенденцию к пролиферативной активности эффекторных T-лимфоцитов определяли по продуцируемому IFNg, характерного для Tх1, и IL-4, характерного для Tх2. В группе Me соли ванадия и хрома вызвали стабильно низкую и, соответственно, отличную от контроля продукцию IFNg и IL-4 во все сроки исследования. Развитие воспаления на этом фоне (Me+AB) вызвало сохранение IFNg и IL-4 в первый срок исследования на контрольном уровне, тогда как в последующие сроки содержание IFNg и IL-4 прогрессивно отставало от показателей AB на 68,6 и 73,2% через 7 суток и на 66 и 76,5% через 14 суток соответственно.

Предыдущие исследования показали, что Clu транскрипционно активируется фактором теплового шока (HSF-1) [307, 308]. По сведениям [309] кластерин (Clu) играет важную роль в регуляции нескольких важных физиологических процессов, включая запрограммированную гибель клеток, метастазирование, инвазию, пролиферацию и рост клеток, посредством регуляции различных сигнальных путей, опосредующих прогрессирование рака при различных видах рака, таких как рак предстательной железы, молочной железы, легких, рак печени, толстой кишки, мочевого пузыря и поджелудочной железы. В нашей работе мы показали, что экспрессия Clu в группе Me+AB против AB повышалась до 459,5 (р=1,40E-05).

Уровень В-лимфоцитов является важным показателем развития воспалительного процесса благодаря их способности процессировать и презентировать антиген T-клеткам. Встреча зрелых В-клеток с чужеродным антигеном приводит к их селективной пролиферации и дифференцировке в клетки, секретирующие антитела или в В-клетки памяти. Ответ зрелых В-клеток на антиген включает связывание антигена с В-клеточным рецептором (BCR), который в дальнейшем и презентует антиген T-клеткам. Распознавание антигена BCR приводит к быстрой передаче и связыванию

антигена с белковым связывающим участком (PPLC) главного комплекса гистосовместимости (МНС) II типа. При этом, экспрессия МНСII В-клетками наблюдается на ранних этапах дифференцировки В-клеток и участвует не только в презентации антигена, но и в генерации долгоживущих зрелых В-клеток [310]. Syk связывается с активированными Fc-рецепторами, комплексом рецепторов Т-клеток и комплексом антиген-рецептор В-клеток (BCR) в незрелых и зрелых В-лимфоцитах [311, 312]. В сигнальном пути В-клеточного рецептора ответ на связывание чужеродного антигена с В-клеточным рецептором (BCR) заключается в том, что ген SYK кодирует фермент тирозинкиназу. SYK широко экспрессируется в гемопоэтических клетках и участвует в соединении активированных иммунорецепторов с нижестоящими сигнальными событиями, которые опосредуют разнообразные клеточные ответы, включая пролиферацию, дифференцировку и фагоцитоз.

Ранее было показано, что пролиферация В-клеток и продукция иммуноглобулинов липополисахарид-стимулированными В-клетками значительно подавлялась при внутрибрюшинном введении частиц кобальта-хрома мышам и при культивировании лимфоцитов *in vitro* в присутствии кобальта-хрома [313]. Было также показано, что соединение хрома Cr(NO<sub>3</sub>)<sub>3</sub> подавляет липополисахарид-индуцированную пролиферацию В-клеток и продукцию IFN- $\gamma$ , IL-2 и IL-6 РНА-стимулированными мононуклеарными клетками периферической крови человека *in vitro* [79, p. 43-62]. Результаты наших исследований согласуются с приведенными выше работами. Так, хром и ванадий снижали долю активированных В-лимфоцитов во все сроки исследования асептического воспаления. Об активности В-клеток в наших экспериментальных группах судили по экспрессии молекулы МНС-II, анализируя долю B220+RT1(МНС-II)+-спленоцитов в гейте CD45+ лимфоцитов. В группе Me+AB количество B220+RT1+-спленоцитов через 7 суток не достигало уровня AB, тогда как через 14 суток снизилось до контрольного уровня.

В проведенном нами биоинформатическом анализе было показано, что ген Syk (Location 17p14, M=100,9, pvalue=1,02E-06), специфичный для тимуса, оказался в числе нерегулируемых (менее экспрессируемых) генов в сравниваемых группах AB против Me+AB. По сведениям [311, p. 303-305; 314] значения экспрессии генов (в нашем исследовании – снижение) нарушают пролиферацию и дифференцировку В-клеток, по-видимому, путем нарушения передачи сигналов от комплекса pre-BCR и, таким образом, предотвращения клональной экспансии и дальнейшего созревания pre-B клеток.

Как известно, течение воспалительного процесса сопровождается включением иммунологических механизмов защиты организма, в основном за счет клеточных компонентов крови. Макрофаги являются важными клетками врожденного иммунитета. Благодаря своим иммунорегуляторным функциям и повсеместному присутствию они играют важную роль в иммунном гомеостазе и воспалении, а также в патогенезе повреждения тканей.

Количество моноцитов и нейтрофилов не имело существенных различий в периферической крови. Отличительная особенность в картине крови группы

Me+AB заключалась в более низких показателях лейкоцитарной фракции. В сравнительной характеристике нейтрофильной фракции крови для групп AB и Me+AB отмечалась следующая тенденция: содержание нейтрофилов в группе Me+AB, лишь на 60 и 86,7% статистически значимо превысив значения контроля, так и не достигало значений AB. Общий анализ крови выявил также снижение частоты и количества лимфоцитов в группе Me+AB. В картине лимфоцитарной фракции крови тенденции прироста не наблюдалось, из чего сделано заключение, что ванадий и хром оказывают повреждающее влияние на лимфоциты крови. Так, [315, 316] отмечают участие ванадия в механизмах иммунной регуляции, включая подавление иммунитета и подавление воспаления. Также выяснилось, что ионы тяжелых металлов взаимодействуют с ДНК и ядерными белками, вызывая повреждение ДНК, что приводит к модуляции клеточного цикла, апоптозу или канцерогенезу [317].

Исследования [318] показали, что транскрипционный фактор Sp3, взаимодействуя с NF-κB, способствует экспрессии клеточных воспалительных цитокинов, фактора некроза опухоли (TNF)-α, тем самым влияя на клеточное воспаление. Результаты показали, что подавление Sp3 значительно снижало экспрессию IL-6 и TNF-α. Благодаря взаимодействию Sp3-NF-κB активируются воспалительные сигналы и снижается экспрессия фактора роста фибробластов. Многие исследователи пытались определить связь между экспрессией Hsp и Sp3, в результате чего было заключено о роли Hsp в нарушении взаимодействия Sp3 и NF-κB, что дает уникальное представление о связях между воспалением, иммунитетом и патогенезом развития болезней.

Биоинформатический анализ, проведенный в рамках наших исследований, показал, что уровень Sp3 (Location 3q23, M=332,0, pvalue=8,45E-06) в группе Me+AB оказался достоверно ниже группы AB. Кроме того, в исследованиях, проведенных в рамках одноименного НТП (финансирование МОН РК, 2015-2017 гг.), было показано, что через 1 сутки в группе Me+AB в ответ на воспаление продукция провоспалительного ИЛ-6 оказалась более чем в 4 раза ниже группы AB. Вместе эти данные позволяют предположить роль солей тяжелых металлов в противовоспалительной регуляции посредством суперэкспрессии Hsp и последующего вмешательства во взаимодействие Sp3-NF-κB, что является основанием для более детального изучения выдвинутой гипотезы в наших будущих исследованиях.

Вышеизложенные данные дают основание утверждать, что во многом количественное соотношение популяций Т-клеток способно изменять течение заболевания, что позволяет рассматривать их дисбаланс в качестве ключевого звена в патогенезе заболевания.

Таким образом, метаваданат аммония и дихромат калия способны исказить нормальный ход острого воспаления путем нарушения модуляции транскриптов генов, связанных с воспалительной реакцией, передачей сигнала и пролиферацией клеток, при этом по-разному экспрессируемых генов, участвующих в регуляции воспалительных фенотипов, как то: смещение провоспалительных сигналов на активацию противовоспалительных цитокинов IL-10 и TGF-β и ингибирование регуляторных супрессорных Т-клеток, которые



вместе могут препятствовать разрешению воспаления и, следовательно, способствовать патогенезу хронических воспалительных процессов.

К категориям иммуномодулирующих препаратов или иммунокорректоров относят препараты, характеризующиеся нормализующим действием на иммунную систему, способные в конкретных условиях повышать сниженные показатели или подавлять повышенные [319].

Результаты исследований с экспериментальными животными, несмотря на разные механизмы влияния, достаточно убедительно демонстрируют синергизм иммуномодулирующего действия МХФ18 и ПО. Особое место занимает МХФ18. По результатам проведенного дискриминантного анализа МХФ18 дискриминирует с ПО по его эффективности предупреждать внутриклеточное накопление FoxP3+ на всем протяжении эксперимента. Кроме того, МХФ18 в отличие от ПО лучше стимулирует пролиферативную активность, и тем самым, фагоцитарную активность моноцитов с нарастающим эффектом на протяжении всего эксперимента.

Таким образом, при оценке естественных иммунных ответов генетические факторы и факторы окружающей среды играют согласованную роль. Транскриптомная информация, полученная от лимфоорганов экспериментальных животных, дает фундаментальное представление об иммунных реакциях, характерных для течения воспаления в условиях воздействия солей хрома и ванадия. Международный опыт подобного рода геномных исследований показывает необходимость проведения валидации (проверки) этих генов в условиях нового эксперимента. Это позволит выявить среди десятков идентифицированных генов именно те гены, которые могли бы служить прогностическими критериями в оценке тяжести воспалительного процесса.

На основании проведенного исследования сделаны следующие **выводы**:

1. Анализ дифференциально экспрессируемых генов показал групповые различия экспрессии генов тимуса в группах «Me+AB» против «AB», в результате которого идентифицированы 20 генов. Установлена сверхэкспрессия Hsp90aa и Stag2, ответственных за трансляцию сигналов иммуносупрессии, а также статистически значимое повышение экспрессии Tnfrsf4, Clu, Sp3, Cd19, запускающих процессы активации Трег, FoxP3, апоптоза, хронизации воспаления, опухолевого роста. Установлено статистически значимое снижение экспрессии иммунных регуляторов - Dpp4, Txndc5, Syk, ответственных за экспрессию клеточных воспалительных цитокинов ИЛ-6, TNF- $\alpha$ , апоптоз, В-клеточную дифференциацию, что является предиктором неблагоприятного течения воспаления.

2. Ключевые показатели экспериментального воспаления под влиянием метаванадата аммония и дихромата калия в крови опытных животных ассоциированы с развитием анемии; дефицитом лейкоцитов преимущественно за счет их лимфоцитарной и нейтрофильной фракций; дисбалансом цитокиновой регуляции в сторону повышения противовоспалительных IL-10 и TGF- $\beta$  цитокинов и недостаточной продукции IL-6 и IL-1 $\beta$ ; дисбалансом селезеночных субклеточных популяций с фенотипами IFN $\gamma$ +/IL-4- и IFN $\gamma$ -/IL-

4+; нарушением дифференцировки и последующей активности В-лимфоцитов, индуцированием дифференцировки селезеночных субклеточных популяций с фенотипами CD4+CD25+, CD4+CD25+FoxP3+, CD4+FoxP3+CTLA+.

3. Наибольший вклад в характеристику ванадий- и хроминдуцированных нарушений в манифестации воспаления вносят развитие анемии, расстройство гуморального звена иммунитета и неспецифической резистентности организма с доминированием супрессорной роли селезеночных субпопуляций Т-регуляторных лимфоцитов.

4. Установлено, что в недельный срок исследования корригирующая эффективность МХФ18 превышает ПО в отношении лейкоцитарных фракций крови. Корригирующей эффективностью МХФ18 и ПО в отношении эритроцитов и гемоглобина в обозначенные сроки исследования установлено не было. МХФ18 повышает долю В-клеток, среди которых отмечался существенный прирост клеток с фенотипом B220+RT1+. Однако ПО, также как и МХФ18 не изменяют долю RT1+ в CD45+CD45R(B220)+ гейте лимфоцитов опытных крыс. Сравнимость уровней экспрессии маркеров иммуносупрессии на поверхности лимфоцитарных клеток при воспалении, вызванном на фоне затравки ванадием и хромом, под влиянием МХФ18 и ПО приводит к повышению экспрессии иммунофенотипических маркеров CD4+CD25+FoxP3+, CD4+FoxP3+CTLA4+ к 14 суткам исследования, что способствует резолюции воспалительного процесса.

5. В результате проведенного дискриминантного анализа удалось установить, что группы «Опыт+МХФ18» и «Опыт+ПО» дискриминируют с группой «Опыт» по показателям, характеризующим степень ингибирования активации CD4+FoxP3+ и CD4+FoxP3+CTLA4+. Из вышеизложенного следует, что на 7 сутки течения асептического воспаления МХФ18 и ПО равнозначно препятствуют накоплению CD4+FoxP3+ и CD4+FoxP3+CTLA4+. На 14 сутки исследования установлено, что МХФ18 дискриминирует с ПО по его эффективности предупреждать внутриклеточное накопление FoxP3+ на всем протяжении эксперимента. Кроме того, МХФ18 в отличие от ПО лучше стимулирует пролиферативную активность и, тем самым, фагоцитарную активность моноцитов с нарастающим эффектом на протяжении всего эксперимента.

6. Транскриптомный анализ тканеспецифичной экспрессии генов дал фундаментальное представление о закономерностях регуляции иммунного ответа в условиях интоксикации организма солями хрома и ванадия. В совокупности наши результаты продемонстрировали различные профили экспрессии генов тимуса опытных крыс с высоким и низким ответом во время острого асептического воспаления. Большее количество генов с пониженной модуляцией нарушали механизм разрешения воспаления. Среди 20 аннотированных генов ключевую роль отвели Hsp90aa (белок теплового шока) как инициатору супрессорного иммунного ответа. Проведенные фундаментальные исследования согласуются с выводами транскриптомного анализа и подтверждают их роль в регуляции воспалительных фенотипов. Подтверждением тому является сопоставление результатов количественной и

качественной оценки воспалительных фенотипов с экспрессионным профилем идентифицированных генов.

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

4. 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.

5. 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.

## СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ

- 1 Tchounwou P.B., Yedjou C.G., Patlolla A.K. et al. Heavy Metals Toxicity and the Environment // Exp Suppl. – 2012. – Vol. 101. – P. 133-164.
- 2 Duffus J.H. Heavy metals - a meaningless Term? Pure Appl Chem. – 2002. – Vol. 74, №5. – P. 793-807.
- 3 Bradl H. Heavy Metals in the Environment // Origin, Interaction and Remediation. – 2002. – Vol. 6. – P. 2012-2027.
- 4 He Z.L., Yang X.E., Stoffella P.J. Trace elements in agroecosystems and impacts on the environment // J. Trace Elem Med Biol. – 2005. – Vol. 19, №2-3. – P. 125-140.
- 5 Goyer R.A. et al. Toxic effects of metals // In book: Cassarett and Doull's Toxicology: The Basic Science of Poisons. – NY., 2001. – P. 811-867.
- 6 Herawati N., Suzuki S., Hayashi K. et al. Cadmium, copper and zinc levels in rice and soil of Japan, Indonesia and China by soil type // Bull Env Contam Toxicol. – 2000. – №64. – P. 33-39.
- 7 Arruti A., Fernández-Olmo I., Irabien A. Evaluation of the contribution of local sources to trace metals levels in urban PM2.5 and PM10 in the Cantabria region (Northern Spain) // J. Environ Monit. – 2010. – Vol. 12, №7. – P. 1451-1458.
- 8 Sträter E., Westbeld A., Klemm O. Pollution in coastal fog at Alto Patache, Northern Chile // Environ Sci Pollut Res Int. – 2010. – Vol. 17, №9. – P. 1563-1573.
- 9 Кравченко А.Л. Влияние тяжёлых металлов на состояние окружающей среды: теоретические и эмпирические подходы модельного изучения // Мир науки, культуры, образования. – 2016. – №1(56). – С.197-199.
- 10 Тухватшин Р.Р., Аумолдаева З.М., Абаева Т.С. и др. Биохимические показатели крови у животных различного возраста при отравлении тяжёлыми металлами // <http://7universum.com/ru/med/archive/item/4156>. 10.11.2023.
- 11 Апокина Л.Ю., Ершова Е.Л. Влияние ксенобиотиков и фитоэкстрактов на показатели крови мышей в эксперименте // Научный журнал. – 2018. – №6(29). – С. 10-14.
- 12 Акшораева Г.О., Мадибеков А.С. Алматы қаласының экологиялық жағдайын бағалау // Молодой ученый. – 2020. – №6(296). – С. 318-322.
- 13 Байкенова Ю.Г. Оценка степени опасности загрязнения почв тяжёлыми металлами (ТМ) // Аграрный вестник Урала. – 2014. – №7(125). – С. 10-14.
- 14 Грищенко И.И., Зорькина А.В., Басенко И.Н. и др. Гигиеническая оценка распределения тяжёлых металлов в почвах техногенного региона // Университетская клиника. – 2017. – №4-1(25). – С. 42-46.
- 15 Ефремов И.В. Оценка риска загрязнения почвенно-растительных систем тяжёлыми металлами при антропогенном воздействии // Вестник оренбургского государственного университета. – 2018. – №6(218). – С. 132-139.
- 16 Алматова Б.Г. Окружающая среда и здоровье населения нефтегазовых регионов и влияние нефтегазовых предприятий на их качество // <https://articlekz.com/article/12241>. 18.02.2022.

- 17 Trace Elements in Human Nutrition and Health / WHO/FAO/IAEA. – Geneva, 1996. – 752 p.
- 18 Kabata-Pendia A. Trace Elements in Soils and Plants. – Boca Raton, 2001. – 413 p.
- 19 Stern B.R. Essentiality and toxicity in copper health risk assessment: overview, update and regulatory considerations // *Toxicol Environ Health*. – 2010. – Vol. 73, №2. – P. 114-127.
- 20 Harvey L.J., McArdle H.J. Biomarkers of copper status: a brief update // *Br. J Nutr.* – 2008. – Vol. 99, Suppl. 3. – S. S10-S13.
- 21 Tchounwou P., Newsome C., Williams J. et al. Copper-induced cytotoxicity and transcriptional activation of stress genes in human liver carcinoma cells // *Metal Ions Biol Med.* – 2008. – №10. – P. 285-290.
- 22 Wang S., Shi X. Molecular mechanisms of metal toxicity and carcinogenesis // *Mol Cell Biochem.* – 2001. – Vol. 222, №1-2. – P. 3-9.
- 23 Beyersmann D., Hartwig A. Carcinogenic metal compounds: recent insight into molecular and cellular mechanisms // *Arch Toxicol.* – 2008. – Vol. 82, №8. – P. 493-512.
- 24 Yedjou C.G., Tchounwou P.B. Oxidative stress in human leukemia cells (HL-60), human liver carcinoma cells (HepG2) and human Jerkat-T cells exposed to arsenic trioxide // *Metal Ions Biol Med.* – 2006. – Vol. 9. – P. 298-303.
- 25 Yedjou G.C., Tchounwou P.B. In vitro cytotoxic and genotoxic effects of arsenic trioxide on human leukemia cells using the MTT and alkaline single cell gel electrophoresis (comet) assays // *Mol Cell Biochem.* – 2007. – Vol. 301, №1-2. – P. 123-130.
- 26 Tchounwou P.B., Centeno J.A., Patlolla A.K. Arsenic toxicity, mutagenesis and carcinogenesis - a health risk assessment and management approach // *Mol Cell Biochem.* – 2004. – Vol. 255. – P. 47-55.
- 27 Tchounwou P.B., Ishaque A., Schneider J. Cytotoxicity and transcriptional activation of stress genes in human liver carcinoma cells (HepG2) exposed to cadmium chloride // *Mol Cell Biochem.* – 2001. – Vol. 222. – P. 21-28.
- 28 Patlolla A., Barnes C., Field J. et al. Potassium dichromate-induced cytotoxicity, genotoxicity and oxidative stress in human liver carcinoma (HepG2) cells // *Int J Environ Res Public Health*. – 2009. – Vol. 6. – P. 643-653.
- 29 Patlolla A., Barnes C., Yedjou C. et al. Oxidative stress, DNA damage and antioxidant enzyme activity induced by hexavalent chromium in Sprague Dawley rats // *Environ Toxicol.* – 2009. – Vol. 24, №1. – P. 6-73.
- 30 Yedjou G.C., Tchounwou P.B. N-acetyl-cysteine affords protection against lead-induced cytotoxicity and oxidative stress in human liver carcinoma (HepG2) cells // *Intl J Environ Res Public Health*. – 2008. – Vol. 4, №2. – P. 132-137.
- 31 Tchounwou P.B., Yedjou C.G., Foxx D. et al. Lead-induced cytotoxicity and transcriptional activation of stress genes in human liver carcinoma cells (HepG2) // *Mol. Cell Biochem.* – 2004. – Vol. 255. – P. 161-170.
- 32 Sutton D.J., Tchounwou P.B. Mercury induces the externalization of phosphatidylserine in human proximal tubule (HK-2) cells // *Intl J Environ Res Public Health*. – 2007. – Vol. 4, №2. – P. 138-144.

- 33 Sutton D., Tchounwou P.B., Ninashvili N. et al. Mercury induces cytotoxicity, and transcriptionally activates stress genes in human liver carcinoma cells // *Intl J Mol Sci.* – 2002. – Vol. 3, №9. – P. 965-984.
- 34 Mukherjee B., Patra B., Mahapatra S. et al. Vanadium--an element of atypical biological significance // *Toxicol Lett.* – 2004. – Vol. 150. – P. 135-143.
- 35 Gruzewska K., Michno A., Pawelczyk T. et al. . Essentiality and toxicity of vanadium supplements in health and pathology // *J Physiol Pharmacol.* – 2014. – Vol. 65. – P. 603-611.
- 36 Ochi A., Ishimura E., Tsujimoto Y. et al. Trace elements in the hair of hemodialysis patients // *Biol Trace Elem Res.* – 2011. – Vol. 143. – P. 825-834.
- 37 Jayawardene I., Paradis J.-F. et al. Multi-elemental determination of metals, metalloids and rare earth element concentrations in whole blood from the Canadian Health Measures Survey, 2009-2011 // *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology.* – 2021. – Vol. 68. – P. 126830.
- 38 Sohrabi M., Nikkhah M., Sohrabi M. et al. Evaluating tissue levels of the eight trace elements and heavy metals among esophagus and gastric cancer patients: A comparison between cancerous and non-cancerous tissues // *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology.* – 2021. – Vol. 68. – P. 126761.
- 39 Zhu G., Zheng T., Xia Ch. et al. Plasma levels of trace element status in early pregnancy and the risk of gestational diabetes mellitus: A nested case-control study // *J of Trace Elements in Medicine and Biol.* – 2021. – Vol. 68. – P. 126829.
- 40 Filler G. et al. A cross-sectional study of vanadium and chromium levels in pediatric patients with CKD // *BMJ Open.* – 2017. – Vol. 7, №5. – P. e014821.
- 41 Services USDoHaH. Toxicological Profile for Chromium, 2012 // <http://www.atsdr.cdc.gov/ToxProfiles/tp7.pdf>. 11.07.2022.
- 42 Saha P.D., Ghosh A.B., Chatterjee S.K. et al. Environmental contamination of chromium: an overview on its toxicological, environmental fate, and preventive strategies // In book: *Comprehensive water quality and purification.* – Amsterdam: Elsevier, 2019. – P. 387-407.
- 43 Ray R.R. Adverse hematological effects of hexavalent chromium: an overview // *Interdiscip Toxicol.* – 2016. – Vol. 9, №2. – P. 55-65.
- 44 Jacobs J.A., Testa S.M. Overview of chromium(VI) in the environment: background and history // In book: *Chromium (VI) Handbook.* – Boca Raton: CRC Press, 2005. – P. 1-22.
- 45 Patlolla A., Barnes C., Yedjou C. et al. Oxidative stress, DNA damage and antioxidant enzyme activity induced by hexavalent chromium in Sprague Dawley rats // *Environ Toxicol.* – 2009. – Vol. 24, №1. – P. 66-73.
- 46 Wang X.F., Xing M.L., Shen Y. et al. Oral administration of Cr (VI) induced oxidative stress, DNA damage and apoptotic cell death in mice // *Toxicology.* – 2006. – Vol. 228. – P. 16-23.
- 47 Capella L.S., Gefé M.R., Silva E.F. et al. Mechanisms of vanadate-induced cellular toxicity: Role of cellular glutathione and NADPH // *Arch. Biochem. Biophys.* – 2002. – Vol. 406. – P. 65-72.

- 48 Velma V., Vutukuru S.S., Tchounwou P.B. Ecotoxicology of hexavalent chromium in freshwater fish: a critical review // *Rev Environ Health*. – 2009. – Vol. 24, №2. – P. 129-145.
- 49 Guertin J. Toxicity and health effects of chromium (all oxidation states) // In book: *Chromium (VI) Handbook*. – Boca Raton: CRC Press, 2005. – P. 216-234.
- 50 De Flora S., Mulbah S., Cartiglia C. et al. Smoke-induced micro RNA and related proteome alterations. Modulation by chemopreventive agents // *Int J Cancer*. – 2012. – Vol. 131, №12. – P. 2763-2773.
- 51 Thompson C.M., Haws L.C., Harris M.A. et al. Application of the U.S. EPA mode of action Framework for purposes of guiding future research: a case study involving the oral carcinogenicity of hexavalent chromium // *Toxicol Sci*. – 2011. – Vol. 119. – P. 20-40.
- 52 Chiu A., Shi J., Lee W.K.P. et al. Overview of chromium(VI) apoptosis, cell cycle arrest and carcinogenesis // *J Environ Sci Health C Environ Carcinog Ecotoxicol*. – 2010. – Vol. 28, №3. – P. 188-230.
- 53 Shelnutt S.R., Goad P., Belsito D.V. Dermatological toxicity of hexavalent chromium // *Crit. Rev Toxicol*. – 2007. – Vol. 37. – P. 375-387.
- 54 Toxicological Profile for Chromium / Department of Health and Human Services. – Atlanta, 2008. – 610 p.
- 55 Fortoul T.I., Rojas-Lemus M., Rodriguez-Lara V. et al. Overview of environmental and occupational vanadium exposure and associated health outcomes: An article based on a presentation at the 8th International Symposium on Vanadium Chemistry, Biological Chemistry, and Toxicology, Washington DC, August 15–18, 2012 // *Journal of Immunotoxicology*. – 2014. – Vol. 11, №1. – P. 13-18.
- 56 Imtiaz M. et al. Vanadium, recent advancements and research prospects: A review // *Environment International*. – 2015. – Vol. 80. – P. 79-88.
- 57 Thompson K.H., Orvig C. Vanadium in diabetes: 100 years from Phase 0 to Phase I // *J. Inorg. Biochem*. – 2006. – Vol. 100. – P. 1925-1935.
- 58 Thompson K.H., Lichter J., LeBel C. et al. Vanadium treatment of type 2 diabetes: A view to the future // *J. Inorg. Biochem*. – 2009. – Vol. 103. – P. 554-558.
- 59 Kurt O., Ozden T.Y., Ozsoy N. et al. Influence of vanadium supplementation on oxidative stress factors in the muscle of STZ-diabetic rats // *Biomaterials*. – 2011. – Vol. 24. – P. 943-949.
- 60 Missaoui S., Ben Rhouma K., Yacoubi M.T. et al. Vanadyl sulfate treatment stimulates proliferation and regeneration of beta cells in pancreatic islets // *J. Diabetes Res*. – 2014. – Vol. 18. – P. 335-367
- 61 Pirmoradi L., Mohammadi M.T., Safaei A. et al. Does the relief of glucose toxicity act as a mediator in proliferative actions of vanadium on pancreatic islet beta cells in streptozocin diabetic rats // *Iran. Biomed. J*. – 2014. – Vol. 18. – P. 173-180.
- 62 Sun L. et al. The protective effect of vanadium against diabetic cataracts in diabetic rat model // *Biol. Trace Elem*. – 2014. – Vol. 158. – P. 219-223.
- 63 Soveid M. et al. Long-term efficacy and safety of vanadium in the treatment of type 1 diabetes // *Arch. Iran. Med*. – 2013. – Vol. 16. – P. 408-411.
- 64 Evangelou A.M. Vanadium in cancer treatment // *Crit. Rev. Oncol. Hematol*. – 2002. – Vol. 42. – P. 249-265.

- 65 Bishayee A. et al. Vanadium in the detection, prevention and treatment of cancer: the in vivo evidence // *CancerLett.* – 2010. – Vol. 294. – P. 1-12.
- 66 Crans D.C., Smee J.J., Gaidamauskas E. et al. The chemistry and biochemistry of vanadium and the biological activities exerted by vanadium compounds // *Chem. Rev.* – 2004. – Vol. 104. – P. 849-902.
- 67 Yang X., Wang K., Lu J. et al. Membrane transport of vanadium compounds and the interaction with the erythrocyte membrane // *Coord. Chem. Rev.* – 2003. – Vol. 237. – P. 103-111.
- 68 Capella L.S., Gefé M.R., Silva E.F. et al. Mechanisms of vanadate-induced cellular toxicity: Role of cellular glutathione and NADPH // *Arch. Biochem. Biophys.* – 2002. – Vol. 406. – P. 65-72.
- 69 Crans D.C., Zhang B., Gaidamauskas E. et al. Is vanadate reduced by thiols under biological conditions? Changing the redox potential of V(V)/V(IV) by complexation in aqueous solution // *Inorg. Chem.* – 2010. – Vol. 49. – P. 4245-4256.
- 70 Meng F.G., Zhang Z.Y. Redox regulation of protein tyrosine phosphatase activity by hydroxyl radical // *Bioc. Biop. Acta.* – 2013. – Vol. 1834. – P. 464-469.
- 71 Ostman A., Frijhoff J., Sandin A. et al. Regulation of protein tyrosine phosphatases by reversible oxidation // *J. Biochem.* – 2011. – Vol. 150. – P. 345-356.
- 72 Kordowiak A.M., Klein A., Goc A. et al. Comparison of the effect of VOSO<sub>4</sub>, Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub> and NaVO<sub>3</sub> on proliferation, viability and morphology of H35-19 rat hepatoma cell line // *Pol. J. Pathol.* – 2007. – Vol. 58. – P. 51-57.
- 73 Cuesta S., Francés D., García G.B. ROS formation and antioxidant status in brain areas of rats exposed to sodium metavanadate // *Neurotoxicol. Teratol.* – 2011. – Vol. 33. – P. 297-302.
- 74 Fortoul T.I., Rojas-Lemus M. Vanadium as an air pollutant // In book: *Vanadium: Its Impact on Health.* – NY., 2007. – Ch. 1. – P. 1-6.
- 75 Englert N. Fine particles and human health – a review of epidemiological studies // *Toxicology Letters.* – 2004. – Vol. 149. – P. 1-3.
- 76 González-Villalva A. et al. Blood changes generated after vanadium inhalation // *Current Topics in Toxicology.* – 2009. – Vol. 6. – P. 31-38.
- 77 Fortoul T.I., Piñón-Zárate G., Díaz-Bech M.E. et al. Spleen and bone marrow megakaryocytes as targets for inhaled vanadium // *Histology and Histopathology.* – 2008. – Vol. 23, №11. – P. 1321-1326.
- 78 González-Villalva A.E. et al. Signaling pathways involved in megakaryopoiesis // *Gaceta Médica de México.* – 2010. – Vol. 146, №2. – P. 136-143.
- 79 Piñón-Zarate G. et al. Metals and immune system // In book: *Metals and Toxicological Implication in Health.* – NY., 2007. – Ch. 5. – P. 43-64.
- 80 Avila-Costa M.R., Fortoul T.I. Vanadium and the liver // In book: *Vanadium: Its Impact on Health.* – NY., 2007. – Ch. 8. – P. 57-74.
- 81 Bonner J.C. et al. Airway fibrosis in rats induced by vanadium pentoxide // *American Journal of Physiology.* – 2000. – Vol. 278, №1. – P. L209-L216.
- 82 Fortoul T.I., Rodriguez-Lara V., Mussali-Galante P. et al. Vanadium and respiratory system // In book: *Vanadium Its Impact on Health.* – NY., 2007. – Ch. 3. – P. 21-27.



- 83 Avila-Costa M.R., Colín-Barenque L., Zepeda-Rodríguez A. et al. Ependymal epithelium disruption after vanadium pentoxide inhalation: a mice experimental model // *Neuroscience Letters*. – 2005. – Vol. 381, №1-2. – P. 21-25.
- 84 Avila-Costa M.R. et al. Nigrostriatal modifications alter vanadium inhalation and immunocytochemical and cytological approach // *Neurochemical Research*. – 2004. – Vol. 29, №7. – P. 1365-1369.
- 85 Avila-Costa M.R., Fortoul T.I., Niño-Cabrera G. et al. Hippocampal cell alterations induced by the inhalation of vanadium pentoxide(V<sub>2</sub>O<sub>5</sub>) promote memory deterioration // *Neurotoxicology*. – 2006. – Vol. 27. – P. 1007-1012.
- 86 Chandra A.K., Ghosh R., Chatterjee A. et al. Effects of vanadate on male rat reproductive tract histology, oxidative stress markers and androgenic enzyme activities // *Journal of Inorganic Biochemistry*. – 2007. – Vol. 101, №6. – P. 944-956.
- 87 Aragón M.A., Ayala M.E., Fortoul T.I. et al. Vanadium induced ultrastructural changes and apoptosis in male germ cells // *Reproductive Toxicology*. – 2005. – Vol. 20, №1. – P. 127-134.
- 88 Fortoul T.I., Bizarro-Neves P. et al. Ultrastructural findings in murine seminiferous tubules as a consequence of subchronic vanadium pentoxide inhalation // *Reproductive Toxicology*. – 2007. – Vol. 23, №4. – P. 588-592.
- 89 Mussali-Galante P., Rodríguez-Lara V., Hernández-Tellez B. et al. Inhaled vanadium pentoxide decrease gamma-tubulin of mouse testes at different exposure times // *Toxicology and Industrial Health*. – 2005. – Vol. 21, №9. – P. 215-222.
- 90 Lindahl T., Wood R.D. Quality control by DNA repair // *Science*. – 1999. – Vol. 286, №5446. – P. 1897-1905.
- 91 Slupphaug G., Kavli B., Krokan H.E. The interacting pathways for prevention and repair of oxidative DNA damage // *Mutation Research*. – 2003. – Vol. 531, №1-2. – P. 231-251.
- 92 Valko M., Rhodes C.J., Moncol J. et al. Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer // *Chemico-Biological Interactions*. – 2006. – Vol. 160, №1. – P. 1-40.
- 93 Møller P. Genotoxicity of environmental agents assessed by the alkaline comet assay // *Basic and Clinical Pharmacology and Toxicology*. – 2005. – Vol. 96, №1. – P. 1-42.
- 94 Opinion of the scientific panel of dietetic products, nutrition and allergies on a request from the comission related to the tolerable upper intake level of vanadium / European Food Safety Authority // *The EFSA Journal*. – 2004. – Vol. 33. – P. 1-22.
- 95 Yang X., Wang K., Lu J. et al. Membrane transport of vanadium compounds and the interaction with the erythrocyte membrane // *Coordination Chemistry Reviews*. – 2003. – Vol. 237, №1-2. – P. 103-111.
- 96 NTP toxicology and carcinogenesis studies of vanadium pentoxide (CAS No. 1314-62-1) in F344/N rats and B6C3F1 mice (inhalation) / National Toxicology Program // *National Toxic. Prog. Tech. Report Series*. – 2002. – №507. – P. 1-343.
- 97 Aguirre M.V., Juaristi J.A., Alvarez M.A. et al. Characteristics of in vivo murine erythropoietic response to sodium orthovanadate // *Chemico-Biological Interactions*. – 2005. – Vol. 156, №1. – P. 55-68.

98 Zwolak I. Protective Effects of Dietary Antioxidants against Vanadium-Induced Toxicity: A Review // *Oxid Med Cell Longev.* – 2020. – Vol. 2020. – P. 1490316.

99 Zhang W.X., Chen H., Zeng Q. et al. Prenatal and postnatal exposure to vanadium and the immune function of children // *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology.* – 2021. – Vol. 67. – P. 126787.

100 Cui W., Cui H., Peng X. et al. Excess Dietary Vanadium Induces the Changes of Subsets and Proliferation of Splenic T Cells in Broilers // *Biological Trace Element Research.* – 2011. – Vol. 143. – P. 932-938.

101 Cui W., Cui H., Peng X. et al. Effect of Vanadium on the Subset and Proliferation of Peripheral Blood T Cells, and Serum Interleukin-2 Content in Broilers // *Biological Trace Element Research.* – 2011. – Vol. 141. – P. 192-199.

102 Deng Y.X., Cui H.M., Peng X. et al. Effect of Dietary Vanadium on Cecal Tonsil T Cell Subsets and IL-2 Contents in Broilers // *Biological Trace Element Research.* – 2011. – Vol. 67, №1-3. – P. 647-656.

103 Pizzino G., Bitto A., Interdonato M. et al. Oxidative stress and DNA repair and detoxification gene expression in adolescents exposed to heavy metals living in the Milazzo-Valle del Mela area (Sicily, Italy) // *Redox Biol.* – 2014. – Vol. 2. – P. 686-693.

104 Hodgson S., Nieuwenhuijsen M.J., Elliott P. et al. Kidney disease mortality and environmental exposure to mercury // *American Journal of epidemiology.* – 2007. – Vol. 165, №1. – P. 72-77.

105 Wang Z., Chai L., Yang Z. et al. Identifying sources and assessing potential risk of heavy metals in soils from direct exposure to children in a mine-impacted city, Changsha, China // *Journal of Environmental Quality.* – 2010. – Vol. 39, №5. – P. 1616-1623.

106 Breton J., Daniel C., Vignal C. et al. Does oral exposure to cadmium and lead mediate susceptibility to colitis? The dark-and-bright sides of heavy metals in gut ecology // *Sci Rep.* – 2016. – Vol. 6. – P. 19200.

107 Петрова П.Г., Захарова Д.А., Борисова Н.В. и др. Влияние микроэлементного дисбаланса среды на иммунный статус организма // *Аллергология и иммунология.* – 2003. – Т. 4, №2. – С. 201.

108 Burska A.N. et al. Gene expression analysis in RA: towards personalized medicine // *Pharmacogenomics J.* – 2014. – Vol. 14, №2. – P. 93-106.

109 van Baarsen L.G., Wijbrandts C.A., Timmer T.C. et al. Synovial tissue heterogeneity in rheumatoid arthritis in relation to disease activity and biomarkers in peripheral blood // *Arthritis Rheum.* – 2010. – Vol. 62. – P. 1602-1607.

110 Park Y.-Y., Park E.S., Kim S.B. et al. Development and Validation of a Prognostic Gene-Expression Signature for Lung Adenocarcinoma // *PLoS One.* – 2012. – Vol. 7, №9. – P. e44225.

111 Cankorur-Cetinkaya A., Dereli E., Eraslan S. et al. A Novel Strategy for Selection and Validation of Reference Genes in Dynamic Multidimensional Experimental Design in Yeast // *PLoS One.* – 2012. – Vol. 7, №6. – P. e38351.

- 112 Pascual-Auir A., Fita-Torro J., Proft M. Capturing and Understanding the Dynamics and Heterogeneity of Gene Expression in the Living Cell // *Int J Mol Sci.* – 2020. – Vol. 21, №21. – P. 8278-1-8278-19.
- 113 Murray J.I., Whitfield M.L., Trinklein N.D. et al. Diverse and specific gene expression responses to stress in cultured human cells // *Mol. Biol. Cell.* – 2004. – Vol. 15. – P. 2361-2374.
- 114 Gasch A.P. et al. Genomic expression programs in yeast cell response to environmental changes // *Mol. Biol. Cell.* – 2000. – Vol. 11. – P. 4241-4257.
- 115 de-Leon S.B.T., Davidson E.H. Gene regulation: a gene control network in development // *Annu Rev Physiol. Biomol. Structure.* – 2007. – Vol. 36. – P. 191-212.
- 116 Rienzo A., Pascual-Ahuir A., Proft M. The use of a real-time luciferase assay to quantify gene expression dynamics in the living yeast cell // *Yeast.* – 2012. – Vol. 29. – P. 219-231.
- 117 Dolz-Edo L., Rienzo A., Poveda-Huertes D. et al. Deciphering dynamic dose responses of natural promoters and single cis elements upon osmotic and oxidative stress in yeast // *Mol. Cell. Biol.* – 2013. – Vol. 33. – P. 2228-2240.
- 118 Pascual-Ahuir A., González-Cantó E., Juyoux P. et al. Dose dependent gene expression is dynamically modulated by the history, physiology and age of yeast cells // *Biochim. Biophys. Acta Gene Reg. Mech.* – 2019. – Vol. 1862. – P. 457-471.
- 119 Hartl F.U., Bracher A., Hayer-Hartl M. Molecular chaperones in protein folding and proteostasis // *Nature.* – 2011. – Vol. 475. – P. 324-332.
- 120 Lindquist S., Craig E.A. The heat-shock proteins // *Annu. Rev. Genet.* – 1988. – Vol. 22. – P. 631-677.
- 121 De Maio A. Heat shock proteins: facts, thoughts, and dreams // *Shock (Augusta, Ga.)*. – 1999. – Vol. 11, №1. – C. 1-12.
- 122 Borges T.J., Wieten L., Martin J.C. et al. The anti-inflammatory mechanisms of Hsp70 // *Front Immunol.* – 2012. – Vol. 3. – P. 95-1-95-12.
- 123 Prodromou C. Mechanisms of Hsp90 regulation // *Biochem J.* – 2016. – Vol. 473, №16. – P. 2439-2452.
- 124 Schick C., Arbogast M., Lowka K. et al. Continuous enhanced expression of Hsc70 but not Hsp70 in rheumatoid arthritis synovial tissue // *Arthritis Rheum.* – 2004. – Vol. 50. – P. 88-93.
- 125 Maximilian M. Biebl and Johannes Buchner. Structure, Function, and Regulation of the Hsp90 Machinery // *Cold Spring Harb Perspect Biol.* – 2019. – Vol. 11, №9. – P. a034017.
- 126 Sela U., Olds P., Park A. et al. Dendritic cells induce antigen-specific regulatory T cells that prevent graft versus host disease and persist in mice // *J. Exp. Med.* – 2011. – Vol. 208. – P. 2489-2496.
- 127 Tang Q., Bluestone J.A. The Foxp3<sup>+</sup> regulatory T cell: a jack of all trades, master of regulation // *Nat. Immunol.* – 2008. – Vol. 9. – P. 239-244.
- 128 Roncarolo M.G., Battaglia M. Regulatory T-cell immunotherapy for tolerance to self antigens and alloantigens in humans // *Nat. Rev. Immunol.* – 2007. – Vol. 7. – P. 585-598.

- 129 Vignali D.A., Collison L.W., Workman C.J. How regulatory T cells work // *Nat. Rev. Immunol.* – 2008. – Vol. 8. – P. 523-532.
- 130 Bluestone J.A. Regulatory T-cell therapy: is it ready for the clinic? // *Nat. Rev. Immunol.* – 2005. – Vol. 5, №4. – P. 343-349.
- 131 Murayama Y., Samora C.P., Kurokawa Y. et al. Establishment of DNA-DNA Interactions by the Cohesin Ring // *Cell.* – 2018. – Vol. 172, №3. – P. 465-477.
- 132 Lengronne A. et al. Establishment of sister chromatid cohesion at the *S. cerevisiae* replication fork // *Mol Cell.* – 2006. – Vol. 23, №6. – P. 787-799.
- 133 Ström L., Lindroos H.B., Shirahige K. et al. Postreplicative recruitment of cohesin to double-strand breaks is required for DNA repair // *Mol Cell.* – 2004. – Vol. 16, №6. – P. 1003-1015.
- 134 Michaelis C. et al. Cohesins: chromosomal proteins that prevent premature separation of sister chromatids // *Cell.* – 1997. – Vol. 91, №1. – P. 35-45.
- 135 Kojic A., Cuadrado A., De Coninck M. et al. Different roles of cohesin-SA1 and cohesin-SA2 in the three-dimensional organization of chromosomes // *Nat Struct Mol Biol.* – 2018. – Vol. 25, №6. – P. 496-504.
- 136 Sasca D., Yun H., Giotopoulos G. et al. Cohesin-dependent regulation of gene expression during differentiation is lost in cohesin-mutated myeloid malignancies // *Blood.* – 2019. – Vol. 134, №24. – P. 2195-2208.
- 137 Oreskovic E., Wheeler E.C., Mengwasser K. et al. Genetic analysis of cancer drivers reveals cohesin and CTCF as suppressors of PD-L1 // *Proc Natl Acad Sci U S A.* – 2022. – Vol. 119, №7. – P. e2120540119.
- 138 Ding S., Diep J., Feng N. et al. STAG2 deficiency induces interferon responses via cGAS-STING pathway and restricts virus infection // *Commun Nat.* – 2018. – Vol. 9. – P. 1485-1-1485-8.
- 139 Xiu P. et al. Clusterin: a review of research progress and promising directions in the field of hepatocellular carcinoma // *World J Gastroenterol.* – 2015. – Vol. 21, №27. – P. 8262-8270.
- 140 Zoubeidi A., Ettinger S., Beraldi E. et al. Clusterin facilitates COMMD1 and I- $\kappa$ B degradation to enhance NF- $\kappa$ B activity in prostate cancer cells // *Mol Cancer Res.* – 2010. – Vol. 8, №1. – P. 119-130.
- 141 Loison F., Debure L., Nizard P. et al. Up-regulation of the clusterin gene after proteotoxic stress: implication of HSF1-HSF2 heterocomplexes // *Biochem J.* – 2006. – Vol. 395, №1. – P. 223-231.
- 142 Kulatu Y., Grote G., Reth M. Autoinhibition and adapter function of Syk // *Immunol Rev.* – 2009. – Vol. 232, №1. – P. 286-299.
- 143 Cheng A.M. et al. Syk tyrosine kinase required for mouse viability and B-cell development // *Nature.* – 1995. – Vol. 378, №6554. – P. 303-306.
- 144 Wang L., Aschenbrenner D., Zeng Z. et al. Gain-of-function variants in SYK cause immune dysregulation and systemic inflammation in humans and mice // *Nat Genet.* – 2021. – Vol. 53, №4. – P. 500-510.
- 145 Wan D., Feng J., Wang P. et al. Hypoxia- and Inflammation-Related Transcription Factor SP3 May Be Involved in Platelet Activation and Inflammation in Intracranial Hemorrhage // *Front Neurol.* – 2022. – Vol. 13. – P. 886329.

- 146 Hota S.K., Hota K.B., Prasad D. et al. Oxidative-stress-induced alterations in Sp factors mediate transcriptional regulation of the NR1 subunit in hippocampus during hypoxia // *Free Radical Biol Med.* – 2010. – Vol. 49. – P. 178-191.
- 147 Duval E., Bouyoucef M., Leclercq S. et al. Hypoxia inducible factor 1 alpha down-regulates type i collagen through Sp3 transcription factor in human chondrocytes: HIF-1 alpha down regulates COL1A1 through Sp3 // *IUBMB Life.* – 2016. – Vol. 68. – P. 756-763.
- 148 Carver B.J., Plosa E.J., Stinnett A.M. et al. Interactions between NF-κB and SP3 connect inflammatory signaling with reduced FGF-10 expression // *J Biol Chem.* – 2013. – Vol. 288, №21. – P. 15318-15325.
- 149 Zheng C. et al. Downregulation of SENP1 suppresses LPS-induced macrophage inflammation by elevating Sp3 SUMOylation and disturbing Sp3-NF-κB interaction // *Am J Transl Res.* – 2020. – Vol. 12. – P. 7439-7448.
- 150 Si-Tahar M., Touqui L., Chignard M. Innate immunity and inflammation – two facets of the same anti-infectious reaction // *Clin Exp Immunol.* – 2009. – Vol. 156, №2. – P. 194-198.
- 151 de Seny D. et al. Biomarkers of inflammation and innate immunity in atrophic nonunion fracture // *J Transl Med.* – 2016. – Vol. 14. – P. 258-268.
- 152 Schwartz C. et al. Interleukin 33: an innate alarm for adaptive responses beyond Th2 immunity-emerging roles in obesity, intestinal inflammation, and cancer // *Eur J Immunol.* - 2016. – Vol. 46, №5. – P. 1091-1100.
- 153 Huang Y., Chen Z. Inflammatory bowel disease related innate immunity and adaptive immunity // *Am J Transl Res.* – 2016. – Vol. 8, №6. – P. 2490-2497.
- 154 Потапнев М.П. Иммунные механизмы стерильного воспаления // *Иммунология.* – 2015. – №5. – С. 312-318.
- 155 Шортанбаев А.А., Кожанова С.В. *Общая иммунология.* – Изд. 3-е. – Алматы: Эверо, 2014. – 668 с.
- 156 Dubaniewicz A. Microbial and human heat shock proteins as “danger signals” // *Human Immunol.* – 2013. – Vol. 74. – P. 1550-1558.
- 157 Vénéreau E., Ceriotti C., Bianchi M.E. DAMPs from Cell Death to New Life // *Front Immunol.* – 2015. – Vol. 6. – P. 422-1-422-11.
- 158 Потапнев М.П. Молекулярные аспекты распознавания в иммунном и воспалительном ответе // *Здравоохранение (Минск).* – 2014. – №3. – С. 8-27.
- 159 Franchi L. et al. Function of NOD-1 like receptors in microbial recognition and host defense // *Immunol Rev.* – 2009. – Vol 227, №1. – P. 106-128.
- 160 Leichtle A., Klenke C., Ebmeyer J. et al. NOD-Like Receptor Signaling in Cholesteatoma // *Biomed Research International.* – 2015. – Vol. 2015. – P. 108169.
- 161 Тухватулин А.И. и др. Изучение способности лигандов рецептора NOD1 активировать транскрипционный фактор NF-κB в условиях *in vitro* и *in vivo* // *Acta naturae.* – 2011. – Vol. 3, №1. – P. 82-90.
- 162 Man S.M. et al. Regulation of inflammasome activation // *Immunol Rev.* – 2015. – Vol. 265, №1. – P. 6-21.
- 163 Geering B. et al. Living and dying for inflammation: neutrophils, eosinophils, basophils // *Trends Immunol.* – 2013. – Vol. 34, №8. – P. 398-409.

- 164 Land W.G. The role of damage associated molecular patterns in human diseases: Part I: Promoting inflammation and immunity // Sultan Qaboos Univ Med J. – 2015. – Vol. 15. – P. 9-21.
- 165 Carrero R., Cerrada I., Lledo E. et al. IL1beta induces mesenchymal stem cells migration and leucocyte chemotaxis through NF-kappaB // Stem Cell Rev. – 2012. – Vol. 8. – P. 905-916.
- 166 Hengartner N.E. et al. Crucial Role of IL1beta and C3a in the In Vitro-Response of Multipotent Mesenchymal Stromal Cells to Inflammatory Mediators of Polytrauma // PLoS One. – 2015. – Vol. 10, №1. – P. 45-65.
- 167 Карзакова Л.М., Сидоров И.А., Волков А.Н. и др. Типы цитокинового дисбаланса при тяжелых гнойно-воспалительных заболеваниях лица и шеи // Иммунология. – 2013. – №3. – С. 155-158.
- 168 Keyel P.A. How is inflammation initiated? Individual influences of IL-1, IL-18 and HMGB1 // Cytokine. – 2014. – Vol. 69, №1. – P. 136-145.
- 169 Krishnan S.M. et al. IL-1 $\beta$  and IL-18: inflammatory markers or mediators of hypertension? // Br J Pharmacol. – 2014. – Vol. 171, №24. – P. 5589-5602.
- 170 Pedersen B.K., Febbraio M.A. Muscles, exercise and obesity: skeletal muscle as a secretory organ // Nat Rev Endocrinol. – 2012. – Vol. 8. – P. 457-465.
- 171 Muñoz-Cánoves P., Scheele C. et al. Interleukin-6 myokine signaling in skeletal muscle: a double-edged sword? // FEBS J. – 2013. – Vol. 280, №17. – P. 4131-4148.
- 172 Scheller J., Rose-John S. Interleukin-6 and its receptor: from bench to bedside // Med Microbiol Immunol. – 2006. – Vol. 195. – P. 173-183.
- 173 Tanaka T., Kishimoto T. The biology and medical implications of interleukin-6 // Cancer Immunol Res. – 2014. – Vol. 2, №4. – P. 288-294.
- 174 Yin H., Price F., Rudnicki M.A. Satellite cells and the muscle stem cell niche // Physiol Rev. – 2013. – Vol. 93. – P. 23-67.
- 175 Rocheteau P., Gayraud-Morel B. et al. A subpopulation of adult skeletal muscle stem cells retains all template DNA strands after cell division // Cell. – 2012. – Vol. 148. – P. 112-125.
- 176 Zhang C., Li Y., Wu Y. et al. Interleukin-6/signal transducer and activator of transcription 3 (STAT3) pathway is essential for macrophage infiltration and myoblast proliferation during muscle regeneration // J Biol Chem. – 2013. – Vol. 288. – P. 1489-1499.
- 177 Old L.J. Tumor necrosis factor (TNF) // Science. – 1985. – Vol. 230, №4726. – P. 630-632.
- 178 Gomes F.I. et al. Inflammatory Cytokines Interleukin-1 $\beta$  and Tumour Necrosis Factor- $\alpha$  - Novel Biomarkers for the Detection of Periodontal Diseases: a Literature Review // J Oral Maxillofac Res. – 2016. – Vol. 7, №2. – P. 356-376.
- 179 Hojs R., Ekart R. et al. Markers of Inflammation and Oxidative Stress in the Development and Progression of Renal Disease in Diabetic Patients // Nephron. – 2016. – Vol. 133, №3. – P. 159-162.
- 180 Zampronio A.R., Soares D.M., Souza G.E. Central mediators involved in the febrile response: effects of antipyretic drugs // Temperature (Austin). – 2015. – Vol. 2, №4. – P. 506-521.

- 181 Ярилин Д.А. Роль фактора некроза опухолей в регуляции воспалительного ответа моноцитов и макрофагов // Иммунология. – 2014. – №4. – С. 195-201.
- 182 Wajant H., Pfizenmaier K., Scheurich P. Tumor necrosis factor signaling // *Cell Death Differ.* – 2003. – Vol. 10, №1. – P. 45-65.
- 183 da Costa R.M., Neves K.B. et al. TNF- $\alpha$  induces insulin resistance via positive modulation of PTEN and decreased Akt/eNOS/NO signaling in high fat diet-fed mice // *Cardiovasc Diabetol.* – 2016. – Vol. 15, №1. – P. 119-1-119-12.
- 184 Costa N.T. et al. Influence of Insulin Resistance and TNF- $\alpha$  on the Inflammatory Process, Oxidative Stress, and Disease Activity in Patients with Rheumatoid Arthritis // *Oxid Med Cell Longev.* – 2016. – P. 8962763.
- 185 Schoenborn J.R. et al. Regulation of interferon-gamma during innate and adaptive immune responses // *Adv. Immunol.* – 2007. – Vol. 96. – P. 41-101.
- 186 Chen G.Y., Nunez G. Sterile inflammation: sensing and reacting to damage // *Nat. Rev. Immunol.* – 2010. – Vol. 10. – P. 826-837.
- 187 Cho S.Y., Choi J.H. Biomarkers of sepsis // *Infect. Chemother.* – 2014. – Vol. 46, №1. – P. 1-12.
- 188 Asadullah K., Sterry W., Volk H.D. Interleukin-10 therapy – review of a new approach // *Pharmacol. Rev.* – 2003. – Vol. 55. – P. 241-269.
- 189 D’Elia R.V., Harrison K. et al. Targeting the “cytokine storm” for therapeutic benefit // *Clin. Vac. Immun.* - 2013. – Vol. 20, №3. – P. 319-327.
- 190 Joss A., Akdis M., Faith A. et al. IL-10 directly acts on T cells by specifically altering the CD28 co-stimulation pathway // *European Journal of Immunology.* – 2000. – Vol. 30, №6. – P. 1683-1690.
- 191 Yilma A.N., Singh S.R., Farley S.J. et al. The Anti-Inflammatory Cytokine, Interleukin-10, Inhibits Inflammatory Mediators in Human Epithelial Cells and Mouse Macrophages Exposed to Live and UV-Inactivated *Chlamydia trachomatis* // *Mediators inflamm.* – 2012. – Vol. 2012. – P. 520174-1-520174-10.
- 192 Mumm J.B., Emmerich J., Zhang X. et al. IL-10 elicits IFN $\gamma$ -dependent tumor immune surveillance // *Cancer Cell.* – 2011. – Vol 20, №6. – P. 781-796.
- 193 Sabat R. IL-10 family of cytokines // *Cytokine and Growth Factor Reviews.* – 2010. – Vol. 21, №5. – P. 315-324.
- 194 Villalta S.A. et al. Interleukin-10 reduces the pathology of mdx muscular dystrophy by deactivating M1 macrophages and modulating macrophage phenotype // *Human Molecular Genetics.* – 2011. – Vol. 20. №4. – P. 790-805.
- 195 Park S.J., Choi Y.S., Lee S. et al. BIX02189 inhibits TGF- $\beta$ 1-induced lung cancer cell metastasis by directly targeting TGF- $\beta$  type I receptor // *Cancer Lett.* – 2016. – Vol 381, №2. – P. 314-322.
- 196 Jeong M.H., Kim S.J. et al. Cucurbitacin I Attenuates Cardiomyocyte Hypertrophy via Inhibition of Connective Tissue Growth Factor (CCN2) and TGF- $\beta$ /Smads Signalings // *PLoS One.* – 2015. – Vol. 10, №8. – P. 456-472.
- 197 Caja F., Vannucci L. TGF $\beta$ : A player on multiple fronts in the tumor microenvironment // *J Immunotoxicol.* – 2015. – Vol. 12, №3. – P. 300-307.
- 198 Li Ming O., Flavell Richard A. TGF- $\beta$ : A Master of All T Cell Trades // *Cell.* -2008. - Vol. 134, №3. – P. 392-404.

- 199 Annes J.P., Munger J.S., Rifkin D.B. Making sense of latent TGF-beta activation // *J. Cell. Sci.* – 2003. – Vol. 116, Pt. 2. – P. 217-224.
- 200 Wipff P.J., Hinz B. Integrins and the activation of latent transforming growth factor beta1 – an intimate relationship // *Eur. J. Cell Biol.* – 2008. – Vol. 87, №8-9. – P. 601-615.
- 201 Derynck R. et al. Smad-dependent and Smad-independent pathways in TGF- $\beta$  family signaling // *Nature.* – 2003. – Vol. 425, №6958. – P. 577-584.
- 202 Rodríguez-Gómez I.M., Barranco I., Amarilla S.P. et al. Activation of extrinsic- and Daxx-mediated pathways in lymphoid tissue of PRRSV-infected pigs // *Vet Microbiol.* – 2014. – Vol. 172, №1-2. – P. 186-194.
- 203 Nouël A., Pochard P., Simon Q. et al. B-Cells induce regulatory T cells through TGF- $\beta$ /IDO production in a CTLA-4 dependent manner // *J Autoimmun.* – 2015. – Vol. 59. – P. 53-60.
- 204 Wahl S.M. Transforming growth factor- $\beta$ : innately bipolar // *Current Opinion in Immunology.* – 2007. – Vol. 19, №1. – P. 55-62.
- 205 Zhu J. T helper 2 (Th2) cell differentiation, type 2 innate lymphoid cell (ILC2) development and regulation of interleukin-4 (IL-4) and IL-13 production // *Cytokine.* – 2015. – Vol. 75, №1. – P. 14-24.
- 206 Paul W.E. History of interleukin-4 // *Cytokine.* – 2015. – Vol. 75, №1. – P. 3-7.
- 207 Kolaczowska E., Kubes P. Neutrophil recruitment and function in health and inflammation // *Nat Rev Immunol.* – 2013. – Vol. 13. – P. 159-175.
- 208 Jhunjhunwala S., Aresta-DaSilva S., Tang K. et al. Neutrophil Responses to Sterile Implant Materials // *PLoS One.* – 2015. – Vol. 10, №9. – P. 90-96.
- 209 Нестерова И.В., Колесникова Н.В. Чудилова Г.А. и др. Нейтрофильные гранулоциты: новый взгляд на «старых игроков» на иммунологическом поле // *Иммунология.* – 2015. – №4. – С. 257-265.
- 210 Kobayashi Y. Neutrophil biology: an update // *EXCLI J.* – 2015. – Vol. 14. – P. 220-227.
- 211 Van Gisbergen K.P.J.M., Ludwig I.S., Geijtenbeck T.B.H. Interactions of DC-SIGN with Mac-1 and CEACAM 1 regulate contact between dendritic cells and neutrophils // *FEBS letters.* – 2005. – Vol. 579. – P. 6159-6168.
- 212 Odobasic D., Kitching A.P., Yang Y. et al. Neutrophil myeloperoxidase regulates T-cell driven tissue inflammation in mice by inhibiting dendritic cell function // *Blood.* – 2013. – Vol. 121, №20. – P. 4195-4204.
- 213 Puga I., Cols M., Barra C.M. B-helper neutrophils stimulate immunoglobulin diversification and production in the marginal zone of the spleen // *Nat Immunol.* – 2012. – Vol. 13, №2. – P. 170-180.
- 214 Беляева А.С. и др. Нейтрофильные гранулоциты как регуляторы иммунитета // *Иммунология.* – 2016. – №2. – С. 129-133.
- 215 Takashima A., Yao Y. Neutrophil plasticity: acquisition of phenotype and functionality of antigen-presenting cell // *J Leukoc Biol.* 2015. – Vol. 98, №4. – P. 489-496.



- 216 Abi Abdallah D., Egan C.E., Butcher B.A. Mice neutrophils are professional antigen-presenting cells programmed to instruct Th1 Th17 T-cell differentiation // *Intern. Immunol.* – 2011. – Vol. 23, №5. – P. 317-326.
- 217 González-Amaro R., Marazuela M. T regulatory (T регуляторных клеток) and T helper 17 (Th17) lymphocytes in thyroid autoimmunity // *Endocrine.* – 2016. – Vol. 52, №1. – P. 30-38.
- 218 Grimm M., Feyen O., Hofmann H. et al. Immunophenotyping of patients with oral squamous cell carcinoma in peripheral blood and associated tumor tissue // *Tumour Biol.* – 2016. – Vol. 37. – P. 3807-3816.
- 219 Rioux J.D., Abbas A.K. Paths to understanding the genetic basis of autoimmune disease // *Nature.* – 2005. – Vol. 435, №7042. – P. 584-589.
- 220 Mathis D., Benoist C. Aire // *Annual Review of Immunology.* – 2009. – Vol. 27, №1. – P. 287-312.
- 221 Owen J.A.P., Punt J., Stranford S.A. et al. *Kuby Immunology.* – NY., 2013. – 692 p.
- 222 Anderson G., Jenkinson W.E., Jones T. et al. Establishment and functioning of intrathymic microenvironments // *Immunological Reviews.* – 2006. – Vol. 209. – P. 10-27.
- 223 Itoi M., Kawamoto H., Katsura Y. et al. Two distinct steps of immigration of hematopoietic progenitors into the early thymus anlage // *International Immunology.* – 2001. – Vol. 13. – P. 1203-1211.
- 224 Kyewski B., Derbinski J. Self-representation in the thymus: an extended view // *Nature Reviews Immunology.* – 2004. – Vol. 4, №9. – P. 688-698.
- 225 Shen X., Lee K., König R. Effects of heavy metal ions on resting and antigen-activated CD4+ T cells // *Toxicology.* – 2001. – Vol. 169, №1. – P. 67-80.
- 226 Zumer K. et al. The mechanism of tissue-restricted antigen gene expression by AIRE // *J of Immunology.* – 2013. – Vol. 190, №6. – P. 2479-2482.
- 227 Vijay K. et al. Garg Immunomodulation by Lead // *Immunologic Research.* – 2003. – Vol. 28, №2. – P. 151-165.
- 228 de la Fuente H., Cibrián D., Sánchez-Madrid F. Immunoregulatory molecules are master regulators of inflammation during the immune response // *FEBS Letters.* – 2012. – Vol. 586, №18. – P. 2897-2905.
- 229 Carrio R., Lopez D.M. Insights into thymic involution in tumor-bearing mice // *Immunologic Research.* – 2013. – Vol. 57, №1-3. – P. 106-114.
- 230 Yu Y., Ceredig R., Seoighe C. LymAnalyzer: a tool for comprehensive analysis of next generation sequencing data of T cell receptors and immunoglobulins // *Nucleic Acids Res.* – 2015. – Vol. 44, №4. – P. 1-10.
- 231 Wu C., Li Z., Fu X. et al. Antigen-specific human NKT cells from tuberculosis patients produce IL-21 to help B cells for the production of immunoglobulins // *Oncotarget.* – 2015. – Vol. 6, №30. – P. 764-782.
- 232 Munang'andu H.M. et al. A Review of the Immunological Mechanisms Following Mucosal Vaccination of Finfish // *Front Immunol.* – 2015. – Vol. 6. – P. 427-1-427-11.
- 233 Vivier E., Raulet D.H., Moretta A. et al. Innate or adaptive immunity? The example of natural killer cells // *Science.* – 2011. – Vol. 331, №6013. – P. 44-49.

- 234 Montaldo E., Del Zotto G., Della Chiesa M. et al. Human NK cell receptors/markers: a tool to analyze NK cell development, subsets and function // *Cytometry A*. – 2013. – Vol. 83, №8. – P. 702-713.
- 235 Kerdiles Y., Ugolini S., Vivier E. T cell regulation of natural killer cells // *J Exp Med*. – 2013. – Vol. 210, №6. – P. 810-888.
- 236 Reikvam H., Brenner A.K., Hagen K.M. et al. The cytokine-mediated crosstalk between primary human acute myeloid cells and mesenchymal stem cells alters the local cytokine network and the global gene expression profile of the mesenchymal cells // *Stem Cell Res*. – 2015. – Vol. 15, №3. – P. 530-541.
- 237 Pillet S. et al. Immunomodulatory effects of estradiol and cadmium in adult female rats // *Toxicol Sci*. – 2006. – Vol. 92, №2. – P. 423-432.
- 238 Miller A.C. et al. Effect of the militarily-relevant heavy metals, depleted uranium and heavy metal tungsten-alloy on gene expression in human liver carcinoma cells (HepG2) // *Mol Cell Biochem*. – 2004. – Vol. 255. – P. 247-256.
- 239 Anunciación L. et al. Differential effects of cadmium on blood lymphocyte subsets // *BioMetals*. – 2004. – Vol. 17, №4. – P. 451-456.
- 240 Ohsawa M. Heavy metal-induced immunotoxicity and its mechanisms // *Article in Japanese Yakugaku Zasshi*. – 2009. – Vol. 129, №3. – P. 305-319.
- 241 Lafuente A., Gonzalez-Carracedo A., Romero A. et al. Effect of cadmium on lymphocyte subsets distribution in thymus and spleen // *J. Physiol. Biochem*. – 2003. – Vol. 59, №1. – P. 43-48.
- 242 Fujimaki H., Ishido M., Nohara K. Induction of apoptosis in mouse thymocytes by cadmium // *Toxicol Lett*. – 2000. – Vol. 115, №2. – P. 99-105.
- 243 Brahmkar M.G. et al. Effects of Lead acetate toxicity on blood indices in male Wistar Rat // *Indian J Environ Toxicol*. – 2011. – Vol. 19. – P. 35-37.
- 244 Kim M.G., Ryoo J.H., Chang S.J. et al. Blood Lead Levels and Cause-Specific Mortality of Inorganic Lead-Exposed Workers in South Korea // *Journal pone*. – 2015. – Vol. 10, №10. – P. 1371-1383.
- 245 Sinha S., Thaker A.M. Study on the impact of lead acetate pollutant on immunotoxicity produced by thiamethoxam pesticide // *Indian J Pharmacol*. – 2014. – Vol. 46, №6. – P. 596-600.
- 246 Shukla G., Singhal L.K., Singh D.D. et al. Lead induced apoptosis in avian lymphocytes // *J Immunol Immunopathol*. – 2004. – Vol. 6. – P. 106-109.
- 247 Miller T.E. et al. Developmental exposure to lead causes persistent immunotoxicity in Fischer 344 rats // *Toxicol Sci*. – 1998. – Vol. 42, №2. – P. 35-42.
- 248 Dangleben N.L., Skibola C.F., Smith M.T. Arsenic immunotoxicity: a review // *Environ Health*. – 2013. – Vol. 12. – P. 12-73.
- 249 Cheng P.C., Steele C.R., Gu L. et al. MHC class II antigen processing in B cells: accelerated intracellular targeting of antigens // *J. Immunol*. – 1999. – Vol. 162, №12. – P. 7171-7180.
- 250 Tsave O., Petanidis S., Kioseoglou E. et al. Role of Vanadium in Cellular and Molecular Immunology: Association with Immune-Related Inflammation and Pharmacotoxicology Mechanisms // *Oxid. Med. Cell. Longev*. – 2016. – Vol. 2016. – P. e4013639.

- 251 Shrivastava R., Upreti R.K., Seth P.K. et al. Effects of chromium on the immune system // *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* – 2002. – Vol. 34, №1. – P. 1-7.
- 252 Wang J.Y., Tsukayama D.T., Wicklund B.H., Gustilo R.B. Inhibition of T and B cell proliferation by titanium, cobalt, and chromium: Role of IL-2 and IL-6 // *J Biomed Mater Res.* – 1996. – Vol. 32, №4. – P. 655-661.
- 253 Железникова Г.Ф. Регуляторные Т-лимфоциты в иммунном ответе на инфекцию // *Журнал инфектологии.* – 2011. – Т. 3, №1. – С. 6-13.
- 254 Жулай Г.А., Олейник Е.К. Регуляторные Т, Лимфоциты CD4+CD25+FOXP3+. Перспективы применения в иммунотерапии // *Тр. Карельского научного центра РАН.* – 2012. – №2. – С. 3-17.
- 255 Трошина Е.А., Сеньюшкина Е.С. Вклад центральных регуляторов иммунного ответа в развитие заболеваний щитовидной железы // *Проблемы эндокринологии.* – 2019. – Т. 65, №6. – С. 458-465.
- 256 Торгашина А.В., Соловьев С.К. Особенности Т-регуляторных клеток у больных системной красной волчанкой // *Современная ревматология.* – 2018. – №12(4). – С. 9-15.
- 257 Setoguchi R., Hori S., Takahashi T. et al. Homeostatic maintenance of natural Foxp3+CD25+CD4+ regulatory T cells by interleukin (IL)-2 and induction of autoimmune disease by IL-2 neutralization // *J Exp Med.* – 2005. – Vol. 201, №5. – P. 723-735.
- 258 Shevryev D., Tereshchenko V. Treg Heterogeneity, Function, and Homeostasis // *Front Immunol.* – 2019. – Vol. 10. – P. 3100-1-300-13.
- 259 Корсунский И.А. и др. Роль регуляторных Т-клеток CD4+CD25+ и мезенхимальных стволовых клеток костного мозга в подавлении реакции трансплантат против хозяина // *Онкогематология.* – 2008. – №3. – С. 45-51.
- 260 Jiang S., Lechler R.I., He X.S. et al. Regulatory T cells and transplantation tolerance // *Hum Immunol.* – 2006. – Vol. 67, №10. – P. 765-776.
- 261 Остапчук Е.О., Мухатаев Ж.Е., Перфильева Ю.В. Фенотипический анализ Т-регуляторных клеток периферической крови больных витилиго // *Experimental Biology.* – 2020. – Vol. 2, №2. – С. 84-91.
- 262 Xu Z., Jiang X., Dai X. et al. The Dynamic Role of FOXP3+ T регуляторных клеток and Their Potential Therapeutic Applications During SARS-CoV-2 Infection // *Front. Immunol.* – 2022. – Vol. 13. – P. 916411-1-916411-12.
- 263 Borsellino G., Kleinewietfeld M. et al. Expression of Ectonucleotidase Cd39 by Foxp3+ T регуляторных клеток Cells: Hydrolysis of Extracellular Atp and Immune Suppression // *Blood.* – 2007. – Vol. 110, №4. – P. 1225-1232.
- 264 Deaglio S., Dwyer K.M., Gao W. et al. Adenosine Generation Catalyzed by Cd39 and Cd73 Expressed on Regulatory T Cells Mediates Immune Suppression // *J Exp Med.* – 2007. – Vol. 204, №6. – P. 1257-1265.
- 265 Zarek P.E., Huang C.T., Lutz E.R. et al. A2a Receptor Signaling Promotes Peripheral Tolerance by Inducing T-Cell Anergy and the Generation of Adaptive Regulatory T Cells // *Blood.* – 2008. – Vol. 111, №1. – P. 251-259.
- 266 Misra N., Bayry J. et al. Cutting Edge: Human Cd4+Cd25+ T Cells Restrain the Maturation and Antigen-Presenting Function of Dendritic Cells // *J Immunol.* – 2004. – Vol. 172, №8. – P. 4676-4680.

- 267 Qureshi O.S., Zheng Y., Nakamura K. et al. Trans-Endocytosis of Cd80 and Cd86: A Molecular Basis for the Cell-Extrinsic Function of Ctla-4 // *Science*. – 2011. – Vol. 332, №6029. – P. 600-603.
- 268 Fallarino F. et al. Modulation of Tryptophan Catabolism by Regulatory T Cells // *Nat Immunol*. – 2003. – Vol. 4, №12. – P. 1206-1212.
- 269 Yan Z. et al. Cells Interfere With Glutathione Metabolism in Dendritic Cells and T Cells // *J Biol Chem*. – 2010. – Vol. 285, №53. – P. 41525-41532.
- 270 Liang B., Workman C., Lee J. et al. Regulatory T Cells Inhibit Dendritic Cells by Lymphocyte Activation Gene-3 Engagement of Mhc Class Ii // *J Immuno*. – 2008. – Vol. 180, №9. – P. 5916-5926.
- 271 Cao X., Cai S.F., Fehniger T.A. et al. Granzyme B and Perforin Are Important for Regulatory T Cell-Mediated Suppression of Tumor Clearance // *Immunity*. – 2007. – Vol. 27, №4. – P. 635-646.
- 272 Gotot J., Gottschalk C., Leopold S. et al. Regulatory T Cells Use Programmed Death 1 Ligands to Directly Suppress Autoreactive B Cells in Vivo // *Proc Natl Acad Sci U S A*. – 2012. – Vol. 109, №26. – P. 10468-10473.
- 273 Kalra R., Singh S.P. et al. Immunosuppressive and Anti-Inflammatory Effects of Nicotine Administered by Patch in an Animal Model // *Clin Diagn Lab Immunol*. – 2004. – Vol. 11, №3. – P. 563-568.
- 274 Клаг У.С., Каммингс М.Р., Спенсер Ш.А. и др. Основы генетики / пер. с англ. – М., 2016. – 944 с.
- 275 Dobin A. et al. STAR: ultrafast universal RNA-seq aligner // *Bioinformatics*. – 2013. – Vol. 29, №1. – P. 15-21.
- 276 Li B., Dewey C.N. RSEM: accurate transcript quantification from RNA-Seq data with or without a reference genome // *BMC Bioinformatics*. – 2011. – Vol. 12. – P. 323-1-323-16.
- 277 Robinson J.T., Thorvaldsdóttir H., Winckler W. Integrative genomics viewer // *Nature Biotechnology*. – 2011. – Vol. 29. – P. 24-26.
- 278 Love M.I. et al. Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2 // *Gen. Biology*. – 2014. – Vol. 15. – P. 550-1-550-21.
- 279 Subramaniana A., Tamayo P., Mootha V.K. Gene set enrichment analysis: A knowledge-based approach for interpreting genome-wide expression profiles // *Current Issue*. – 2005. – Vol. 102, №43. – P. 15545-15550.
- 280 Lesur I., Textoris J., Loriod B. et al. Gene Expression Profiles Characterize Inflammation Stages in the Acute Lung Injury in Mice // *PLoS One*. – 2010. – Vol. 5, №7. – P. e11485.
- 281 Calvano S.E., Xiao W., Richards D.R. et al. A network-based analysis of systemic inflammation in humans // *Nature*. – 2005. – Vol. 437. – P. 1032-1037.
- 282 Bone R.C., Grodzin C.J., Balk R.A. Sepsis: a new hypothesis for pathogenesis of the disease process // *Chest*. – 1997. – Vol. 112. – P. 235-243.
- 283 Nefedova Y. et al. Activation of dendritic cells via inhibition of Jak2/STAT3 signaling // *J Immunol*. – 2005. – Vol. 175. – P. 4338-4346.
- 284 Lee H, et al. Persistently activated Stat3 maintains constitutive NF-kappaB activity in tumors // *Cancer Cell*. – 2009. – Vol. 15. – P. 283-293.

285 Токушева А.Н., Балабекова М.К., Мырзагулова С.Е. и др. Реакция периферической крови крыс в ответ на воспаление, вызванное на фоне интоксикации соединениями ванадия и хрома (эксперимент) // <https://science-education.ru/ru/article/view?id=23769&ysclid=m10kwfryei242831790>. 02.05.2023.

286 Балабекова М.К., Рыспекова Н.Н., Токушева А.Н. и др. Динамика течения воспаления, вызванного на фоне металлиндуцированной иммунодепрессии // <https://science-education.ru/ru/article/view?id=>. 02.05.2023.

287 Hu L., Su P., Li R. et al. Isoforms, structures, and functions of versatile spectraplakин MACF1 // *BMB Rep.* – 2016. – Vol. 49, №1. – P. 37-44.

288 Ray R.R. Adverse hematological effects of hexavalent chromium: an overview // *Interdiscip Toxicol.* – 2016. – Vol. 9, №2. – P. 55-65.

289 Chousterman B.G., Swirski F.K., Weber G.F. Cytokine storm and sepsis disease pathogenesis // *Semin Immunopathol.* – 2017. – Vol. 39. – P. 517-528.

290 Turner M.D., Nedjai B., Hurst T. et al. Cytokines and chemokines: At the crossroads of cell signalling and inflammatory disease // *Biochim Biophys Acta.* – 2014. – Vol. 1843. – P. 2563-2582.

291 Arvey A. et al. Genetic and epigenetic variation in the lineage specification of regulatory T cells // *Elife.* – 2015. – Vol. 4. – P. e07571.

292 Кашенко С.А., Ерохина В.В., Гончарова М.В. и др. Анализ основных иммунологических показателей у крыс различных видов // *Світ медицини та біології.* – 2012. – №4. – С. 136-138.

293 Lim H.W. et al. Cutting edge: direct suppression of B cells by CD4+CD25+ regulatory T cells // *J Imm.* – 2005. – Vol. 175, №7. – P. 4180-4183.

294 Kurosaki T., Shinohara H., Baba Y. B cell signaling and fate decision // *Annual Review of Immunology.* – 2010. – Vol. 28. – P. 21-55.

295 Ramsdell F, Ziegler SF. FOXP3 and scurfy: how it all began // *Nat Rev Immunol.* – 2014. – Vol. 14, №5. – P. 343-349.

296 Lucy S.K. Walker. T регуляторных клеток and CTLA-4: Two intertwining pathways to immune tolerance // *Journal of Autoimmunity.* – 2013. – Vol. 45. – P. 49-57.

297 Cho B.A., Iyengar N.M., Zhou X.K. et al. Blood biomarkers reflect the effects of obesity and inflammation on the human breast transcriptome // *Carcinogenesis.* – 2021. – Vol. 42, №10. – P. 1281-1292.

298 Xing C., Yang F., Lin Y. et al. Hexavalent Chromium Exposure Induces Intestinal Barrier Damage via Activation of the NF-κB Signaling Pathway and NLRP3 Inflammasome in Ducks // *Front Immunol.* – 2022. – Vol. 13. – P. 952639.

299 Balali-Mood M., Naseri K., Tahergorabi Z. et al. Toxic Mechanisms of Five Heavy Metals: Mercury, Lead, Chromium, Cadmium, and Arsenic // *Front Pharmacol.* – 2021. – Vol. 12. – P. 643972.

300 Aalami A.H., Hoseinzadeh M. et al. Carcinogenic effects of heavy metals by inducing dysregulation of microRNAs: A review // *Mol Biol Rep.* – 2022. – Vol. 49, №12. – P. 12227-12238.

301 Rahman Z., Singh V.P. The relative impact of toxic heavy metals (THMs) (arsenic (As), cadmium (Cd), chromium (Cr)(VI), mercury (Hg), and lead (Pb)) on the total environment: an overview // *Env. Monit Ass.* – 2019. – Vol. 191. – P. 419.

- 302 Chappell G.A., Wikoff D.S., Thompson C.M. Assessment of Mechanistic Data for Hexavalent Chromium-Induced Rodent Intestinal Cancer Using the Key Characteristics of Carcinogens // *Toxicol Sci.* – 2021. – Vol. 180, №1. – P. 38-50.
- 303 Rouadi P.W., Idriss S.A., Naclerio R.M. et al. Immunopathological features of air pollution and its impact on inflammatory airway diseases (IAD) // *World Allergy Organ J.* – 2020. – Vol. 13, №10. – P. 100467.
- 304 Santoro M.G. Heat shock factors and the control of the stress response // *Biochemical pharmacology.* – 2000. – Vol. 59, №1. – P. 55-63.
- 305 Ye S. et al. Cunningham et al. CD4 + Foxp3 + T-regulatory cells in noninfectious uveitis // *Arch Ophthalmol.* – 2009. – Vol. 127, №4. – P. 407-413.
- 306 Xu Z., Jiang X., Dai X. et al. The Dynamic Role of FOXP3+ Tregs and Their Potential Therapeutic Applications During SARS-CoV-2 Infection // *Front Immunol.* – 2022. – Vol. 13. – P. 916411.
- 307 Zoubeidi A., Ettinger S., Beraldi E. et al. Clusterin facilitates COMMD1 and I- $\kappa$ B degradation to enhance NF- $\kappa$ B activity in prostate cancer cells // *Mol Cancer Res.* – 2010. – Vol. 8, №1. – P. 119-130.
- 308 Loison F., Debure L., Nizard P. et al. Up-regulation of the clusterin gene after proteotoxic stress: implication of HSF1-HSF2 heterocomplexes // *Biochem J.* – 2006. – Vol. 395, №1. – P. 223-231.
- 309 Zhang Y., Lv X., Chen L. et al. The role and function of CLU in cancer biology and therapy // *Clin Exp Med.* – 2023. – Vol. 23, №5. – P. 1375-1391.
- 310 Cheng P.C. et al. MHC class II antigen processing in B cells: accelerated intracellular targeting of antigens // *J. Immunol.* – 1999. – Vol. 162. – P. 7171-7180.
- 311 Cheng A.M. et al. Syk tyrosine kinase required for mouse viability and B-cell development // *Nature.* – 1995. – Vol. 378, №6554. – P. 303-306.
- 312 Wang L., Aschenbrenner D., Zeng Z. et al. Gain-of-function variants in SYK cause immune dysregulation and systemic inflammation in humans and mice // *Nat Genet.* – 2021. – Vol. 53, №4. – P. 500-510.
- 313 Shrivastava R., Upreti R.K., Seth P.K. et al. Effects of chromium on the immune system // *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* – 2002. – Vol. 34, №1. – P. 1-7.
- 314 Kulathu Y., Grothe G., Reth M. Autoinhibition and adapter function of Syk // *Immunol Rev.* – 2009. – Vol. 232, №1. – P. 286-299.
- 315 Zwolak I. Vanadium carcinogenic, immunotoxic and neurotoxic effects: a review of in vitro studies // *Toxicol. Mechan. and Met.* – 2014. – Vol. 24. – P. 1-12.
- 316 Valko M., Morris H., Cronin M.T.D. Metals, toxicity and oxidative stress // *Current Medicinal Chemistry.* – 2005. – Vol. 12, №10. – P. 1161-1208.
- 317 Tchounwou P.B., Yedjou C.G., Patlolla A.K. et al. Heavy metal toxicity and the environment // *Exp Suppl.* – 2012. – Vol. 101. – P. 133-164.
- 318 Carver B.J., Plosa E.J., Stinnett A.M. et al. Interactions between NF- $\kappa$ B and SP3 Connect Inflammatory Signaling with Reduced FGF-10 Expression // *J Biol Chem.* – 2013. – Vol. 288, №21. – P. 15318-15325.
- 319 Пинегин Б.В., Некрасов А.В., Хаитов Р.М. Иммуномодулятор полиоксидоний: механизмы действия и аспекты клинического применения // *Цитокины и воспаление.* – 2004. – №3. – С. 21-27.

# ПРИЛОЖЕНИЕ А

## Патент



(19) **МИНИСТЕРСТВО ЮСТИЦИИ РЕСПУБЛИКИ КАЗАХСТАН**

## ПАТЕНТ

(11) **№ 3006**

(12) **НА ПОЛЕЗНУЮ МОДЕЛЬ**

(54) **НАЗВАНИЕ:** Способ прогнозирования хронизации воспалительного процесса в условиях интоксикации солями ванадия и хрома

(73) **ПАТЕНТООБЛАДАТЕЛЬ:** 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 Наталия Николаевна (KZ); Мырзагулова Сыреулу Ермуқанбетовна (KZ); Жукешева Майя Канатовна (KZ); Токушева Алия Нурлановна (KZ); Трубачев 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.

Вице-министр юстиции  
Республики Казахстан

Handwritten signature of N. Pan in blue ink.

Н. Пан

Сведения о внесении изменений приводятся на отдельном листе в виде приложения к настоящему патенту