

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

УДК 616-002:549.2

На правах рукописи

КАЙРАНБАЕВА ГУЛЬГУЛЬ КАЙРАНБАЕВНА

**Металлиндуцированные нарушения регуляции воспалительного
процесса в эксперименте и пути их патогенетической коррекции**

6D110100 – МЕДИЦИНА

Диссертация на соискание степени
доктора философии (PhD)

Научный консультант:
д.м.н., Балабекова Марина Казыбаевна
Зарубежный научный консультант:
PhD, Professor, Edgaras Stankevicius

Республика Казахстан
Алматы, 2024

СОДЕРЖАНИЕ

ОБОЗНАЧЕНИЯ И СОКРАЩЕНИЯ	4
ВВЕДЕНИЕ	6
1 ОСНОВНАЯ ЧАСТЬ	13
1.1. Токсическое действие экотоксикантов на организм вследствие антропогенного загрязнения окружающей среды	13
1.2. Распознавание регуляторных Т-клеток как клеточного механизма иммунной толерантности	18
1.3. О миелоидно-супрессорных клетках	23
1.4. Достижения в поисках новых методов коррекции воспалительных процессов в эксперименте	27
2 МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ	30
2.1. Объект исследования	30
2.2. Условия и характер проведения экспериментов	30
2.3. Дизайн эксперимента	31
2.4. Определение острой токсичности Комплекса	33
2.5. Лабораторные методы	39
2.5.1 Иммунологические исследования	39
2.5.2 Гематологические исследования	42
2.5.3 Микроскопические исследования	42
2.6. Статистическая обработка результатов исследования	43
3 РЕЗУЛЬТАТЫ СОБСТВЕННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ	44
3.1 Экспериментальное изучение лимфоорганов ткани воспаления опытных крыс с экспериментальным воспалением	44
3.2 Экспериментальное изучение показателей периферической крови у крыс с экспериментальным воспалением, предварительно затравленных солями кадмия и свинца	51
3.3 Экспериментальное изучение показателей сывороточных цитокинов у крыс с экспериментальным воспалением, предварительно затравленных солями кадмия и свинца	54
3.4 Экспериментальное изучение показателей селезеночных субпопуляций лимфоцитов у крыс с экспериментальным воспалением, предварительно затравленных солями кадмия и свинца	57
3.5 Экспериментальное изучение лимфоорганов ткани воспаления опытных крыс с экспериментальным воспалением, предварительно затравленных солями кадмия и свинца, после коррекции Комплексом	65
3.6 Экспериментальное изучение показателей периферической крови у крыс с экспериментальным воспалением, предварительно затравленных солями кадмия и свинца, после коррекции Комплексом	72

3.7.	Экспериментальное изучение показателей сывороточных цитокинов у крыс с экспериментальным воспалением, предварительно затравленных солями кадмия и свинца, после коррекции Комплексом свинца, после коррекции Комплексом.....	78
3.8	Экспериментальное изучение показателей селезеночных субпопуляций лимфоцитов у крыс с экспериментальным воспалением, предварительно затравленных солями кадмия и свинца, после коррекции Комплексом.....	81
3.9	Применение метода дискриминантного анализа для математического моделирования данных.....	89
	ЗАКЛЮЧЕНИЕ.....	96
	ВЫВОДЫ.....	101
	СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ.....	104
	ПРИЛОЖЕНИЕ А.....	118
	ПРИЛОЖЕНИЕ Б.....	119

ОБОЗНАЧЕНИЯ И СОКРАЩЕНИЯ

eTreg	– эффекторные Т-регуляторные клетки
iTreg	– индуцированные Т-регуляторные клетки
nTreg	– натуральные Т-регуляторные клетки
BCR	– В-клеточный рецептор (B cell receptor)
CD	– кластер дифференцировки (Cluster of differentiation)
CTL	– цитотоксическая Т-клетка (Cytotoxic T lymphocyte)
CTLA-4	– цитотоксический Т-лимфоцит-ассоциированный белок 4 (Cytotoxic T-Lymphocyte Associated Protein 4)
FoxP3	– транскрипционный фактор развития и функционирования регуляторных Т-клеток
HCT	– гематокрит
HGB	– гемоглобин
IFNg	– интерферон гамма
Ig	– иммуноглобулин
Ig A	– иммуноглобулин А
Ig E	– иммуноглобулин Е
Ig G	– иммуноглобулин G
Ig M	– иммуноглобулин М
IL-10	– интерлейкин-10
IL-4	– интерлейкин-4
IL-6	– интерлейкин-6
MDSC	– миелоидные супрессорные клетки
MHC	– Главный комплекс гистосовместимости
MMP	– Матриксная металлопротеиназа 1
NK	натуральная киллерная клетка (Natural killer cell)
Pb	– Свинец
pH	– Водородный показатель
PBS	– фосфатно-солевой буферный раствор
PD-1	– рецептор программируемой клеточной гибели 1
PD-L1	– лиганд рецептора программируемой клеточной гибели 1
PGE2	– простагландин E2
PLT	– общее число тромбоцитов
RBC	– общее число эритроцитов
RDW-CV	– ширина распределения эритроцитов по объему
Th	– Т-хелпер (T helper cell)
Treg	– Т-регуляторная клетка (T regulatory cell)
TCR	– Т-клеточный рецептор
TGF- β	– трансформирующий ростовой фактор бета

TNF	фактор некроза опухоли (Tumor necrosis factor)
WBC	– общее число лейкоцитов
AB	– асептическое воспаление
АПК	– антиген-представляющие клетки
АФК	– активные формы кислорода
АДФ	– Аденозиндифосфат
АМФ	– Аденозинмонофосфат
АС	Ацетат свинца
АТФ	– Аденозинтрифосфат
ДИ	– доверительный интервал
ДНК	– дезоксирибонуклеиновая кислота
КазНМУ	– Казахский Национальный медицинский университет
ЛПС	– Липополисахарид
ЛФ	– лимфоциты
ЛЭК	– локальная этическая комиссия
мкМ	– микрометр
МХФ 20	– биологически активное соединение
Me	– Металлы
НФ	– нейтрофилы
ИЛ-1	– интерлейкин-1
ИЛ-1 β	– интерлейкин-1 бета
ИЛ-2	– интерлейкин-2
ИЛ-6	– интерлейкин-6
ИЛ-10	– интерлейкин-10
ИФА	– Иммуноферментный анализ
КЖ	– Контрольные животные
АО	– акционерное общество
ПО	– полиоксидоний
ПЦР	– Полимеразная цепная реакция
РК	– Республика Казахстан
РНК	– Рибонуклеиновая кислота
РФ	– Российская Федерация
СЖК	– свободные жирные кислоты
СО	– среднее значение
ФНО	– фактор некроза опухоли
ЦОК2	– циклооксигеназы-2
ХК	– Хлорид кадмия
Э	– эозинофилы
ЭПО	– эритропоэтин

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность. Люди подвергаются воздействию комбинаций химических веществ, а не отдельных веществ (Andjelkovic M., et al., 2019). Европейская комиссия подчеркнула значимость оценки так называемых «эффектов коктейля», указав, что длительное воздействие даже небольших доз сложных сочетаний загрязнителей может существенно повлиять на здоровье жителей Европы (Брюссель, Бельгия, 2003). Совместное действие кадмия и свинца может привести к синергетическим, антагонистическим, аддитивным или новым эффектам, которые не наблюдаются при воздействии только одного из этих металлов (Matović V., et al., 2015; Wang G., Fowler B.A., 2015). Кадмий и свинец – широко распространенные, не поддающиеся разложению загрязнители, представляющие серьёзную угрозу для здоровья человека. Хотя оба металла присутствуют в природе, их концентрация в окружающей среде резко возросла из-за промышленного развития (Нуркеева Б. А., Адамбекова А. А., 2022; Васильянова Л. С., 2018, часть 1, 2). Ключевыми источниками выбросов кадмия и свинца являются отрасли, связанные с выплавкой, добычей, производством батарей, пигментов и керамики. Повышение уровня этих металлов в окружающей среде и их стойкость увеличивают риск воздействия на человека. ВОЗ включила кадмий и свинец в список 10 наиболее опасных химических веществ для здоровья человека (WHO, 2018; ATSDR, 2018). В патогенезе воспалительных заболеваний с высоким риском возникновения чаще рассматривают патологию иммунной системы. При этом токсическое воздействие на функцию иммунной системы посредством индукции перекисного окисления липидов мембран могут оказывать тяжелые металлы, в том числе свинец и кадмий (Ahamed M., Siddiqui M.K., 2007).

Воспаление, вызванное повреждением, представляет собой совокупность взаимодействия множества клеток и молекулярных событий, направленную на восстановление гомеостаза (Ibrahim IBM, Pidaparti R., 2019). На течение воспаления влияет множество факторов, поэтому важно уметь выявлять основные из них для глубокого понимания механизмов развития воспалительного процесса. Как известно, в восстановлении гомеостаза поврежденных тканей участвуют врожденная и адаптивная иммунные системы (Wu K.Y., 2024). Воспаление, будь оно острым или хроническим, локализованным или системным, играет важную роль в процессе дифференциации и развития Т-лимфоцитов (Moro-García M.A., et al., 2018). В ходе течения воспаления фенотип этих лимфоцитов может меняться от эффекторного (CD4+, Th) до регуляторного (Трег). Клетки Т-хелперов известны тем, что производят различные провоспалительные цитокины и хемокины через активацию сигнального пути NF-κB (Zhao, H., Wu, L., Yan, G. et al. 2021). Это привлекает лимфоциты и лейкоциты к очагу воспаления, где иммунные клетки продолжают экспрессировать и выделять дополнительные хемокины и цитокины, усиливая воспаление в ответ на вирусные инфекции. Воспалительное

микроокружение значительно влияет на процесс дифференциации наивных Т-лимфоцитов, вплоть до состояния их истощения или гибели. Изменения, происходящие при дифференциации лимфоцитов, связаны с изменениями клеточного метаболизма. Как известно, окислительный стресс является основным механизмом токсичности тяжелых металлов, тогда как высокие уровни активных форм кислорода снижают способность Т-лимфоцитов к активации и пролиферации.

Как известно, Треги играют существенную роль в подавлении воспалительных реакций на завершающих этапах воспаления (Gootjes, С.; Zwaginga, J.J.; Roer, В.О. 2024). Треги подавляют активацию клеток врожденной и адаптивной иммунной системы, включая Т-клетки, В-клетки, НК-клетки, ДК и макрофаги, а также гранулоциты (Sharma R., Kinsey G.R., 2018).

Treg-клетки (регуляторные Т-лимфоциты) играют важную роль в поддержании иммунного гомеостаза, подавляя иммунный ответ и предотвращая его избыточную или неадекватную активацию. Любой ответ иммунной системы на патоген сопровождается активацией различных ее компонентов. В случае ее чрезмерности Трег-клетки регулируют взаимодействие врожденного и адаптивного звеньев иммунитета путем подавления (Shevach E.M., 2019).

В тимусе происходит созревание нулевых Т-лимфоцитов. Путем прохождения двойной селекции на антигены собственных тканей они расселяются в периферических лимфоорганах. Дифференцированные в тимусе натуральные Т-лимфоциты впоследствии распознаются по фенотипу CD4+CD25+ и CD4+Foxp3+. Они приобретают регуляторные свойства благодаря индукции ответа иммунной системы. Их обнаруживают во всех органах иммуногенеза, а также и в крови. Иммуносупрессивные функции для Трег-клеток придают особые молекулы - CTLA-4. Увеличение экспрессии CTLA-4 способствует лучшему взаимодействию Трег с воспалительным микроокружением и участвующими компонентами иммунной системы. Благодаря повышению экспрессии CTLA-4 активность эффекторных лимфоцитов снижается, соответственно снижается и воспалительная реакция (Turley A.E., Zagorski J.W., Kennedy R.C. и др., 2019; Sakaguchi S., Yamaguchi T., Nomura T., Ono M., 2015). Однако накопление Трег-клеток в опухолевом микроокружении может оказывать негативное влияние на иммунный ответ против раковых клеток. В опухолевой ткани Трег-клетки подавляют антиопухолевый иммунитет и способствуют росту и метастазированию опухоли (Zou W., 2019). В то же время недостаток Трег-клеток может привести к возникновению аутоиммунных заболеваний, так как без должного контроля может возникнуть чрезмерный иммунный ответ, направленный против собственных тканей организма. В литературе приводят пример, при котором экспериментальных мышей лишают Трег-клеток. Последствия, развившиеся в ответ на это, вызвали гиперактивность иммунного ответа. Она проявилась развитием воспаления кишечника. Причем иммунная система проявила нетерпимость к бактериям, относящимся нормальной микрофлоре. Это также может привести к другим иммунным расстройствам, таким как воспалительные

заболевания суставов или кожи (Singh B., Read S., Asseman C. и др., 2021). Таким образом, Трег-клетки играют ключевую роль в регуляции иммунных ответов, поддержании толерантности и защите от избыточных воспалительных реакций. Исследование механизмов их функционирования и роли в различных заболеваниях продолжает оставаться важным направлением в иммунологии.

Между тем, возможное влияние на их раннюю активацию солей кадмия и свинца остается не изученной. В связи с этим, в диссертационной работе была изучена функциональная активность иммуносупрессорных субпопуляций (Трег) при (асептическом) воспалении, вызванном после двухнедельной пероральной интоксикации кадмием и свинцом. Согласно литературным сведениям, определенный успех в изучении нарушений в организме, вызванных различными токсикантами, достигнут. Продолжается изучение сложных взаимодействий различных компонентов иммунной системы, участвующих в механизмах регуляции воспаления. При этом роль кадмия и свинца в модуляции иммунного ответа с участием Трег-клеток не изучена. Понимание механизмов регуляции воспаления необходимо для возможного предотвращения неблагоприятных исходов воспалительных процессов.

Становится очевидным, что изучением роли Трег в механизмах регуляции асептического воспаления у опытных крыс наши исследования не завершатся. Станет необходимым поиск новых путей коррекции.

Цель настоящего исследования: изучить роль иммунных клеток, обладающих регуляторными и супрессорными функциями, в механизмах развития воспалительного процесса при металлиндуцированной иммунодепрессии для поиска возможных путей патогенетической коррекции с помощью производных пиперазина.

Задачи исследования:

1. Провести микроскопическое исследование тимуса, брыжеечных лимфоузлов, очага воспаления на коже экспериментальных крыс с асептическим воспалением, предварительно затравленных кадмием и свинцом.

2. Изучить динамику изменений основных гематологических и иммунологических показателей, ассоциированных с возможными ключевыми механизмами регуляции воспаления, вызванного на фоне двухнедельной интоксикации солями кадмия и свинца.

3. Провести экспериментальную оценку регенеративного потенциала Комплекса по характеру изменений иммуноморфологических реакций в органах иммуногенеза опытных крыс.

4. Оценить гематологические показатели и фенотипический профиль селезеночных субпопуляций у опытных крыс с асептическим воспалением после коррекции Комплексом.

5. Установить ключевые изменения исследованных параметров под влиянием Комплекса и полиоксидония методом дискриминантного анализа.

Научная новизна работы.

Проведенная комплексная оценка, включавшая микроскопические исследования центральных и периферических органов иммуногенеза и очага воспаления, исследование клеточных и гуморальных компонентов иммунитета в селезенке и периферической крови у экспериментальных животных, подвергавшихся двухнедельной интоксикации кадмием и свинцом, расширила современное представление о том, что нарушение течения воспалительного процесса формируется многообразным комплексом взаимообусловленных патологических механизмов. Установлено, что среди изученных показателей, для выявления особенностей течения воспалительного процесса через 7 и 14 суток наибольший интерес представляет количественная оценка Т регуляторных лимфоцитов, вовлекающихся в механизмы регуляции воспаления. Повышение через 7 суток экспрессионной активности CD4+, CD25+, Foxp3+ и CTLA-4+ повышает вероятность нарушения регуляции воспаления.

Снижение активности CD4+, CD8+, His48+CD11b/c+, His48+CD11b/c- внесли ясность в понимание механизма развития асептического воспаления, индуцированного на фоне предварительной интоксикации солями кадмия и свинца.

У крыс с асептическим воспалением проводили патогенетическую коррекцию нарушений, вызванных кадмием и свинцом. Впервые было использовано новое производное пиперазина – Комплекс, синтезированный в лаборатории АО «Институт химических наук имени А.Б. Бектурова», в сравнении с полиоксидонием.

Впервые установлено, что Комплекс способствует улучшению регенеративных процессов в тимусе и ткани воспаления. Комплекс восстанавливает % CD8+, повышает активность ИЛ-6 и показывает более высокую эффективность в модуляции CD4+CD25+ и CTLA4+, чем полиоксидоний.

Практическая и теоретическая и значимость.

Проведенная работа вносит определенный вклад в расширение современных представлений о патогенезе воспалительного процесса в условиях интоксикации тяжелыми металлами, способствует углубленному пониманию комплексных взаимодействий между центральными и периферическими органами иммуногенеза, участвующими в развитии воспаления. Полученные результаты свидетельствуют о значимости Т-регуляторных лимфоцитов и их экспрессионной активности, а также изменениях в пролиферативной активности иммунных клеток, что позволяет понимать тонкие механизмы регуляции иммунного ответа на фоне вторичного иммунодефицита, вызванного интоксикацией соединениями тяжелых металлов, а также модуляции иммунного ответа при помощи вновь синтезированных соединений пиперазинового ряда.

Работа имеет прикладное значение, так как впервые был применен Комплекс, разработанный в лаборатории АО «Институт химических наук имени А.Б. Бектурова», который показал эффективность в поддержании функций

иммунной системы и регенерации поврежденных тканей. Полученные результаты применения Комплекса могут стать основой для дальнейших углубленных исследований нового производного пиперазина. Полученные в ходе выполнения диссертационной работы результаты исследований, могут быть включены в учебно-методический комплекс дисциплин на кафедрах медицинского и биологического профиля. Материалы также могут быть использованы на факультетах повышения квалификации для врачей-иммунологов, ВОП.

Основные положения диссертации, выносимые на защиту:

1. Течение асептического воспаления у крыс, подвергавшихся двухнедельной пероральной затравке хлоридом кадмия и ацетатом свинца, в тимусе, брыжеечных лимфатических узлах и очаге воспаления сопровождается изменениями деструктивного характера в оба срока исследования.

2. Предварительная интоксикация соединениями свинца и кадмия у экспериментальных крыс с асептическим воспалением вызывает выраженные дегенеративно-деструктивные изменения лимфоорганов и их структурных компонентов на всем протяжении эксперимента.

3. Ацетат свинца и хлорид кадмия индуцируют супрессорный фон на ранних этапах воспаления за счет активации Т-регуляторных лимфоцитов и их фенотипов $CD4^+CTLA4^+$, $CD4^+FoxP3^+$, ингибирования пролиферативной активности гранулоцитарных и моноцитарных миелоидных клеток селезенки, а также снижения клеточных компонентов периферической крови, что способствует неблагоприятному исходу воспалительного процесса.

4. Комплекс улучшает структурные и регенеративные процессы в тимусе и лимфоорганах экспериментальных крыс

5. Комплекс наряду с полиоксидонием в исследованных параметрах периферической крови экспериментальных крыс с асептическим воспалением способен оказать эффективность в устранении иммунотоксических проявлений тяжелых металлов.

6. Корректирующая эффективность Комплекса сопоставима с полиоксидонием.

Личный вклад соискателя.

Непосредственное участие диссертанта в реализации научных проектов:

1. «Роль $CD4^+CD25^+FOXP3^+$ Tregs в регуляции воспалительного процесса: металл-индуцированные механизмы иммуносупрессии и поиск новых методов патогенетической коррекции в эксперименте», научный руководитель Балабекова М.К., в рамках внутривузовского финансирования, 2019-2021 гг.

2. «Механизмы нарушения регуляции воспаления под влиянием химических экотоксикантов и новые способы их патогенетической коррекции» 0122РК00549, научный руководитель Кайранбаева Г.К., в рамках проведенного конкурса на грантовое финансирование исследований молодых ученых Жас Галым МНВО РК, 2022-2024 гг.

Основные положения диссертационной работы доложены и обсуждены на:

1. I Международный форум «Asfen.Forum, новое поколение – 2023» – Алматы, Казахстан, 5-6 июня 2023 г.
2. Международная конференция «Physiology in Focus 2023» (Tartu, Lithuania).
3. VII Международная научно-практическая конференция Аллергология и иммунология: достижения и перспективы, 21 – 23 сентября 2023 года, Алматы, Казахстан.
4. Научно-практическая конференция ДНИ НАУКИ КГМА — 2024, посвященная 85 — летию Кыргызской государственной медицинской академии им. И. К. Ахунбаева, 11-12 апреля 2024 г., Бишкек, КР.

Опубликованные работы по результатам диссертационного исследования:

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

1. Naphthaleneoxupropargyl-Containing Piperazine as a Regulator of Effector Immune Cell Populations upon an Aseptic Inflammation // *Molecules*. – 2023. – Vol. 28. – P. 7023 (S. CiteScore 2023 – 6,7. Перцентиль – 68 (Molecular Medicine), IF-4,6).

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

1. Изучение острой токсичности новых химических соединений МХФ-19, МХФ-20 // *Вестник КазНМУ*. – 2020. – №4. – С. 434-438.

2. Тимусопосредованная регуляция воспаления в условиях патогенетической коррекции комплексом // *Фтизиопульмонология*. – 2024. – №1-43. – С 140-145.

- 2 Экспериментальная оценка селезеночных иммуноцитов при воспалении, вызванном на фоне воздействия кадмия и свинца // *Фтизиопульмонология*. – 2024. – №1-43. – С 146-149.

- 3 Патогенетическая модуляция иммунного ответа при асептическом воспалении // *Фтизиопульмонология*. – 2024. – №3-45. – С. 42-46.

1 патент на полезную модель:

Пат. №36782. Соединение 1-[1-(2,5-диметоксифенил)-4-(нафталин-1-илокси)бут-2-инил]-4-метилпиперазин в комплексе с β -циклодекстрином, обладающее иммуномодулирующей активностью (07.06.2024), Приложение А.

1 авторское свидетельство:

Авторское свид. № 48776. Экспериментальная оценка эффективности нового соединения (Комплекс) в качестве патогенетической коррекции

выявленных в тимусе нарушений в условиях асептического воспаления (01.08.2024), Приложение Б.

Структура и объем диссертации

Диссертационная работа состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов исследования, главы собственных исследований, выводов, списка использованной литературы (всего 210 источников).

Диссертация изложена на 117 страницах, содержит 20 таблиц, 31 рисунок, 2 приложения.

1. ОСНОВНАЯ ЧАСТЬ

1.1 Токсическое действие экотоксикантов на организм вследствие антропогенного загрязнения окружающей среды.

Во всем мире стала острой проблемой загрязнение токсичными опасными материалами [1]. Вред, наносимый здоровью человека тяжелыми металлами, всегда вызывал большую обеспокоенность, поскольку являются высокотоксичными и стойкими химическими соединениями [2]. Главным источником их поступления в окружающую человека среду является антропогенная деятельность человека. Возрастающая экономическая потребность воплощается в проблему загрязнения окружающей среды. К основным факторам, загрязняющим окружающую среду, относят тяжелые металлы. Источниками распространения тяжелых металлов в окружающей среде стали горнодобывающая и металлургическая промышленность [3]. Между тем, в литературе в качестве источников описывают природные ресурсы, сельскохозяйственную продукцию, электронные и бытовые отходы и т.д. Другие авторы к основным источникам относят предприятия химической промышленности и объекты атомной энергетики.

Проведен мониторинг экологического состояния за 1972-2023 гг. Результаты проведенного анализа, установлен качественно новый состав загрязнителей окружающей среды, в который стали входить уже тяжелые металлы. Особенную трудность представляет разработка новых способов очистки комбинаций токсикантов, учитывая тот факт, что ранее эти методы разрабатывались к моноэлементному загрязнению.

К разряду полиметаллических экотоксикантов стали относить самый опасный класс химических соединений. К ним относятся, не поддающиеся к биораспаду, постоянно перераспределяющиеся в экосистеме, кадмий и свинец [4, 5].

К классу опасных экотоксикантов, превышающих допустимые нормы концентрации в окружающей среде, отнесены свинец, кадмий, ртуть, медь и хром. Плотность химического элемента свыше 5,0 г/см³ и высокий атомный вес являются критериями, по которым определяют тяжелые металлы. К этой категории относят также кадмий и свинец [6]. Характеризующей особенностью токсичных и незаменимых металлов является голубовато-серый цвет свинца и голубовато-белый цвет кадмия.

В последние несколько десятилетий особую обеспокоенность вызывали источники загрязнения окружающей среды, состоящие из комплекса загрязнителей. Быстрые темпы развития промышленности одновременно становятся и глобальной проблемой, связанной с сопутствующим загрязнением отходами производства, в том числе тяжелыми металлами, почвы, воды и воздуха [7, 8, 9, 10, 11, 12].

В Казахстане проблемы экологии и пути решения регламентированы двумя основными государственными документами: Экологический кодекс и национальная программа «Жасыл Казахстан», принятые в 2021 году. Эти

программы направлены с одной стороны для модернизации и систематизации законодательства в сфере экологии, с другой – для государственной поддержки научно-технических проектов, направленных на решение проблем экологии, для достижения максимальной осведомленности и повышения образования в данном приоритетном направлении [13].

В ходе многолетних наблюдений акценты с источников экотоксикантов перемещены на естественные геохимические процессы. Zhou et al. обращает внимание мирового сообщества на скопления промышленных отходов, способствующих миграции поллютантов из-за их выветривания. Так, проблемой городов стали промышленные (шламовые) отходы, которые складываются вокруг предприятий и создают пылевые выбросы [14, 15]. Исследование горизонтальной миграции пылевых частиц с поверхности золошлакоотвалов на территории Чимкентского свинцового завода показало наличие высокой концентрации частиц свинца. Их распространение в атмосферу с последующим оседанием на почве зависело от розы ветров и метеоусловий [16, 17]. Определение концентрации кадмия и свинца в промышленных зонах г. Усть-Каменогорска выявили сильную степень загрязнения тяжелыми металлами в северных пригородах [18, 19, 20, 21].

Особый вклад в загрязнение атмосферного воздуха городов тяжелыми металлами представляют выхлопные газы автотранспорта. В этом отношении воздушный бассейн крупного мегаполиса – Алматы загрязнен выхлопными выбросами от интенсивного движения легкового и грузового автотранспорта. Наибольший поток автотранспорта зарегистрирован по улицам Рыскулова, Раимбека и Саина [22].

Большинство тяжелых металлов попадают в организм через пищу, воду, воздух или кожу. В организме эти вещества накапливаются в органах и тканях. Так, антропогенной нагрузке оказались подвержены и природные воды. Казахстанскими учеными проведено исследование пресноводной воды озера Нижний Кольсай, расположенного в Кегенском районе Алматинской области. Была дана экспериментальная оценка генотоксической и мутагенной активности воды. Исследователями было установлено, что вода у экспериментальных животных вызвала разрывы ДНК в клетках костного мозга и селезенки, повышение частоты хромосомных aberrаций и уровня конечных продуктов перекисного окисления липидов (ПОЛ) в печени мышей [23].

Другие казахстанские ученые генотоксичность воды в реках Есентай и Улкен Алматы. Были обнаружены аналогичные предыдущим исследованиям разрывы ДНК в селезенке, костном мозге, печени и почках экспериментальных мышей, а также активация ПОЛ по результатам определения его конечных продуктов [24]. Несмотря на то, что родники относят к природным исключительно чистым источникам, исследователи обнаружили концентрацию свинца, превышающую ПДК, в родниковой воде, потребляемой населением г. Алматы (р. Проходная, р. Батарейка в районе Кок-Жайляу, в районе санатория Просвещенец) [25]. Другие исследователи предлагают способы очистки водных растворов от содержания в ней кадмия и свинца [26]

Тяжелые металлы имеют свойство накапливаться в почве, что не может не влиять на качественный состав выращенной сельскохозяйственной продукции [27]. Это явление стало серьезной проблемой для густонаселенного Китая, где остро стоит вопрос наличия качественной сельскохозяйственной продукции [28, 29].

В современном урбанизированном обществе промышленные зоны граничат с пригородными участками, тогда как сельскохозяйственные угодья расположены близко к городам и автомагистралям. Исследования овощных культур, выращенных в г. Усть-Каменогорск, показали высокую концентрацию кадмия и свинца в огородных культурах, преимущественно в свекле и моркови [30].

Цинковый завод, расположенный в г. Риддер Восточно-Казахстанской области, является источником загрязнения почвенного и растительного покровов тяжелыми металлами [31]. Определение уровня загрязнения почв наличием в нем тяжелых металлов выявило преимущественно содержание кадмия, свинца, меди и цинка, значительно превышавшее ПДК. Растительность на исследованной территории была скудной. Оставшаяся растительность выглядела угнетенно, с явлениями ожогов на листе и усохшими ветвями. Кifle с соавторами озабочены высокой токсичностью алюминия, свинца и кадмия, которые опасны для здоровья даже при низких концентрациях, не говоря уже о превышении предельно допустимых концентраций.

Исследованиями содержания тяжелых металлов в почве прибрежной зоны мыса Песчаного, относящегося к Прикаспийскому региону, установлено статистически значимое повышение хрома, кадмия, меди и кобальта по сравнению с качественным составом почвы Каракольского заказника [32]

Современная зарубежная литература демонстрирует аналогичные данные. Тяжелые металлы устойчивы, не разлагаются и не уничтожаются полностью. Они накапливаются в продуктах питания и могут попадать в организм людей и животных. Другие исследования также показали, что, помимо профессионального воздействия, пищи и воды, курение сигарет является важным источником загрязнения кадмием.

Особое беспокойство вызывает способность тяжелых металлов к биоаккумуляции в тканях организма даже при нормальном функционировании желудочно-кишечного тракта.

Металлы плохо выводятся из организма вследствие нарушения метаболических процессов, что приводит к их накоплению в клетках (Engwa et al. (2019)). Свинцовые интоксикации приводят к анемиям, расстройствам нервной, пищеварительной, мочеполовой систем. Отмечены и канцерогенные свойства свинца, приводящие к раку молочной железы.

Даже низкие дозы тяжелых металлов способны снижать репродуктивную функцию у мужчин. Их токсичность усиливается при накоплении в клетках, нарушая обмен веществ и работу мозга, печени и почек.

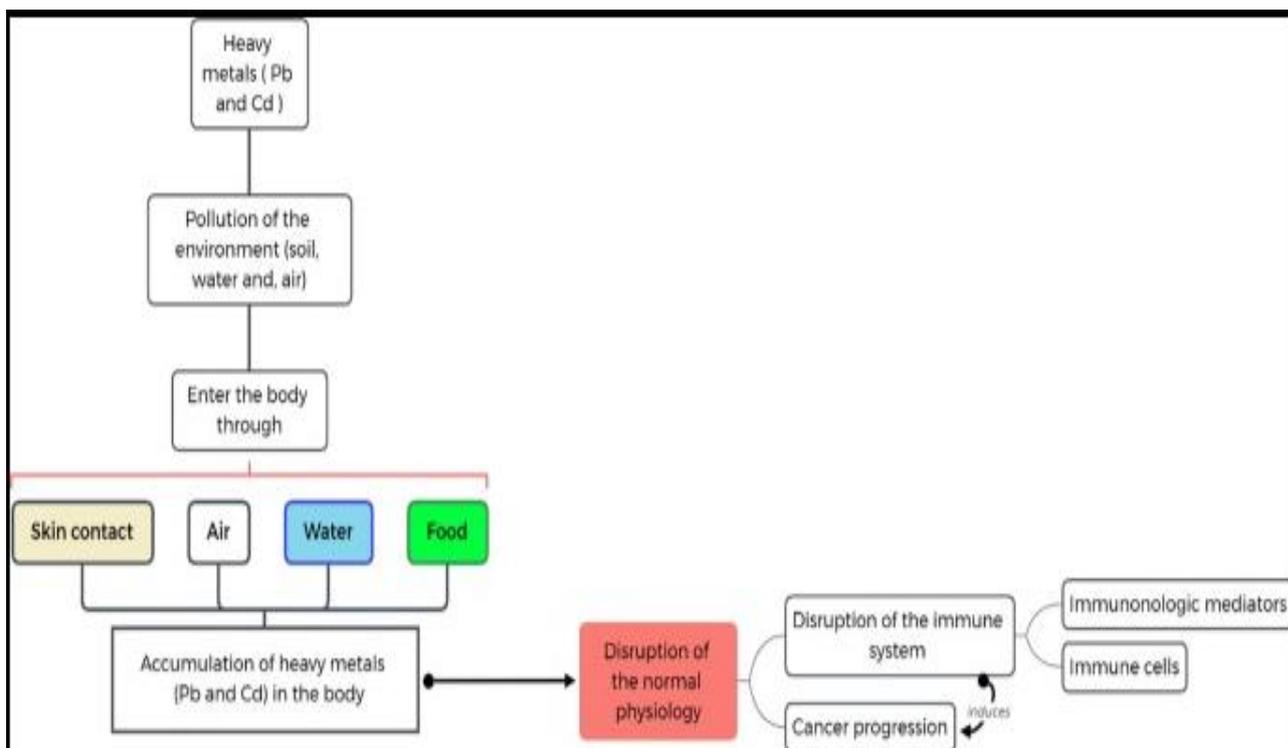


Рисунок 1 – Пути проникновения тяжелых металлов и их воздействие на иммунную систему (этот рисунок был воспроизведен из работы Ebrahimi M. и др.) [33].

Хроническое загрязнение приводит к развитию аллергии, рака и других заболеваний. При этом отмечают, что некоторые металлы, такие как железо, цинк и селен полезны. Они помогают организму бороться с болезнями. Тяжелые металлы вызывают системные поражения внутренних органов, что характерно для их токсического действия. Длительные клинические наблюдения (Yuan et al., 2016) выявили широкий спектр заболеваний, связанных с хроническим отравлением тяжелыми металлами.

Кроме того, свинец и кадмий негативно влияют на работу иммунной системы. В патогенезе иммунотоксичности кадмия существенную роль играет накопление свободных радикалов [35]. Другие авторы расширяют механизмы токсичности кадмия сведениями о повышении каспазы-3, регуляторной дисфункцией bcl-2 и дефицитом p-53 [36]. Под влиянием кадмия нарушается нормальная дифференцировка лимфоцитов. В результате нарушений в органах иммуногенеза существенно меняются ответные иммунные реакции [37, 38, 39]. Характер специфических и неспецифических реакций у морских млекопитающих зависел от длительности поступления и дозы кадмия. Значительные изменения в уровнях CD4+, CD8+, CD25+, CD44+ и CD223+ под влиянием кадмия обнаруживались и у мышей [40].

В патогенезе железодефицитной анемии кадмий играет непосредственную роль. Он ингибирует выработку эритропоэтина (ЭПО), а также нарушает транспорт железа из двенадцатиперстной кишки [41, 42].

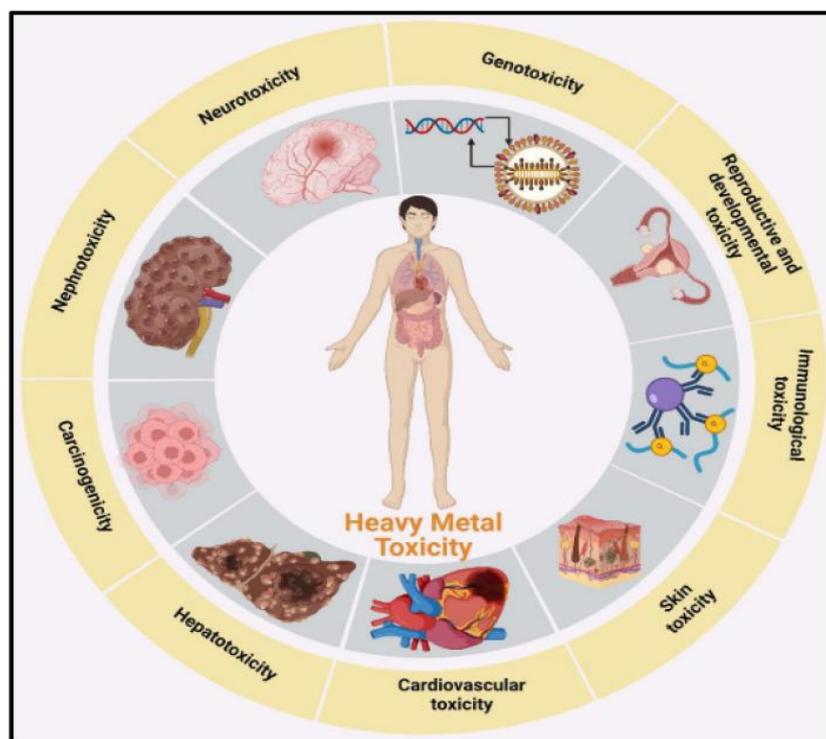


Рисунок 2 – Схематическая диаграмма, показывающая токсичность тяжелых металлов в органах человека (этот рисунок был воспроизведен из работы Вауно J.и др.) [34]

При длительном воздействии кадмия клетки тимуса и селезенки сами продуцируют высокие уровни активных форм кислорода (АФК). За счет критической продукции АФК повреждается митохондриальная мембрана и наступает апоптоз [43]. Даже при низких концентрациях кадмия он способен индуцировать синтез АТФ [44]. В других исследованиях этот механизм описан как способность кадмия активировать внутренний путь апоптоза при высокой продукции АФК [45]. Способность свинца индуцировать АФК, тем самым, нарушая функцию Т-клеток, также отмечается в исследованиях [46].

Наиболее часто воздействию свинца и кадмия подвергаются работники производств, у которых чаще всего обнаруживаются нарушения функции иммунной системы. Исследования выявили у них повышенные уровни ИЛ-10 и фактора некроза опухоли. В исследованиях, проведенных [47], установлено, что сульфат кадмия ингибирует высвобождение цитокинов. Так, уровни провоспалительных цитокинов, таких как ИЛ-1 β и ИФН γ заметно снижались.

Это свидетельствовало о нарушении хелперной функции лимфоцитов [48]. Между тем, воздействие кадмия стимулировало выработку ИЛ-6. Таким образом, установлено, что соли кадмия и свинца оказывают выраженное иммунотоксическое воздействие. Но, иммунная система представляет собой сложный механизм взаимодействия множества клеток на молекулярно-генетическом уровне, которые задействованы в процессе восстановления исходного гомеостаза, что и сподвигает ученых продолжать исследования с

целью установления более тонких механизмов токсического действия тяжелых металлов.

1.2 Распознавание регуляторных Т-клеток как клеточного механизма иммунной толерантности.

Иммунотоксическое воздействие тяжелых металлов рассматривается с двух сторон: прямое повреждение иммунной системы и её участие в механизмах токсического действия этих веществ. Попадание тяжелых металлов в организм может нарушить неспецифическую сопротивляемость и иммунную реактивность, а также вызвать вторичный иммунодефицит. Это приводит к снижению противоинфекционной и противоопухолевой защиты, а также к развитию аллергий, аутоиммунных заболеваний и других патологий.

Свинец и кадмий оказывают прямое токсическое влияние на легочную ткань, подавляя фагоцитарную активность легочных макрофагов. Это подтверждает связь между интоксикацией тяжелыми металлами, ростом инфекционных заболеваний и повышением заболеваемости хроническими воспалительными процессами. В отечественных и зарубежных исследованиях эта проблема остается мало изученной, что связано с недостаточным вниманием к влиянию загрязнения окружающей среды на снижение общей устойчивости организма.

Регуляторные Т-клетки (Т-reg клетки) важны для поддержания иммунного баланса, подавления воспалений и предотвращения аутоиммунных заболеваний [49]. Они контролируют избыточную активность иммунной системы через различные молекулярные механизмы. Основная функция Т-reg клеток — регулировать иммунные процессы, сохраняя баланс между активацией и подавлением иммунитета. Это делает их перспективными в лечении хронических воспалений, аллергий и аутоиммунных заболеваний, связанных с чрезмерной активностью иммунной системы.

Регуляторные Т-клетки (Т-reg) были впервые описаны как ключевые элементы, поддерживающие периферическую иммунную толерантность, еще в 1991 году. Так, Powrie F. и Mason D. опубликовали первые исследования о CD45RBhigh CD4+ клетках, обладающих аутоагрессивным потенциалом [50, 51]. Так, у крыс с врожденным отсутствием вилочковой железы, которым вводили CD45RBhigh CD4+ Т-клетки от здоровых доноров, развивалась тяжелая истощающая болезнь. Она сопровождалась воспалительными процессами в печени, легких, желудке, а также в щитовидной и поджелудочной железах. При введении смеси CD4+ Т-клеток, состоящую из двух третей CD45RBhigh и одной трети CD45RBlow, болезнь не развивалась, а воспаление в органах происходило гораздо реже, чем у тех, кто получил только CD45RBhigh клетки. Это указывает на то, что CD45RBhigh CD4+ клетки обладают аутоагрессивным потенциалом, который в нормальных условиях подавляется CD45RBlow CD4+ клетками. Как утверждали авторы, эти исследования требуют дальнейшего изучения, поскольку нарушение этого регуляторного механизма может иметь серьезные последствия [52].

Супрессивные CD4⁺ клетки у мышей стало возможным определять после того, как в 1995 году Sagakuchi и его команда выделили CD25⁺ как маркер. Это должно возможность называть их как регуляторные Т-клетки (Трег). Важным шагом в изучении Tregs стало открытие FOXP3, которое сыграло ключевую роль в их идентификации. На данный момент известно, что Трег играют важную роль в сохранении иммунного баланса и предотвращении чрезмерных реакций иммунной системы. Одной из главных задач Т-reg клеток является подавление иммунного ответа на микроорганизмы, что помогает избежать воспалительных заболеваний. Этот механизм, вероятно, развился в процессе эволюции для защиты от аутоиммунных нарушений, вызванных реакцией организма на собственные клетки.

Регуляторные Т-клетки (Трег) представляют собой особую популяцию Т-клеток. Они отличаются тем, что экспрессируют транскрипционный фактор Foxp3. Эти клетки играют важную роль в поддержании иммунного гомеостаза. Как и обычные Т-клетки, Т reg клетки могут быть активированы. Это происходит через рецептор антигена Т-клетки (TCR). После активации наивные Т reg клетки превращаются в супрессивные Трег клетки (eT reg). Эти клетки характеризуются повышенной экспрессией Foxp3 и CTLA-4, IL-10. Трег клетки являются доминирующей популяцией в нелимфоидных тканях и опухолях [53, 54].

Эффективная работа иммунной системы зависит от сбалансированных клеточных и гуморальных ответов. Агенты физического, химического или инфекционного происхождения, приводящие к повреждению тканей могут активировать мощный иммунный ответ. Благодаря наличию регуляторных механизмов интенсивность иммунного реагирования может быть сдержана. Изменения баланса в сторону увеличения клеток Трег может ослабить иммунный ответ в борьбе с инфекцией. Снижение популяций Трег клеток, напротив, направит течение воспаления в сторону усиления с возможным аутоиммунным проявлением.

Человеческий организм постоянно подвергается воздействию множества патогенов, что инициирует различные иммунные реакции. Первичные патоген-специфические иммунные ответы приводят к образованию различных подмножеств Т-клеток памяти, которые обеспечивают защиту при повторных инфекциях. Недавние исследования выявили несколько новых подтипов Т-клеток, что значительно расширяет наши представления о дифференциации Т-клеток и механизмах регулирования иммунных реакций [55].

Среди CD4⁺ лимфоцитов мышей выделили два типа Т-хелперных клеток. Т-хелперные клетки 1 типа (Th1) секретируют ИЛ-2, интерферон-γ, а Т-хелперные клетки 2 типа (Th2) вырабатывают IL-4, IL-5 [56]. К началу 1990-х годов было установлено, что в тканях и периферической крови человека можно обнаружить CD4⁺ Т-клетки, характеризующиеся профилями Th1 и Th2. В 1994 году была выявлена новая подгруппа CD4⁺ Т-клеток, продуцирующих трансформирующий фактор роста β (TGF-β), и названная Th3 [57]. Позднее была обнаружена группа регуляторных Т-клеток, экспрессирующих CD25. В 2003 году был идентифицирован Foxp3, который играет основную роль в

регулировании их транскрипции [58]. В 2005 году была выявлена новая популяция CD4⁺ клеток, которые не вырабатывали типичные для Th1/Th2 цитокины, но начали производить IL-17. Эти клетки были названы провоспалительными Th17 клетками [59, 60].

Последние исследования доказывают, что Т-клетки CD4 могут обладать цитолитической активностью, которая ранее считалась исключительно присущей Т-клеткам CD8. Изначально цитотоксические Т-клетки CD4 (CD4 CTL) рассматривались как возможный артефакт, возникающий в условиях *in vitro*, в ходе искусственного культивирования клеток. Однако эти гипотезы были опровергнуты более поздними исследованиями, которые показали, что некоторые антигенспецифические Т-клетки CD4, находящиеся в организме, обладают способностью к прямой цитотоксической активности. В отличие от традиционно известных Т-клеток CD8, цитотоксическая активность Т-клеток CD4 ограничена молекулами МНС класса II, что означает, что они способны распознавать и уничтожать инфицированные или опухолевые клетки, которые экспрессируют эти молекулы. Это открытие кардинально изменило понимание роли Т-клеток CD4 в иммунном ответе. Ранее считалось, что Т-клетки CD4 играют исключительно роль хелперов, регулируя иммунные ответы и активируя другие иммунные клетки, такие как Т-клетки CD8. Однако, благодаря обнаружению цитотоксической активности Т-клеток CD4, стало ясно, что они могут также напрямую участвовать в уничтожении клеток, представляющих угрозу организму, например, зараженных вирусами или трансформированных опухолевых клеток. Исследования, проведенные в 1970-1980-х годах, как на людях, так и на животных моделях, стали основой для более глубокой разработки этой теории. Со временем стало понятно, что Т-клетки CD4, экспрессирующие молекулы, отвечающие за распознавание антигенов на молекулах МНС II, могут напрямую влиять на клетки, которые они распознают как чуждые или поврежденные [61, 62, 63, 64].

Сами Т-регуляторные клетки формируются из лимфоидных предшественников, мигрировавших в тимус из костного мозга. В тимусе Treg взаимодействуют с Т-клеточным рецептором (TCR), и в ходе селекции преобразуются в наивные Т-клетки.

Процесс лимфопоэза начинается с клеток-предшественников, имеющих на поверхности молекулы CD2, CD5, CD7 и цитоплазматический CD3. Эти клетки проникают в корковую часть тимуса, где завершается их созревание и подготовка к выполнению защитных функций [65, 66, 67, 68].

НК-Т-клетки формируются из предшественников Т-клеток, экспрессирующих CD3, благодаря взаимодействию специфической α -цепи ($V\alpha 14-J\alpha 18$) с β -цепью через гликолипид-CD1d. В процессе созревания они начинают экспрессировать молекулу адгезии нейронных клеток (CD56) [69, 70].

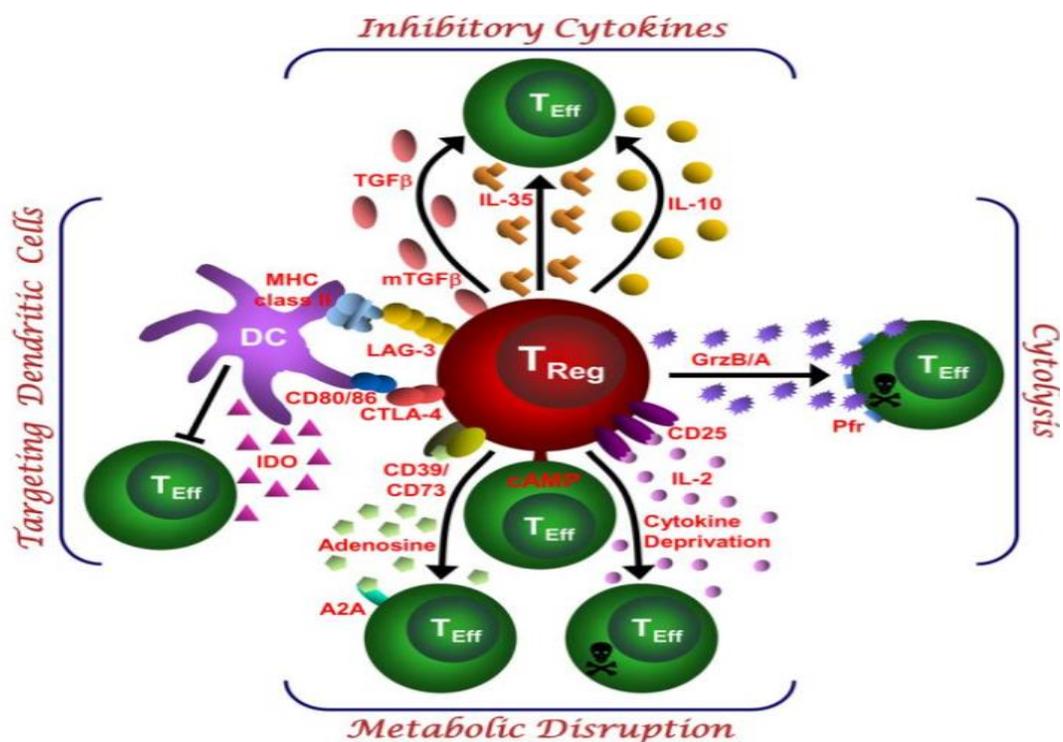


Рисунок 3 – Основные механизмы, используемые Treg-клетками.

Параллельно предшественники Т-клеток с низкой экспрессией CD3 проходят стадию, где сначала появляется экспрессия CD8, а затем CD4. Экспрессия CD8 может происходить как до, так и после перестройки TCR, что позволяет Т- $\gamma\delta$ -клеткам отделяться от Т- $\alpha\beta$ -пути. Около 30% Т- $\gamma\delta$ -клеток экспрессируют CD8. Взаимодействие с пептидами, связанными с МНС класса I, приводит к экспрессии только CD8, а с пептидами, связанными с МНС класса II, — только CD4 [71]. Затем Т- $\alpha\beta$ -клетки перемещаются в мозговое вещество тимуса для отрицательного отбора, устраняющего клетки с высокой чувствительностью к собственным антигенам. После созревания CD4⁺ и CD8⁺ Т- $\alpha\beta$ -клетки поступают в кровоток [72]. Небольшая доля Т- $\alpha\beta$ -клеток в периферической крови (~1%) остается без экспрессии CD4 и CD8, они известны как двойные отрицательные (DN) Т- $\alpha\beta$ -клетки [73, 74].

Механизмы иммунной толерантности помогают иммунной системе справляться с повреждениями, вызванными внешними факторами, одновременно минимизируя ущерб собственным тканям организма. Эти механизмы обеспечиваются Treg-клетками, одними из первых исследователей, которых были Qin S. С соавт., 1993 и Sakaguchi S. С соавт., 1995 [75, 76].

В соответствии с современной классификацией, регуляторные Т-клетки делятся на тимусные Treg, которые созревают в тимусе, и периферические Treg, формирующиеся в периферических тканях. Также существуют индуцированные Treg, которые создаются в лабораторных условиях *in vitro* [77, 78, 79, 80]. tTreg составляют около 80% циркулирующих Treg-клеток и характеризуются устойчивой экспрессией транскрипционного фактора FoxP3 [81]. Напротив, pTreg обладают менее стабильной экспрессией FoxP3, которая ограничивает их

функцию подавления до времени его наличия [82, 83, 84]. Стабильность этих клеток обеспечивается множеством факторов, таких как специфические маркеры поверхностных белков [85, 86, 87] и эпигенетические изменения в геноме [88, 89]. Важнейшую роль в формировании и поддержании их функций выполняет транскрипционный фактор FoxP3, который выступает основным регулятором этих процессов [90, 91, 92].

Изначально FoxP3 считался ключевым регулятором Treg-клеток CD4, но оказалось, что их функции определяются взаимодействием множества транскрипционных факторов, генетических и эпигенетических механизмов, а также сигналов микроокружения. Дисфункция Treg-клеток может возникать как из-за утраты FoxP3, так и из-за других генетических нарушений [93, 94, 95].

FoxP3 играет ключевую роль в иммунной толерантности, что подтверждено исследованиями на мышах Scurfy и пациентах с синдромом IPeX [96, 97, 98]. Удаление FoxP3 вызывает тяжелую аутоиммунную реакцию, а его экспрессия превращает CD4+ T-клетки в Treg, подавляющие воспаление [99]. В клетках Jurkat FoxP3 усиливает Treg-маркеры и подавляет цитокины, предотвращая пролиферацию обычных T-клеток [100].

FoxP3 – это фактор транскрипции из семейства forkhead. Он находится в ядре и взаимодействует с примерно 700 генами и микроРНК. FoxP3 регулирует сигнальные пути TCR, клеточную коммуникацию и транскрипцию. [101, 102, 103, 104]. FoxP3 активирует транскрипцию некоторых генов. Он также действует как репрессор, регулируя гены через взаимодействие с другими факторами транскрипции. Важно, что FoxP3 может образовывать гетеродимеры с FoxP1. Это усиливает его регуляторные функции в клетках Treg [105, 106, 107].

CTLA4 – это белковый рецептор из суперсемейства иммуноглобулинов, который экспрессируется активированными T-клетками и передает ингибирующие сигналы, подавляя их функции [108, 109, 110]. При активации T-клеточного рецептора CTLA4 мобилизуется на поверхность клетки, где связывается с молекулами CD80 и CD86 на антигенпрезентирующих клетках, удаляя их с поверхности. Этот процесс, известный как трансэндоцитоз, играет ключевую роль в поддержании толерантности и регуляции иммунного ответа. [111]. К тому же, полученные данные объясняют механизм иммунной регуляции, в котором молекула CTLA-4 играет ключевую роль в подавлении костимуляции, инициируемой CD28. Это подавление происходит через внешний механизм истощения лигандов, что в свою очередь приводит к нарушению активации T-клеток. Подобное взаимодействие молекул является основой работы системы CD28-CTLA-4, где CTLA-4 выступает как важный ингибитор, препятствующий возрастанию иммунного ответа, которое обычно происходит при связывании CD28 с его лигандами. Таким образом, CTLA-4 способен поддерживать баланс и гомеостаз иммунной активности, регулируя уровень активации T-клеток и предотвращая избыточное воспаление и аутоиммунные реакции [112].

CTLA4 (цитотоксический T-лимфоцитарный антиген 4) играет ключевую роль в регуляции активации T-клеток, действуя как важный отрицательный регулятор иммунных ответов. Он ингибирует костимуляцию T-клеток, вытесняя

молекулу CD28 с поверхности антигенпрезентирующих клеток, таких как дендритные клетки, которые экспрессируют молекулы CD80 и CD86. Это вытеснение снижает способность CD28 к активации Т-клеток, что в свою очередь ослабляет иммунный ответ. Кроме того, CTLA4 конкурирует с CD28 за место в центральных надмолекулярных активационных кластерах (сSMAC) в иммунных синапсах, что важно для правильной активации Т-клеток. Эта конкуренция за место в сSMAC позволяет CTLA4 эффективно блокировать активацию Т-клеток, предотвращая избыточное воспаление или аутоиммунные реакции. Внутриклеточно CTLA4 связывается с протеинфосфатазой 2A (PP2A) и тирозинфосфатазой SHP-2, что приводит к их дефосфорилированию. Эти киназы являются важными для передачи сигналов активации в клетке. Дефосфорилирование этих киназ снижает их активность, тем самым блокируя ключевые молекулярные пути, которые обычно способствуют пролиферации и активации Т-клеток [113].

Такая многогранная регуляция позволяет CTLA4 эффективно контролировать активность Т-клеток, предотвращая их чрезмерную активацию и минимизируя риск аутоиммунных заболеваний.

1.3 О миелоидно-супрессорных клетках.

Миелоидные супрессорные клетки (MDSC) являются одним из важнейших разделов в иммунологии, представляющий, на сегодняшний день, большой интерес в научном сообществе. Хотя сама классификация данных клеток имеет обширный охват, под понятием MDSC описывают клетки, чаще встречающиеся на поздних стадиях онкологических заболеваний, в процессе формирования хронического воспаления [114, 115]. Популяция миелоидных клеток имеет, достаточно, парадоксальную позицию. С одной стороны, MDSC участвуют в иммунной регуляции для защиты организма, способствуя быстрому заживлению ран и восстановлению кровообращения, а с другой стороны, миелоидные клетки могут ослаблять защитные реакции организма. Возможно, это обусловлено действием различных факторов внутренней и внешней среды. К фактору внешней среды, в данном случае, могут относиться социально-экономическое неблагополучие, негативный эффект от урбанизированных экосистем, где львиную долю составляет отравление организма солями тяжелых металлов: свинец, кадмий, ванадий, хром, мышьяк, алюминий и т.д.

Миелоидные супрессорные клетки представляют собой разнородную группу незрелых миелоидных клеток. Главной характеристикой этих клеток считают их способность подавлять функции Т-лимфоцитов [116]. Их высвобождение происходит при различных видах биологического стресса, включая острое повреждение тканей и воспалительные процессы [117].

Что касается вопроса основных характеристик и функции MDSC, несомненно, представленные клетки выполняют важную роль в иммунорегуляции. Основная задача заключается в защите организма от чрезмерно активных иммунных реакций, поддержании иммунологической толерантности и восстановлении тканевого гомеостаза. MDSC демонстрируют

как про-, так и противовоспалительные свойства. Эти эффекты опосредуются через выработку различных веществ: активных форм кислорода (ROS), аргиназы-1 (Arg-1), трансформирующего фактора роста-бета (TGF- β), матриксных металлопротеиназ (ММП), а также через высвобождение цитокинов –интерлейкина-6 (IL-6), интерлейкина-1 β (IL-1 β).

Миелоидные супрессорные клетки играют важную роль в различных биологических процессах, включая формирование толерантности между матерью и плодом, развитие иммунотолерантности к собственным антигенам, патогенез рака [118], течение сепсиса и травматических состояний.

В настоящее время выделяют две основные разновидности MDSC: гранулоцитарные/полиморфноядерные (PMN) и моноцитарные (M). Данное разделение основано на их происхождении из соответствующих миелоидных клеточных линий.

У животных (мышей) MDSC характеризуются экспрессией миелоидных маркеров GR1+CD11b+. У человека специфический антиген Gr1 отсутствует. Маркер Gr1 включает в себя определение параметров экспрессии LybC и LybG. Человеческие MDSC экспрессируют маркеры миелоидных клеток CD11b+ и CD33+, но обычно не имеют антигенов HLA-DR и линейно-специфических антигенов (Lin), таких как CD3, CD19 и CD57 [119].

Особое клиническое значение имеют три фенотипа MDSC: промиелоцитарный, моноцитарный и гранулоцитарный. Промиелоцитарные MDSC (PM) представляют собой крайне незрелую популяцию миелоидных клеток с фенотипом Lin^{low}/+HLA-DR+CD33+CD11b+. Моноцитарные MDSC (M) характеризуются фенотипом Lin^{low}/-HLA-DR-CD14+CD11b+CD33+. Гранулоцитарные MDSC (G) помимо антигенов CD11b+ и CD33+ экспрессируют гранулоцитарные маркеры CD15 или CD66b, при этом обычно не имея CD14 [120].

Было установлено о наличии клеточных популяции, называемыми натуральными супрессорными клетками, которые отличаются от нейтрофилов и моноцитов [121].

Какова роль MDSC в патологических процессах? Изменения в микроокружении прогрессирующих опухолей напоминают процесс хронического воспаления [122]. Этот процесс начинается с ишемии, за которой следуют межклеточный и клеточный отек, миграция иммунных клеток, рост кровеносных сосудов, восстановление тканей и формирование воспалительных инфильтратов [123]. Миелоидные супрессорные клетки являются одной из основных популяций иммуносупрессивных клеток в микроокружении опухоли, а факторы транскрипции, вероятно, участвуют в прицельной активации MDSC [124]. Насколько велика роль MDSC в воспалительном микроокружении, настолько и недостаточно понимания и знаний механизма их действия. Нет понимания о том, каков механизм иммуносупрессии, как они подавляют активность НК-клеток. Недостаточно изучено, какова их связь друг с другом в опухолевом микроокружении [125]. Известно лишь, что при любых хронических состояниях, таких как повреждения органов и тканей длительного характера,

инфекциях, политравмах, хроническом воспалении и опухолях обнаруживаются участвующие в патологическом процессе MDSC [126]. В результате происходит длительная экспансия MDSC и усиление их иммуносупрессивной функции [127].

Широко распространено мнение, что расстройство сигнальных путей, которые участвуют в развитии гемопоэза и миелопоэза при патологических состояниях, таких как опухолевый рост, способствует развитию миелоидных супрессорных клеток [128].

Воспалительный ответ при сепсисе представляет собой динамический процесс. Он эволюционирует от раннего свехвоспалительного состояния к позднему иммуносупрессивному [129, 130]. Миелоидные супрессорные клетки, выделенные из организма мышей на ранних стадиях сепсиса, проявляют провоспалительные свойства. Напротив, клетки, полученные на поздних стадиях, демонстрируют иммуносупрессивную активность. Улучшение выживаемости наблюдается только при раннем септическом воспалении. Количество MDSC будет постоянно велико в организме с сепсисом и связано с внутрибольничными инфекциями и другими неблагоприятными клиническими исходами. Однако их функциональные механизмы во время сепсиса не были полностью изучены [131].

Регуляторные механизмы играют ключевую роль в поддержании тонкого баланса между уничтожением патогенных клеток и защитой окружающих тканей от чрезмерного повреждения. Миелоидные супрессорные клетки, как иммунорегуляторные клетки, одними из первых реагируют на повреждение тканей [132]. Их основная функция направлена на содействие регенерации и заживлению, что помогает предотвратить неконтролируемое воспаление и поддерживать иммунный гомеостаз. При патологических состояниях, таких как воспаление, инфекции, опухолевый рост [133], происходит нарушение нормальной клеточной дифференцировки, что приводит к накоплению незрелых миелоидных клеток в организме.

Новые направления исследований в научных трудах указывают на взаимную регуляцию между MDSC и Т-регуляторными клетками (Treg) (Рисунок 4). Этот процесс осуществляется через различные механизмы: взаимодействие IL-10, IL-4R α , TGF- β , PD-L1, ЦОГ-2, систему CD40-CD40L, индукцию аргиназа 1 (ARG1), индуцируемая NO-синтаза (iNOS), индолмин-2, 3-диоксигеназа (ИДО) и CCR-5-опосредованную миграцию [135].

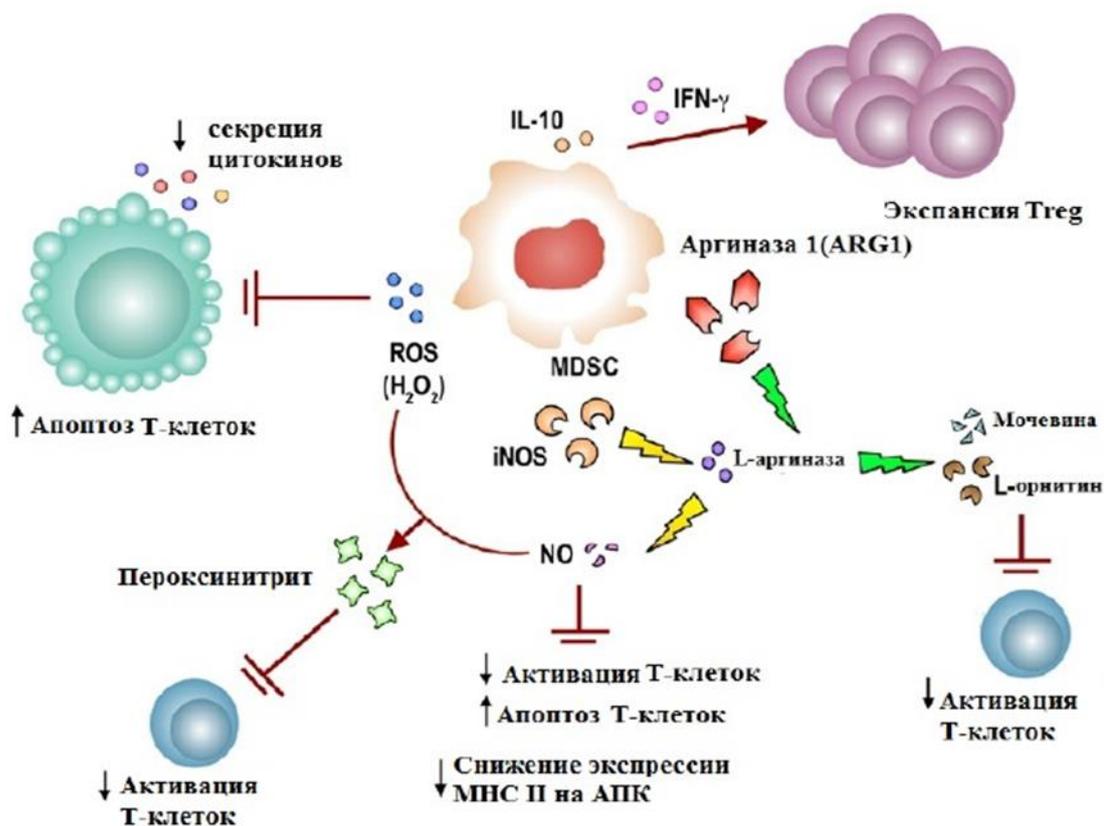


Рисунок 4 – Основные механизмы иммуносупрессивных функции MDSC [134].

Взаимосвязь между MDSC и Treg при онкологических заболеваниях хорошо изучена, многие типы клеток участвуют в микроокружении опухоли [136]. Снижение уровня Treg уменьшает иммуносупрессивное действие MDSC путем снижения экспрессии PD-L1 и продукции IL-10. В то время как врожденные иммунные клетки, такие как нейтрофилы, макрофаги и моноциты, являются сигнальными медиаторами неинфекционного воспаления, известно, что хроническое воспаление, как предраковое состояние, способен нарушать естественный миелопоэз [137].

Ряд воспалительных медиаторов способствует накоплению или активации MDSC. К ним относятся IFN γ , TNF, PGE₂, IL-6 и IL-1 β . Активированные MDSC подавляют ответы T-клеток, влияют на экспрессию цитокинов макрофагами и нарушают развитие дендритных клеток. Особенно интересна роль IFN γ в развитии и функционировании MDSC. IFN- γ способен регулировать экспрессию CD40 на MDSC и, следовательно, влияет на взаимный контакт CD40+MDSC с CD40L+. Некоторые исследования показывают, что развитие MDSC зависит от IFN γ , который также необходим для продукции активных форм кислорода (ROS) или оксида азота (NO) [138].

Миелоидные супрессорные клетки представляют уникальную категорию клеток миелоидного ряда. Они способствуют подавлению развития

цитотоксических Т-лимфоцитов (CTL) *in vitro* и индукции антиген-специфической толерантности CD8⁺ Т-клеток *in vivo*.

Интересно подметить, что иммуносупрессия, вызванная MDSC при различных патологических процессах, вызывает очень похожие изменения, которые присутствуют при иммунном старении организма [139].

Концепция MDSC помогла объяснить миелоидные феномены, связанные с исходами различных заболеваний. Однако в настоящее время отсутствуют четкие определения и унифицированная структура для разных патологических состояний. Предлагается классифицировать MDSC как дискретные клеточные состояния на основе активирующих сигналов в миелоидных популяциях [140]. Эти состояния характеризуются специфическими, измеримыми супрессорными эффектами. Терапевтические стратегии, направленные на регуляцию популяции MDSC и их функций, могут повысить эффективность лечения злокачественных новообразований. Углубление знаний о миелоидных состояниях при различных патологиях может в перспективе изменить подходы к классификации и лечению заболеваний.

1.4 Достижения в поисках новых методов коррекции воспалительных процессов в эксперименте.

В настоящее время иммуномодуляторы активно применяются для лечения различных заболеваний с установленной иммунной этиологией [141]. В настоящее время доступны многочисленные иммуномодуляторы как природного, так и синтетического происхождения. Идут активные поиски эффективных средств с иммуномодулирующим действием. Использование современных наукоемких технологий расширяет возможности разработки новых препаратов. Особый интерес представляют препараты с высоким лечебным и профилактическим потенциалом, обладающие минимальными побочными эффектами [142, 143, 144]. Разработчики таких препаратов преследуют цель исследовать их потенциальную модулирующую, а также стимулирующую иммунную систему активность. Некоторые предпочитают отдавать растительным препаратам, которые, по их мнению, безопасны, неканцерогенны и не вызывают привыкание.

Иммуномодуляторы представляют собой препараты с иммуотропной активностью, которые восстанавливают функции иммунной системы, оказывая защиту иммунной системе [145]. Иммуномодуляторы избирательно модулируют иммунную систему. Не изменяя исходные параметры, иммуномодуляторы снижают их повышенные уровни и, наоборот, повышают, в случае их снижения. Некоторые из них могут оказать влияние только на макрофаги. Соответственно, другие влияют на другие компоненты иммунитета, такие как В-лимфоциты, Т-лимфоциты или НК-клетки. Иммуномодуляторы подразделяются на экзогенные и эндогенные. Кроме того, бывают и синтетические.

Основные требования к иммуномодуляторам, как и ко всем препаратам, сводятся к тому, что иммуномодуляторы не должны провоцировать аллергию, повышая чувствительность организма. Не должны быть источником

иммунопатологических нарушений. Фармакокинетика и фармакодинамика иммуномодуляторов должна включать исследования метаболизма и основных путей выведения. Кроме того, при применении в качестве вспомогательного препарата, иммуномодулятор должен быть совместим с другими используемыми препаратами. Он не должен оказывать эффект усиления других средств, применяемых при заболеваниях воспалительного и инфекционного генеза. [146, 147].

Модуляция функций макрофагов является многообещающим подходом для профилактики и лечения воспалительных заболеваний [148]. Исследования показали, что слитый белок rFlaA: Betv1, объединяющий адъювант флагеллин А из *Listeria monocytogenes* и аллерген пыльцы березы Bet v 1, уменьшает аллергенное воспаление Th2-типа. Он регулирует высвобождение макрофагами провоспалительных (IL-1 β , IL-6 и TNF- α) и противовоспалительных (IL-10) цитокинов у мышей. В своей работе Yen-Ju Lin и соавторы определили, что инфламмосомы NLRC4 и NLRP3 играют ключевую роль в этом процессе, способствуя высвобождению IL-1 β и других провоспалительных цитокинов в макрофагах из клеточной линии THP-1 человека [149]. Исследователи также обнаружили, что секреция IL-1 β , вызванная rFlaA:Betv1, сильно зависит от активации сигнальных путей NF κ B и SAPK/JNK.

Противовоспалительные свойства каннабиноидов были подтверждены рядом *in vitro* и *in vivo* исследований [150]. В работе Перес-Диего и его коллег изучались механизмы, благодаря которым синтетический каннабиноид WIN55,212-2 проявляет свои противовоспалительные эффекты на различные типы миелоидных клеток человека. Исследование показало, что при дифференциации в присутствии WIN55,212-2 моноцитарные дендритные клетки (MDDC) человека приобретают толерогенный профиль, характеризующийся сниженной реакцией на липополисахарид (ЛПС) и способностью активировать регуляторные Т-клетки (Tregs). Кроме того, было установлено, что WIN55,212-2 подавляет поляризацию макрофагов и моноцитов, полученных из линии THP-1, в провоспалительный тип M1. Это происходит через изменение их метаболизма и эпигенетических механизмов, что приводит к снижению секреции провоспалительных цитокинов, уменьшению пироптоза и активации инфламмосом.

Ранее было установлено, что гипоксическая среда опухоли существенно ослабляет функции дендритных клеток (DCs), находящихся в опухолевом микроокружении [151]. Bhatt K. и его коллеги исследовали, могут ли кислородные криогели, выделяющие O₂, предотвратить это подавление [152]. Их результаты показали, что воздействие O₂-криогелей на человеческие дендритные клетки, дифференцированные из моноцитов (MDDCs), компенсирует негативное влияние гипоксии на поглощение антигенов, созревание и миграцию DCs. Более того, O₂-криогели поддерживают иммуномодулирующие свойства DCs, позволяя им активировать и стимулировать наивные Т-клетки даже в условиях гипоксии.

Растительные полисахариды обладают разнообразными биоактивными свойствами, включая иммуномодуляцию [153], противораковое действие [154],

нейропротекторную активность [155], антиоксидантные [156] и антимикробные [157] эффекты. Они способны модулировать иммунную систему, при этом не вызывая побочных негативных эффектов, что обсуждается в ряде исследований [158]. Большинство из этих эффектов, как считается, являются результатом иммуномодуляции. Применение как природных, так и синтетических иммуномодуляторов для регулирования иммунной активности становится все более популярным в лечении различных заболеваний, включая инфекционные и онкологические [159]. Растительные полисахариды, являясь естественными экзогенными иммуномодуляторами, проявляют широкий спектр терапевтической активности и могут использоваться как нутрицевтики [160]. Эти вещества также находят применение в иммунотерапии и вакцинации, а их иммуностимулирующие свойства делают их полезными в качестве адьювантов и средств для заживления ран [161].

Окислительный стресс представляет собой дисбаланс между избыточной продукцией активных форм кислорода и их нейтрализацией защитными механизмами организма, что может способствовать развитию хронического воспаления. Этот процесс активирует различные транскрипционные факторы, что, в свою очередь, вызывает измененную экспрессию генов, участвующих в воспалительных реакциях. Окислительный стресс, как причина воспаления, играет ключевую роль в патогенезе множества хронических заболеваний [162]. В связи с этим, полифенолы были предложены в качестве перспективной дополнительной терапии благодаря своим антиоксидантным и противовоспалительным свойствам, а также способности ингибировать ферменты, которые участвуют в синтезе эйкозаноидов [163, 164, 165]. Изучение механизма действия полифенолов в контексте их воздействия на воспаление и окислительный стресс, а также их роль в блокировке молекулярных сигнальных путей, активируемых окислительным стрессом, может предоставить важные данные для разработки новых антиоксидантных и противовоспалительных препаратов.

2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

2.1 Объект исследования

Объектами исследования научной работы являлись периферическая кровь, один из центральных органов иммунной системы – тимус, клетки селезенки – спленоциты, кожные покровы с моделированным асептическим воспалением и брыжеечные лимфатические узлы лабораторных животных (крыс).

Гипотеза научной работы: *если* в исследовании будет использован комплексный подход, позволяющий установить количественный и качественный профиль иммунокомпетентных клеток в центральных и периферических органах иммуногенеза и крови, а также выявить причинно-следственные связи между кадмиево-свинцовым воздействием и изменениями активации иммунных звеньев, *то* это позволит сформировать представление о роли металлиндуцированной иммунодепрессии в механизме развития воспалительного процесса и разработать новые пути патогенетической коррекции выявленных нарушений.

2.2 Условия и характер проведения экспериментов

В ходе проведения исследования были учтены все надлежащие нормы, согласно защите прав, благополучия и полной безопасности объектов исследования.

Весь объем выполненных научных работ проводился в соответствии с Приказом Министра здравоохранения РК (от 11.12.2020 №255/2020), Европейской конвенцией о защите прав позвоночных животных, используемых в экспериментальных и других научных целях (2012).

Также, при оценке острой и подстрой общей токсичности испытуемых веществ, мы руководствовались «Руководством по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ» (Р.У. Хабриева, 2005 год Москва).

Во всех проведенных экспериментах с животными обращались в строгом соответствии с надлежащей практикой обращения с животными, установленной соответствующими международными и государственными правилами защиты животных. Крыс содержали в обычных условиях (комнатная температура 22,5–23,0 °С, относительная влажность 50–70 %, 12-часовой цикл день/ночь) при свободном доступе к пище и воде. Для проведения всех этапов экспериментальных работ получено положительное заключение локальной этической комиссии КазНМУ имени С.Д. Асфендиярова протокол №3 (94) от 25.03.2020 года.

Диссертационная работа была выполнена в рамках 2-х научных проектов:

1. «Роль CD4+CD25+FOXP3+Tregs в регуляции воспалительного процесса: металлиндуцированные механизмы иммуносупрессии и поиск новых методов патогенетической коррекции в эксперименте» (научный руководитель Балабекова М.К., 2019-2021), источник финансирования – НАО КазНМУ. Лабораторные исследования по договору оказания услуг сторонних организаций был проведен в РГП «Институте молекулярной биологии и биохимии им. М.А. Айтхожина», совместно с сотрудниками лаборатории молекулярной иммунологии и иммунобиотехнологии.

2. Финансирование исследований молодых ученых по проектному гранту «Жас ғалым» (МНиВО РК) «Механизмы нарушения регуляции воспаления под влиянием химических экотоксикантов и новые способы их патогенетической коррекции», сроки реализации 2022-2024 гг. Исследования выполнены в лаборатории «Life Science» НИИ ФиПМ им. № Б№А№ Атчабарова

2.3 Дизайн эксперимента

Для постановки эксперимента были использованы 150 особей половозрелых не линейных самцов-крыс с массой тела 170 – 250 грамм (± 15 грамм).

Сам дизайн эксперимента состоит из основных 8 серий:

- Интактные животные (*ИЖ*)
- Животным моделировали скипидар-индуцированное асептическое воспаление (*AB*)
- Животные подвергались предварительной затравке солями тяжелых металлов (*Металлы*)
- Животным моделировали скипидар-индуцированное асептическое воспаление с предварительной затравкой солями тяжелых металлов Ацетата свинца и Хлорида кадмия (*AB+Металлы*)
- Группа животных с моделированным асептическим и эталонным лечением (*AB+Полиоксидоний*)
- Группа животных с моделированным асептическим и экспериментальным лечением (*AB+Комплекс*)
- Группа животных с моделированным асептическим воспалением и с предварительной затравкой солями тяжелых металлов и эталонным лечением (*Me+AB+Полиоксидоний*)
- Группа животных с моделированным асептическим воспалением и с предварительной затравкой солями тяжелых металлов и экспериментальным лечением (*Me+AB+Комплекс*)

Все опытные группы животных были разделены на 2 срока исследования: на 7 и 14 сутки эксперимента.

Предварительная комбинированная затравка солями тяжелых металлов (хлоридом кадмия и ацетатом свинца) проводилась каждый день в течение двух недель перорально с помощью металлического зонда (доза 2,5 мг/кг м.т.).

После выбривания шерсти и обработки кожи 70% этанолом подкожно введено 0,3 мл скипидарного масла. Моделирование асептического воспаления животным осуществлялось по окончании недельной затравки ХК и АС, после чего продолжается недельная затравка.

Патогенетическая коррекция начинается сразу после моделирования асептического воспаления – эталонным препаратом Полиоксидоний и экспериментальным соединением производного пиперазина МХФ-20.

Терапевтическая доза Полиоксидония составляет 0,008 мг на 100 г. крысы.

Используемая разовая доза смеси солей тяжелых металлов основывается результатами проведения научных работ и многолетним опытом школы экологической патофизиологии в Казахстане (профессор Нурмухамбетов А.Н.) (рисунок 5).

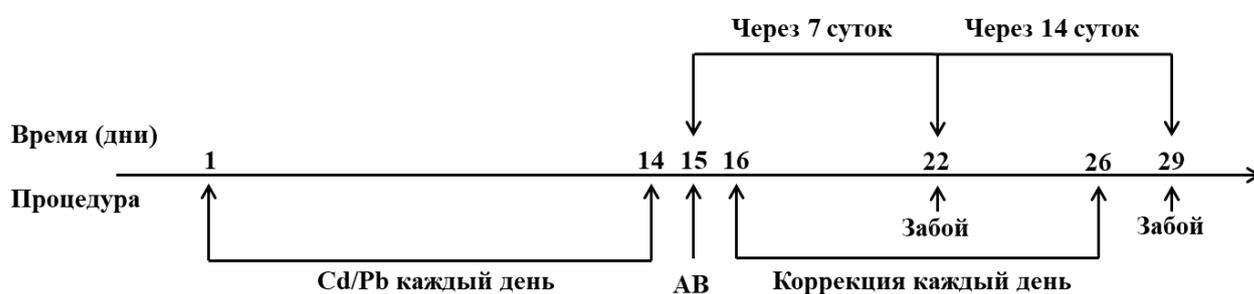


Рисунок 5 – План эксперимента

В ходе выполнения работ проводилась комплексная оценка состояния организма лабораторных животных: поведения животных, ориентация в пространстве, состояния шерстяных покровов, нарушение стула и т.д.

В журнале регистрации эксперимента осуществлялась оценка общего состояния лабораторных животных: фото-видео съемка, запись активных или, наоборот, чрезмерно замедленных жизненных показателей крыс, визуальный мониторинг состояния кожных и слизистых покрытий, состояние функционирования внутренних органов опытных животных.

По происшествию двух недель отравления тяжелыми металлами опытным животным эксперимента сразу моделировали асептическое воспаление. Забор биологических материалов (периферическая кровь и ткани-мишени (селезенка, тимус, брыжеечные лимфатические)) проводился через 7 и 14 суток с момента моделирования асептического воспаления.

Крысам под анестезией Золетил-Ксилазином проводили предварительную премедикацию атропином (по 10 животных в каждом сроке).

Для проведения дальнейших современных научных исследований мы ориентировались на выборе правильных методов научной работы (иммунологических, гематологических и микроскопических): для данных целей, после гуманного умерщвления животных методом декапитации, у экспериментальных крыс забирали брыжеечные лимфатические узлы, селезенку, тимус, и периферическую кровь.

Для патогенетической коррекции применяли новое биологически активное химическое соединение – Комплекс под лабораторным шифром МХФ-20 (1-[1-(2,5-диметоксифенил)-4-(нафталин-1-илокси)бут-2-инил]-4-метилпиперазин в комплексе с β -CD), синтезированный в АО «Институт химических наук имени А.Б. Бектурова» под руководством д.х.н., профессора В.К. Ю. По результатам проведенного исследования данное новое биологически активное химическое соединение – Комплекс было запатентовано (патент на полезную модель: «Соединение 1-[1-(2,5-диметоксифенил)-4-(нафталин-1-илокси)бут-2-инил]-4-метилпиперазин в комплексе с β -циклодекстрином, обладающее иммуномодулирующей активностью» от 07.06.2024, № 36782 РГП «Национальный институт интеллектуальной собственности»).

Терапевтическая доза Комплекса составила 325 мг/кг м.т., способ введения подкожно. Для приготовления разовой дозы был следующий расчет:

на крысу с весом 230 г.:

100 г. лабораторного животного = 3,25 мг. соединения,

для лабораторного животного весом 200 г. разовая доза = 6,5 мг

для приготовления раствора необходимо было 100 мг соединения растворить в 5 мл 0,9 % NaCl, где 0,5 мл раствора содержит 10 мг соединения.

Следовательно, для нашей крысы весом необходимо было 0,58 мл раствора.

В качестве эталонного препарата был выбран Полиоксидоний. Полиоксидоний является признанным иммуномодулятором с хорошим эффектом. Разовая терапевтическая доза Полиоксидония, согласно инструкции по применению, для взрослого человека весом 75 кг составляет 6 мг. Следовательно,

100 г. лабораторного животного = 0,008 мг. соединения,

для лабораторного животного весом 200 г. разовая доза = 0,016 мг.

Далее 0,8 мг препарата растворяли в 10 мл физиологического раствора, где в 0,1 мл раствора содержалось 0,008 мг препарата для крысы весом 100 г.

2.4 Определение острой токсичности Комплекса

Для проведения оценки корригирующей эффективности новой экспериментальной патогенетической терапии было использовано новое химическое соединение из ряда производных пиперазина 1-[1-(2,5-диметоксифенил)-4-(нафталин-1-илокси)бут-2-инил]-4-метилпиперазин (Комплекс включения (Комплекс)) под лабораторным шифром МХФ-20.

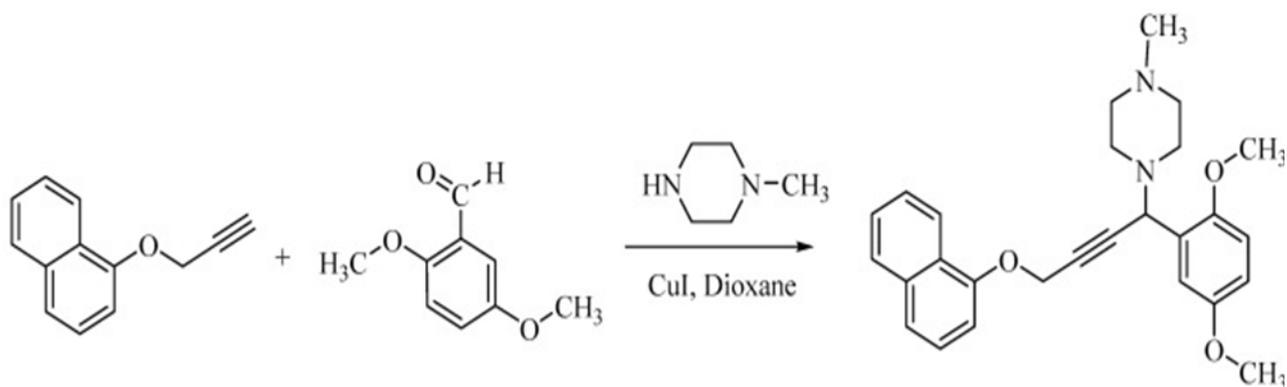


Рисунок 6 – Синтез нового 1-(1-(2,5-dimethoxyphenyl)-4-(naphthalene-1-улоху)but-2-yn-1-yl)-4-methyl-piperazine [167]

Оценка токсичности нового химического соединения является необходимым и обязательным этапом при изучении фармакологических свойств препарата, тем самым являясь гарантом безопасности для лабораторных животных, и в дальнейшем, и для самих пациентов. В нашем исследовании нового биологически-активного соединения Комплекса проводилась оценка острой и подострой токсичности (ЛД50) согласно с «Методическим руководством по экспериментальному изучению фармакологических веществ» [168] и в рамках дозволенных методов, рекомендованными Фармакологическим комитетом Республики Казахстан и руководством по изучению новых фармакологических веществ [169].

Вся экспериментальная часть исследования по изучению острой токсичности нового соединения Комплекса проходила на базе вивария и фармакологической лаборатории НИИ ФиПМ имени Б. Атчабарова совместно диссертанта с сотрудниками кафедры фармакологии КазНМУ имени С.Д. Асфендиярова.

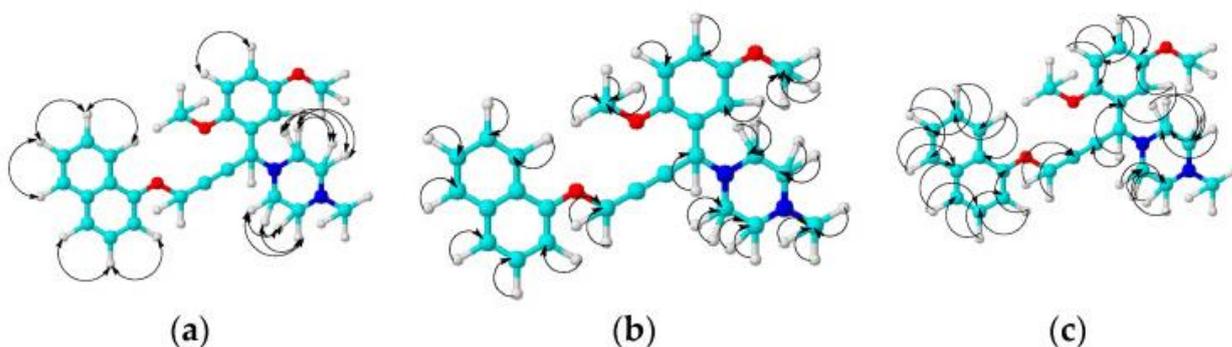


Рисунок 7– The structural correlations COSY (a), HMQC (b) and HMBC (c) in NMR spectra of new 4-naphthoxybutynylamine derivative [167].

Для постановки эксперимента были отобраны 84 белых мышей.

Мыши находились в специализированном помещении для содержания животных, отвечающим стандартным правилам условия содержания с полным доступом к воде и еде. Экспериментальные группы животных формировались методом случайной выборки с учетом массы тела. Масса тела беспородистых мышей колебалась от 15 г. до 25 г. Порядок идентификации особей: маркировка животных по группам производилась с помощью красителей соответственно имеющимся рекомендациям, способ умерщвления животных – декапитация. Летальная доза (ЛД₅₀) рассчитывалась с помощью методов Литчфилда и Уилкоксона для определения ЛД₅₀ – дозы, вызывающей гибель 50% подопытных животных [170]. Токсичность вещества определялась на основе показателя ЛД₅₀ [171]. Основной способ введения препаратов – подкожно и внутривентриально.

Для гистоморфологического анализа случайным образом было отобрано по одному животному из каждой группы. После вскрытия умерших мышей печень и почки полностью извлекали, разделяли на фрагменты размером 0,5 см в толщину и 1-1,5 см в длину, которые помещали в буферный раствор 10%-го формалина. Затем ткани печени и почек фиксировали в 10%-м нейтральном формалине, обезвоживали в спиртах возрастающей концентрации, заливали в парафин и изготавливали серийные срезы толщиной 5 мкм с помощью микротомы.

Для гистологического анализа срезы окрашивали гематоксилином и эозином. При микроскопическом исследовании основное внимание уделялось гистоморфологическим изменениям в печени и почках у подопытных животных, проводилась сравнительная оценка выявленных изменений в этих органах.

Обсуждение результатов

Фиксировались особенности внешних проявлений интоксикации, скорость их возникновения и факт наступления смерти животного. После введения исследуемых веществ в токсических дозах у животных отмечалось выраженная заторможенность с нарушением координации движения, низкая двигательная активность. Физикально наблюдали достаточно выраженные признаки дыхательной и сердечно-сосудистых недостаточностей. Наблюдалось учащенное дыхание с началом патологического дыхания по типу Куссмауля. У животных взъерошенная шерсть, тонико-клонические судороги. У 2 животных из экспериментальной группы фиксировались признаки пареза задних лапок. У опытных мышей наблюдалось изменение поведения – низкий уровень социальности у животных, начали забиваться по углам, слабо реагировать на внешние раздражители, низкий интерес к окружающей среде.

Выжившие мыши к концу дня начали приобретать ясное сознание, что выражалось в активном поведении, выходили из заторможенного состояния. Состояние животных контролировалось до полного восстановления в течение 7 дней. Органы погибших животных были направлены на гистоморфологическое исследование [172].

Таблица 1 – Летальные эффекты в зависимости от доз подкожным введением химического соединения Комплекс

Доза							
1500	1550	1600	1650	1700	1750	1800	
6/6	5/6	4/6	3/6	2/6	1/6	0/6	← Живые
0/6	1/6	2/6	3/6	4/6	5/6	6/6	← Умершие
Интеграция							
21	15	10	6	3	1	0	← Живые
0	1	3	6	10	15	21	← Умершие
21	16	13	12	13	16	21	
21	16	13	12	13	16	21	
0	6,3	23	50	77	94	100	Сумма % смерти

Таблица 2 – Летальные эффекты в зависимости от доз внутривнутрибрюшинным введением химического соединения Комплекс

Доза							
1300	1350	1400	1450	1500	1550	1600	
6/6	5/6	4/6	3/6	2/6	1/6	0/6	← Живые
0/6	1/6	2/6	3/6	4/6	5/6	6/6	← Умершие
Интеграция							
21	15	10	6	3	1	0	← Живые
0	1	3	6	10	15	21	← Умершие
21	16	13	12	13	16	21	
21	6,3	13	12	13	16	21	
0	6,3	23	50	77	94	100	Сумма % смерти

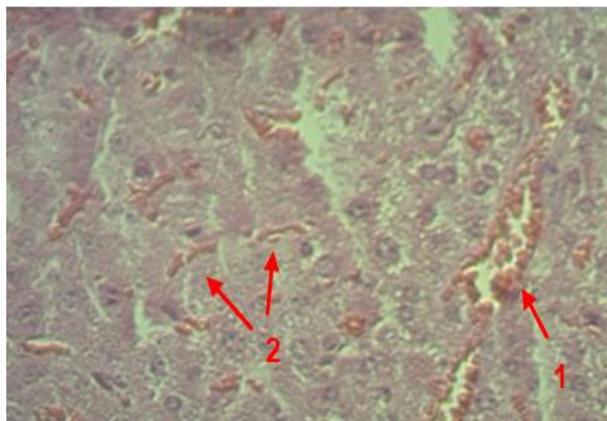
Таблица 3 – Определение острой токсичности нового соединения и препарата сравнения [172]

Соединение, препарат	ЛД ₅₀ (мг/кг)	
	Подкожное введение	Внутрибрюшинное введение
МХФ-20	1625±20,3	1340±16,6
«Ибупрофен» [173]	1518±6,0	1220±9,3

Внутренние органы (печень и почки) погибших животных были подвергнуты некроскопическому исследованию для выявления патологических изменений, возможно, ставших причиной их гибели.

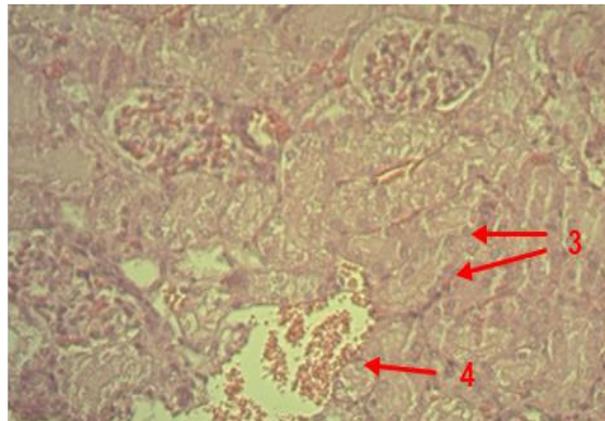
При микроскопическом исследовании печени (рисунок 8) у группы мышей, получавших Комплекс в дозе 1500 мг п/к, показал некротические изменения ткани с выраженным отеком клеток и видимые нарушения кровотока (полнокровие центральных вен и синусоидов).

А



Полнокровие синусоидов, дистрофия
и некроз гепатоцитов

Б



Дистрофия и некроз эпителия
канальцев на фоне нарушения
кровообращения.

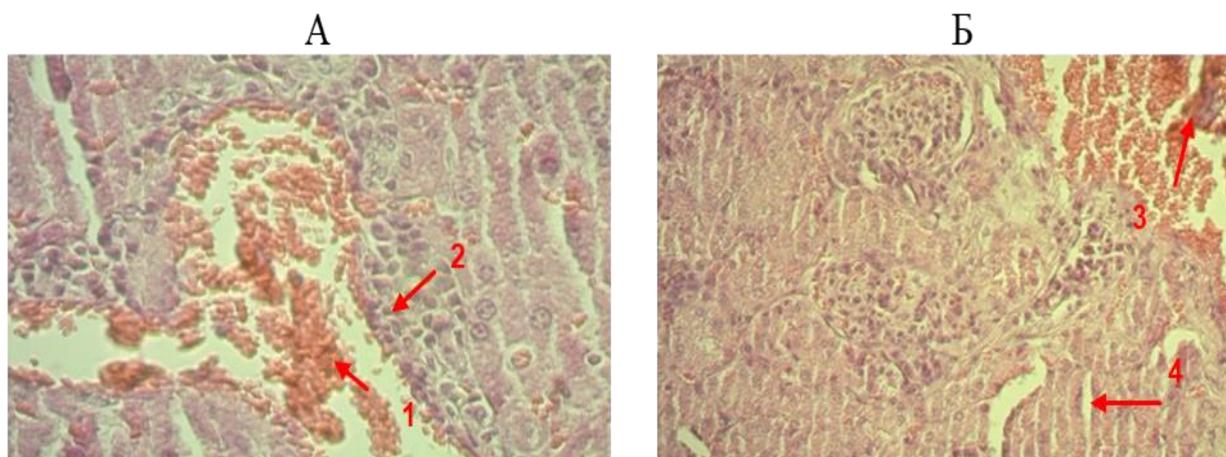
Рисунок 8 – Микроскопическое исследование печени и почек мышей, подкожно получавших Комплекс в дозе 1500 мг [172]

Микроскопический анализ почек (рисунок 8 Б) у мышей, получавших Комплекс в дозе 1500 мг п/к, отмечалась гидропическая дистрофия и очаговый некроз эпителия канальцев, представленные с частичной утратой ядер в эпителиях канальцев, нарушения кровообращения в виде резкого расширения и полнокровия сосудов, с выраженным отеком и очагами кровоизлияния в строму.

При микроскопическом исследовании печени (рисунок 8 А) у группы, получавшей Комплекс в дозе 2000 мг п/к, отмечалась выраженная гидропическая вакуольная дистрофия и очаговый некроз гепатоцитов, выраженный отек и нарушения кровообращения в виде расширения и полнокровия центральных вен, вокруг центральных вен отмечается очаги кровоизлияния.

При микроскопическом исследовании почек (рисунок 9 Б) у мышей, получавших Комплекс в дозе 2000 мг п/к, наблюдались гидропическая, вакуольная дистрофия и тотальный некроз эпителия канальцев, представленные полями безъядерных канальцев, нарушения кровообращения в виде резкого расширения и полнокровия сосудов, с отеком стромы.

Таким образом, у животных, выживших в течение 24 часов после введения Комплекса изменения, имеют более насыщенный характер, так как у них развивалась морфологическая картина острой токсической дистрофии печени и некротический нефроз почек.



А
Нарушения кровообращения с
пролиферацией Купферовских клеток

Б
Некроз эпителия канальцев,
нарушения кровообращения

Рисунок 9 – Микроскопическое для печени и почек, подкожно получавших Комплекс в дозе 2000 мг [172]

Имеется массивный цитолиз, обширные очаги некроза гепатоцитов, в виде тотального некроза, без образования фиброзных изменений стромы, в почках гидрочическая, вакуольная дистрофия, выраженный и тотальный некроз эпителия канальцев. Также сохраняются зоны вакуольной дистрофии, изменения ядер гепатоцитов, с выраженным увеличением количества Купферовских клеток и их гиперплазией.

Общая оценка состояния животных, микроскопический анализ органов-мишеней, а также данные токсикометрии могут свидетельствовать о слабой токсичности соединения Комплекс. Следовательно, новое соединение можно отнести к V классу токсичности, то есть к практически нетоксичным фармакологическим средствам (таблица 4).

Таблица 4 – Классификация токсичности веществ по К.К. Сидорову [172, 174].

Класс токсичности	Степень токсичности	Средняя смертельная доза (мг/кг) при введении:	
		под кожу	в брюшную полость
1	Чрезвычайно токсично	$\leq 0,3$	$\leq 0,2$
2	Высоко токсично	0,4-15	0,3-10,0
3	Умеренно токсично	16-150	11-100
4	Мало токсично	151-1500	101-1000
5	Практически нетоксично	1501-4500	1001-3000
6	Относительно безвредно	>4500	>3000

Концентрация вещества в группах с патогенетической коррекцией Комплексом составила 325 мг/кг массы тела.

2.5. Лабораторные методы

2.5.1 Иммунологические исследования

Исследования проводились с использованием акустически фокусирующего проточного цитофлуориметра Attune™ NxT (Thermo Fisher Scientific, Уолтем, Массачусетс, США) и иммуноферментного анализатора спектрофотометра для микропланшетов Thermo Scientific Multiskan FC.

В ходе постановки экспериментов использовали следующие реактивы: физиологический раствор (PBS), лизирующий раствор FACS для лизиса эритроцитов – Cyto Fix Fixation Buffer (BD Biosciences, Маунтин-Вью, Калифорния, США), APC-меченные CD3 (0,1 мг, BD Biosciences, Калифорния, США), Cy CD4, меченный Chrome™ (0,1 мг, BD Biosciences, Калифорния, США), меченный PerCP CD8a (0,1 мг, BD Biosciences, Калифорния, США), PE-меченный CD11b/c (0,2 мг, BD Biosciences, Калифорния, США), FITC-меченые гранулоциты (0,5 мг, BD Biosciences, Калифорния, США), FITC-меченный анти-His48 (BD Biosciences, Калифорния, США), меченный FITC CD4 (0,5 мг, BD Biosciences, Калифорния, США), наборы для ИФА Rat ELISA Kit IL-6, 1 beta, TGF beta, 10 (R&D Systems), физиологический раствор 0,9% (ТОО «Келун-Казфарм», Казахстан), нейлонные фильтры с ячейками размером 70 микрометров (Fisherbrand™, Великобритания), готовый реагент для лизиса эритроцитов High-Yield Lyse (Invitrogen™, Испания), реагент для фиксации клеток CytoFix Fixation Buffer (BD Biosciences, США), PerCP-labeled anti-CD8a (BD Biosciences), FITC-labeled anti-His48 (BD Biosciences), PE-labeled anti-CD11b/c (BD Biosciences).

2.5.1.а Получение клеточной суспензии спленоцитов с помощью метода однородного размельчения.

В первый период проведения экспериментальных работ использование стеклянного гомогенизатора с PBS не дал нужного эффекта. На клеточном анализаторе мы получали критически малое количество клеток. Возможно, сделанный на заказ стеклянный гомогенизатор для данной работы не подошел, и при размельчения тканевой массы разрушались большое количество цельных клеток.

В данный момент такие вопросы решены, и нами удачно получаются выделение клеток на стеклянных поверхностях с использованием нейлоновых мембран. Гомогенизированная клеточная суспензия проходит по этапную отмывку.

2.5.1.б Приготовление буферных растворов.

Представленный фосфатно-солевой буфер (PBS) используется для приготовления отмывочного буферного раствора. Для приготовления 1 л PBS,

готовили 100 мл 10X PBS к 900 мл воды. Данный раствор PBS содержит 137 мм NaCl, 2,7 мм KCl, 10 мм Na₂HPO₄ и 1,8 мм KH₂PO₄ с соответствующим уровнем pH. Необходимо соблюдение стерильности самих растворов, и в этих целях используют жаровой шкаф, до и после пропуская через стерильный мембранный фильтр с диаметром пор 0,22 мкм, и хранили в холодильнике при +4-8°C.

2.5.1.в Проточная цитофлуориметрия.

Для работы на проточном цитометре были использованы разнообразные коммерческие наборы моноклональных и поликлональных антител (Таблица 2.1).

Перед выделением клеток из половины или трети органа размером 0,5 см × 2 см, селезенка крыс помещалась в 0,5 мл холодного физиологического раствора (ТОО «Келун-Казфарм», Казахстан). К измельчённой суспензии ткани добавляли 4,5 мл холодного физиологического раствора, после фильтрование через одноразовые нейлонные фильтры с ячейками размером 70 микрометров (Fisherbrand™, Великобритания), и затем центрифугирование при 400 G в течение 5 минут, максимально отбирали надосадочную жидкость, не тревожа осадок.

Подготовка и окрашивание спленоцитов для проточной цитометрии. После выделения клеток селезенки, размером 0,5 × 2 см (половина или треть селезёнки), максимально отбирается надосадочная жидкость без осадка. В дальнейшем проводится лизис эритроцитов с помощью 2 мл раствора High Yield Lyse. По прошествии 10 минут, с предварительным перемешиванием раствора, спленоциты находятся в растворе, аккуратно отбирается жидкость в микропробирки, не затрагивая кусочки ткани, большие фрагменты взвеси и прочие элементы раствора. Центрифугирование проводится при 500 RCF в течение 5 минут с добавлением 2 мл 0,9% физиологического раствора. К готовой суспензии клеток добавляется смесь антител с 0,9% физиологического раствора, хорошо перемешаются и инкубируются 30 минут при +4 градусах в холодильнике. Раствор для фиксации/пермеабелизации клеток готовится из 1,5 мл Foxp3 Fixation/Permeabilization Concentrate и 4,5 мл Foxp3 Fixation/Permeabilization Diluent, инкубирование в течении 30 минут при комнатной температуре в темноте. В целях подготовки буферного раствора пермеабелизации готовится смесь из 5,1 мл 10 X Permeabilization Buffer и 45,9 мл дистиллированной воды. Добавляется по 1,5 мл Permeabilization buffer (разведённый до 1X), центрифугируют при 400 RCF 5 минут, отбирая надосадочную жидкость. Отмывка проводится трехкратно с последующим центрифугированием при 500 RCF в течение 5 минут, надосадочную жидкость удаляют. Инкубируют при комнатной температуре в течение 30 минут. Добавляется 500 мкл 0,9% физиологического раствора, осадок перемешивается вортексированием или пипетированием. Результаты анализируются на проточном цитометре.

Таблица 5 – Антитела для проточного цитофлуориметра

Антитела	Флюорохром	Производитель	Клоны	Код категории
CD4	PerCP-eFluor™ 710	eBioscience™	OX-35	46-0040-82
CD25	APC	eBioscience™	OX-39	17-0390-82
FOXP3	FITC	eBioscience™	FJK-16s	11-5773-82
CD152 (CTLA-4)	R-PE	eBioscience™	WKH203	12-1520-82
CD45	PE	eBioscience™	OX-1	12-0461-80
CD8a	PerCP-eFluor™ 710	eBioscience™	OX-8	46-0084-82
CD3	APC	eBioscience™	eBioG4.1 8 (G4.18)	17-0030-82
CD11b/c	PE	eBioscience™	OX-42	12-0110-82
CD45R (B220)	PE-Cyanine7	eBioscience™	HIS24	25-0460-82
RT1.B	FITC	eBioscience™	OX-6	MA517430
KLRB1	PE	eBioscience™	10-78	MA517540
Granulocyte Marker	FITC	eBioscience™	HIS48	11-0570-82
IFN gamma	eFluor™ 660	eBioscience™	DB-1	50-7310-80

2.5.1.г Программное обеспечение проточного цитофлуориметра

Функционирование цитомера с акустической фокусировкой Attune™ NxT контролируется программным обеспечением Attune™ NxT Cytometry Software, версия 6.0.1 (Thermo Fisher Scientific). Программное обеспечение предварительно установлено на компьютерную рабочую станцию, поставляемую с цитомером с акустической фокусировкой Attune™ NxT, и значок программного обеспечения Attune™ NxT размещается на рабочем столе компьютера. Программное обеспечение Attune™ NxT представляет собой универсальный инструмент для сбора и анализа данных, который использует иерархическое представление: проектирование и проведение экспериментов, определение независимых настроек прибора и оптимизация сбора данных, проведение проверок производительности прибора и отслеживание производительности прибора, получение и запись данных, управление и обработка записанных данных.

Анализ данных проводился по принципу общей стратегии гейтирования.

2.5.1.д Иммуноферментный анализ

Для определения количества про – и противовоспалительных цитокинов в сыворотке крови экспериментальных животных работали на оборудовании

иммуноферментного анализатора спектрофотометра для микропланшетов Thermo Scientific Multiskan FC. Были использованы коммерческие наборы ИФА для различных целей научных работ, согласно инструкциям от фирм-производителей. Материалом для иммуноферментного анализатора спектрофотометра служили замороженные сыворотки крови крыс. После предварительной разморозки биоматериала, подготавливали специальные планшеты на 96 лунок. Далее размороженные сыворотки периферической крови вносят на лунки микропланшетов. После анализируется на иммуноферментном анализаторе с помощью построения калибровочных кривых.

2.5.3 Гематологические исследования

Для определения количества форменных элементов крови, содержания гемоглобина, эритроцитов, ретикулоцитов, лейкоцитов, тромбоцитов были использованы следующие гематологические оборудования и расходные материалы: автоматический гематологический анализатор HumaCount 60TS, портативный гематологический анализатор DH 26 (производство DYMIND), пробирки специальные на 2 мл, 5 мл, лизирующие растворы Lytic reagent, поршень лизина для гематологического анализатора Z110, изотонический разбавитель PCE-210, ферментативный очиститель MicroCC-20Plus Периферическую кровь забирали в стерильные пробирки с антикоагулянтом.

2.5.4 Микроскопическое исследование

Микроскопическое исследование проводили в целях оценки морфологических изменений тимуса, брыжеечных лимфатических узлов и очага воспаления в тканях кожного покрова лабораторных крыс. При микроскопическом исследовании материала особое внимание мы обращали на изучение гистоморфологической картины фрагмента кожного покрова в области инъекций, так как развивался очаг воспаления, представленный гнойно-некротическими изменениями, также ткань тимуса и брыжеечных лимфатических узлов. Фрагменты ткани размером 0,5 см толщиной, длиной 1-1,5 см помещали на забуференный 10%-й формалин. После чего кусочки ткани фиксировали в 10 % растворе нейтрального формалина, обезвоживали в спиртах восходящей крепости, заливали в парафин, затем на микротоме готовили серийные срезы толщиной 5 мкм. Для гистологического метода исследования срезы окрашивали гематоксилином и эозином и пикрофуксином по Ван Гизону.

После полученные препараты исследуют на световом микроскопе с высоким разрешением. Был использован слепой полуколичественный метод с оценкой от 0 до 3 баллов (0 – нет патологии, 1 – слабая, 2 – средняя, 3 – сильно выраженная патология), продолжающееся асептическое воспаление оценивали по размеру некротической зоны, припухлости мягких тканей, лейкоцитарной инфильтрацией, разрастанием кровеносных сосудов и фибробластов.

2.6 Статистическая обработка данных

По результатам проведенных исследований описание количественных показателей производилось с помощью ППП STATISTIKA 7,0, SPSS версия 16 с использованием параметрических и непараметрических методов с помощью U-критерия Манна-Уитни, Вилкоксона, описание качественных признаков с использованием критерия Хи-квадрат Пирсона или двустороннего точного критерия Фишера, многофакторный логистический регрессионный анализ с использованием методики со свободным членом, без свободного члена, с последовательным включением и исключением независимых переменных. Использовали программу Excell, для построения графических изображений применяли программное обеспечение GraphPad Prism версия 10, выпущенное Graphpad Software.

3. РЕЗУЛЬТАТЫ СОБСТВЕННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ

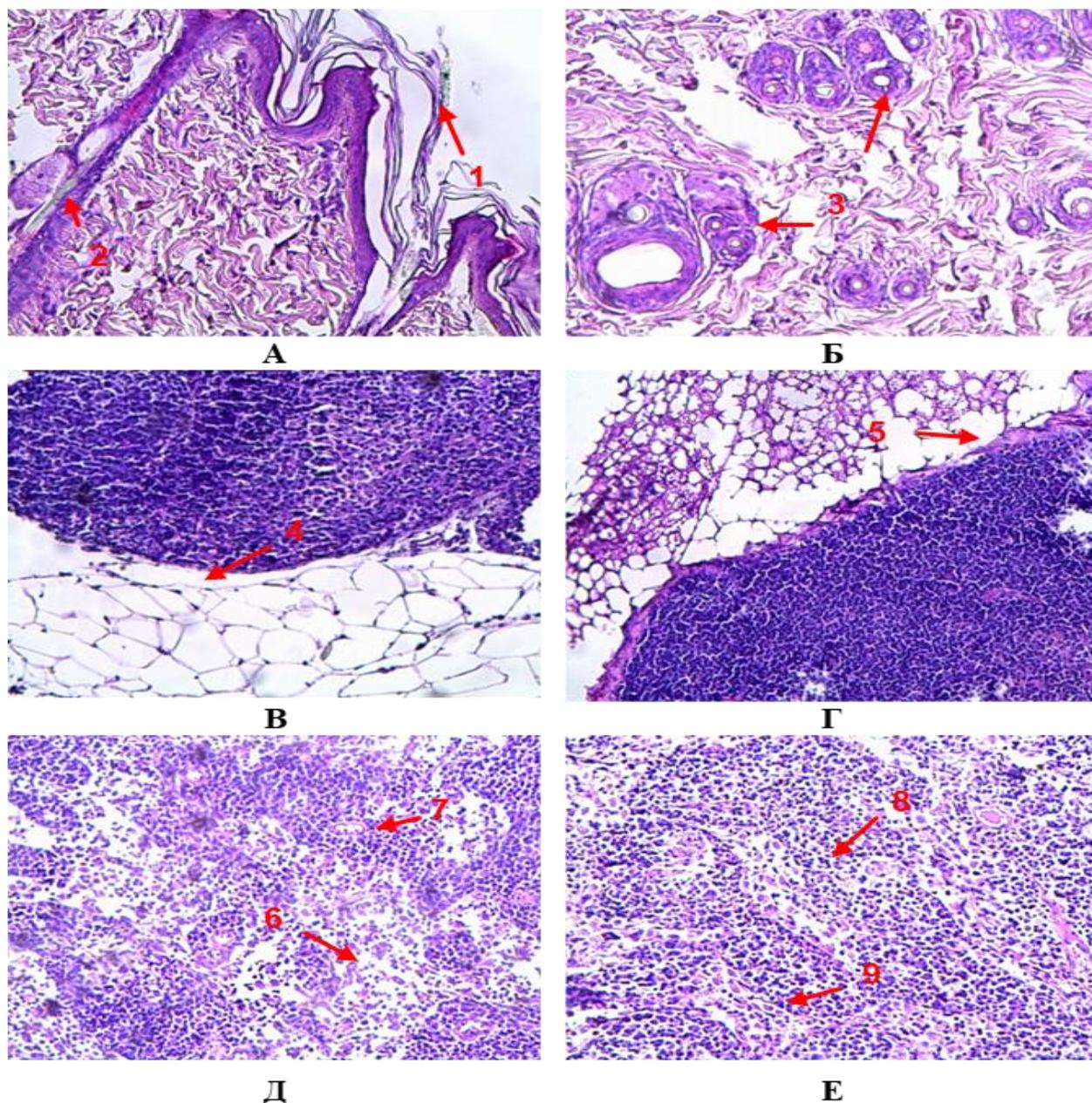
3.1. Экспериментальное изучение лимфоорганов ткани воспаления опытных крыс с экспериментальным воспалением

Через 7 суток после развития асептического воспаления был произведен забор органов (тимус, брыжеечные лимфатические узлы, кожа из очага воспаления) для проведения морфологических исследований с целью выявления в них последствий развития воспаления. Выявленные изменения сравнивались с органами интактных (контрольных) крыс.

При микроскопическом исследовании материала особое внимание обращали на изучение гистоморфологической картины фрагмента ткани кожного покрова в области инъекций с очагом воспаления, представленные гнойно-некротическими изменениями, также тимуса и брыжеечных лимфатических узлов.

На рисунке 10 представлены образцы ткани органов здоровой крысы. При световой микроскопии тимус здоровых крыс имел дольчатую структуру с равномерными по размеру долями. Соединительнотканная капсула и междольковые перегородки были тонкими и гладкими, не доходя до границы коркового и мозгового вещества, и содержали отдельные фиброциты, фибробласты и кровеносные сосуды. В периваскулярных пространствах наблюдались макрофаги, эпителиоциты и лимфоциты, выстроенные в цепочку. Корковое и мозговое вещества четко различались: корковое было темным, а мозговое — светлым, при соотношении их площадей около 2,5:1. Субкапсулярная зона коры содержала крупные лимфоциты, расположенные в 1-2 слоя, в то время как глубокие слои состояли из малых и средних тимоцитов. На границе с мозговым веществом сосредоточивались средние лимфоциты. В мозговом веществе были выявлены единичные тимические тельца (Гассалья), а более светлый вид был обусловлен меньшим количеством лимфоцитов. В кровеносных сосудах наблюдались участки плазмостаза, эритростаза и лимфостаза, а в окружающей жировой ткани — микрогеморрагии с лимфоцитами.

Брыжеечные лимфатические узлы имели капсулу, состоящую из коллагеновых волокон, с небольшим количеством фибробластов, фиброцитов и гладкомышечных клеток. Трабекулы имели схожее строение и содержали кровеносные сосуды. Корковая часть была насыщена клетками и представлена лимфоидными фолликулами, в то время как медуллярная часть была более рыхлой и состояла из тяжелой лимфоцитов и плазмоцитов. Кожа крыс состоит из многослойного плоского эпителия, а в дерме присутствуют корни волос, сальные и потовые железы и гладкие мышцы. Подкожный слой образован рыхлой соединительной тканью с жировыми включениями.



Примечание: А – кожный покров через 7 суток, определяется эпидермис (1), состоящий из плоского многослойного эпителия, в дерме располагаются корни волос (2). Б – кожный покров через 14 суток, сальные и потовые железы (3), а также фрагменты гладких мышц. Подкожный слой состоит из рыхлой соединительной ткани. В – тимус через 7 суток, дольчатое строение органа, окружающая жировая ткань (4). Г – тимус через 14 суток, междольковые перегородки тонкие, гладких очертаний. В окружающей жировой ткани диапедез эритроцитов с примесью лимфоцитов (5). Д – брыжеечные лимфоузлы через 7 суток, мозговая часть более рыхлой структуры (6), в ней меньше клеток и больше сосудов (7). Е – брыжеечные лимфоузлы через 14 суток, мозговая часть состоит из скопления лимфоцитов (8), среди них нередко обнаруживаются плазмоциты (9). Окраска: гематоксилином и эозином $\times 200$.

Рисунок 10 – Микроскопическая картина тимуса, брыжеечных лимфоузлов, кожи интактных крыс через 7 и 14 сутки эксперимента.

Кровеносные сосуды заполнены неравномерно, местами отмечены плазмостазы и эритростазы.

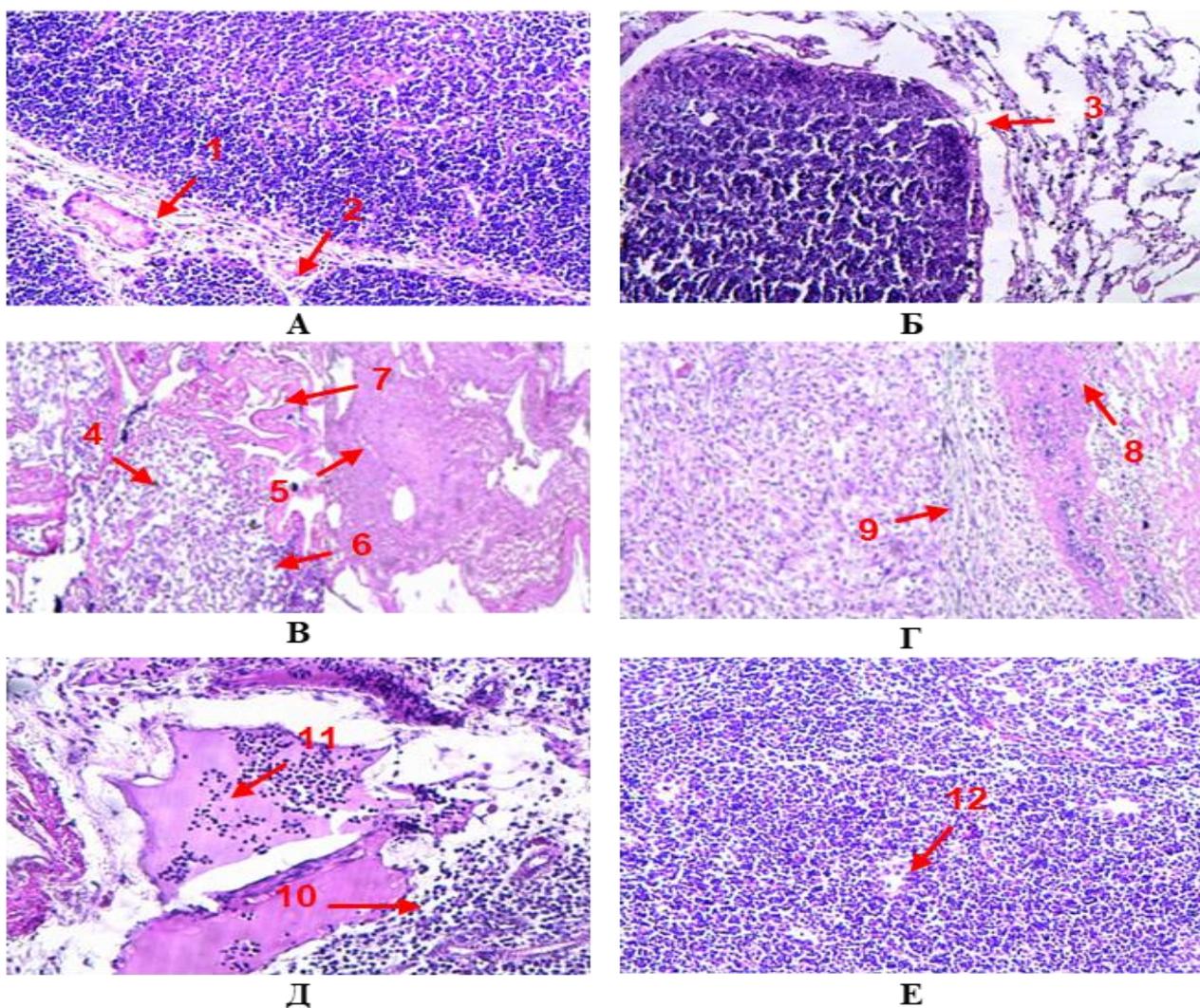
Таким образом, морфологические особенности тимуса, лимфатических узлов и кожи у крыс контрольной группы соответствуют норме, и патологических изменений не выявлено. На следующем рисунке 11 представлена макроскопическая картина кожного покрова – очага воспаления со скипидар-индуцированным воспалением на 7 и 14 сутки эксперимента.

На следующем рисунке 11 представлена микроскопическая картина тимуса, брыжеечных лимфоузлов, очага воспаления со скипидар-индуцированным воспалением через 7 и 14 суток эксперимента.

Микроскопическое исследование срезов тимуса, проведенное через неделю после моделирования АВ, показало отек стромы, расширение перикапиллярных пространств и отек соединительной ткани между дольками. В интерстициальных и лимфоидных зонах наблюдалось полнокровие сосудов микроциркуляторного русла, микрогеморрагии с проникновением нейтрофилов и лимфоцитов, а также апоптоз лимфоцитов. Через 14 суток сохранялся отек капсулы тимуса, отмечалось уменьшение количества лимфоцитов в корковом слое, коллапс ретикулярной сети долек и сокращение числа мелких тимических телец. Кровеносные сосуды оставались частично полнокровными, с мелкими кровоизлияниями, включающими лейкоциты и лимфоциты.

В брыжеечных лимфатических узлах через 7 суток наблюдалось увеличение больших и средних лимфоцитов, сокращение числа малых лимфоцитов, а также присутствие единичных плазматических клеток. Было отмечено значительное количество макрофагов, нейтрофилов и эозинофилов, что свидетельствовало о активной клеточной воспалительной реакции. Через 14 суток содержание всех форм лимфоцитов уменьшилось, сохранялись единичные плазматические клетки, а количество нейтрофилов оставалось повышенным, хотя и с тенденцией к снижению, что указывало на постепенное ослабление воспаления и продолжающийся клеточный и гуморальный иммунный ответ.

При исследовании кожных покровов через 7 суток вокруг очага некроза была выявлен обширный отек. Выраженная лейкоцитарная инфильтрация обнаружена в зоне реактивного воспаления. По краям зоны воспаления, где открывалась нормальная ткань обнаружены фибробласты. Также определялись умеренное количество моноцитов. Напротив, гистиоциты и эозинофилы были представлены в большом количестве. На фоне многочисленных капилляров коллагеновые волокна располагались горизонтально. К концу второй недели исследования зона с некрозом заметно уменьшалась, на ее краях преобладали моноциты и лейкоциты, а также сформировалась зрелая грануляционная ткань с утолщением соединительнотканевой капсулы.



Примечание: А – тимус, через 7 суток, перикапиллярные пространства увеличены, наблюдается отек междольковой соединительной ткани тимуса (1), интерстициальные пространства были расширены (2). Б – тимус, через 14 суток в структуре капсулы тимуса сохраняется явления отека (3). В – кожный покров – очаг воспаления, через 7 суток. На границе с некрозом отмечался выраженный отек, лейкоцитарная инфильтрация (4). Широкое поле некроза (5), лейкоцитарная инфильтрация (6), зона на границе с окружающей нормальной тканью состояла из фибробластов, тонких коллагеновых волокон (7), небольшое количество моноцитов, больше гистиоцитов, эозинофильных лейкоцитов. Г – кожный покров – очаг воспаления, через 14 суток, зона некроза (8) стало чуть меньше, чем в предыдущем сроке. Капсула вокруг некроза несколько утолщена, в ней преобладала зрелая грануляционная ткань (9) с формированием соединительно-тканной капсулы. Д – брыжеечные лимфоузлы, через 7 суток, клеточные проявления воспалительной реакции (10), отек (11). Е – брыжеечные лимфоузлы, через 14 суток. В брыжеечном лимфатическом узле через 14 сутки отмечается нормальное строение лимфоузла с нечеткими фолликулами, видны несколько плазматических клеток (12). Окраска: гематоксилином и эозином х 200. [175, 176]

Рисунок 11 – Микроскопическая картина тимуса, брыжеечных лимфоузлов, очага воспаления крыс со скипидар-индуцированным воспалением через 7 и 14 сутки эксперимента

В микропрепаратах срезов кожного покрова с воспалением во всех экспериментальных группах использовали слепой полуколичественный метод с оценкой от 0 до 3 баллов (0 – нет патологии, 1 – слабая, 2 – средняя, 3 – сильно выраженная патология), продолжающееся асептическое воспаление оценивали по наличию патологических показателей, различающихся по размеру (таблица 6).

Таблица 6 – Характеристика очага воспаления по патологическим показателям животных групп К, АВ, Ме/АВ через 7 и 14 суток после моделирования асептического воспаления

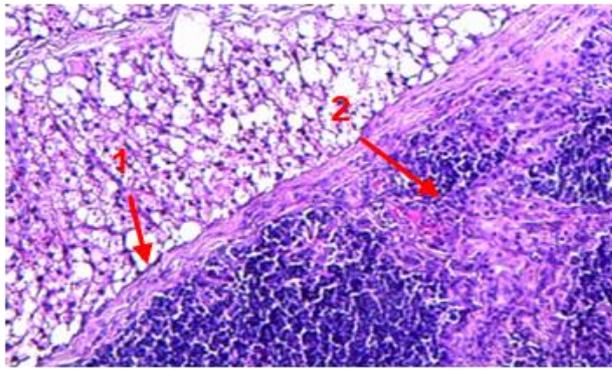
Баллы в группах (для каждой группы, n = 6)	Патологические показатели			
	Некротический очаг	Отек мягких тканей	Лейкоцитарная инфильтрация	Пролиферация сосудов, фибробластов
	(Минимум-максимум)			
	Через 7 суток			
К	(0-0)	(0-0)	(0-0)	(0-0)
АВ	(1-3)*	(1-3)*	(1-3)*	(0-2)*
Ме/АВ	(3-3)**+	(2-3)**+	(1-3)*	(0-0)+
	Через 14 суток			
К	(0-0)*	(0-0)*	(0-0)*	(0-0)*
АВ	(0-2)*	(0-2)*	(0-3)*	(1-3)*
Ме/АВ	(2-3)**+	(2-3)**+	(2-3)**+	(0-1)+

*Примечание: значимые различия, оцененные с помощью однофакторного дисперсионного анализа, определяются как: *p < 0,01 к К; +p < 0,01 к Ме/АВ. ^p < 0,01 к Ме/АВ.*

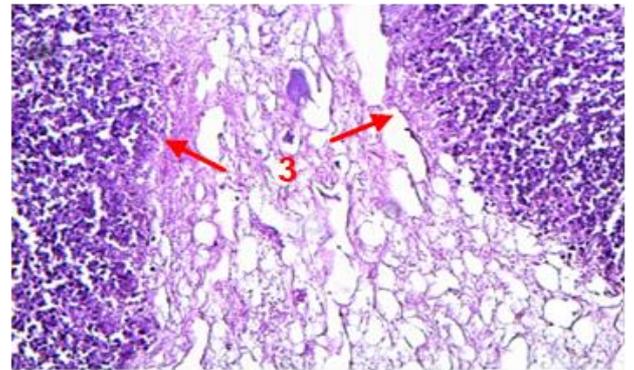
Количественные показатели патологических изменений в очаге воспаления групп АВ и Ме/АВ в оба срока исследования были статистически значимо выше по сравнению с интактными животными ($p < 0,01$). На 7 и 14 сутки после инициации асептического воспаления группа Ме/АВ характеризовалась выраженными размерами некротического очага, отеком мягких тканей и отсутствием пролиферации мелких сосудов по сравнению с крысами SI ($p < 0,01$).

Таким образом, в ходе морфологических исследований было установлено, что на фоне асептического воспаления у экспериментальных животных происходит прогрессирующее снижение клеточности лимфоидных органов, что подчеркивает важность дальнейшего сравнения этой группы с группой Ме/АВ.

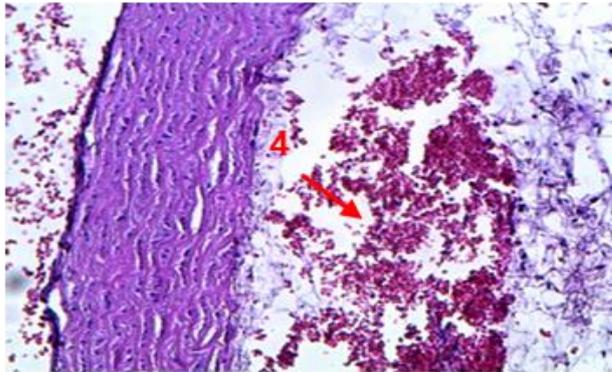
На рисунке 12 представлена микроскопическая картина тимуса, брыжеечных лимфоузлов, очага воспаления со скипидар-индуцированным воспалением на фоне предварительной интоксикации солями ацетата свинца и хлорида кадмия через 7 и 14 суток эксперимента.



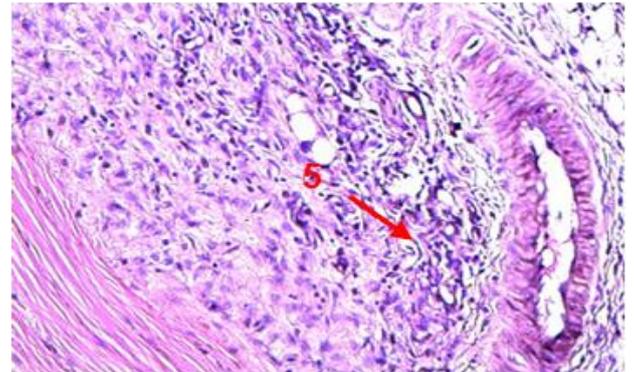
А



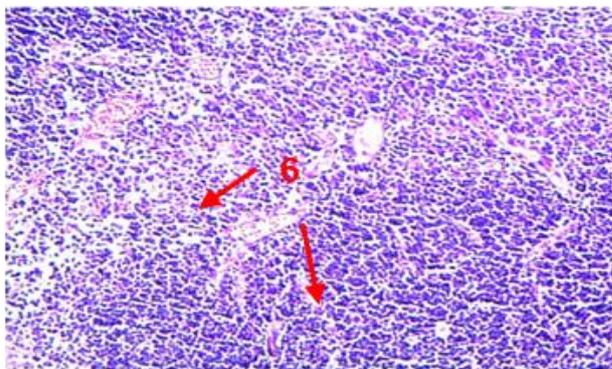
Б



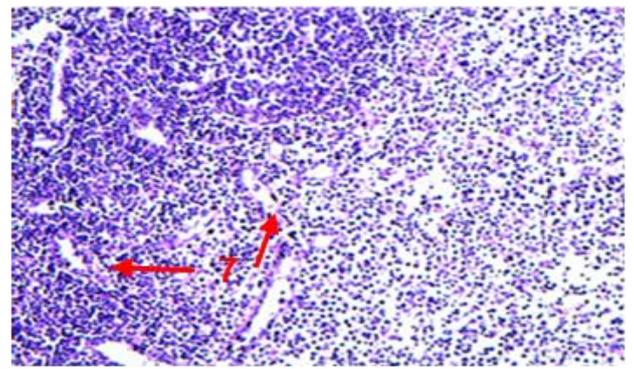
В



Г



Д



Е

Примечание: А – тимус, через 7 суток, уменьшение количество лимфоцитов. Местами обедненная лимфоцитами паренхима выглядит однородной, поскольку в дольках нет их четкого разделения. Отмечается отек капсулы (1) и трабекул (2). Б – тимус, через 14 суток, опустошена субкапсулярная зона долек тимуса (3), строма ее отечна. В – кожный покров – очаг воспаления, через 7 суток. Очаг кровоизлияния в подкожно-жировую клетчатку (4). Г – кожный покров – очаг воспаления, через 14 суток, незрелая соединительная ткань (5), состоящая из фибробластов. Д – брыжеечные лимфоузлы, через 7 суток, отмечается дистрофические и некротические изменения клеток (6). Е – брыжеечные лимфоузлы, через 14 суток. Обнаружено много тонкостенных сосудов капиллярного типа (7). Окраска: гематоксилином и эозином x 200.

Рисунок 12 – Микроскопическая картина тимуса, брыжеечных лимфоузлов, очага воспаления со скипидар-индуцированным воспалением на фоне предварительной интоксикации солями ацетата свинца и хлорида кадмия через 7 и 14 сутки эксперимента

При светооптическом исследовании тимуса через 7 и 14 суток было выявлено снижение числа лимфоцитов как в корковом, так и в мозговом веществе. В некоторых участках лимфоцитарная паренхима становилась однородной, что приводило к исчезновению четкой границы между дольками. Субкапсулярная зона долек тимуса была опустошена, а строма в этой области проявляла признаки отека. В данной области обнаруживались макрофаги, гистиоциты, лимфоциты, небольшое количество нейтрофилов и эозинофилов, а также единичные тучные клетки и свободные эритроциты. В строме и вокруг капилляров отмечались признаки регенерации. Наблюдалась соединительную ткань в фазе формирования. Просвет сосуда суживался за счет отека эндотелиального слоя. Окружающая соединительная ткань выглядела отечной, с небольшими скоплениями тучных клеток. Также в мозговом веществе тимуса, субкапсулярной зоне и междольковой соединительной ткани были обнаружены лаброциты, в то время как тельца Гассалья почти не визуализировались.

Микроскопическое исследование брыжеечных лимфоузлов у крыс с асептическим воспалением через 7 и 14 суток после воздействия металлов (ХК+АС) показало снижение числа лимфоцитов в маргинальной зоне, что приводило к её осветлению. Через 7 суток были зафиксированы дистрофические и некротические изменения в клетках, а доля лимфоидных узелков с центрами размножения уменьшалась. С 14 суток на микропрепаратах лимфатического узла наблюдались диапедезные кровоизлияния, стаз и полнокровие сосудов. Также было отмечено увеличение доли клеток с признаками дегенеративных изменений. Вокруг сосудов и в строме происходило разрастание соединительной ткани, а размер лимфоидных узелков с центром размножения постепенно уменьшался, аналогичные изменения происходили и в центрах размножения. Кроме того, была зафиксирована утолщение капсулы и трабекул лимфоидных узелков.

При исследовании кожных покровов крыс через 7 суток была обнаружена обширная зона гнойно-некротического воспаления вокруг инъекций. На границе с некрозом наблюдались выраженный отек и лейкоцитарная инфильтрация. Зона воспаления, примыкающая к нормальной ткани, была диффузно инфильтрирована лейкоцитами, включая сегментоядерные нейтрофилы и эозинофилы, а также содержала обширные участки кровоизлияний. В зоне некроза происходил распад тканей с образованием гнойно-некротического детрита. Через 7 суток зона некроза оставалась, но в ней уже присутствовали небольшие количества фибробластов, тонких коллагеновых волокон и моноцитов, в то время как количество гистиоцитов оставалось высоким. Также в этой области наблюдалось значительное количество тонкостенных капилляров. На границе с некрозом преобладали фибробласты и фиброциты, а в центре некроза находились колонии микробов. Капсула вокруг некроза утолщалась, с преобладанием зрелой грануляционной ткани, что свидетельствовало о процессе формирования соединительнотканевой капсулы.

3.2. Экспериментальное изучение показателей периферической крови у крыс с экспериментальным воспалением, предварительно затравленных солями кадмия и свинца

Иммунотоксическое действие исследованных соединений солей тяжелых металлов ацетата свинца и хлорида кадмия зависит от множества различных факторов. Периферическая кровь, как из важных показателей гомеостаза организма, одним из первых сталкивается с их повреждающим действием. Общее количество лейкоцитов являются одними из основных участников регуляции воспалительного ответа. Мембранные рецепторы нейтрофилов распознают молекулы, связанные с асептическим повреждением тканей. Эти молекулы инициируют активацию иммунной системы [177]. Тяжелые металлы, такие как свинец и кадмий, оказывают негативное влияние на организм. Они могут приводить к стойким и необратимым сбоям в иммунной регуляции.

Исследование механизмов адаптации организмов к воздействию экотоксикантов является важным направлением науки. Особое внимание уделяется поиску веществ, способных нормализовать метаболизм и блокировать патологические свободнорадикальные процессы [178]. Одним из ключевых факторов токсического действия тяжелых металлов является окислительный стресс. Этот процесс вызывает повреждение клеток организма из-за активных окислительных реакций. Ионы свинца и кадмия инициируют образование избытка активных форм кислорода. Это приводит к цепным реакциям окислительной деградации биомолекул. В результате происходит перекисное окисление липидов клеточных мембран, что нарушает их структуру и повышает проницаемость.

Исследование проводили на 4 группах животных. Первая группа представляла собой интактных животных, не подвергавшихся никакому воздействию (контрольные животные, К). Второй группе вводили под кожу скипидар, вызывая асептическое воспаление (АВ). Третья группа получала перорально смесь ХК и АС в течение двух недель ежедневно из расчета 2,5 мг/кг массы тела перорально (Ме). Четвертой группе вводили скипидар после двухнедельного курса введения солей тяжелых металлов (Ме+АВ) [179].

Поскольку количественные показатели клеточных компонентов крови являются прямым отражением состояния иммунной системы, в этом разделе работы будут представлены и обсуждены результаты исследованных параметров крови у животных всех групп в оба срока исследования.

Результаты анализа параметров крови всех исследуемых групп животных представлены в таблице 7. Исследования были проведены через 7 и 14 дней после завершения воздействия соединениями тяжелых металлов и моделирования асептического воспаления.

В результате проведенных исследований был проанализирован количественный состав периферической крови опытных животных. Изучение у крыс с асептическим воспалением проводилось на комбинированного

воздействия ацетата свинца и хлорида кадмия. Объектами исследования явились компоненты периферической крови.

У животных группы Me/AB, подвергшихся воздействию ацетата свинца и хлорида кадмия, уровни показателей белой крови были в два раза ниже, чем у животных группы AB. Эти различия имели статистическую значимость.

В группе AB воспалительный процесс сопровождался выраженным увеличением количества всех фракций лейкоцитов, что значительно превосходило показатели контрольной группы.

Таблица 7 – Количественные показатели периферической крови для групп AB, ME/AB

Клеточный состав крови	Группы, М (СО), n=10 (*p)				
	К	AB	р	Me/AB	р
7 суток					
Лейкоциты, $\times 10^3/\mu\text{L}$	9,6 (2,0)	15,1 (2,1)	0,009 ^a	4,3 (0,7)	0,009 ^a 0,001 ^b
Эритроциты, $\times 10^3/\mu\text{L}$	8,1 (0,4)	7,9 (0,6)	-	7,5 (0,3)	-
Hb, g/L	138,0 (2,2)	136,5 (9,3)	-	122,00 (5,9)	0,008 ^a 0,045 ^b
RDW-SD, fL	29,9 (2,3)	31,1 (2,8)	-	33,7 (1,4)	0,038 ^a
RDW-CV, %	20,8 (1,8)	20,5 (1,5)	-	22,3 (1,0)	
Нейтрофилы, $\times 10^3/\mu\text{L}$	1,2 (0,1)	4,3 (1,3)	0,016 ^a	1,58 (0,4)	0,019 ^b
Лимфоциты, $\times 10^3/\mu\text{L}$	6,4 (1,2)	9,4 (0,8)	0,009 ^a	2,6 (0,3)	0,004 ^a 0,000 ^b
Моноциты, $\times 10^3/\mu\text{L}$	0,4 (0,2)	1,2 (0,5)	0,041 ^a	0,4 (0,2)	0,038 ^b
Эозинофилы, $\times 10^3/\mu\text{L}$	0,1 (0,1)	0,3 (0,1)	0,039 ^a	0,2 (0,1)	-
14 суток					
Лейкоциты, $\times 10^3/\mu\text{L}$	9,6 (2,0)	14,6 (4,1)	-	4,1 (1,6)	0,006 ^a 0,010 ^b
Эритроциты, $\times 10^3/\mu\text{L}$	8,1 (0,4)	8,5 (0,1)	-	8,1 (0,5)	-
Hb, g/L	138,0 (2,2)	139,2 (1,6)	-	131,3 (11,2)	-
RDW-SD, fL	29,9 (2,3)	34,3 (1,7)	0,023 ^a	36,0 (1,8)	0,006 ^a
RDW-CV, %	20,8 (1,8)	23,5 (0,5)	0,048 ^a 0,019 ^f	24,1 (1,0)	0,024 ^a
Нейтрофилы, $\times 10^3/\mu\text{L}$	1,2 (0,1)	3,3 (1,0)	0,018 ^a	1,1 (0,7)	0,009 ^b
Лимфоциты, $\times 10^3/\mu\text{L}$	6,4 (1,2)	4,03 (0,5)	-	2,6 (1,0)	0,003 ^a 0,013 ^b
Моноциты, $\times 10^3/\mu\text{L}$	0,4 (0,2)	1,0 (0,6)	-	0,4 (0,2)	-
Эозинофилы, $\times 10^3/\mu\text{L}$	0,1 (0,1)	0,4 (0,2)	0,031 ^a	0,1 (0,0)	0,043 ^a 0,017 ^b

*Примечание: * p – по T-test, статистическая значимость: a – к Контролю; b – к AB; f – к 7 суткам*

Проанализировав количественные гематологические показатели у экспериментальных животных, мы установили, что течение воспаления у крыс группы Me/AB сопровождалось количественным снижением лейкоцитов в ответ на развитие асептического воспаления (таблица 7). В первую неделю исследования в картине крови крыс, предварительно затравленных кадмием и свинцом, наблюдали снижение в 2.2 раза от контроля общего количества лейкоцитов ($M=4.3$, $CO=0.7$; $pK=0.009$) преимущественно за счет лимфоцитов, значения которых оказались в 3 раза ниже контроля ($M=2.6$, $CO=0.3$; $pK=0.003$). Между тем, к этому сроку исследования показатели лейкоцитов, лимфоцитов, моноцитов и нейтрофилов группы AB были существенно выше показателей группы Me+AB в 3,5 раза ($M_{лейкоциты}=15.2$, $CO=2.2$; $pMe/AB=0,009$), 4.3 раза ($M_{лимфоциты}=9.4$, $CO=0.8$; $pMe/AB<0,0001$), 3 раза ($M_{моноциты}=1.2$, $CO=0.5$; $pMe/AB=0.0038$) и 2.7 раза ($M_{нейтрофилы}=4.3$, $CO=1.3$; $pMe/AB=0.004$) соответственно. Таким образом, период разгара воспаления у крыс группы Me+AB сопровождался резким снижением уровня лейкоцитов, особенно лимфоцитов. Следует подчеркнуть, что в группе Me/AB общее содержание лейкоцитов, а также лимфоцитов не достигли контрольного уровня даже спустя 14 суток развития воспаления.

Результаты проведенных исследований показали, что на протяжении обоих суток исследования воспалительный процесс у экспериментальных животных сопровождался выраженной гипореактивностью нейтрофилов.

Предполагаемые механизмы воздействия кадмия и свинца на процесс эритропоэза включают нарушение синтеза гема, накопление железа и регуляцию выработки эритропоэтина (ЭПО). Экспериментальные и острые исследования показали, что кадмий и свинец снижают способность крови переносить кислород и нарушают процесс образования эритроцитов [180, 181]. Также было установлено, что кадмий и свинец препятствуют всасыванию железа, что способствует возникновению анемии. Интоксикация свинцом ассоциируется с изменением формы эритроцитов, аномалиями в составе порфирина и нормобластов, а также базофильной зернистостью. Кадмий, вероятно, уменьшает усвоение железа в желудочно-кишечном тракте, однако исследования относительно влияния перорального воздействия кадмия на анемию дают противоречивые результаты. Кадмий накапливается в органах, ответственных за выработку ЭПО, таких как почки, и, как показали исследования, дозозависимо влияет на синтез ЭПО. ЭПО играет важную роль в регуляции эритропоэза, однако при хроническом отравлении кадмием его уровень не повышается, несмотря на выраженную анемию.

В наших исследованиях в динамике течения воспаления наблюдали снижение содержания гемоглобина в сравниваемых группах исследования (Me/AB, AB), что предполагает развитие анемии (таблица 7). Так, изменений абсолютного количества эритроцитов ни в один из исследованных сроков обнаружено не было. Между тем, соли кадмия и свинца уже через 7 суток вызывали снижение содержания гемоглобина в группе Me/AB, статистически значимая разница которого от группы AB составила 8,8% ($p=0,045$). Через 14

суток содержание гемоглобина в группе Me/AB вернулось к исходному уровню. Картина красной крови у крыс, подвергнутых воздействию солей тяжелых металлов, была характерна для микроцитарной анемии.

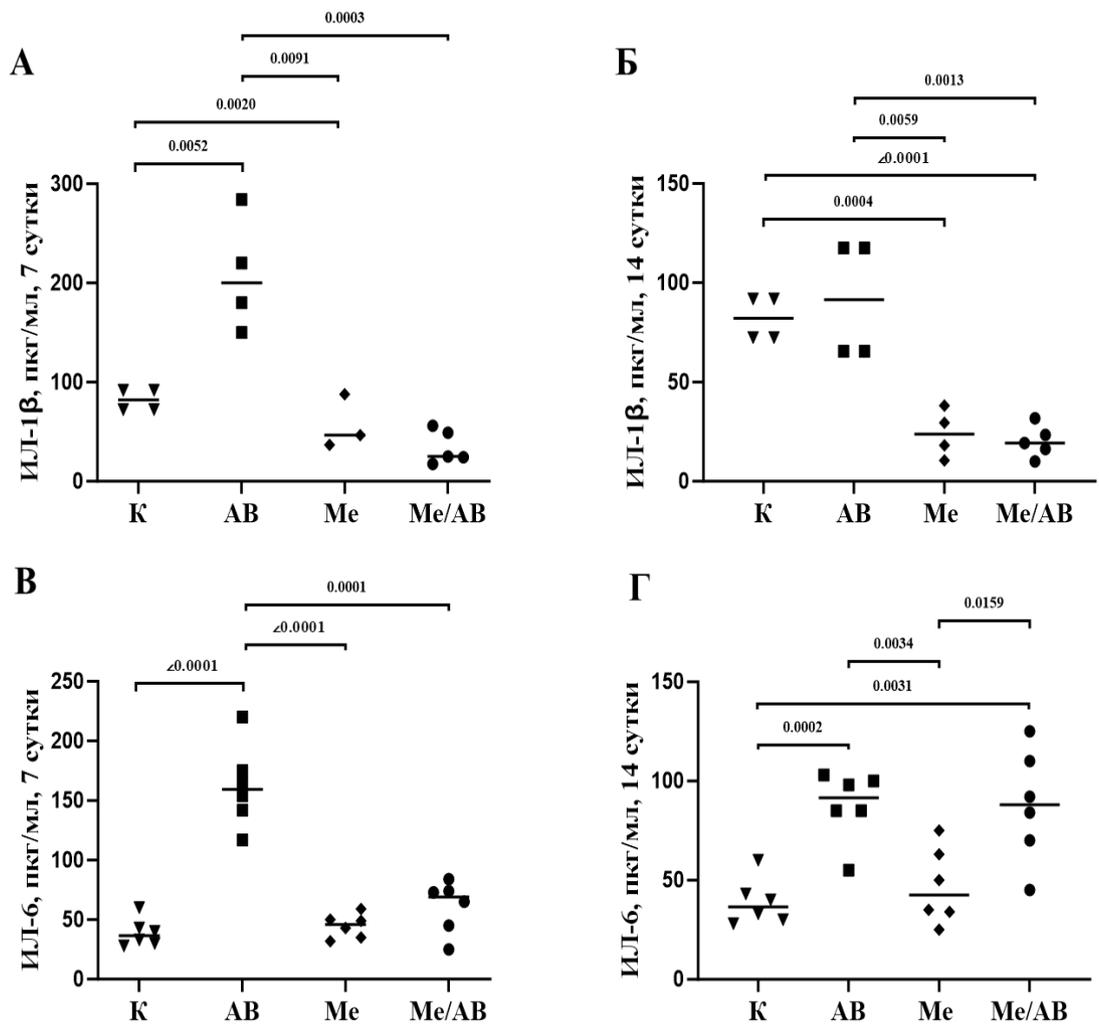
Исследование размера эритроцитов является ярким показателем нестабильности эритроцита. Обычно определяют ширину. Повышение ширины эритроцита (RDW) свидетельствует о гемолизе эритроцитов, либо недостатке железа с питательными веществами [182]. В нашей работе в первую неделю исследования в картине крови крыс группы Me/AB наблюдали увеличение на 7,2% RDW-CV, значения которых через 14 суток превышали показатели контрольной группы на 15,9% ($p=0,024$) (таблица 7).

Согласно существующим данным, в патогенезе анемии, развивающейся при комбинированном воздействии солей тяжелых металлов, ключевую роль могут играть нарушения синтеза порфиринов, снижение продукции глобина, в частности альфа-цепи, а также ускоренное разрушение эритроцитов [183].

Свинец инактивирует дегидратазу δ -аминолевулиновой кислоты, фермент, который катализирует соединение двух молекул аминолевулиновой кислоты с образованием порфобилиногена. Это приводит к накоплению δ -аминолевулиновой кислоты в моче. Дополнительно свинец ингибирует различные стадии синтеза порфиринов. Снижение активности гемсинтетазы, фермента, ответственного за включение железа в порфириновое кольцо, вызывает повышение уровня копропорфирина в моче. В эритроблестах и зрелых эритроцитах наблюдается накопление не утилизованного железа, которое образует гранулы и способствует их превращению в сидеробласты и сидероциты. Однако механизмы воздействия свинца на ферменты, участвующие в порфириновом обмене, до сих пор недостаточно изучены. Важным аспектом является не только прямое влияние ацетата свинца на активность этих ферментов, но и его воздействие на их синтез в таких органах, как костный мозг, печень и почки, которые служат основными депо свинца.

3.3. Экспериментальное изучение показателей сывороточных цитокинов у крыс с экспериментальным воспалением, предварительно затравленных солями кадмия и свинца

На следующем этапе работы мы оценивали влияние тяжелых металлов на уровень провоспалительных цитокинов ИЛ-6 и ИЛ-1 β (рисунок 13). В данном исследовании подчеркивается значимость цитокинов ИЛ-1 β и ИЛ-6 как ключевых регуляторов воспалительного процесса. Эти провоспалительные цитокины играют важную роль в усилении воспалительного ответа, обеспечивая активацию эффекторных иммунных клеток, их пролиферацию и дифференцировку. ИЛ-1 β и ИЛ-6 также участвуют в запуске острого воспаления и формировании системного ответа организма на воспалительные стимулы, что делает их важными для оценки и управления воспалительными процессами.



Обобщенные данные представлены в виде $M \pm CO$. Достоверность различий представлена как $*p < 0,05$.

Рисунок 13 – Содержание ИЛ-1β и ИЛ-6 в сыворотке периферической крови опытных крыс с асептическим воспалением.

Уровень ИЛ-1β и ИЛ-6 в сыворотке животных оценивали через 7 и 14 суток после подкожного введения скипидара или металлов методом ИФА. Через 7 суток в группе АВ в развитии асептического воспаления отмечали достоверное повышение более чем в 2 раза уровня ИЛ-1β в сыворотке крыс по отношению к контролю ($M=208.5$, $CO=58.0$; $p_K=0.0052$ против контроля $M=82.2$, $CO=11.2$) (рисунок 13 А). Под влиянием металлов в группе Me, а также после моделирования воспаления в группе Me+AB уровень ИЛ-1β существенно отставал от АВ соответственно в 3,6 раза ($M=57.1$, $CO=27.0$; $p_{AB}=0.0091$) и 6,1 раза ($M=34.4$, $CO=17.0$; $p_{AB}=0.0003$). Через 14 суток в группе АВ уровень ИЛ-1β в сыворотке крыс вернулся к контрольным значениям, тогда как в группах Me и Me+AB оставались на уровне предыдущего срока исследования (рисунок 13 Б).

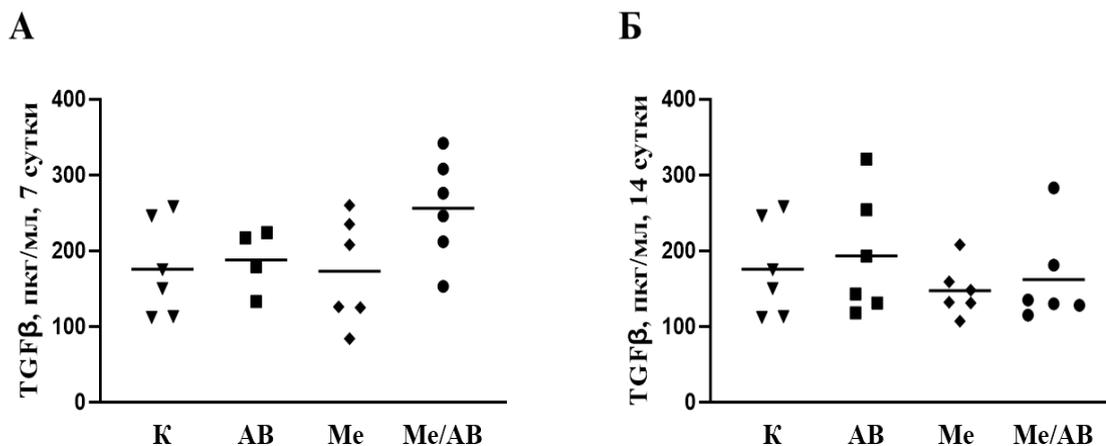
ИЛ-6 является цитокином, который быстро и временно продуцируется в ответ на внедрение патогенов и повреждение тканей, играя важную роль в

защите организма. Этот цитокин стимулирует кроветворение и инициирует острую фазу воспаления, помогая организму эффективно противостоять инфекциям и повреждениям. Его синтез жестко регулируется на уровне транскрипции и посттранскрипции. Однако нарушение этих механизмов может привести к нарушению синтеза ИЛ-6, что наблюдается при хронических воспалительных процессах и онкологических заболеваниях, что делает его ключевым маркером патологических изменений в воспалительном ответе.

Изменения уровней ИЛ-6 через 7 суток исследования во всех группах оказались аналогичными уровням ИЛ-1 β (рисунок 13 В). Однако через 14 суток воспалительная реакция в группе Me+AB сопровождалась сопоставимыми с группой АВ значениями ИЛ-6 (рисунок 13 Г).

В группе АВ через 7 суток наблюдался пик уровня ИЛ-1 β , что указывает на активную фазу воспалительного ответа. Тем не менее, в группах, подвергшихся интоксикации тяжелыми металлами (Me и Me/AB), наблюдается значительное снижение уровня ИЛ-1 β , что указывает на подавляющий эффект кадмия и свинца на активацию цитокинов и воспалительных реакций.

Изучение противовоспалительной активности TGF β в сыворотке периферической крови крыс не выявило каких-либо изменений, которым можно было дать сравнительную оценку между группами (Рис.3.9 А, Б).



Обобщенные данные представлены в виде $M \pm CO$. Достоверность различий представлена как $*p < 0,05$.

Рисунок 14 – Содержание TGF β в периферической крови экспериментальных крыс с асептическим воспалением.

По данным проведенных исследований цитокинов заключено, что снижение уровня ИЛ-1 β и ИЛ-6 в группах с интоксикацией тяжелыми металлами, в сравнении с группой АВ, может указывать на нарушение регуляторных процессов, что, вероятно, обусловлено подавлением пролиферации иммунных клеток и усилением апоптоза под влиянием токсичных

веществ. На 14-й день уровня ИЛ-6 в группе Me+AB приблизился к показателям группы AB, что может говорить о восстановлении частичной активности воспалительного ответа под влиянием металлов. Однако уровень ИЛ-1 β в этой группе так и не достиг значений, близких к контрольным, что указывает на затяжной, но недостаточный восстановительный процесс при продолжающемся токсическом воздействии. Общая картина данных показывает, что кадмий и свинец не только подавляют синтез ИЛ-1 β и ИЛ-6, но и, вероятно, препятствуют полноценному развитию воспалительного ответа, что может создавать предпосылки для хронического воспаления и более глубоких нарушений иммунной функции. Подавление ИЛ-1 β и ИЛ-6 при интоксикации тяжелыми металлами свидетельствует о нарушении естественных защитных механизмов и изменении привычного течения воспалительного процесса, что может иметь долгосрочные последствия для иммунной системы и общей устойчивости организма к воспалительным стимулам. Уровень противовоспалительного цитокина TGF β не показал значимых изменений, что не позволяет судить о его роли в реакции на воздействие тяжелых металлов и воспаление в данном эксперименте.

Таким образом, полученные данные указывают на то, что кадмий и свинец оказывают выраженное подавляющее воздействие на ключевые механизмы воспаления, что может привести к нарушению естественных защитных механизмов организма и долгосрочным негативным последствиям для иммунной системы.

3.4. Экспериментальное изучение показателей селезеночных субпопуляций лимфоцитов у крыс с экспериментальным воспалением, предварительно затравленных солями кадмия и свинца

В ходе исследования было выявлено, что воздействие относительно низких уровней свинца и кадмия приводит к нарушениям уровней популяций основных эффекторных лимфоидных и миелоидных клеток и повышенному иммуносупрессорному фону при воспалительном процессе, которые могут быть скорректированы применением производных пиперазина или полиоксидония. Полученные результаты предполагают новые механизмы иммунотоксического влияния кадмия и свинца на организм.

Результаты оценки динамики изменения клеточности селезенки и статистические данные о достоверности различий между опытными группами представлены в таблице 8.

Проведенный однофакторный дисперсионный анализ не выявил статистически значимых различий между контрольной группой животных и экспериментальными группами животных с асептическим воспалением и/или подвергшихся воздействию ХК и АС.

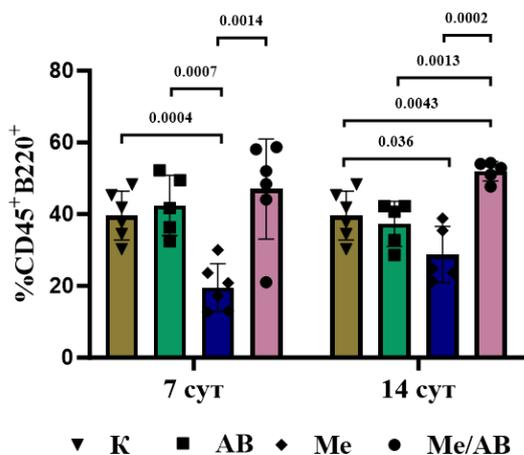
Таблица 8 – Клеточность селезенки ($\times 10^6$ кл/мг) в контрольной и опытных группах животных

№ п/п	Группы сравнения	Через	
		7 суток	14 суток
1	Контроль	0,64±0,09	-
2	AB	0,58±0,10	0,68±0,14
3	Me	0,71±0,13	0,57±0,09
4	Me/AB	0,67±0,15	0,49±0,17

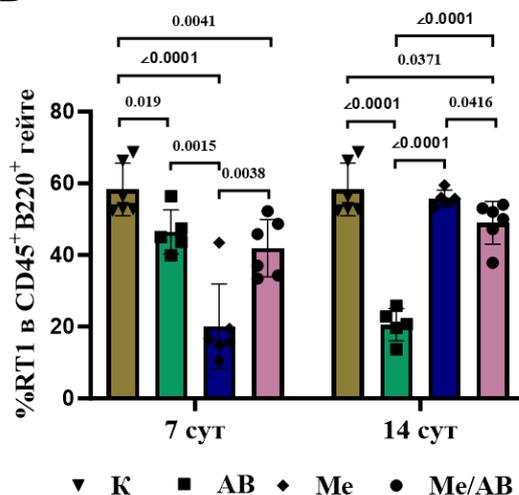
Следует отметить, что, поскольку мы не обнаружили статистически значимых различий в весе и клеточности селезенки между группами животных, которые не получали препараты, изменения в пропорциях клеточных популяций, обнаруженные нами, соответствовали изменениям их абсолютному содержанию.

Количество В-клеток изучали методом проточной цитофлуориметрии, анализируя долю CD45+B220(CD45R)+-спленоцитов в лимфоцитарном гейте (рисунок 15). В ходе исследования было обнаружено, что введение ХК и АС приводило к статистически значимому снижению относительного содержания В-клеток в группе Me на 50,6% через 7 суток ($M=19.6$, $CO=6.7$; $pK=0.0004$) и через 14 суток на 27,4% ($M=28.8$, $CO=7.8$; $pK=0.0036$) при сравнении с интактными животными ($M=39.6$, $CO=6.8$).

А



Б



Обобщенные данные представлены в виде $M \pm CO$.

Рисунок 15 – Доля CD45+B220+, RT1+ в CD45+B220+ гейте- в динамике наблюдения

Ранее проведенные исследования показали снижение содержания В-клеток при воздействии кадмия и свинца. Это снижение, вероятно, связано с индукцией апоптоза этих клеток. Например, у мышей и в периферической крови рабочих, подвергшихся воздействию свинца и кадмия, было зафиксировано значительное уменьшение количества В-лимфоцитов, а также снижение продукции IgG и IgA [184].

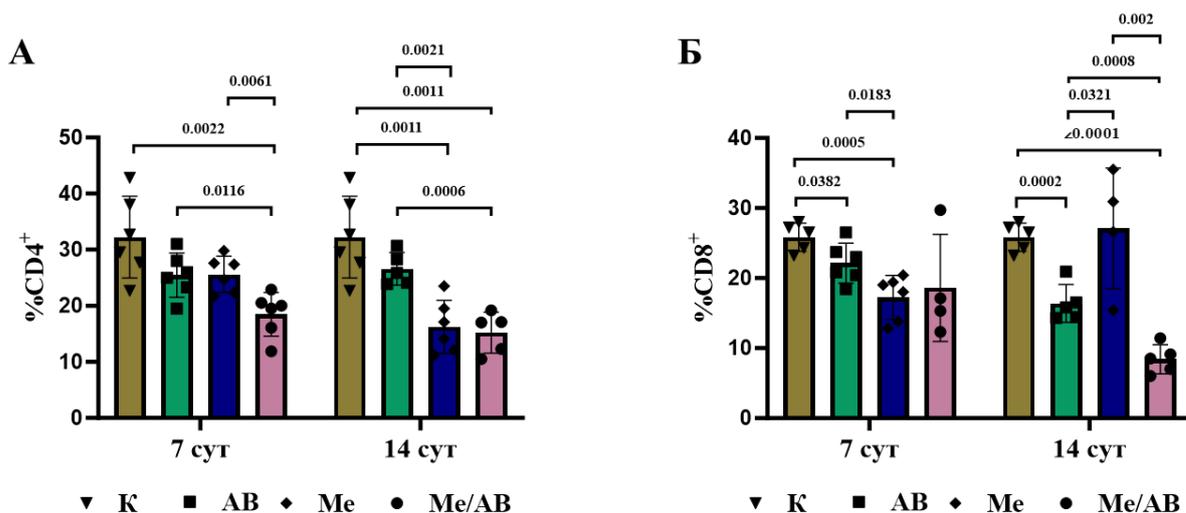
Асептическое воспаление не оказывало влияния на количество В-клеток на протяжении всего периода наблюдения. Однако интересно, что предварительное воздействие металлов на крыс приводило через 14 суток к достоверному увеличению содержания В-клеток в селезенке животных группы Me/AB ($M=52.0$, $CO=2.7$) на 39,1% по сравнению с группой AB ($M=37.3$, $CO=6.2$; $p_{Me/AB}=0.0013$) и на 31,1% по сравнению с контрольной группой ($M=39.6$, $CO=6.8$; $p_{Me/AB}=0.0043$), что свидетельствовало о дисрегуляции воспалительного процесса на фоне введения тяжелых металлов.

Активность В-клеток в экспериментальных группах оценивалась на основе экспрессии молекулы МНС-II. Для этого анализировалась доля RT1(МНС-II)+-спленоцитов в гейте CD45+B220+-лимфоцитов. Подкожное введение скипидара животным через 7 суток индуцировало значительное постепенное снижение на 20,2% содержания CD45+B220+RT1(МНС-II)+-спленоцитов в группе AB ($M=46.5$, $CO=8.4$; $pK=0.019$) и далее через 14 суток на 64,8% ($M=20.5$, $CO=4.5$; $pK<0,0001$) по сравнению с контрольными животными.

При том, что соли кадмия и свинца через 7 суток вызывали повышение пролиферативной активности В-лимфоцитов (CD45R(B220), способность к экспрессии молекул МНС-II (RT1+ в CD45+CD45R(B220)+гейте) на ранних сроках воспаления в группе Me+AB была ниже средних контрольных значений на 28% ($M=58.3$, $CO=7.3$; $pK=0.0041$).

Роль эффекторных и регуляторных лимфоцитов, особенно Т-лимфоцитов, является важным фактором в механизмах регуляции воспаления, особенно при воздействии токсичных металлов, таких как кадмий и свинец. Нарушение их баланса влияет на активность иммунных клеток и может приводить к выраженным изменениям воспалительного ответа. Как и в случае с В-клетками, иммунотоксическое воздействие ХК и АС также оказывало влияние на основные эффекторные популяции Т-клеток. (рисунок 16).

В механизмах регуляции воспаления существенная роль отводится популяции эффекторных и регуляторных лимфоцитов, от которых зависит активность иммунных клеток [185], [186]. Установление баланса между эффекторными и регуляторными Т-лимфоцитами было важно при воспалении у крыс, подвергнутых интоксикации хлоридом кадмия и ацетатом свинца. Эти металлы в группе Me/AB снижали процент CD4+ лимфоцитов ($M=18.5$, $CO=3.9$) на первой неделе, отставая на 42,5% от значений контрольного уровня ($M=32.2$, $CO=7.3$; $p_{Me/AB}=0.0022$) и на 47,8% от АВ ($M=25.5$, $CO=3.9$; $p_{Me/AB}=0.0116$) (рисунок 16 А). К 14 суткам наблюдали продолжающееся статистически значимое снижение CD4+ лимфоцитов как по отношению к контролю на 52,8% ($M=32.2$, $CO=7.3$; $p_{Me/AB}=0.0011$), так и по отношению к АВ на 42,7% ($M=26.6$, $CO=2.9$; $p_{Me/AB}=0.0006$).



Обобщенные данные представлены в виде $M \pm CO$.

Рисунок 16 – Доля $CD4^+$, $CD8^+$ - клеток к в динамике наблюдения

Снижение $CD4^+$ лимфоцитов в оба срока исследования предположительно связано с тем, что тяжелые металлы нарушают пролиферацию и вызывают апоптоз лимфоцитов, что подтверждается ранними данными о повышенной чувствительности Th-клеток к токсическому действию металлов [187].

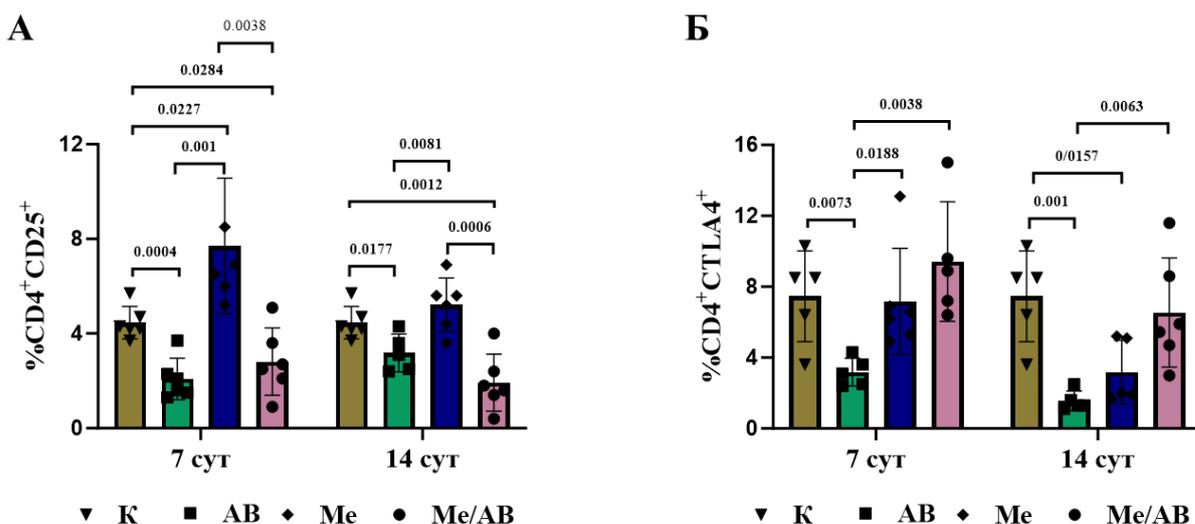
Предшествующие исследования выявили, что Th-клетки являются наиболее уязвимыми к токсичному воздействию кадмия и свинца среди всех типов лимфоцитов [179, 188, 189]. Анализ показал, что асептическое воспаление приводит к заметному сокращению $CD8^+$ Т-клеток, причем наиболее выраженное снижение наблюдается в группе Me+AB, что свидетельствует о значительном подавляющем влиянии тяжелых металлов на эту популяцию клеток.

Продолжая далее изучение популяций Т-клеток было установлено, что течение воспаления сопровождается неуклонным спадом активности $CD8^+$ Т-клеток (рисунок 17) на 14,2% через 7 суток ($M=22.1$, $CO=2.9$; $pK=0.0382$) и на 36,5% через 14 суток ($M=16.4$, $CO=22.7$; $pK=0.0002$) по сравнению с контролем ($M=25.8$, $CO=2.0$) соответственно. Еще большее снижение % $CD8^+$ Т-клеток наблюдали в группе Me+AB через 14 суток, значение которого оказались ниже как по отношению к контролю ($M=25.8$, $CO=2.0$), так и к AB ($M=16.4$, $CO=2.7$) и Me ($M=17.1$, $CO=8.6$) соответственно на 67,4% ($pK<0.0001$), 48,8% ($pAB=0.0008$) и на 69% ($pMe=0.002$).

Роль Treg-клеток в воспалении является двусмысленной. Считается, что активация Treg-клеток играет важную роль в поддержании гомеостаза тканей и защите их от чрезмерной активности эффекторных иммуноцитов во время острой инфекции. Однако при хроническом воспалении увеличение числа Treg-клеток может препятствовать адекватному иммунному ответу на инфекцию и замедлять процесс разрешения воспаления. Обычно острое воспаление инициирует активацию эффекторных Т-клеток и превращение Treg-клеток в эффекторные через утрату экспрессии Foxp3 и приобретение способности

вырабатывать IFN- γ . Позже, на стадии восстановления, количество Трег-клеток увеличивается, что способствует возвращению гомеостаза [179, 189, 190, 191].

В данном исследовании определение регуляторных клеток проводили по фенотипу CD4⁺CD25⁺ (рисунок 17). Одним из ключевых аспектов исследования было наблюдение за популяцией Трег, которые играют важную роль в подавлении воспаления [179, 189, 190, 192]. Классическое течение асептического воспаления, представленное группой АВ ($M=2.1$, $CO=0.9$), сопровождалось статистически значимым снижением общей популяции Трег в 2 раза по сравнению с контролем ($M=4.5$, $CO=0.7$; $p_{AB}=0.0004$). Через 14 суток процент Трег не возвращается к контрольному уровню.



Обобщенные данные представлены в виде $M \pm CO$.

Рисунок 17 – Доля CD4⁺CD25⁺, CD4⁺CTLA4⁺ - клеток к в динамике наблюдения.

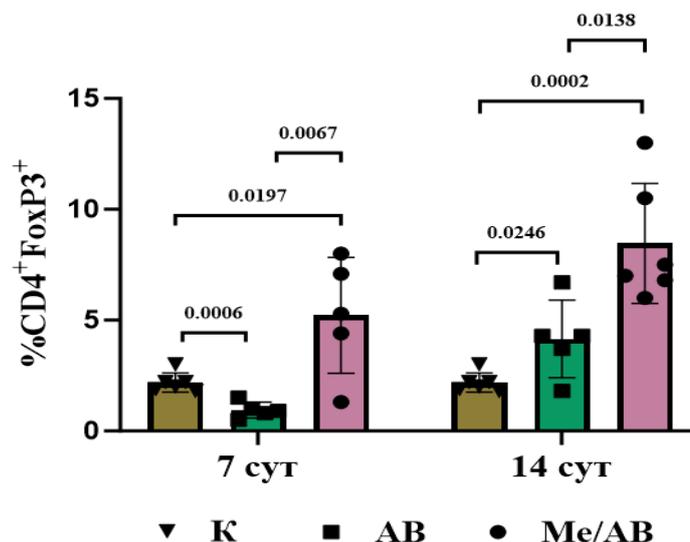
Напротив, в группе Me через 7 суток наблюдали резкое повышение общей популяции Трег ($M=7.7$, $CO=2.9$; $p_K=0.0227$) в 1,7 раза превышавшего значения контроля ($M=4.5$, $CO=0.7$) и в 3,7 раза АВ ($M=2.1$, $CO=0.9$; $p_{Me}=0.001$). через 14 суток значения Трег вернулись к контролю. В наших исследованиях в группе Me/AB общая популяция Трег под влиянием кадмия и свинца ($M=2.8$, $CO=1.4$) в первый срок исследования снижалась от уровня контрольных величин на 37,6 % ($M=4.5$, $CO=0.7$; $p_{Me+AB}=0.0284$) (рисунок 17). Через 14 суток мы наблюдали еще большее снижение процента CD4⁺CD25⁺, уровень которого составил 1,9% и оказался в 2,4 раза статистически значимо ниже уровня контроля ($p_{Me+AB}=0.0112$).

Роль Трег-клеток в воспалении имеет двусторонний характер: их активация важна для предотвращения избыточной иммунной реакции, однако при хроническом воспалении увеличение числа Трег-клеток может затруднять ликвидацию инфекции и замедлять процесс разрешения воспаления. В условиях асептического воспаления наблюдалось значительное снижение Трег-клеток,

особенно в группе АВ, с тенденцией к восстановлению на 14-й день, что указывает на длительное подавление иммунорегуляторных механизмов [179, 189, 190].

Нормальный воспалительный процесс в группе АВ сопровождался постепенным снижением содержания CD4+CTLA-4+-клеток, достигающим статистической значимости по сравнению с контролем к 14 суткам исследования ($p=0,01$). Предварительное введение ХК и АС животным с воспалением приводило к значительно более высокому содержанию Treg-клеток на 7 и 14 сутки исследования по сравнению с группой АВ [179, 189, 190]]. Полученные данные показывают, что соединения свинца и кадмия нарушают нормальный ход воспалительного процесса. Это приводит к повышению уровня иммуносупрессии. В результате, адекватный ответ эффекторных иммунцитов на антиген оказывается нарушенным. Можно предположить, что снижение числа CD8+ клеток, которое было зафиксировано в группе Me/AB на 14-й день эксперимента (рисунок 18), связано с расширением популяции Treg-клеток [179, 189, 190]. Ранее было многократно продемонстрировано, что Treg-клетки способны ингибировать дифференцировку и функции CTL [193]. Это может свидетельствовать о более сложных механизмах супрессии воспаления, при которых активность Treg контролируется не только через CTLA-4, но и через другие иммунные пути, что подчеркивает необходимость их дальнейшего изучения.

Более выраженное воспалительное бремя было связано с повышенной экспрессией FoxP3+ и прогрессированием его супрессорной активности в группе Me/AB, что обычно ассоциируется с ингибированием воспалительного процесса (рисунок 18) [194].



Обобщенные данные представлены в виде $M \pm CO$. Достоверность различий представлена как $*p < 0,05$.

Рисунок 18 – Доля CD4+FoxP3+ - клеток к в динамике наблюдения

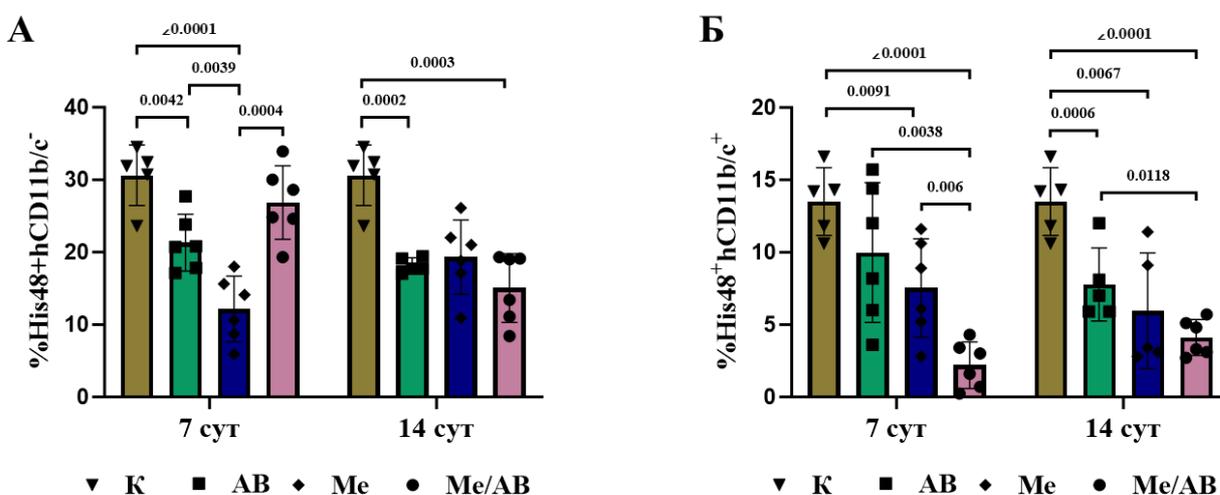
Через 7 дней процент CD4+FoxP3+ ($M=5.2$, $CO=2.6$) превысил значения АВ более чем в 5 раз ($M=0.9$, $CO=0.4$; $p_{Me/AB}=0.0067$), значения контроля в 2,4

раза ($M=2.2$, $CO=0.4$; $p_{Me/AB}=0.0197$), что указывало на выраженную активацию регуляторных Т-клеток в условиях воздействия металлов. К 14 суткам исследования эти значения в группе Me/AB продолжали нарастать по сравнению с предыдущим сроком исследования, что являлось свидетельством продолжающегося или усиливающегося иммунного ответа.

В условиях классического течения воспалительного процесса регуляторные механизмы иммунного ответа подключаются в более поздние сроки. Так, в группе АВ лишь к 14 суткам исследования наблюдали двукратное статистически значимое повышение экспрессии FoxP3+ ($M=4.2$, $CO=1.8$; $pK=0.0246$) по отношению к контролю, тогда как в первый срок исследования эти значения также, более чем в 2 раза не достигали контрольного уровня ($M=0.9$, $CO=0.4$; $pK=0.0006$).

Таким образом, результаты указывают на более активное участие регуляторных Т-клеток в ответ на воспаление при воздействии металлов по сравнению с нормальным течением воспаления.

Нейтрофилы и моноциты/макрофаги являются важнейшими клетками воспалительного процесса [195]. Поэтому в дальнейшем мы исследовали, как соединения свинца и кадмия влияют на содержание нейтрофилов, которые характеризуются как His48+hCD11b/c+, и моноцитов, которые определяются как His48-CD11b/c+ клеточные популяции [196] (рисунок 19).



Обобщенные данные представлены в виде $M \pm CO$. Достоверность различий представлена как $*p < 0,05$.

Рисунок 19 – Доля His48+hCD11b/c-, His48+hCD11b/c+ - клеток в динамике наблюдения

При анализе гранулоцитарной популяции клеток в динамике, мы отметили, что через 7 суток в группе животных с асептическим воспалением наблюдалось их заметное снижение (рисунок 19 Б). Между тем, в группе крыс, предварительно затравленных комбинацией тяжелых металлов, в этот срок

наблюдения металлы в 2 раза снижали их в сравнении с контрольной группой ($M=7.5$, $CO=3.4$; $pK=0.0091$ против контроля $M=13.5$, $CO=2.3$), тогда как в группе Me/AB ($M=2.2$, $CO=1.6$; $pK<0.0001$) отмечалось шестикратное снижение от контрольного уровня. Через 14 суток, в группе AB снижение His48+hCD11b/c+ продолжалось двукратное статистически значимое отставание от уровня контроля ($M=7.8$, $CO=2.5$; $pK=0.0006$ против контроля $M=13.5$, $CO=2.3$). Под влиянием металлов в группе Me гранулоцитарная популяция продолжала снижаться с более чем двукратным их снижением по сравнению с контрольным уровнем ($p=0.0067$). Доля гранулоцитарной популяции в группе Me/AB в этот срок исследования отмечалась двукратным их повышением по сравнению с предыдущими результатами, но не сравнилась с уровнем AB и контроля соответственно в 2 раза ($M=4.1$, $CO=1.2$; $pAB=0.0118$ против AB $M=7.8$, $CO=2.5$) и в 3.3 раза ($pK=0.0118$ против контроля $M=13.5$, $CO=2.3$).

Как в первый (через 7 суток), так и во второй (через 14 суток) срок исследования воспалительная реакция в группе AB сопровождалась статистически значимым снижением моноцитарной популяции селезеночных клеток (рисунок 19 А). Под влиянием хлорида кадмия и ацетата свинца популяции моноцитов отставали от контроля в 2 раза ($pK<0.0001$) и в 1,3 раза ($pAB<0.0039$). К 14 сроку исследования их значения оказались склонны к восстановлению. Между тем, воспалительная реакция в группе Me+AB показала нам результаты моноцитарной популяции, сопоставимые с результатами контроля. Однако к 14 суткам исследования эти показатели не восстановились до уровня контроля, оказавшись в 2 раза статистически значимо ниже ($pK=0.0003$).

Подавление His48+hCD11b/c+ при воздействии кадмия и свинца в группе Me/AB, особенно в первые 7 суток, указывает на высокую чувствительность этих клеток к токсическому действию металлов, что может ослабить первичный защитный барьер иммунной системы и замедлить восстановительные процессы в тканях. Низкий уровень моноцитов в течение всего периода наблюдений, особенно выраженный в группах с воздействием металлов, подтверждает их уязвимость к тяжелым металлам и позволяет предположить, что интоксикация приводит к нарушению функции фагоцитоза, что критично для очищения тканей от патогенов и клеточного мусора.

Выявленное замедление восстановления моноцитарной и гранулоцитарной популяций в условиях интоксикации указывает на длительное угнетение иммунных клеток даже после удаления токсинов, что может увеличить риск хронических воспалительных состояний и осложнить процессы выздоровления. Увеличение гранулоцитарной популяции на 14-й день в группе Me/AB, хотя и не достигло нормальных значений, предполагает компенсаторные механизмы, направленные на восстановление гомеостаза. Однако этот эффект остаётся ограниченным, что может быть связано с продолжительным воздействием токсичных веществ на клетки и их пролиферацию.

Таким образом, результаты исследования указывают на значительное подавление как гранулоцитарной, так и моноцитарной популяций клеток под

воздействием тяжелых металлов, что снижает эффективность иммунного ответа в условиях воспаления и препятствует восстановлению клеточной популяции, особенно при комбинированном действии интоксикации и воспалительного процесса.

Подводя итоги проведенных исследований, можно утверждать, что двухнедельное введение хлорида кадмия и ацетата свинца существенно нарушало иммунную активность у животных. Это проявлялось в снижении количества таких ключевых иммунных клеток, как В-клетки, CD4⁺ Th-клетки, моноциты и гранулоциты в селезенке, что указывает на токсическое воздействие этих металлов на иммунную систему и ее функциональные нарушения.

В группе АВ установлено заметное снижение доли МНСII-экспрессирующих В-клеток, CD8⁺, CD4⁺CD25⁺ клеток, Трег-клеток, моноцитов и гранулоцитов к 14 суткам эксперимента. Это может свидетельствовать о миграции этих клеток к воспаленному участку. Такое снижение клеточной активности, с одной стороны, создает условия для воспаления, а с другой – снижает иммуносупрессивный эффект.

Комбинированное воздействие соединений кадмия и свинца усиливало дисбаланс в воспалительном процессе, что проявлялось в снижении числа CD8⁺ клеток и гранулоцитов, а также в увеличении доли В-клеток и Трег-клеток. Этот эффект указывает на преобладание иммуносупрессорного фона, а также Th2-направленного иммунного ответа, что, в свою очередь, может нарушить нормальную противовоспалительную реакцию организма.

Эти данные подчеркивают, что интоксикация свинцом и кадмием нарушает баланс между различными клеточными популяциями иммунной системы, усиливая депрессивные эффекты и способствуя дисрегуляции иммунного ответа. Это может способствовать хроническому воспалению и снижению иммунной активности в организме. Полученные результаты требуют дальнейших исследований для разработки методов предотвращения и коррекции этих токсических нарушений в иммунной системе.

3.5. Экспериментальное изучение лимфоорганов ткани воспаления опытных крыс с экспериментальным воспалением, предварительно затравленных солями кадмия и свинца, после коррекции Комплексом

Через 7 и 14 суток после развития асептического воспаления был произведен забор органов (тимус, брыжеечные лимфатические узлы, кожа из очага воспаления) для проведения морфологических исследований с целью выявления в них последствий развития воспаления после коррекции препаратом Полиоксидоний.

В группе Me/AB/ПО через 7 суток кожный покров с очагом воспаления сохранял структуру эпидермиса и волосяных фолликулов (рисунке 20 В). В глубоких слоях дермы отмечалась очаговая лейкоцитарная инфильтрация, а в просвете сосудов скапливались лейкоциты. По периферии наблюдалась гистиоцитарная инфильтрация, которая проникала в интерстиции мышечных

волокон и достигала жировой ткани, где находились единичные кальцинаты. Через 14 суток лейкоцитарная инфильтрация в очаге воспаления снизилась, в его центре происходил процесс капилляризации (рисунке 20 Г). В области воспаления фиксировались васкуляризация и полнокровие сосудов, некроз находился на стадии рассасывания, а демаркационная зона воспаления стала узкой. Морфологическая картина соответствовала неполной регенерации с развитием васкуляризации.

Через 7 суток эксперимента тимус сохранял дольчатую структуру, междольковые прослойки были узкими, а границы между корковым и мозговым слоями хорошо различимы (рисунке 20 А). Ткань характеризовалась гиперклеточностью, в которой присутствовали малые, средние и крупные лимфоциты, а также тимоциты. В мозговом слое наблюдались тельца Гассалья, сосуды были заполнены венозной кровью, а в окружающей жировой ткани отмечались очаги кровоизлияний. Морфологическая картина соответствовала реактивной тимомегалии. Через 14 суток тимус все еще сохранял свою дольчатую структуру, но в фрагментах долек и в окружающей жировой клетчатке появились очаги кровоизлияний (рисунке 20 Б). Границы между корковым и мозговым слоями стали нечитаемыми, наблюдались единичные тельца Гассалья, а тимомегалия проявлялась менее выражено.

Через 7 суток в брыжеечных лимфоузлах наблюдались слабо выраженные фолликулы, а границы между мозговыми тяжами были четко различимы (рисунке 20 Д). Ткань была малокровной, субкапсулярные фолликулы увеличились и не содержали герминативных центров, в которых располагались дендритно-клеточные макрофаги. Ткань состояла преимущественно из малых и средних лимфоцитов. Морфологические изменения соответствовали реактивной гиперплазии.

При светооптическом исследовании брыжеечных лимфоузлов через 14 суток было зафиксировано снижение абсолютного числа клеток лимфоидного ряда в различных структурных компонентах (рисунок 20 Е). Содержание ретикулярных и плазматических клеток оставалось стабильным на протяжении всего эксперимента. Типичные межклеточные ассоциации, такие как макрофагально-лимфоцитарные и плазмоцито-лимфоцитарные комплексы, были обнаружены только около 50% микропрепаратов брыжеечных лимфоузлов на 14-й день. В это время в лимфоузлах наблюдались многочисленные субкапсулярные фолликулы с герминативными центрами, содержащими скопления дендритно-макрофагальных клеток. Капилляры были полнокровными, а ткань состояла из малых, средних и крупных лимфоцитов с примесью плазматических клеток. Морфология указывала на реактивную фолликулярную гиперплазию с гуморальным ответом.

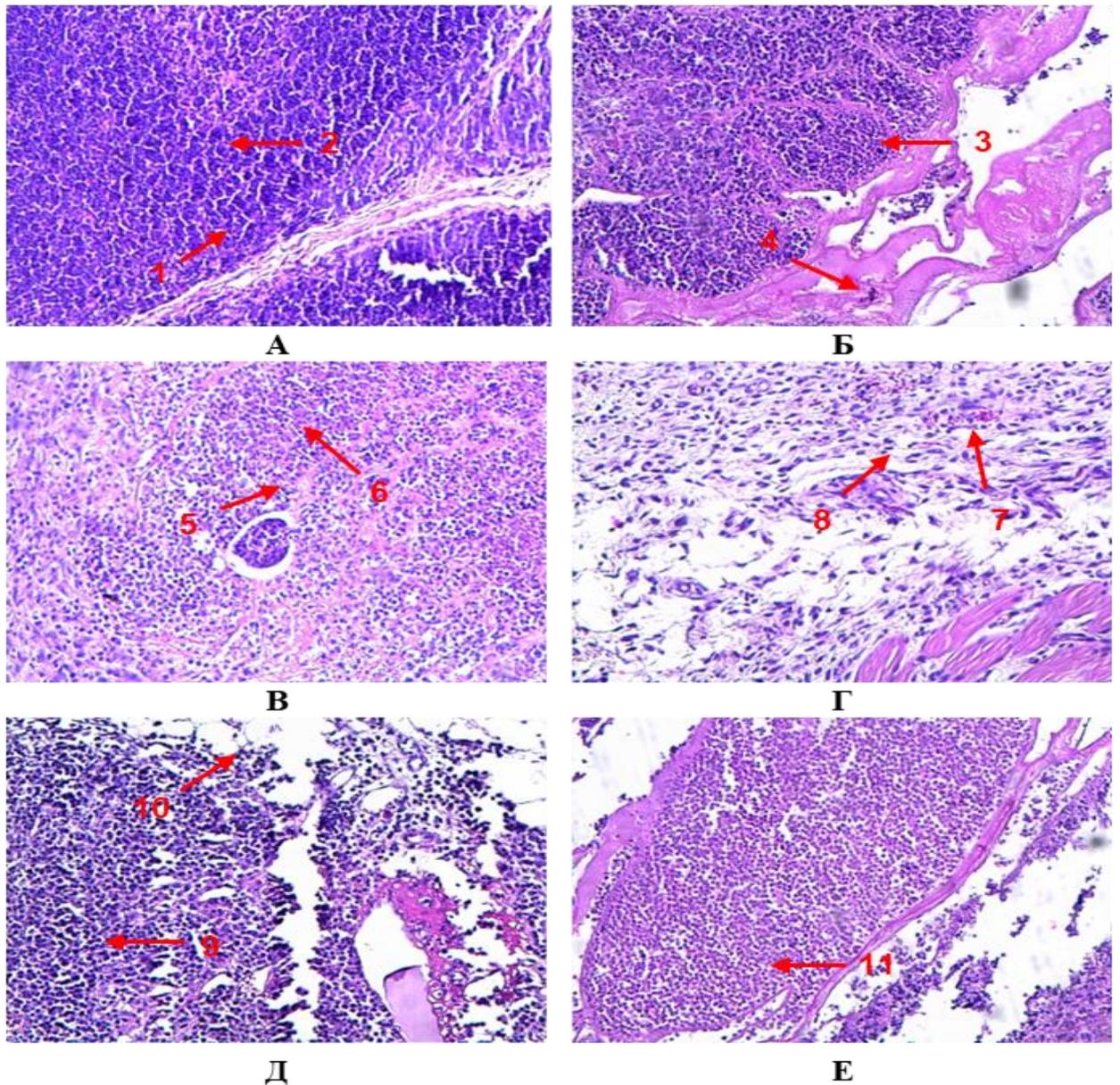
Гистологическая картина тимуса и брыжеечных лимфоузлов через 7 и 14 суток после введения Полиоксидония претерпела значительные изменения. Было зафиксировано заметное увеличение числа лимфоцитов как в корковом, так и в мозговом веществе, причем их количество и размеры значительно возросли, особенно в внутренней кортикальной зоне и мозговом веществе тимусных долек.

Применение Полиоксидония вызывало изменения морфофункционального состояния тимуса и брыжеечных лимфоузлов. В целом, у животных, получавших Полиоксидоний, наблюдалось постепенное восстановление структуры лимфатических узлов, что, по мнению исследователей, свидетельствовало о наличии признаков восстановления защитной функции как центральной, так и периферической иммунной системы.

Сравнение воздействия Полиоксидония на воспалительный процесс при введении металлов показало, что Полиоксидоний не способствовал быстрому заживлению воспалительного очага, даже через 14 суток эксперимента. Зона воспаления оставалась отечной, при этом фиброзная ткань развивалась слабо. Под влиянием Комплекса в группе Me/AB/Комплекс через 7 суток воспалительный очаг начинал рассасываться, а очаг воспаления заменялся фиброзной тканью. Через 14 суток практически весь очаг воспаления, вызванный скипидаром, зажил.

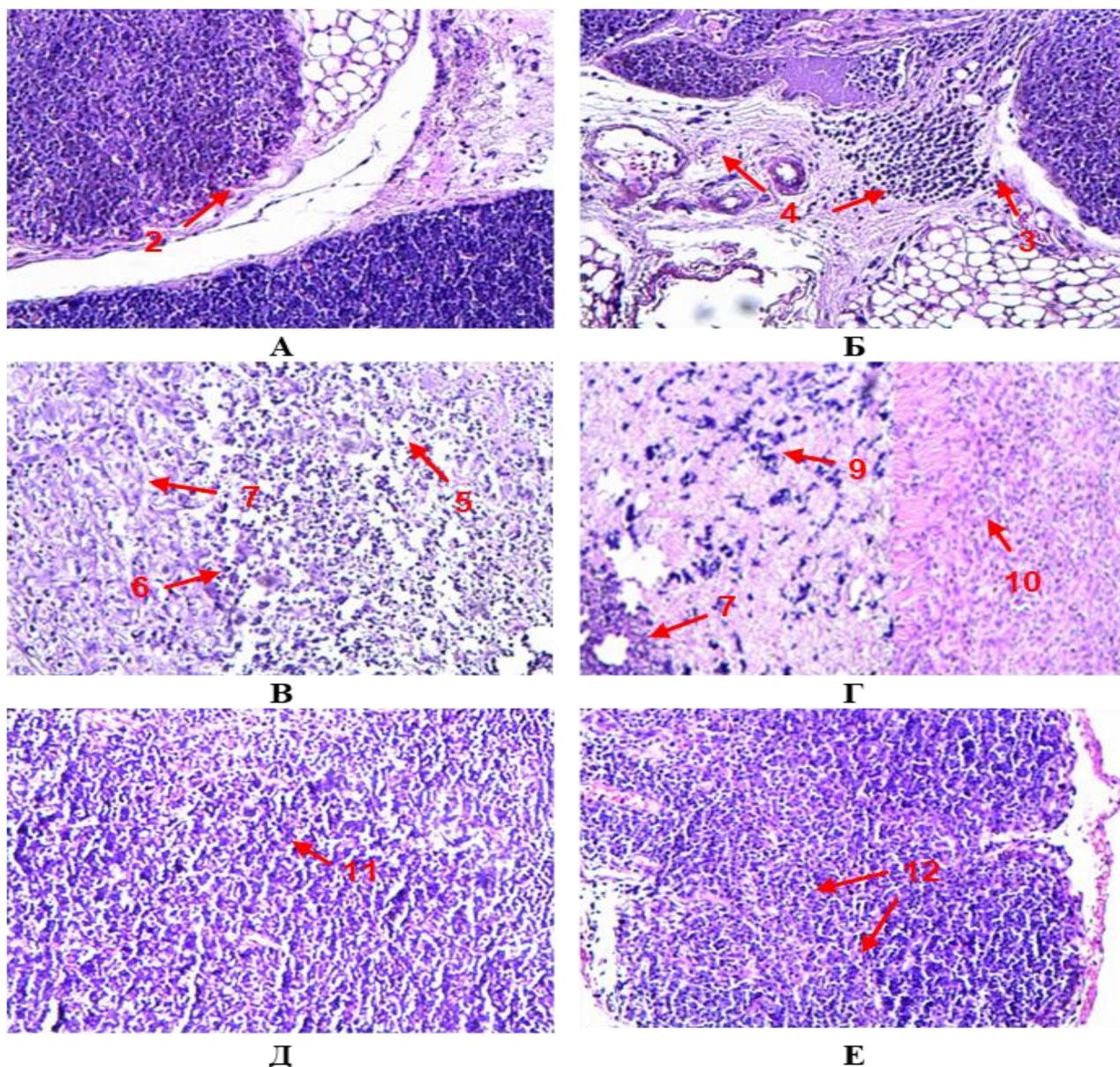
На рисунке 21 представлена микроскопическая картина тимуса, брыжеечных лимфоузлов, очага воспаления [175] со скипидар-индуцированным воспалением на фоне предварительной интоксикации солями ацетата свинца и хлорида кадмия через 7 и 14 суток после коррекции Комплексом.

На представленных гистологических срезах очага воспаления, вызванного скипидаром на фоне предварительной интоксикации солями ацетата свинца и хлорида кадмия, через 7 суток после начала коррекции Комплексом была зафиксирована обширная зона некроза на кожных покровах с выраженной демаркационной зоной воспаления, диффузной лейкоцитарной инфильтрацией и значительным количеством макрофагов (рисунок 21 В). Через 14 суток воспалительная ткань состояла из лейкоцитарной инфильтрации, а также отложений кальцинированных веществ (рисунок 21 Г). Зона некроза значительно уменьшилась, в центре образовался небольшой участок клеточно-ядерного детрита с хроматиновой пылью. Перифокально наблюдалась лимфогистиоцитарная инфильтрация и полнокровие сосудов. В интерстиции мышечно-фиброзной и жировой тканей происходило разрастание рыхлой волокнистой соединительной ткани. Морфологическая картина указывала на неполную репаративную регенерацию с кальцинозом, рубцеванием и заживлением раны.



Примечание: А – тимус, через 7 суток, ткань гиперклеточная (1), состоит из малых, средних и больших лимфоцитов и тимоцитов. В мозговом слое единичные тельца Гассалья (2). Б – тимус через 14 суток с сохраненным дольчатым строением (3), фрагмент долек тимуса и капсула между окружающей жировой клетчаткой и тимусом отечная (4). В – кожный покров – очаг воспаления (5), через 7 суток. В глубоких слоях дермы наблюдается очагово-сливная лейкоцитарная инфильтрация (6). Г – кожный покров – очаг воспаления, через 14 суток. В центре очага воспаления наблюдается васкуляризация и полнокровие сосудов (7), некроз в стадии рассасывания, разрастание грануляционной ткани (8). Д – брыжеечные лимфоузлы, через 7 суток, морфология соответствует реактивной гиперплазии (9) с выраженным отеком и васкуляризацией (10). Е – брыжеечные лимфоузлы, через 14 суток. Морфология характерна для убывания реактивной гиперплазии (11). Окраска: гематоксилином и эозином $\times 200$.

Рисунок 20 – Микроскопическая картина тимуса, брыжеечных лимфоузлов, очага воспаления со скипидар-индуцированным воспалением на фоне предварительной интоксикации солями ацетата свинца и хлорида кадмия через 7 и 14 сутки эксперимента после коррекции Полиоксидонием



Примечание: А – тимус, через 7 суток. Морфология соответствует умеренной тимомегалии (1) с утолщением коркового вещества (2). Б – тимус, через 14 суток. Морфология соответствует умеренной реактивной тимомегалии с очаговой лимфоцитарной инфильтрацией капсулы (3). Отек и полнокровие капсулы (4). В – кожный покров – очаг воспаления, через 7 суток. В глубокой подкожной клетчатке имеется обширная зона некроза с широкой демаркационной зоной воспаления (5), с диффузной лейкоцитарной инфильтрацией и обилием макрофагов (6), и началом разрастанием грануляционной ткани (7). Г – кожный покров – очаг воспаления, через 14 суток. Морфологическая картина характерна для неполной репаративной регенерации (8) с кальцинозом (9), рубцеванием и заживлением раны (10). Д – брыжеечные лимфоузлы, через 7 суток, морфология соответствует реактивной гиперплазии с рыхлой структурой (11). Е – брыжеечные лимфоузлы, через 14 суток, морфологическая картина характерна для реактивной гиперплазии с нечеткими фолликулами (12). Окраска: гематоксилином и эозином $\times 200$.

Рисунок 21 – Микроскопическая картина тимуса, брыжеечных лимфоузлов, очага воспаления со скипидар-индуцированным воспалением на

фоне предварительной интоксикации солями ацетата свинца и хлорида кадмия через 7 и 14 суток эксперимента после коррекции Комплексом

Результаты использованного слепого полуколичественного метода с оценкой от 0 до 3 баллов (0 - нет патологии, 1 - слабая, 2 - средняя, 3 - сильно выраженная патология) представлены в таблице 9.

Таблица 9 – Характеристика очага воспаления по патологическим показателям животных групп К, АВ, Ме/АВ через 7 и 14 суток после моделирования асептического воспаления

Баллы в группах (для каждой группы, n = 6)	Патологические показатели			
	Некротический очаг	Отек мягких тканей	Лейкоцитарная инфильтрация	Пролиферация сосудов, фибробластов
	(Минимум-максимум)			
	Через 7 суток			
К	(0-0)	(0-0)	(0-0)	(0-0)
Ме/АВ	(3-3)* ⁺	(2-3)* ⁺	(1-3)*	(0-0) ⁺
Ме/АВ/ПО	(1,2)* [^]	(1-2)* [^]	(2-3)*	(0-1)* ⁺
Ме/АВ/Комплекс	(0-1) [^]	(0-1) [^]	(2-3)*	(0-1) [^]
	Через 14 суток			
К	(0-0)*	(0-0)*	(0-0)*	(0-0)*
Ме/АВ	(2-3)* ⁺	(2-3)* ⁺	(2-3)* ⁺	(0-1) ⁺
Ме/АВ/ПО	(0-1) [^]	(0-1) [^]	(0-1) [^]	(2-3)* [^]
Ме/АВ/Комплекс	(0-1) [^]	(0-0) [^]	(0-1) [^]	(2-3) [^]

*Примечание: значимые различия, оцененные с помощью однофакторного дисперсионного анализа, определяются как: *p < 0,01 к К; +p < 0,01 к Ме/АВ. ^p < 0,01 к Ме/АВ/ПО..*

Под влиянием Комплекса в исследованные сроки достоверно улучшались показатели некроза, отека и пролиферации сосудов и фибробластов по отношению к группе Ме/СИ (p < 0,01). Из вышеизложенного заключено, что по эффективности Комплекс не уступает препарату сравнения полиоксидонию.

Через 7 суток тимус сохранял дольчатое строение, были замечены участки кровоизлияний в окружающую жировую ткань (рисунок 21 А). Структура тимуса состояла из малых, средних и больших лимфоцитов, а также тимоцитов. В мозговом слое присутствовали тельца Гассалья. Междольковые прослойки были узкими, а сосуды полнокровными. Границы между корковым и мозговым слоями стали нечеткими. Морфология тимуса соответствовала умеренной тимомегалии. Через 14 суток тимус сохранял дольчатое строение, фрагменты долек состояли из малых, средних и больших лимфоцитов и тимоцитов (рисунок 21 Б). Окружающая жировая клетчатка содержала очаги кровоизлияний. Корковые и мозговые слои становились нечеткими, с единичными тельцами Гассалья и лаброцитами. Морфология тимуса указывала на умеренную реактивную тимомегалию.

Через 7 суток в брыжеечных лимфоузлах субкапсулярные фолликулы были неразличимы, герминативные центры отсутствовали, но были присутствующие дендритно-клеточные макрофаги (рисунок 21 Д). Ткань состояла из малых и средних лимфоцитов, что свидетельствовало о фолликулярной реактивной гиперплазии гуморального типа. Через 14 суток субкапсулярные фолликулы брыжеечных лимфоузлов имели стертые границы, и герминативные центры стали отчетливо видимыми (рисунок 21 Е). Мозговые тяжи были отечными с накоплением дендритно-макрофагальных клеток. Капилляры полнокровные, а ткань включала малые, средние и большие лимфоциты, а также плазмоциты. Морфология указала на реактивную гиперплазию с иммунным ответом гуморального типа.

Применение нового производного пиперазина – Комплекса во всех изученных гистопрепаратах (тимус, брыжеечные лимфоузлы, ткань воспаления) у опытных животных сопровождалось заметным утолщением коркового вещества и формированием грануляционной ткани, которая ограничивала очаг воспаления от соседних тканей.

В группе Ме/АВ/Комплекс через 7 суток в очаге воспаления и в процессе регенерации было отмечено значительное сокращение площади некроза, за исключением некоторых отдельных участков. В клеточном инфильтрате наблюдались скопления фибробластов и макрофагов, а также выраженное разрастание грануляционной и рыхлой волокнистой соединительной ткани.

Результаты коррекции показали, что введение Комплекса способствовало более быстрому заживлению очага воспаления благодаря ускоренному формированию грануляционной ткани по сравнению с группой, получавшей Полиоксидоний. Дальнейшие исследования и анализ воздействия Полиоксидония на воспалительный процесс при введении металлов продемонстрировали, что Полиоксидоний не оказал значительного влияния на ускорение заживления, даже через 14 суток, когда в зоне воспаления сохранялись отеки и развитие фиброзной ткани было незначительным. В группе Ме/АВ/Комплекс уже через 7 суток наблюдалось рассасывание участков некроза с участием макрофагов, а к 14 суткам очаг воспаления полностью зажил.

3.6. Экспериментальное изучение показателей периферической крови у крыс с экспериментальным воспалением, предварительно затравленных солями кадмия и свинца, после коррекции Комплексом

В текущее исследование были включены показатели белой и красной крови для групп с изолированным скипидар-индуцированным асептическим воспалением и опытные группы, получавшие ПО и Комплекс. Для оценки эффективности патогенетической коррекции было использовано новое синтезированное соединение из группы производных пиперазина — 1-[1-(2,5-диметоксифенил)-4-(нафталин-1-илокси)бут-2-инил]-4-метилпиперазин, также известное под лабораторным шифром МНФ-20 или Комплекс. Предполагается, что Комплекс оказывает воздействие на ключевые элементы иммунного ответа и обладает высокой биологической активностью.

В качестве препарата сравнения использовался Полиоксидоний – активное соединение нового класса гетероциклических алифатических полиаминов. Он является сополимером N-окси-1,4-этиленпиперазина и (N-карбокси)-1,4-этиленпиперазиния бромидом с молекулярной массой от 60 до 100 кДа. Полиоксидоний преимущественно связывается с моноцитами и нейтрофилами в периферической крови человека. Хотя связывание с лимфоцитами происходит с меньшей афинностью, показана способность полиоксидония индуцировать пролиферацию Т-клеток *in vitro* при высоких концентрациях [197]. В настоящее время полиоксидоний используется в качестве иммунного адьюванта и иммуномодулятора для лечения острых и хронических бактериальных, вирусных или грибковых инфекций.

Анализ результатов гематологического исследования крови показал высокий уровень общих лейкоцитов в группах АВ/ПО и АВ/Комплекс, результаты которых обобщены в таблице 10.

Комплекс, как и Полиоксидоний, повышал общее количество лейкоцитов, превышая контрольный уровень в 1,7 ($p=0,005$) и 2 ($p=0,0001$) раза соответственно. В картине периферической крови отмечали устойчивое увеличение нейтрофилов и лимфоцитов в группах АВ/ПО и АВ/Комплекс по сравнению с контрольными животными и с изолированным скипидар-индуцированным асептическим воспалением уже на 7 сутки эксперимента. Исходя из этого, можно сделать предположение об иммуномодулирующем эффекте Комплекса и полиоксидония.

Через 14 суток абсолютные значения лейкоцитов, нейтрофилов, лимфоцитов и моноцитов вернулись к исходному уровню, что свидетельствовало о завершении воспалительного процесса. Напротив, в группе АВ исследованные показатели крови оставались повышенными, статистически значимо превышая контрольный уровень.

Показатели эритроцитов и гемоглобина как в группе АВ, так и в группах Ме/АВ/ПО, Ме/АВ/Комплекс не претерпевали изменений, оставаясь на уровне контроля (таблица 10).

Таблица 10 – Количественные показатели периферической крови для групп АВ, АВ/ПО, АВ/Комплекс

Клеточный состав крови	Группы, М (СО), n=10 (p*)						
	К	АВ	р	АВ/ПО	р	АВ/Комплекс	р
7 суток							
Лейкоциты, $\times 10^3/\mu\text{L}$	9,6 (2,0)	15,1 (2,1)	0,009 ^a	20,0 (2,1)	0,0001 ^a 0,017 ^b	16,0 (2,1)	0,005 ^a 0,033 ^d
Эритроциты, $\times 10^3/\mu\text{L}$	8,1 (0,4)	7,9 (0,6)	-	7,7 (0,6)	-	8,0 (0,8)	-
Нв, g/L	138,0 (2,2)	136,5 (9,3)	-	141,3 (11,5)	-	132,5 (9,7)	-
RDW-SD, fL	29,9 (2,3)	31,1 (2,8)	-	30,1 (1,4)	-	30,7 (1,0)	-
RDW-CV, %	20,8 (1,8)	20,5 (1,5)	-	18,7 (1,8)	-	21,4 (2,0)	-
Нейтрофилы, $\times 10^3/\mu\text{L}$	1,2 (0,1)	4,3 (1,3)	0,016 ^a	6,6 (0,9)	0,001 ^a 0,027 ^b	3,3 (1,2)	0,038 ^a 0,005 ^d
Лимфоциты, $\times 10^3/\mu\text{L}$	6,4 (1,2)	9,4 (0,8)	0,009 ^a	11,5 (1,2)	0,001 ^a 0,030 ^b	11,4 (1,2)	0,001 ^a 0,036 ^b
Моноциты, $\times 10^3/\mu\text{L}$	0,4 (0,2)	1,2 (0,5)	0,041 ^a	1,5 (0,6)	0,024 ^a	1,2 (0,4)	0,015 ^a
Эозинофилы, $\times 10^3/\mu\text{L}$	0,1 (0,1)	0,3 (0,1)	0,039 ^a	0,1 (0,1)	0,018 ^b	0,16 (0,1)	-
14 суток							
Лейкоциты	9,6 (2,0)	14,6 (4,1)	-	8,0 (1,2)	0,045 ^b 0,000 ^f	8,7 (0,7)	0,064 ^b 0,003 ^f
Лейкоциты, $\times 10^3/\mu\text{L}$	8,1 (0,4)	8,5 (0,1)	-	8,4 (0,4)	-	8,2 (0,6)	-
Эритроциты, $\times 10^3/\mu\text{L}$	138,0 (2,2)	139,2 (1,6)	-	143,5 (7,6)	-	138,5 (9,1)	-
Нв, g/L	29,9 (2,3)	34,3 (1,7)	0,023 ^a	30,1 (1,4)	-	32,1 (1,3)	-

Продолжение таблицы 10

RDW-SD, fL	20,8 (1,8)	23,5 (0,5)	0,048 ^a 0,019 ^f	22,5 (1,9)	0,027 ^f	21,2 (1,0) ^b	0,019
RDW-CV, %	1,2 (0,1)	3,3 (1,0)	0,018 ^a	2,3 (0,2)	0,000 ^a 0,002 ^f	2,3 (1,0)	-
Нейтрофилы, $\times 10^3/\mu\text{L}$	6,4 (1,2)	4,03 (0,5)	-	5,0 (1,2)	0,040 ^b 0,000 ^f	5,6 (0,6)	0,065 ^b 0,000 ^f
Лимфоциты, $\times 10^3/\mu\text{L}$	0,4 (0,2)	1,0 (0,6)	-	0,6 (0,1)	0,043 ^f	0,5 (0,2)	0,023 ^f
Моноциты, $\times 10^3/\mu\text{L}$	0,1 (0,1)	0,4 (0,2)	0,031 ^a	0,13 (0,0)	0,034 ^b	0,1 (0,1)	0,023 ^b
<i>Примечание: * *p – по T-test, статистическая значимость: a – к Контролю; b – к АВ; d – к АВ+ПО; f – к 7 суткам.</i>							

Существенные изменения со стороны лейкоцитарной фракции крови наблюдали у крыс с асептическим воспалением, вызванным на фоне предварительной интоксикации тяжелыми металлами, после коррекции Комплексом и полиоксидонием (таблица 11).

На 7 сутки исследования установлено, что Комплекс способствовал увеличению лейкоцитов в 4 раза ($p=0.008$), нейтрофилов более чем в 2 раза ($p=0.040$) и лимфоцитов в 5 раз ($p=0.006$), не снижая нарастания в последующий срок (через 14 суток) исследования. Эти результаты были сопоставимы с полиоксидонием.

Исследование гематологических показателей крови показало, что количество эритроцитов оставалось без изменений во всех сравниваемых группах и на обоих сроках исследования (таблица 11). Однако через 7 дней воздействия Комплекса и Полиоксидония уровень гемоглобина не вернулся к контрольному значению ($p=0,002$). Через 14 дней Комплекс восстановил уровень гемоглобина до контрольного, при этом его содержание оказалось на 7% выше, чем на предыдущем сроке исследования, что было статистически значимо ($p=0,037$). Полиоксидоний не корректировал содержание гемоглобина.

Резюмируя результаты проведенных исследований, следует отметить выраженный иммуномодулирующий эффект Комплекса и Полиоксидония на фоне асептического воспаления. В группе Me/AB применение Комплекса и Полиоксидония привело к значительному увеличению содержания лейкоцитов, нейтрофилов и лимфоцитов на 7-е сутки, указывая на активацию иммунного ответа. На 14-е сутки эти показатели нормализовались, что свидетельствовало о заключительной фазе воспаления. Комплекс способствовал восстановлению уровня гемоглобина до контрольного значения, превысив собственные показатели предыдущего срока, в то время как Полиоксидоний не оказывал аналогичного эффекта.

Таким образом, Комплекс продемонстрировал корректирующее действие на иммунную и эритроцитарную фракции крови при асептическом воспалении на фоне интоксикации тяжелыми металлами.

Таблица 11 – Количественные показатели периферической крови для групп Me/AB/ΠO, Me/AB/Комплекс

Клеточный состав крови	Группы, M (CO), n=10 (p*)						
	К	ME/AB	ρ	Me/AB/Π O	ρ	Me/AB/Комплекс	ρ
7 суток							
Лейкоциты, x10 ³ /μL	9,6 (2,0)	4,3 (0,7)	0,009 ^a	17,6 (2,9)	0,005 ^a 0,002 ^b	16,5 (4,0)	0,033 ^a 0,008 ^b
Эритроциты, x10 ³ /μL	8,1 (0,4)	7,5 (0,3)	-	7,5 (0,3)		7,6 (0,3)	-
Hb, g/L	138,0 (2,2)	122,0 (5,9)	0,008 ^a	122,0 (4,4)	0,002 ^a	130,8 (1,3)	0,002 ^a 0,024 ^c
RDW-SD, fL	29,9 (2,3)	33,7 (1,4)	0,038 ^a	38,5 (4,0)	0,014 ^a	34,4 (2,6)	0,040 ^a
RDW-CV, %	20,8 (1,8)	22,3 (1,0)	-	24,3 (1,2)	0,020 ^a 0,044 ^b	22,5 (0,5)	-
Нейтрофилы, x10 ³ /μL	1,2 (0,1)	1,6 (0,4)	-	3,7 (0,8)	0,009 ^a 0,009 ^b	3,9 (1,4)	0,030 ^a 0,040 ^b
Лимфоциты, x10 ³ /μL	6,4 (1,2)	2,2 (0,3)	0,004 ^a	11,0 (1,5)	0,001 ^a 0,001 ^b	10,7 (2,5)	0,035 ^a 0,006 ^b
Моноциты, x10 ³ /μL	0,4 (0,2)	0,4 (0,2)	-	1,5 (1,2)	-	1,0 (0,5)	-
Эозинофилы, x10 ³ /μL	0,1 (0,1)	0,2 (0,1)	-	0,4 (0,2)	0,030 ^a 0,035 ^b	0,0 (0,0)	0,016 ^a 0,007 ^b 0,015 ^c
14 суток							
Лейкоциты, x10 ³ /μL	9,6 (2,0)	4,1 (1,6)	0,006 ^a	19,8 (3,4)	0,004 ^a 0,001 ^b	20,2 (5,0)	0,017 ^a 0,005 ^b
Эритроциты, x10 ³ /μL	8,1 (0,4)	8,1 (0,5)	-	8,1 (0,4)	-	8,3 (0,2)	-

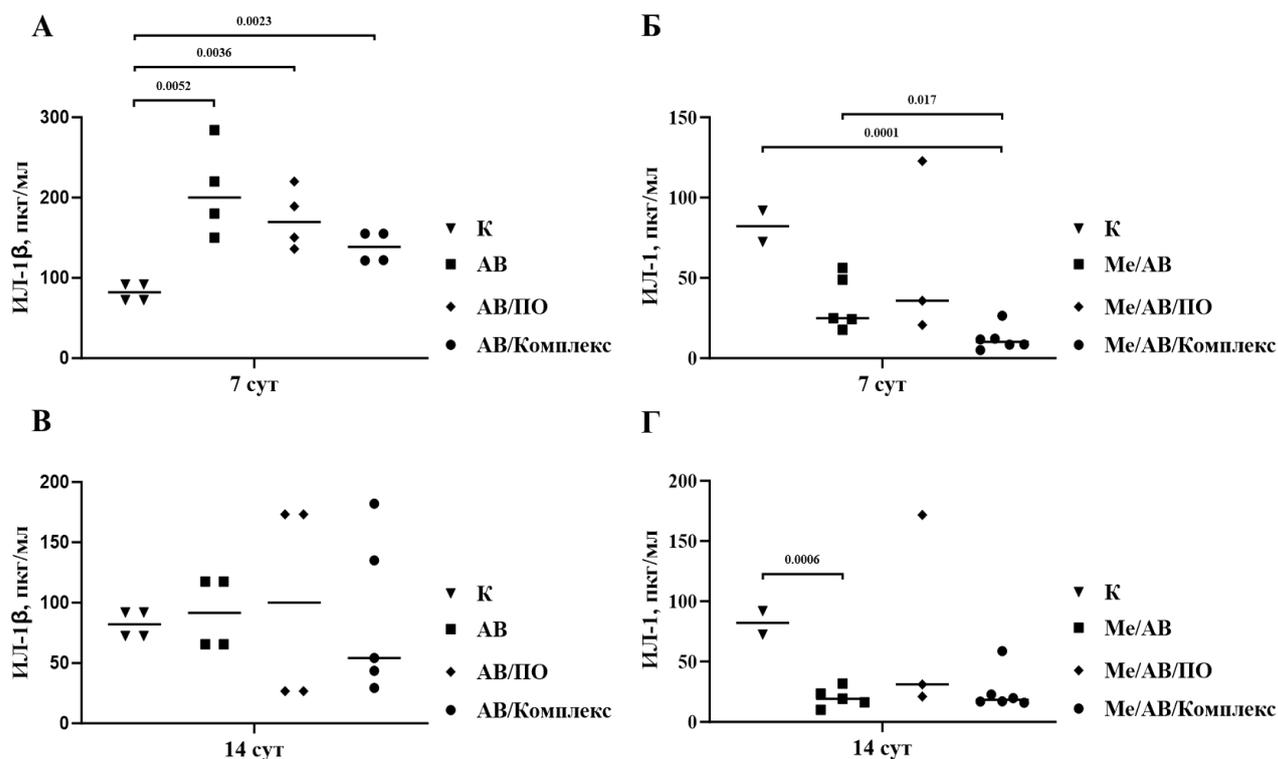
Продолжение таблицы 11

Нв, g/L	138,0 (2,2)	131,3 (11,2)	-	127,8 (6,0)	0,035 ^a	139,8 (6,7)	0,037 ^c
RDW-SD, fL	29,9 (2,3)	36,0 (1,8)	0,006 ^a	37,5 (4,0)	0,003 ^a	34,2 (1,6)	0,021 ^c
RDW-CV, %	20,8 (1,8)	24,4 (1,00)	0,024 ^a 0,038 ^d	27,3 (1,2)	0,005 ^a	23,5 (1,3)	0,032 ^c
Нейтрофилы, x10 ³ /μL	1,2 (0,1)	1,1 (0,7)	-	6,4 (1,6)	0,007 ^a 0,003 ^b 0,030 ^d	5,0 (1,0)	0,004 ^a 0,001 ^b
Лимфоциты, x10 ³ /μL	6,4 (1,2)	2,6 (0,9)	0,003 ^a	11,2 (2,6)	0,025 ^a 0,004 ^b	12,6 (4,0)	0,013 ^b
Моноциты, x10 ³ /μL	0,4 (0,2)	0,4 (0,2)	-	0,8 (0,4)	-	2,3 (0,8)	0,011 ^a 0,012 ^b 0,019 ^c 0,030 ^d
Примечание: * *p – по T-test, статистическая значимость: a – к Контролю; b – к Me/AB; c – к Me/AB/ПО; d – к 7 суткам.							

3.7. Экспериментальное изучение показателей сывороточных цитокинов у крыс с экспериментальным воспалением, предварительно затравленных солями кадмия и свинца, после коррекции Комплексом

Исследование сывороточных цитокинов является важным инструментом для диагностики, прогнозирования, оценки эффективности лечения и глубокого понимания иммунологических процессов, лежащих в основе различных заболеваний и патологических состояний.

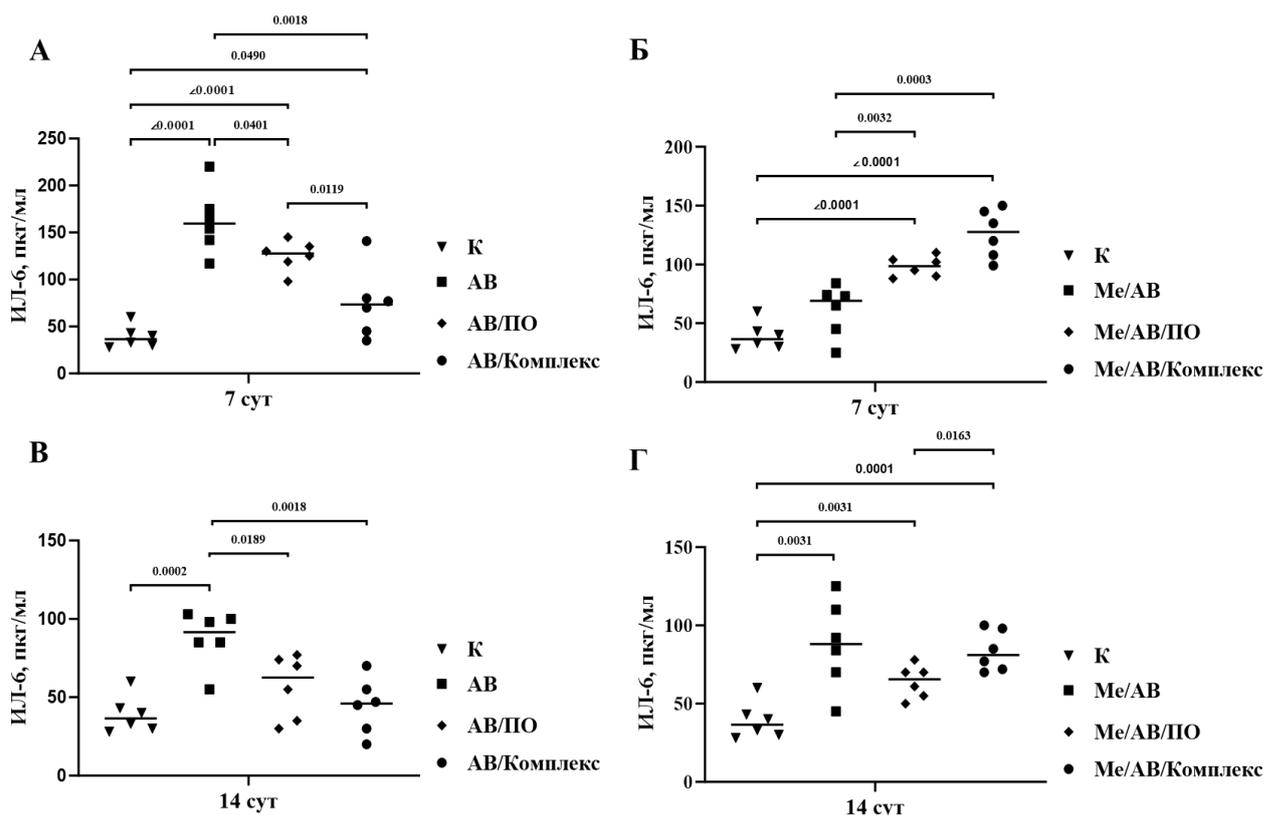
На рисунке 22 представлены результаты исследования ИЛ-1 β после коррекции Комплексом в сравнении с полиоксидонием. Коррекция Комплексом в течение недели в группе АВ приводила к статистически значимому по сравнению с контролем ($M=82.2$, $CO=11.2$) увеличению в 2,5 раза ИЛ-1 β ($M=208.5$, $CO=58.0$; $pK=0.0023$), что оказалось сопоставимо с полиоксидонием (рисунок 22 А). Через 14 суток статистически значимым изменений в концентрации ИЛ-1 β в сравниваемых группах не наблюдалось (рисунок 22 В). Течение асептического воспаления, вызванного на фоне затравки солями кадмия и свинца, Комплекс не корригировал, а значения ИЛ-1 β ($M=12.1$, $CO=7.5$; $pK=0.0001$) через 7 суток оказались статистически значимо ниже не только контроля ($M=82.2$, $CO=13.8$), но Me/AB ($M=34.4$, $CO=17.0$, $pMe/AB/Комплекс=0.017$) (рисунок 22 Б). Через 14 суток наблюдали аналогичную картину (рисунок 22 Г).



Обобщенные данные представлены в виде $M \pm CO$. Достоверность различий представлена как $*p < 0,05$.

Рисунок 22 – Содержание ИЛ-1 в сыворотке периферической крови опытных крыс с асептическим воспалением после коррекции Комплексом.

Далее мы изучали содержание в сыворотке ИЛ-6 (рисунок 23).



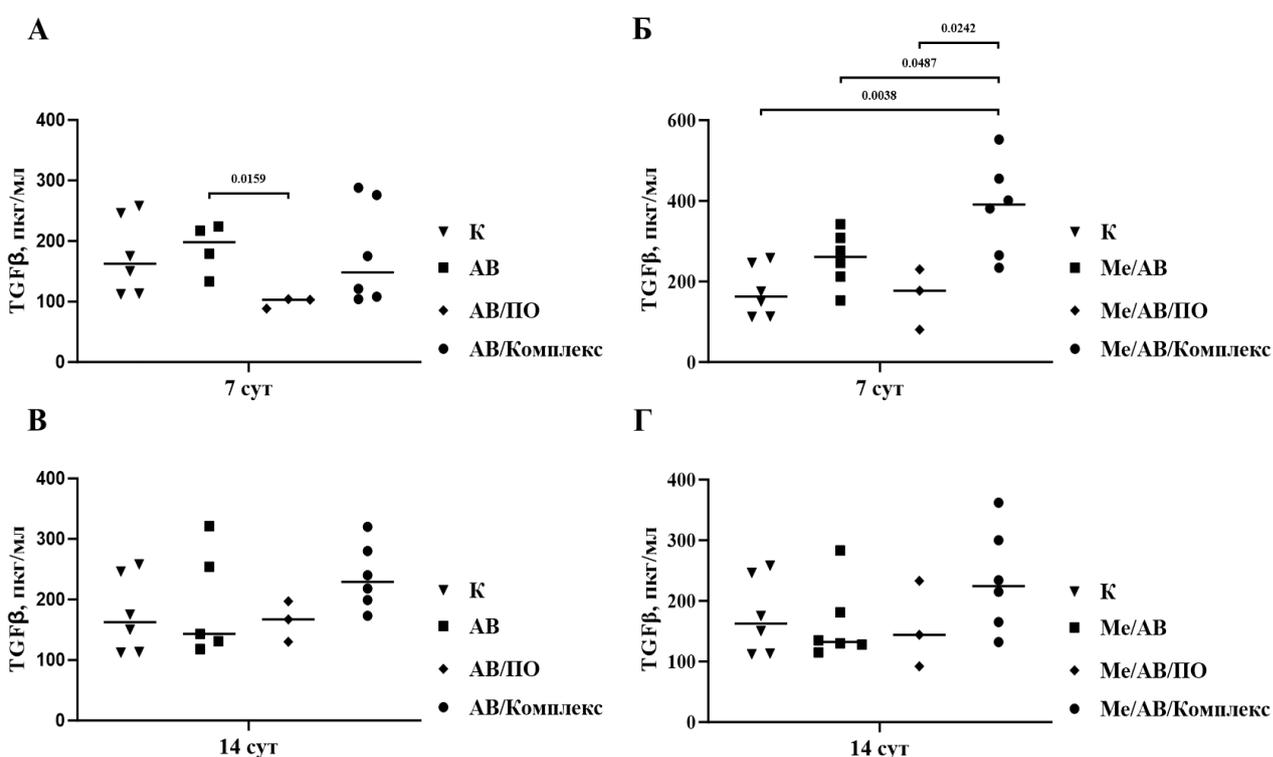
Обобщенные данные представлены в виде $M \pm CO$. Достоверность различий представлена как $*p < 0,05$.

Рисунок 23 – Содержание ИЛ-6 в сыворотке периферической крови опытных крыс с асептическим воспалением после коррекции Комплексом.

Через 7 суток после применения Комплекса уровень ИЛ-6 возрастал в 3,2 раза ($M=126.2$, $CO=20.5$; $pK < 0.0001$) по сравнению с контрольной группой и в 2 раза по сравнению с Me/AB ($M=61.0$, $CO=22.0$; $p_{Me/AB/Комплекс} = 0.0003$) (рисунок 23). Через 14 суток его концентрация осталась выше контрольного показателя в 2 раза ($M=83.7$, $CO=13.0$; $pK = 0.0001$), хотя имела тенденцию к значительному снижению по сравнению с предыдущими исследованиями (рисунок 23 Г). Эти данные сопоставимы с эффективностью полиоксидония. Однако уровни ИЛ-6 в подгруппе АВ/ПО ($M=125.3$, $CO=16.0$) и АВ/Комплекс ($M=74.7$, $CO=37.2$) оставались статистически значимо ниже, чем в подгруппе АВ соответственно в 1,3 раза ($p = 0.0401$) и 2,2 раза ($p = 0.0018$) (рисунок 23 А, В). Результаты показали, что в группе Me/AB/Комплекс через 7 суток Комплекс способствовал активации воспалительного ответа. Значительное снижение этого уровня через 14 суток указывало на частичную нормализацию воспаления, хотя его уровень оставался повышенным по сравнению с контролем. Похожие результаты с полиоксидонием свидетельствуют о возможном иммуностимулирующем эффекте Комплекса. В группе АВ применение полиоксидония и Комплекса приводило к более низким уровням ИЛ-6 по сравнению с группой АВ, что может свидетельствовать о их роли в

модуляции воспалительной активности и снижении избыточного воспалительного ответа.

Результаты исследования TGFβ представлены на рисунке 24.



Обобщенные данные представлены в виде $M \pm CO$. Достоверность различий представлена как $*p < 0,05$.

Рисунок 24 – Содержание TGFβ в сыворотке периферической крови опытных крыс с асептическим воспалением после коррекции Комплексом.

Значения TGFβ в группе АВ/Комплекс как через 7 суток, так и через 14 суток исследования колебались на уровне контрольных величин. Коррекция Комплексом асептического воспаления, вызванного на фоне предварительной интоксикации солями кадмия и свинца, вызывало существенный прирост активности TGFβ значения которого оказались статистически значимо выше контроля и Me/AB, а также значений группы, получавшей полиоксидоний. К 14 суткам исследования уровень TGFβ во всех группах колебался на уровне контроля.

Таким образом, Комплекс демонстрировал сходные эффекты с полиоксидонием в отношении повышения уровней ИЛ-6 и TGFβ. Однако Комплекс обладал более выраженным воздействием на уровни TGFβ, что, возможно, свидетельствует о его способности усиливать противовоспалительные процессы и регенеративные механизмы, что может быть особенно важно в условиях токсического воздействия.

3.8. Экспериментальное изучение показателей селезеночных субпопуляций лимфоцитов у крыс с экспериментальным воспалением, предварительно затравленных солями кадмия и свинца, после коррекции Комплексом

Пиперазины представляют собой азотсодержащие гетероциклические соединения с широким спектром биологической активности. Они применяются в качестве противоопухолевых, противогрибковых, антибактериальных и противомаларийных средств [198].

Полиоксидоний как иммуномодулятор повышает устойчивость организма к местным и общим инфекциям. Основное действие Полиоксидония связано с его прямым влиянием на фагоциты и естественные киллеры, а также со стимуляцией образования антител, в первую очередь затрагивая макрофагально-моноцитарное звено [19].

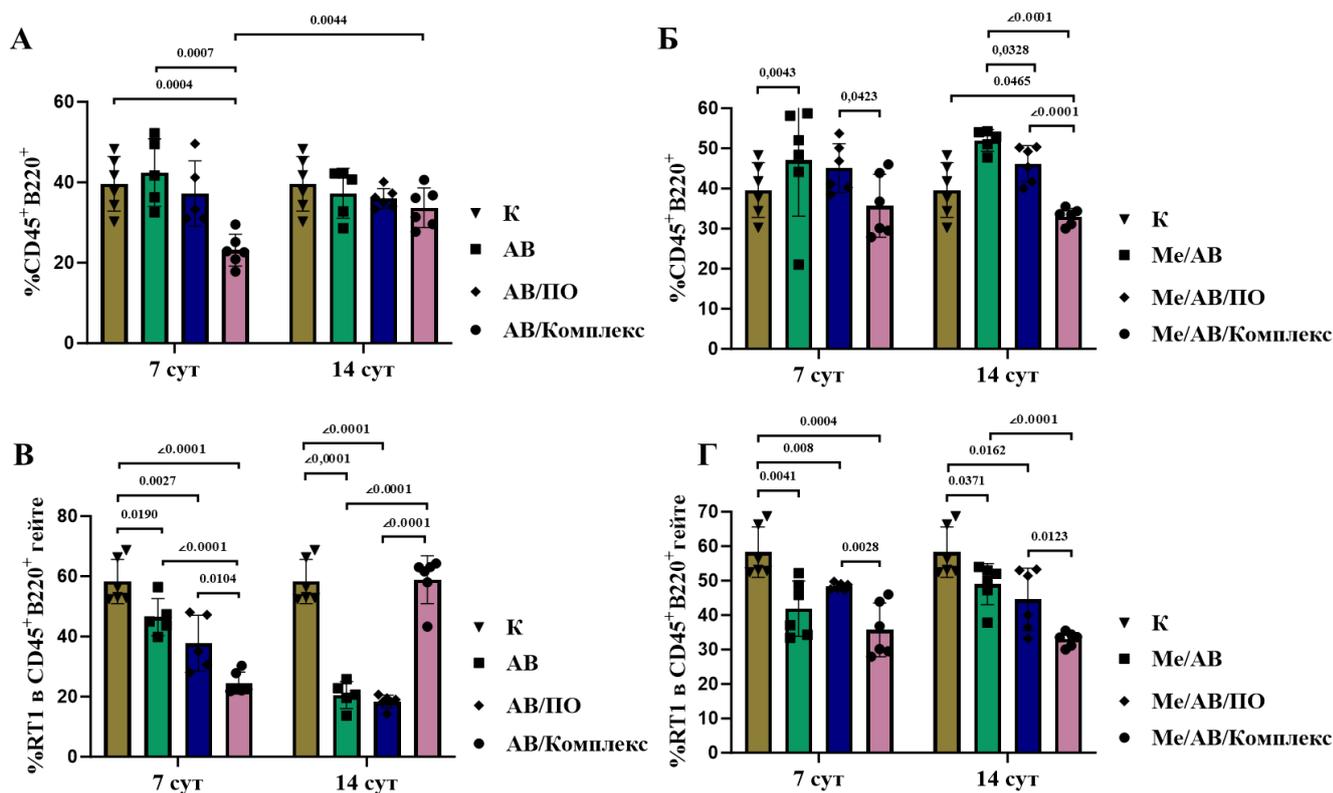
Полученные данные свидетельствуют о положительном влиянии Комплекса и полиоксидония на течение асептического воспаления, в том числе на фоне интоксикации тяжелыми металлами, поскольку увеличение клеточности селезенки при введении этих препаратов указывает на повышенную пролиферацию иммуноцитов, что может способствовать более эффективной элиминации патогенов.

Как видно из таблицы 12, введение полиоксидония и Комплекса приводило к увеличению клеточности селезенки у экспериментальных животных через 14 суток по сравнению с 7 сутками наблюдения (группы АВ/ПО и Ме/АВ/Комплекс), что, по-видимому, было связано с иммуностимулирующим влиянием данных препаратов на иммуноциты.

Таблица 12 – Клеточность селезенки ($\times 10^6$ кл/мг) в контрольной и опытных группах животных

п/п	№ сравнения	Группы	Дни наблюдений	
			7	14
1		К	0,64±0,09	0,64±0,09
2		АВ	0,58±0,10	0,68±0,14
3		Ме	0,71±0,13	0,57±0,09
4		Ме/АВ	0,67±0,15	0,49±0,17
5		АВ/ПО	0,45±0,09	0,68±0,08 ($p=0.005$)
6		АВ/Комплекс	0,68±0,17	0,61±0,04
7		МеАВПО	0,58±0,10	0,54±0,10
8	екс	МеАВ/Компл	0,62±0,18	0,69±0,08 ($p=0.001$)

Введение полиоксидония и Комплекса приводило к нормализации содержания В-лимфоцитов в группах АВ/ПО и АВ/Комплекс к концу второй недели исследования (рисунок 25 А).



Обобщенные данные представлены в виде $M \pm CO$. Достоверность различий представлена как $*p < 0,05$.

Рисунок 25 – Доля RT1 в $CD45^+B220^+$ - гейте лимфоцитов опытных крыс, получавших Комплекс, в динамике наблюдения

Введение полиоксидония и Комплекса приводило к нормализации содержания В-лимфоцитов в группах AB/ПО и AB/Комплекс на 14 сутки исследования (рисунок 25 А), что указывает на их способность восстанавливать численность В-клеток до контрольного уровня в условиях асептического воспаления. Однако, в группе крыс с асептическим воспалением, предварительно затравленных кадмием и свинцом (рисунок 25 Б), через 7 суток содержание В-лимфоцитов оставалось на уровне контроля, тогда как через 14 суток их содержание отставало как от уровня контроля, так и от уровня Me/AB соответственно в 1,2 и 1,6 раза. Это может указывать на постепенное подавление функции В-клеток в условиях асептического воспаления, что подчеркивает вредное воздействие тяжелых металлов на иммунную систему. Введение Комплекса также статистически значимо увеличивало экспрессию молекулы МНС-II на В-лимфоцитах в группе AB/Комплекс ($M=58,9$, $CO=8,0$; $p_{AB} < 0,0001$) по сравнению с группой AB ($M=20,5$, $CO=4,5$), почти в 3 раза через 14 дней (рисунок 25 В). Эти данные предполагают дополнительный механизм иммуностимулирующего эффекта производных пиперазина, связанный с индукцией антиген-презентирующей активности В-клеток через повышение экспрессии молекулы МНС-II. Стоит отметить, что полиоксидоний не оказывал аналогичного эффекта. Поскольку МНС-II играет ключевую роль

в представлении антигенов и активации других клеток иммунной системы, повышение его экспрессии указывает на значительный иммуностимулирующий эффект Комплекса. Следует отметить, что полиоксидоний не продемонстрировал аналогичного действия, что выделяет Комплекс как потенциально более эффективное средство для индукции антигенпрезентации.

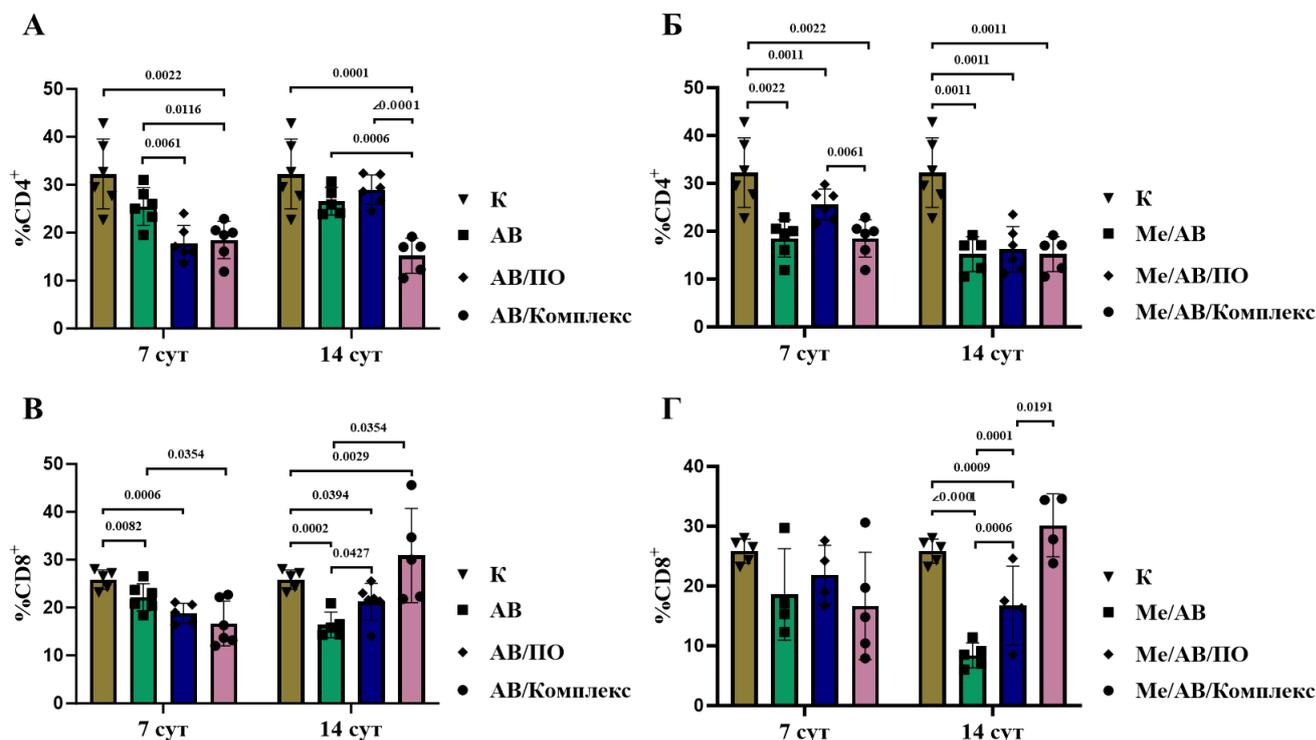
Между тем, коррекция Комплексом группы Me/AB не стимулировала экспрессию молекулы МНС-II В-лимфоцитами ни через 7 суток воздействия, значения которых отставали от контрольного уровня в 1,5 раза ($M=35,7$, $CO=7,8$; *против контроля* $M=58,3$, $CO=7,3$; $pK<0.0004$), ни через 14 суток, не достигая уровня нелеченных крыс ($M=33,0$, $CO=2,1$; *против Me/AB* $M=49,0$, $CO=6,0$; $pMe/AB<0.0001$) (рисунок 25 Г) и указывая на устойчивое угнетение антигенпрезентирующей функции В-клеток в условиях интоксикации тяжелыми металлами. Это, вероятно, свидетельствует о том, что Комплекс менее эффективен в восстановлении антигенпрезентирующей активности при наличии токсического воздействия кадмия и свинца.

Полученные результаты свидетельствовали о выраженном иммуностимулирующем эффекте Комплекса, особенно в условиях асептического воспаления, где он не только восстанавливал численность В-лимфоцитов, но и значительно повышал экспрессию молекулы МНС-II. Это указывало на его способность усиливать антигенпрезентирующую активность В-клеток. Однако в условиях асептического воспаления, вызванного на фоне интоксикации кадмием и свинцом, эффективность Комплекса в индукции экспрессии МНС-II снижалась, что указывает на ограниченность его действия при интоксикации тяжелыми металлами.

Ранние исследования показали, что Th-клетки являются наиболее чувствительными к токсическому воздействию кадмия и свинца среди всех типов лимфоцитов [200].

Проведенными исследованиями установлено, что корригирующая эффективность Комплекса сопоставима с полиоксидонием, когда доля CD4+ в группах АВ/ПО ($M=17,8$, $CO=3,7$) и АВ/Комплекс ($M=18,5$, $CO=3,9$) через 7 суток соответственно почти в 2 раза статистически значимо отставала от контрольных значений ($M=32,2$, $CO=7,3$; $pAB/Комплекс=0.0022$) (рисунок 26 А). Через 14 суток доля CD4+ в группе Me/AB/Комплекс продолжала снижаться в 2 и более раза как от уровня контроля ($M=15,2$, $CO=3,6$; $pK=0.0001$), так и от уровня АВ ($M=26,6$, $CO=3,0$; $pAB=0.0006$), тогда как под влиянием полиоксидония их значения повышались до контрольного уровня. В группах Me/AB/ПО и Me/AB/Комплекс доля CD4+ в оба срока исследования прогрессивно снижалась по отношению к контролю, тогда как по отношению к Me/AB оставалась на его уровне (рисунок 26 Б).

Таким образом, процент CD4+ клеток остается ниже контрольного уровня при применении обоих препаратов, что свидетельствует о том, что ни Комплекс, ни полиоксидоний не способствуют полному восстановлению иммунных клеток в условиях интоксикации кадмием и свинцом.



Обобщенные данные представлены в виде $M \pm CO$. Достоверность различий представлена как $*p < 0,05$.

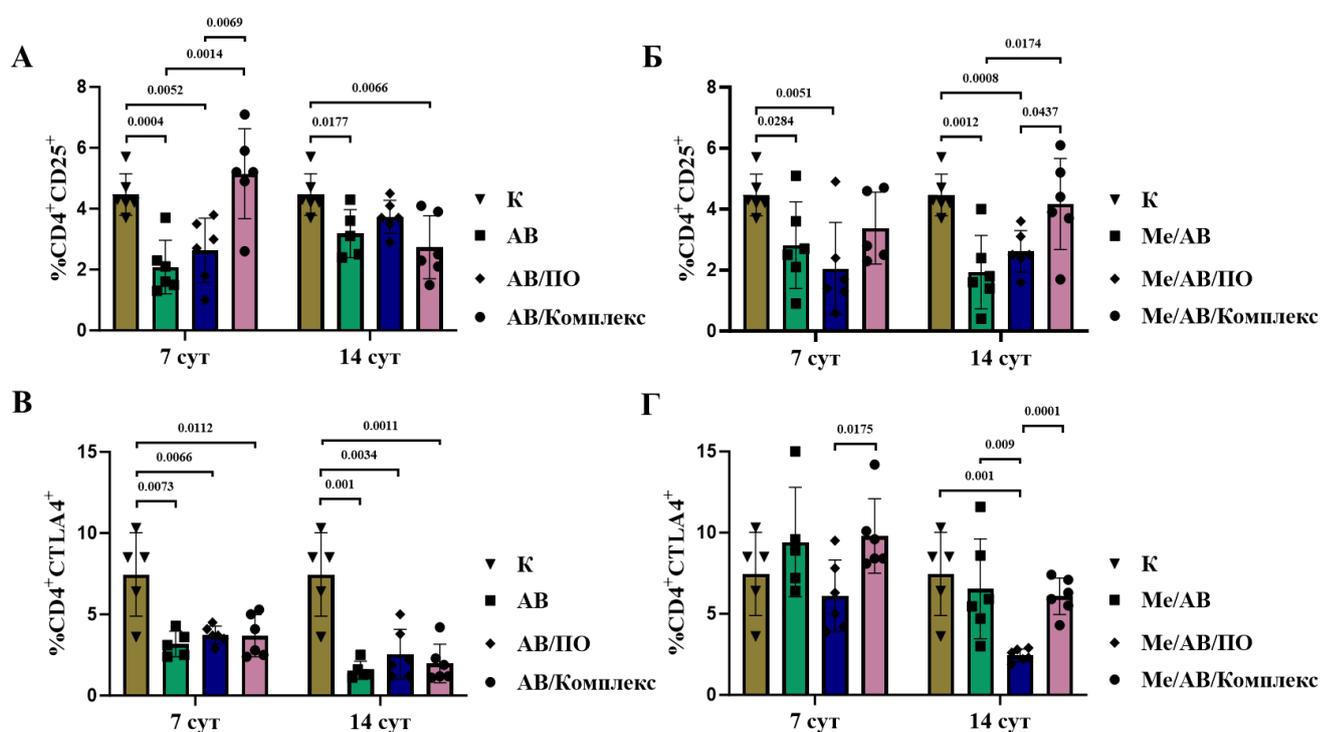
Рисунок 26 – Доля $CD4^+$, $CD8^+$ - клеток опытных крыс, получавших Комплекс, в динамике наблюдения

Введение Комплекса показало значительное восстановление уровня цитотоксических Т-лимфоцитов (CTL, $CD8^+$) в группах AB/Комплекс ($M=30,9$, $CO=9,8$) и Me/AB/Комплекс ($M=30,2$, $CO=5,3$) к 14 суткам исследования, доведя их содержание до контрольного уровня. Этот эффект был статистически значимым ($pK=0,0354$) и оказался в 1,8 раза более выраженным, чем у полиоксидония ($M=16,7$, $CO=6,6$; $pMe/AB/Комплекс=0,0191$), что указывает на лучшую способность Комплекса поддерживать численность и активность CTL (рисунок 26 В, Г). Поскольку CTL играют ключевую роль в противовирусной и противоопухолевой защите организма, восстановление их уровня до нормальных значений является положительным показателем иммуностимулирующего действия Комплекса. Этот результат подчеркивает его потенциальное преимущество перед полиоксидонием в поддержке цитотоксического звена иммунитета.

Под влиянием Комплекса через 7 суток доля $CD4^+CD25^+$ колебалась на уровне контроля, тогда как под влиянием полиоксидония их значения статистически значимо отставали от контроля в 1,8 раза ($M=2,6$, $CO=1,1$; $pK=0,0052$), а от группы AB/Комплекс в 2 раза ($M=5,2$, $CO=1,5$; $pAB/Комплекс=0,0069$) (рисунок 27 А). В группе Me/AB через 7 суток коррекции Комплекс удерживал на контрольном уровне долю $CD4^+CD25^+$, прогрессивно их восстанавливая и статистически значимо превышая в 2 раза значения Me/AB к 14 суткам исследования ($M=6,1$, $CO=1,1$; $pMe/AB=0,0174$), а

также в 2,5 раза значения Me/AB/ПО ($M=2.4$, $CO=0.4$; $p_{Me/AB/Комплекс}=0.0437$) (рисунок 27 Б). Полиоксидоний в оба срока исследования не стимулировал пролиферативную активность CD4+CD25+.

Комплекс продемонстрировал значительное иммуностимулирующее действие на регуляторные Т-клетки (CD4+CD25+), поддерживая их уровень на уровне контроля через 7 суток и способствуя их восстановлению к 14 дню. В условиях интоксикации кадмием и свинцом Комплекс обеспечил стабилизацию и увеличение доли CD4+CD25+ клеток, превышая показатели группы Me/AB в 2 раза к концу исследования. Полиоксидоний, напротив, не оказал аналогичного эффекта на пролиферацию CD4+CD25+ клеток, оставаясь ниже контрольных значений в оба срока исследования. Эти данные свидетельствуют о преимуществе Комплекса в поддержке пролиферативной активности регуляторных Т-клеток и способности эффективно модулировать иммунный ответ, особенно в условиях интоксикации кадмием и свинцом.

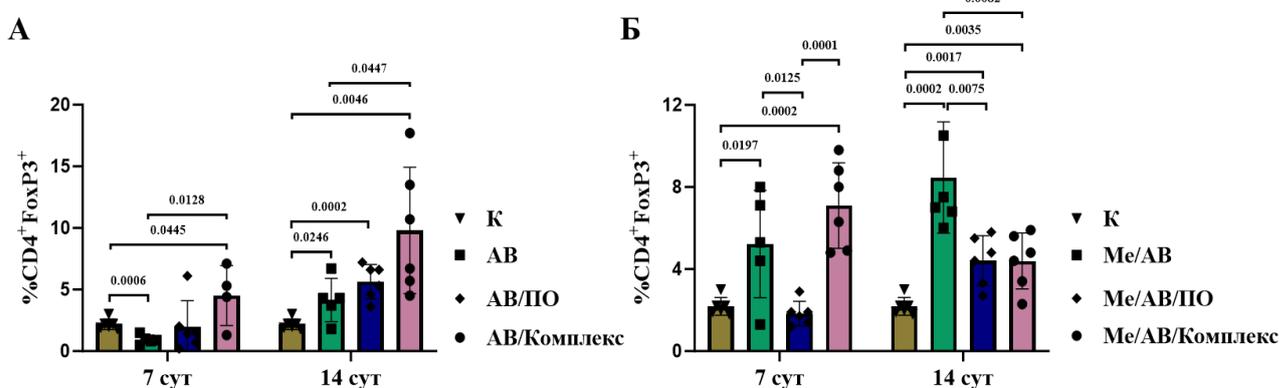


Обобщенные данные представлены в виде $M \pm CO$. Достоверность различий представлена как $*p < 0,05$.

Рисунок 27 – Доля CD4+CD25+, CD4+CTLA4+- клеток опытных крыс, получавших Комплекс, в динамике наблюдения

CTLA4 (антиген цитотоксических Т-лимфоцитов 4) представляет собой молекулу, действующую как отрицательный регулятор активации Т-клеток. Она играет важную роль в подавлении иммунного ответа, ингибируя активность Т-лимфоцитов и, тем самым, предотвращая избыточную активацию, которая может привести к аутоиммунным заболеваниям. В нашем исследовании применение Комплекса в группе АВ сопоставимо с

полиоксидонием сдерживало накопление доли CTLA4+ на уровне нелеченной группы, с более чем двукратным статистически значимым отставанием от контрольных значений через 7 ($M=3.7$, $CO=1.3$; $pK=0.0112$) и 14 суток ($M=2.0$, $CO=1.2$; $pK=0.0011$) исследования (рисунок 27 В). Воздействие Комплекса в группе Me/AB возвращало долю CTLA4+ до контрольного уровня, однако статистически значимо превышало эффективность полиоксидония в 1,7 раза ($M=9.8$, $CO=2.3$; $pMe/AB/Комплекс=0.0175$) через 7 суток и в 2 раза ($M=6.1$, $CO=1.1$; $pMe/AB/Комплекс=0.0001$) через 14 суток (рисунок 27 Г). Это, возможно, является свидетельством способности Комплекса эффективно нормализовать уровни CTLA4+ в условиях интоксикации, что может быть важным для восстановления иммунной функции после воздействия тяжелых металлов.



Обобщенные данные представлены в виде $M \pm CO$. Достоверность различий представлена как $*p < 0,05$.

Рисунок 28 – Доля CD4+FoxP3+ клеток опытных крыс, получавших Комплекс, в динамике наблюдения

Исследование экспрессии FoxP3+ показало, что через 7 суток применения Комплекса в группе с асептическим воспалением доля CD4+FoxP3+ ($M=4.5$, $CO=2.4$; $pK=0.0445$) статистически значимо нарастала более чем в 2 раза как в отношении контрольных значений ($M=2.2$, $CO=0.4$), так и более чем в 3 раза в отношении AB ($M=0.9$, $CO=0.4$; $pK=0.0128$) (рисунок 28 А). Через 14 суток отмечался более чем двукратный прирост доли CD4+FoxP3+ ($M=9.8$, $CO=5.1$) по сравнению с предыдущим сроком, более чем в 2 раза превышавший контроль ($M=2.2$, $CO=0.4$; $pAB/Комплекс=0.0046$) и AB ($M=4.2$, $CO=1.8$; $pAB/Комплекс=0.0447$).

Через 7 суток более чем трехкратное нарастание доли CD4+FoxP3+ ($M=7.1$, $CO=2.1$) как по сравнению с контролем ($M=2.2$, $CO=0.4$; $pMe/AB/Комплекс=0.0002$), так и по сравнению с Me/AB/PIO ($M=2.0$, $CO=2.1$; $pMe/AB/Комплекс=0.0001$) наблюдали в группе Me/AB/Комплекс (рисунок 28 Б). Через 14 суток как под влиянием Комплекса, так и полиоксидония доля CD4+FoxP3+ статистически значимо снижалась в 2 раза как по отношению к предыдущему сроку исследования, так и по отношению к Me/AB

($p_{Me/AB/Комплекс}=0.0082$; $p_{Me/AB/ПО}=0.0075$), но настолько же статистически значимо превышала значения контроля ($p_{Me/AB/Комплекс}=0.0035$; $p_{Me/AB/ПО}=0.0017$).

Резюмируя результаты проведенных исследований следует отметить, что применение Комплекса оказывало неоднозначное воздействие на уровень FоxP3+ клеток в условиях асептического воспаления и интоксикации солями кадмия и свинца. В модели асептического воспаления Комплекс способствовал положительной динамике регуляторного звена иммунного ответа, обеспечивая значимое повышение доли FоxP3+ клеток через 14 суток, что может способствовать эффективному контролю воспалительного процесса. Однако при предварительной интоксикации кадмием и свинцом Комплекс вызывал значительное увеличение доли FоxP3+ клеток уже через 7 суток, что может привести к чрезмерной активации регуляторной части иммунной системы и, как следствие, к возможному ослаблению иммунного ответа [179, 190]. Несмотря на частичное снижение уровня FоxP3+ к 14 суткам, он оставался выше контрольных значений, что может поддерживать состояние иммунодепрессии.

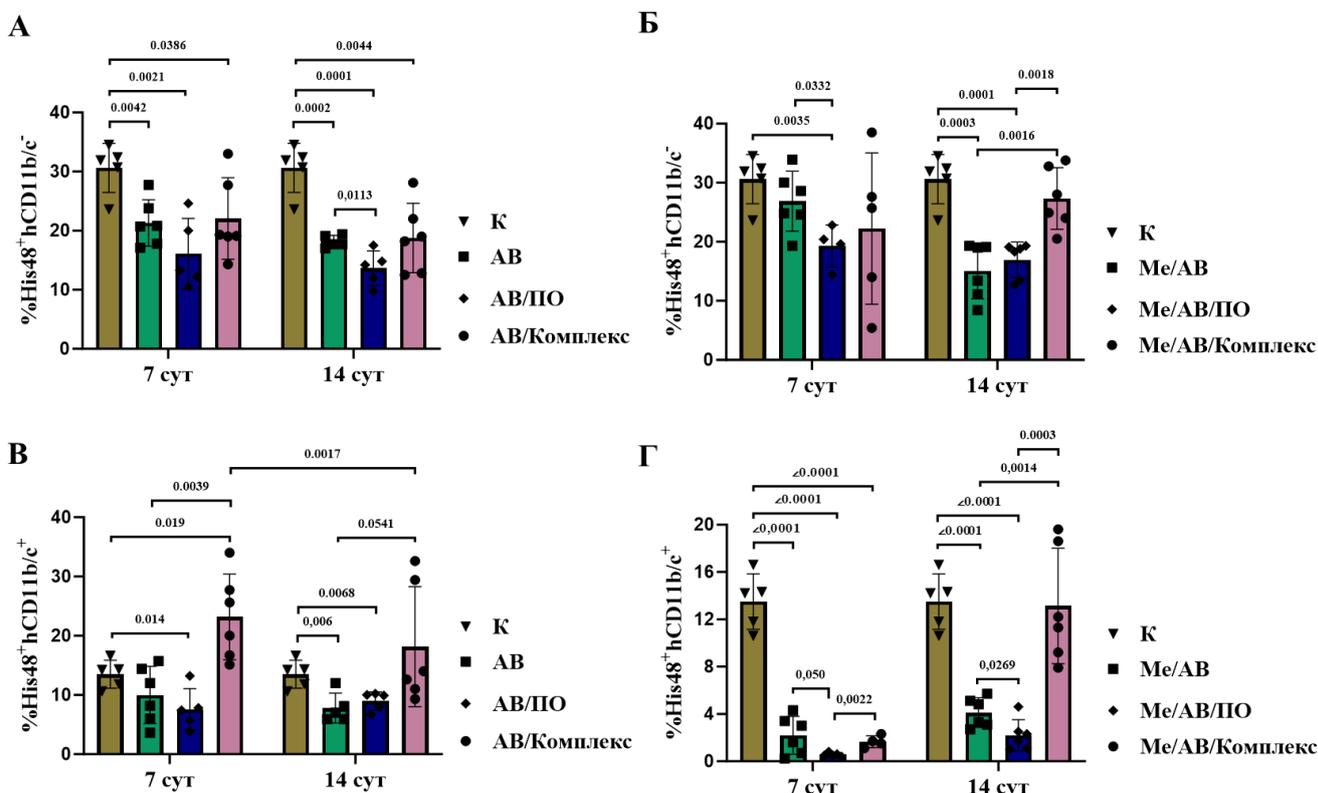
Таким образом, несмотря на первоначальное увеличение доли CD4+FоxP3+ в ответ на применение Комплекса, результаты показывают, что его эффект не является стабильным и к 14 суткам уровень T-регуляторов снижается. Это свидетельствует о неспособности Комплекса поддерживать высокие уровни FоxP3+ в долгосрочной перспективе, что может ограничивать его эффективность в модуляции иммунного ответа и контроле воспалительных процессов.

Дальнейшие исследования были направлены на изучение доли гранулоцитарных и моноцитарных популяций в селезенке экспериментальных крыс, получавших Комплекс и полиоксидоний.

Асептическое воспаление в экспериментальных группах животных АВ, АВ/ПО, Me/AB, Me/AB/ПО сопровождалось существенным снижением уровня моноцитов в селезенке животных, достигающим статистической значимости во всех группах по сравнению с контролем в оба срока исследования (рисунок 29 А, Б). Наблюдаемая картина, вероятно, была вызвана миграцией моноцитов из кровотока в ткани в область воспаления. Под влиянием Комплекса в группе Me/AB/Комплекс через 14 суток доля His48+CD11b/c- возвращалась к контрольному уровню.

Через 7 суток Комплекс повышал на 71,7% ($p=0.019$) долю His48+CD11b/c+ в группе АВ/Комплекс ($M=23.2$, $CO=7.2$) по сравнению с контролем ($M=13.5$, $CO=2.3$; $p_{AB/Комплекс}=0.019$) и на 132% по сравнению с АВ ($M=10.0$, $CO=4.8$; $p_{AB/Комплекс}=0.0039$), а через 14 суток на 132,7% по отношению к АВ ($M=18.2$, $CO=10.1$ против АВ $M=7.8$, $CO=2.5$; $p_{AB/Комплекс}=0.0541$) (рисунок 29 В). В группе Me/AB недельная коррекция Комплексом оказалась неэффективной, тогда как через 14 суток Комплекс вернул долю His48+hCD11b/c+ до контрольных значений. Можно предположить, что наблюдаемое нами повышение клеточности селезенки в группе Me/AB/Комплекс через 14 суток по сравнению с 7 сутками, вероятно,

было связано именно с иммуностимулирующим эффектом Комплекса на гранулоциты. Полиоксидоний в коррекции His48⁺hCD11b/c⁺ оказался неэффективным (рисунок 29 Г).



Обобщенные данные представлены в виде $M \pm CO$. Достоверность различий представлена как $*p < 0,05$.

Рисунок 29 – Доля His48⁺hCD11b/c⁻ His48⁺hCD11b/c⁺ - клеток опытных крыс, получавших Комплекс, к в динамике наблюдения

Таким образом, применение Комплекса показало значительный иммуностимулирующий эффект в условиях асептического воспаления и интоксикации, особенно на уровне гранулоцитов и моноцитов. Комплекс способствовал восстановлению иммунных показателей, возвращая уровни His48⁺CD11b/c⁻ и His48⁺CD11b/c⁺ клеток к контрольным значениям через 14 суток, что свидетельствовало о возможной способности укреплять иммунный ответ при длительном применении. В сравнении с полиоксидонием, Комплекс оказался более эффективным в стимулировании иммунных клеток.

3.9 Применение метода дискриминантного анализа для математического моделирования данных

Для определения ключевых признаков, наиболее эффективно разделяющих исследуемые группы, был проведен дискриминантный анализ. В данном исследовании основное внимание уделялось различиям между тремя группами. Первая группа — Me/AB — включала животных с асептическим воспалением. Вторая группа — Me/AB/ПО — состояла из животных с асептическим воспалением, вызванным предварительной интоксикацией кадмием и свинцом, которые получали полиоксидоний. Третья группа — Me/AB/Комплекс — включала животных с асептическим воспалением, вызванным предварительной интоксикацией кадмием и свинцом, которые получали Комплекс.

Анализ включал 20 переменных. Группирующими переменными выступали «Me/AB», «Me/AB/ПО» и «Me/AB/Комплекс». В качестве дискриминантных переменных были использованы иммунологические и гематологические показатели. Результаты пошагового анализа представлены в таблице 13. Анализ состоял из 7 этапов. По его итогам были выделены 7 наиболее информативных показателей.

Таблица 13 – Результаты заключительного этапа пошагового анализа дискриминантных функций (через 7 суток)

Итоги анализа	Переменные						
	ЛФ	ЭО	CD11+His-	CD4+	ИЛ-1	Нв	Э
Лямбда Уилкса	0,008203	0,001643	0,007648	0,001134	0,000521	0,000053	0,000032
Частная лямбда	0,000570	0,002844	0,000611	0,004120	0,008972	0,088541	0,145280
F-исключ (3,3)	1754,137	350,589	1635,345	241,703	110,453	10,294	5,883
p-уров.	0,000570	0,002844	0,000611	0,004120	0,008972	0,088541	0,145280
Толер.	0,001001	0,003313	0,000678	0,002276	0,006478	0,065015	0,047631
1-толер. (R-кв.)	0,998999	0,996687	0,999322	0,997724	0,993522	0,934985	0,952369
Лямбда Уилкса: ,00000 прил. F (14,4)=131,88 p< ,0001							

В ходе анализа было выделено 7 переменных, из которых две (Нв и Э) показали статистически незначимые р-уровни, что указывает на их слабый вклад в различия между группами. При этом распределение групп проводилось с учетом значимости оставшихся переменных, которые были отсортированы в следующем порядке: ЛФ, CD11+His-, ЭО, CD4+, ИЛ-1. Для дальнейшего анализа был рассчитан вклад этих пяти переменных в межгрупповые различия, что позволило выделить наиболее информативные показатели для дальнейших исследований (таблица 14).

Таблица 14 – Оценка статистической значимости Хи-квадрат для последовательных корней (через 7 суток)

Хи-квадрат, критерии исключения	Корни исключения	
	0	1
Собств. Знач.	20800,75	9,29
Канонич. R	0,999976	0,950148
Лямбда Уилкса	0,000005	0,097219
Хи-квад.	61,36791	11,65395
Ст. св.	14	6
p-уров.	0,000000	0,070149

Первый корень показал статистическую значимость, в то время как второй оказался незначимым ($p=0,070149$), что указывает на его недостаточный вклад в различия между группами. В связи с этим для дальнейшего анализа будут использоваться только стандартизированные коэффициенты первого корня, которые отражают основные различия между исследуемыми группами (таблица 15).

Таблица 15 – Стандартизированные коэффициенты дискриминантных функций (через 7 суток)

Переменные	Стандартиз. коэффициенты для канонических переменных	
	Корень 1	Корень 2
ЛФ	31,59	-0,667428
ЭО	-17,34	-0,722797
CD11+His-	-38,38	0,033932
CD4+	20,91	0,696860
ИЛ-1	-12,37	0,067796
Нв	-3,71	0,497554
Э	-4,20	-0,546950
Соб.значени я	20800,75	9,286062
Кум. доля	1,00	1,000000

Высокие значения собственных чисел (20800,75) и 100% накопленной доли объясненной дисперсии для первого корня подчеркнули его дискриминирующую силу, к которой значительный вклад внесли CD11+His-, лимфоциты и CD4+. Статистически значимые различия между группами представлены в таблице 16.

Таблица 16 – Статистическая значимость различий между группами (через 7 суток)

Группы	p-уровни (Me/AB, Me/AB/ПО, Me/AB/Комплекс, иммунологические, гематологические показатели, 7 сутки)		
	Me/AB	Me/AB/ПО	Me/AB/Комплекс
Me/AB		0,000026	0,000003
Me/AB/ПО	0,000026		0,000044
Me/AB/Комплекс	0,000003	0,000044	

На рисунке 30 представлены канонические корреляции между группами по трем дискриминантным функциям.

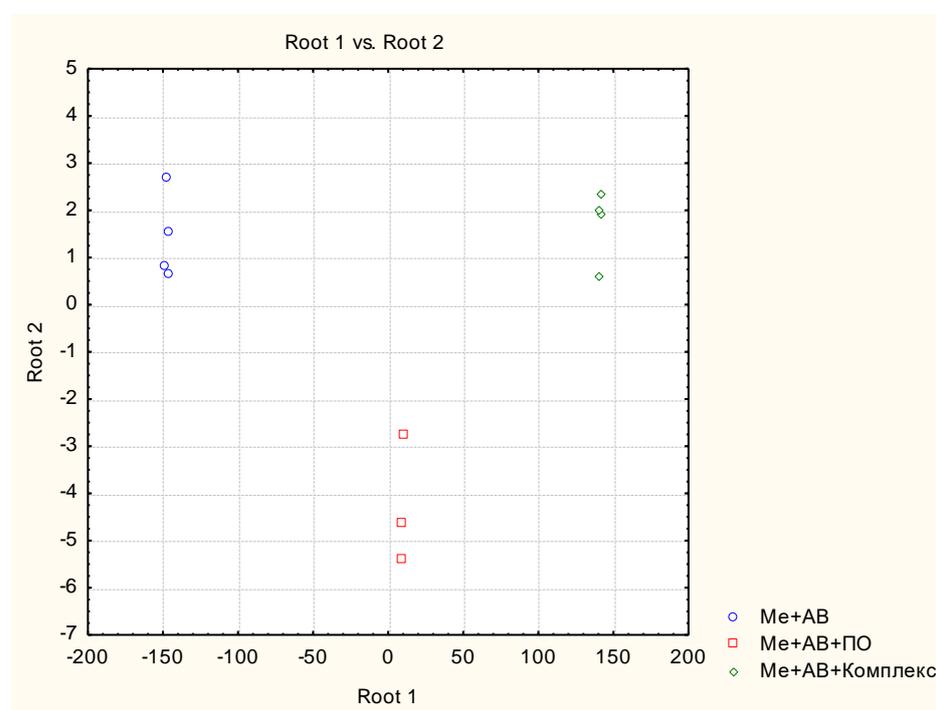


Рисунок 27 – Диаграмма рассеяния канонических корреляций для групп Me/AB, Me/AB/ПО и Me/AB/Комплекс (через 7 суток)

Как видно из таблицы 15 (стандартные коэффициенты), показатели CD11+His-, лимфоцитов и CD4+ оказали наиболее значительное влияние на разделение по первой дискриминантной функции. На рисунке 30 также показаны различия в расположении центроидов по первой дискриминантной функции (Root 1): группа «Me/AB» находится левее центра, что указывает на более низкие значения по корню 1. В то время как значения переменных CD11+His-, лимфоцитов и CD4+ для группы Me/AB/ПО расположены в центре центроида (существенно отличаясь от группы Me/AB), а показатели этих переменных в группе Me/AB/Комплекс находятся правее. Это свидетельствовало о том, что Me/AB дискриминирует с группами Me/AB/ПО и Me/AB/Комплекс низкими значениями лимфоцитов, уменьшением доли

CD11+His- и CD4+лимфоцитов. Недельная коррекция Комплексом эффективнее восстанавливала процент гранулоцитарных селезеночных популяций (CD11+His+) по сравнению с полиоксидонием, тогда как лечение полиоксидонием в этот срок исследования было более эффективным по восстановлению доли CD4+ лимфоцитов.

Затем был проведен дискриминантный анализ для второго этапа исследования, который охватывал двухнедельный период (14 суток). Результаты пошагового анализа, отображенные в таблице 17, предоставляют подробную информацию о выявленных переменных. Статистический процесс включал 6 последовательных шагов, каждый из которых способствовал уточнению и улучшению модели. По результатам анализа было выделено 6 ключевых информативных показателей, которые играют значительную роль в разделении исследуемых групп. Основные статистические данные, характеризующие эти показатели позволяют глубже понять различия между группами на данном этапе исследования.

Таблица 17 – Результаты заключительного этапа пошагового анализа дискриминантных функций (через 14 суток)

Итоги анализа	Переменные					
	CD4+	НФ	CD45+CD45R (B220)	CD4+CTLA4+	ИЛ-6	Л
Лямбда Уилкса	0,003962	0,000263	0,006095	0,002311	0,001631	0,000532
Частная лямбда	0,028384	0,427578	0,018452	0,048660	0,068963	0,211568
F-исключ (3,3)	51,34739	2,00814	79,79005	29,32590	20,25090	5,58992
p-уров.	0,004782	0,279590	0,002507	0,010734	0,018110	0,097314
Толер.	0,038104	0,327881	0,030994	0,041402	0,081915	0,104646
1-толер. (R-кв.)	0,961896	0,672118	0,969006	0,958598	0,918085	0,895354
Лямбда Уилкса: ,000011 припл. F (12,6)=46,649 p< ,0001						

Частичная статистика лямбда Уилкса показала, что переменная «CD45+CD45R(B220)» оказывает наибольшее влияние на различие между группами (0,006095, F=79,79005). Остальные переменные, расположенные по убывающей значимости, включают: CD4+, CD4+CTLA4+ и ИЛ-6. Несмотря на то, что переменные, такие как НФ (нейтрофилы) и Л (лейкоциты), также были включены в модель, их вклад в общую дискриминацию оказался значительно меньше. Для этих переменных лямбда Уилкса составила 0,000263 (F=2,00814) и 0,000532 (F=5,58992), при этом статистическая значимость была несущественной (p=0,279590 и p=0,097314 соответственно).

Проведенными исследованиями пришли к выводу, что через 14 суток отличающимися между группами переменными установлены такие переменные, как CD45+CD45R(B220), CD4+, CD4+CTLA4+ и ИЛ-6. Далее необходимо уточнить вклад этих переменных в различия между группами, проведя расчет дискриминантных функций. Проведенным каноническим анализом были выявлены две дискриминантные функции (корня), статистическая значимость которых представлена в таблице 18. Эти функции играют важную роль в интерпретации различий между исследуемыми группами и могут быть использованы для дальнейших анализов.

Таблица 18 – Оценка статистической значимости Хи-квадрат для последовательных корней (через 14 суток)

Хи-квадрат, критерии исключения	Корни исключения	
	0	1
Собств. Знач.	689,9792	11,8689
Канонич. R	0,999276	0,960361
Лямбда Уилкса	0,000112	0,077707
Хи-квад.	50,01108	14,05147
Ст. св.	12	5
р-уров.	0,000001	0,015286

Нулевая строка анализа показала высокую статистическую значимость корней, с р-значением, которое меньше или равно 0,000001, что указывает на их существенный вклад в различия между группами. Также вторичный корень, по сравнению с первым, оказался статистически значимым (строка 1), с $p=0,015286$, что подтверждает его влияние на дискриминацию между группами. Однако после исключения второго корня третий корень продемонстрировал статистически незначимое значение ($p=0,074045$), что свидетельствует о его минимальном вкладе в различия между группами.

На основании этих результатов для дальнейшей интерпретации будут использоваться стандартизированные коэффициенты первого и второго корня, так как они показывают наибольшую значимость. Эти коэффициенты представлены в таблице 19 и будут служить основой для последующего анализа и интерпретации данных.

Как видно из таблицы 19, наибольшее влияние на разделение групп по первой дискриминантной функции оказали такие показатели, как CD45+CD45R(B220), CD4+, CD4+CTLA4+ и ИЛ-6. Высокое значение собственного числа (689,9792), а также 98% накопленной доли объясненной дисперсии подчеркивают значимость первой дискриминантной функции, что делает её вклад в дискриминацию между группами особенно важным и информативным.

Таблица 19 – Стандартизированные коэффициенты дискриминантных функций (через 14 суток)

Переменные	Стандартиз. коэффициенты для канонических переменных	
	Корень 1	Корень 2
CD4+	4,9997	0,76377
НФ	1,1803	-0,62024
CD45+CD45R(B220)	-5,6313	0,05454
CD4+CTLA4+	4,7743	-0,48494
ИЛ-6	3,3287	0,57220
Л	-2,6230	-0,84851
Соб. значения	689,9792	11,86889
Кум. доля	0,9831	1,00000

Вторая дискриминантная функция в большей степени определяется такими показателями, как CD4+, лейкоциты, нейтрофилы и ИЛ-6. Несмотря на то, что кумулятивная доля объясненной дисперсии для этой функции достигает 100%, собственное число для второго корня значительно ниже по сравнению с первым, что указывает на меньшую роль этой функции в разделении групп. Для лучшего понимания полученных результатов ниже представлена диаграмма рассеяния канонических значений, которая иллюстрирует распределение данных на основе первых двух дискриминантных функций. (рисунок 28).

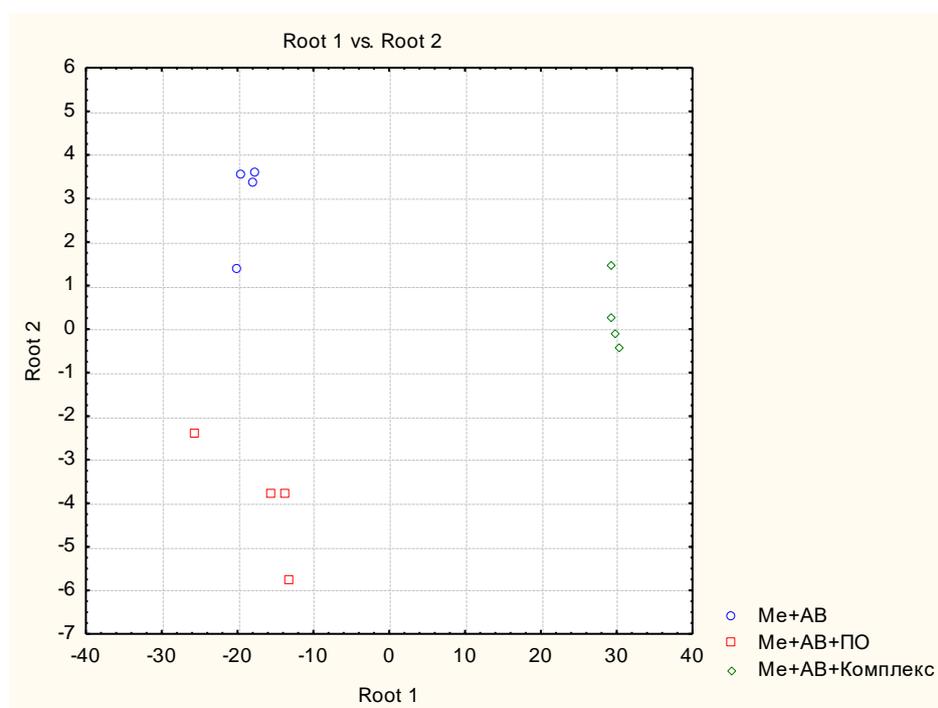


Рисунок 31 – Диаграмма рассеяния канонических корреляций для групп Me/AB, Me/AB/ПО и Me/AB/Комплекс (через 14 суток)

Как показано на рисунке 28, различия между группами становятся очевидными при анализе первой дискриминантной функции (корень 1). Эти различия отражают ключевые аспекты, которые позволяют разделить группы на основе их характеристик. Статистическая значимость этих различий представлена в таблице 20, что подчеркивает важность первого корня для дискриминации между исследуемыми группами.

Таблица 20 – Статистическая значимость различий между группами (через 7 суток (через 14 суток))

Группы	p-уровни (Me/AB, Me/AB/ПО, Me/AB/Комплекс, иммунологические, гематологические показатели, 14 сутки)		
	Me/AB	Me/AB/ПО	Me/AB/Комплекс
Me/AB		0,030781	0,000031
Me/AB/ПО	0,030781		0,000061
Me/AB/Комплекс	0,000031	0,000061	

На рисунке 31 наглядно показано, что расстояния между центроидами по первой дискриминантной функции (Root 1) отличаются: группа Me/AB/Комплекс расположена правее центра, что соответствует более высоким значениям первого корня. Группа Me/AB/ПО находится ближе к центроиду. По второму корню группы Me/AB и Me/AB/ПО расположены симметрично от центра: для Me/AB значения корня положительные, а для Me/AB/ПО – отрицательные.

Таким образом, переменные CD45+CD45R(B220), CD4+, CD4+CTLA4+ и ИЛ-6 позволяют дискриминировать группы Me/AB, Me/AB/ПО и Me/AB/Комплекс. Анализ данных показывает, что к 14 суткам как Комплекс, так и полиоксидоний уменьшают активность ИЛ-6, но не способствуют восстановлению В-лимфоцитов с фенотипом CD45+CD45R(B220) и доли CD4+ лимфоцитов у крыс с асептическим воспалением. Однако Комплекс показывает более высокую эффективность в стимуляции CTLA4+, что может существенно повлиять на регуляцию иммунного ответа и контроль воспалительных процессов.

Так, эффективность препаратов через 14 суток распределилась следующим образом: Комплекс → полиоксидоний

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В ранее проведенных исследованиях выдвигается гипотеза, что увеличение экспрессии Т-клеток в идиопатических воспалительных псевдоопухолевых тканях, имеющих хроническое слабовыраженное воспаление, может быть спровоцировано иммунным дисбалансом [201]. Этиология подобной клинической формы имеет один общий фактор: нарушение регуляции иммунной системы.

Несмотря на значительные успехи в изучении механизмов токсического воздействия ксенобиотиков, влияние кадмия и свинца на развитие воспаления и регуляцию иммунного ответа остается недостаточно исследованным [189]. Также малоизвестна их роль в активации Т регуляторных клеток. Подробное изучение этих аспектов, с акцентом на дисфункцию иммунной системы, вызванную интоксикацией тяжелыми металлами, может значительно расширить понимание патогенеза воспаления и открыть новые возможности для патогенетической коррекции.

Целью данного исследования явилась изучение влияния хлорида кадмия и ацетата свинца на развитие асептического воспаления, а также исследование возможностей иммунной модуляции воспаления на фоне введения этих металлов с использованием производного пиперазина Комплекса и полиоксидония.

Прежде чем углубляться в молекулярные нарушения регуляции, участвующие в патогенезе асептического воспаления, важно понять основные механизмы врожденной и адаптивной иммунной систем. В состав врожденной иммунной системы входят нейтрофилы, эозинофилы, антиген-презентирующие клетки (АПК), такие как макрофаги и дендритные клетки, а также естественные киллерные клетки. Активация этой системы происходит через распознавание растворимых молекулярных паттернов, связанных с патогенами (РАМР), посредством рецепторов распознавания паттернов, таких как толл-подобные рецепторы, на клетках врожденного иммунитета [202, 203, 204]. Связывание с лигандом толл-подобного рецептора запускает нисходящий сигнальный путь, что приводит к выработке провоспалительных цитокинов [205]. АПК выполняют роль моста между врожденной и адаптивной иммунными системами. После активации провоспалительных каскадов с участием АПК провоспалительное микроокружение инициирует активацию Т- и В-клеток. АПК играют центральную роль в активации адаптивного иммунитета, где важную функцию выполняют цитокины. В результате активации рецепторов Т-клеток через АПК наивные CD4⁺ Т-клетки дифференцируются в различные подтипы Th в зависимости от комбинации и экспрессии различных цитокинов [206].

В наших исследованиях оценка динамики основных эффекторных и регуляторных популяций иммуноцитов и миелоидных клеток при асептическом воспалении показала снижение через 14 дней доли В-клеток, экспрессирующих МНСII, цитотоксических Т-лимфоцитов (CTL), CD4⁺CD25⁺, Treg-клеток, а

также моноцитов и гранулоцитов [207]. Это снижение может быть связано с миграцией эффекторных клеток к очагу воспаления и одновременным уменьшением иммуносупрессивного фона.

Наши исследования показали, что двухнедельное введение хлорида кадмия и ацетата свинца в дозе 2,5 мг/кг м.т. оказывало системное иммунотоксическое воздействие на организм, что проявлялось снижением клеточного состава лейкоцитарной фракции крови на протяжении всего периода наблюдения. Острое воспаление является первоначальной реакцией на вредные стимулы и сохраняется в течение нескольких дней или недель. Большинство инфильтрирующих воспалительных клеток при остром воспалении являются гранулоцитами. Так, нейтрофилы выполняют разнообразные функции в процессе воспаления, такие как фагоцитоз микроорганизмов, выработка активных форм кислорода, секреция протеаз и образование нейтрофильных внеклеточных ловушек [208]. Эти клетки играют ключевую роль в разрешении воспаления и восстановлении тканевого гомеостаза [209]. Исследования на мышах показали, что заживление ран замедляется при дефиците нейтрофилов. Кроме того, их недостаток способствует обострению аутоиммунных заболеваний.

Кадмий и свинец вызывали дисрегуляцию воспалительного процесса, проявляющуюся в снижении уровней эффекторных иммунных популяций, таких как В-клетки, CD4⁺ Th-клетки, а также моноциты и гранулоциты в селезенке животных. Кроме того, наблюдалось уменьшение доли цитотоксических Т-лимфоцитов (CTL) и гранулоцитов и увеличение доли Т-регуляторных клеток, что указывало на усиление иммуносупрессии и смещение иммунного ответа в сторону Th2-типа. Несмотря на повышение доли В-клеток, что, по-видимому, обеспечивалось посредством самоподдерживающегося расширения В-клеток, способность к экспрессии молекул МНС-II (RT1⁺ в CD45⁺CD45R(B220)⁺гейте) на ранних сроках воспаления в группе Me/AB была ниже средних контрольных значений. Известно, что макрофаги, В-клетки и дендритные клетки активируют Т-клетки через перекрестную презентацию антигенов.

Цитокины являются основными сигнальными молекулами, высвобождаемыми воспалительными клетками и участвующими во многих функциях [210]. Результаты исследования показали, что интоксикация тяжелыми металлами вызывает значительное снижение уровней провоспалительных цитокинов ИЛ-1 β и ИЛ-6. Это снижение может указывать на нарушение регуляторных процессов в иммунной системе, вызванное подавлением пролиферации иммунных клеток и усилением апоптоза под влиянием токсичных веществ. Через 14 суток уровень ИЛ-6 в группе Me/AB частично восстановился, тогда как уровень ИЛ-1 β так и не достиг контрольных значений.

Эти данные предполагают, что кадмий и свинец не только подавляют синтез ключевых провоспалительных цитокинов, но и препятствуют полноценному воспалительному ответу. Это может создавать предпосылки для

хронического воспаления и глубоких нарушений в работе иммунной системы. Постоянное подавление ИЛ-1 β и ИЛ-6 при воздействии тяжелых металлов нарушает естественные защитные механизмы и меняет типичное течение воспалительного процесса, что может приводить к долгосрочным последствиям для иммунной устойчивости организма. Уровень противовоспалительного цитокина TGF β остался без изменений, что не позволяет сделать вывод о его участии в ответе на интоксикацию тяжелыми металлами в данном исследовании.

Таким образом, кадмий и свинец оказывают выраженное подавляющее влияние на механизмы воспаления, что может ослаблять защитные функции организма и негативно сказываться на его иммунной системе в долгосрочной перспективе.

Наши дальнейшие исследования были направлены на поиск новых патогенетических путей коррекции нарушений, вызванных солями кадмия и свинца.

Применение нового производного пиперазина – Комплекса – у опытных животных в изученных гистопрепаратах (тимус, брыжеечные лимфоузлы, ткани воспаления) вызывало выраженное утолщение коркового слоя и образование грануляционной ткани, которая изолировала очаг воспаления от окружающих тканей. В группе Ме/АВ/Комплекс через 7 суток в очаге воспаления и на стадии регенерации было зафиксировано заметное уменьшение площади некроза, за исключением нескольких участков. В клеточном инфильтрате обнаруживались скопления фибробластов и макрофагов, а также интенсивное разрастание грануляционной и рыхлой волокнистой соединительной ткани. Результаты показали, что введение Комплекса способствовало более быстрому заживлению воспаления благодаря ускоренному образованию грануляционной ткани по сравнению с группой, получавшей Полиоксидоний. Последующие исследования, направленные на изучение воздействия Полиоксидония на воспалительный процесс при введении металлов, показали, что Полиоксидоний не ускорял заживление, даже через 14 суток, когда в зоне воспаления сохранялись отеки, а развитие фиброзной ткани оставалось минимальным. В группе Ме/АВ/Комплекс уже через 7 суток наблюдалось рассасывание некроза с участием макрофагов, а к 14 суткам очаг воспаления полностью зажил.

В текущее исследование были включены показатели белой и красной крови для групп с изолированным скипидар-индуцированным асептическим воспалением и опытные группы, получавшие ПО и Комплекс. Подводя итоги проведенных исследований, можно выделить выраженный иммуномодулирующий эффект как Комплекса, так и Полиоксидония на фоне асептического воспаления. В группе Ме/АВ их применение привело к значительному увеличению числа лейкоцитов, нейтрофилов и лимфоцитов на 7 сутки, что свидетельствовало об активации иммунного ответа. К 14 суткам эти показатели вернулись к норме, что указывало на завершение воспалительного процесса. Комплекс способствовал восстановлению уровня гемоглобина до

контрольных значений, а также превысил предыдущие показатели, в то время как Полиоксидоний не оказал аналогичного воздействия. Таким образом, Комплекс продемонстрировал восстанавливающее действие на иммунную систему и эритроцитарную фракцию крови в условиях асептического воспаления на фоне тяжёлой интоксикации.

Анализ сывороточных цитокинов показал, что в группе Me/AB/Комплекс через 7 суток применение Комплекса способствовало активации воспалительного ответа. Однако через 14 суток было зафиксировано значительное снижение уровня цитокинов, что указывает на частичное восстановление воспалительной реакции, хотя она оставалась выше контрольного уровня. Похожие результаты были получены при применении полиоксидония, что может свидетельствовать о возможном иммуностимулирующем эффекте Комплекса. В группе AB применение полиоксидония и Комплекса привело к более низким уровням ИЛ-6 по сравнению с группой AB, что может свидетельствовать о способности этих препаратов модулировать воспалительную активность и уменьшать избыточную реакцию иммунной системы.

Далее изучали динамику относительного содержания селезеночных субклеточных популяций, которые свидетельствовали о выраженном иммуностимулирующем эффекте Комплекса, особенно в условиях асептического воспаления, где он не только восстанавливал численность В-лимфоцитов, но и значительно повышал экспрессию молекулы МНС-II. Это указывало на его способность усиливать антигенпрезентирующую активность В-клеток. Однако в условиях асептического воспаления, вызванного на фоне интоксикации кадмием и свинцом, эффективность Комплекса в индукции экспрессии МНС-II снижалась, что указывает на ограниченность его действия при интоксикации тяжелыми металлами. Получены сведения о преимуществе Комплекса в поддержке пролиферативной активности регуляторных Т-клеток и способности эффективно модулировать иммунный ответ, особенно в условиях интоксикации кадмием и свинцом. Важным критерием восстановления иммунной функции после воздействия тяжелых металлов является способность Комплекса эффективно нормализовать уровни CTLA4+.

Исследования показали, что применение Комплекса имело двоякое влияние на уровень FoxP3+ клеток при асептическом воспалении и интоксикации кадмием и свинцом. В модели асептического воспаления Комплекс способствовал увеличению доли FoxP3+ клеток через 14 суток, что могло способствовать контролю воспаления. Однако при интоксикации тяжелыми металлами увеличение доли FoxP3+ клеток наблюдалось уже через неделю, что могло привести к чрезмерной активации регуляторного звена и ослаблению иммунного ответа. Хотя уровень FoxP3+ клеток снизился к 14 суткам, их количество оставалось выше нормы, что указывало на сохранение состояния иммунной депрессии.

Применение Комплекса оказало заметный иммуностимулирующий эффект в условиях асептического воспаления и интоксикации, особенно

касающихся гранулоцитов и моноцитов. Комплекс способствовал восстановлению иммунных показателей, возвращая уровни клеток His48+CD11b/c- и His48+CD11b/c+ к контрольным значениям к 14 суткам, что свидетельствовало о его способности поддерживать иммунный ответ при длительном применении. В отличие от Полиоксидония, Комплекс показал большую эффективность в активации иммунных клеток.

Для выявления ключевых отличительных признаков, позволяющих наилучшим образом разделить изучаемые группы, был проведен дискриминантный анализ. Недельная коррекция Комплексом эффективнее восстанавливала процент гранулоцитарных селезеночных популяций (CD11+His+) по сравнению с полиоксидонием, тогда полиоксидоний в этот срок исследования был более эффективным по восстановлению доли CD4+ лимфоцитов. Анализ данных показал, что к 14 суткам как Комплекс, так и полиоксидоний уменьшали активность ИЛ-6, но не способствовали восстановлению В-лимфоцитов с фенотипом CD45+CD45R(B220) и доли CD4+ лимфоцитов у крыс с асептическим воспалением. Однако Комплекс показал более высокую эффективность в стимуляции CTLA4+, что может существенно повлиять на регуляцию иммунного ответа и контроль воспалительных процессов.

ВЫВОДЫ

1. Микроскопическими исследованиями органов иммуногенеза у крыс с асептическим воспалением, вызванным на фоне предварительной интоксикации солями кадмия и свинца, выявлены выраженные структурные изменения лимфоорганов на всем протяжении эксперимента. В тимусе наблюдался отек и расширение перикапиллярных пространств, отек стромы, полнокровие сосудов и микрогеморрагии с апоптозом лимфоцитов (7 сут). Отек капсулы и уменьшение лимфоцитов в корковом слое, снижение количества тимических телец, полнокровные сосуды, кровоизлияния с лейкоцитами наблюдали через 14 суток. В брыжеечных лимфоузлах через 7 суток оказалось увеличенным количество больших и средних лимфоцитов, присутствовали плазматические клетки, макрофаги, нейтрофилы, эозинофилы. Через 14 суток общее количество лимфоцитов снижалось, нейтрофилы оставались на высоком уровне. В кожных покровах через 7 суток вокруг некроза отмечалась зона реактивного воспаления с отеком, лейкоцитарной инфильтрацией, фибробластами и капиллярами. К 14 суткам зона некроза уменьшалась, скапливались моноциты и лейкоциты, формировалась грануляционная ткань, капсула утолщалась.

2. Установлено, что к ключевым показателям нарушения регуляции воспаления в группе Me/AB относятся количественное снижение лейкоцитов, лимфоцитов и нейтрофилов, выраженная анемия. Соли тяжелых металлов на ранних сроках воспаления снижают экспрессию молекулы MHC-II (RT1+ в CD45+CD45R(B220)+гейте) в группе Me+AB на 28%. Течение воспаления усугубляется снижением CD4+ лимфоцитов соответственно на 42,5% и 52,8% по сравнению с контролем в оба срока исследования, повышением доли FoxP3+ и CTLA4+ в ранней стадии воспаления, создающий супрессорный фон для развертывания воспалительной реакции. Воспаление через 2 недели характеризуется снижением дифференцировки гранулоцитарных лейкоцитов в селезенке, снижением лимфоцитарного пула лейкоцитов. Кадмий и свинец подавляют синтез ИЛ-1 β и ИЛ-6 в оба срока исследования, препятствуя полноценному развитию воспалительного ответа.

3. Введение Полиоксидония способствует структурным изменениям в тимусе и лимфоузлах, что отражается в повышении лимфоцитарной активности и регенерации тканей. Восстановительные процессы в тимусе и лимфоузлах свидетельствуют о реактивной адаптации иммунной системы, однако более выраженного фиброзного заживления кожного покрова не происходит. Применение производного пиперазина в группе опытных животных приводит к заметному утолщению коркового вещества и образованию грануляционной ткани, что способствует улучшению регенеративных процессов. Уменьшение участков некроза и развитие грануляционной ткани указывает на его более высокую эффективность в сравнении с Полиоксидонием. В отличие от Комплекса, применение Полиоксидония не приводит к заметному ускорению заживления. Через 14 суток в зоне воспаления остаются отёки и недостаточно

развитая фиброзная ткань, что подтверждает меньшую эффективность Полиоксидония в условиях воспаления, вызванного интоксикацией металлами.

4. Коррекция воспаления, вызванного интоксикацией кадмием и свинцом, показала, что Комплекс на 7 сутки более чем в 3 раза увеличивал количество лейкоцитов и лимфоцитов, а также более чем в 2 раза содержание нейтрофилов, не снижая их количество в последующие сроки. Комплекс не изменял уровень ИЛ-1 β , но повышал ИЛ-6. Он не стимулировал экспрессию МНС-II, оставаясь ниже контрольного уровня. Комплекс восстанавливал уровень CD8⁺ до контрольных значений ($p=0,00191$), что было более выражено, чем у Полиоксидония. Комплекс удерживал долю CD4⁺CD25⁺ на контрольном уровне, превышая значения группы Me/AB в 2 раза к 14 дню. Он восстанавливал долю CTLA4⁺, что статистически значимо превышало эффективность Полиоксидония в 1,7 раза ($p=0,0175$) через 7 суток и в 2 раза ($p=0,0001$) через 14 суток. Однако Комплекс вызывал избыточное нарастание FoxP3⁺ клеток через 7 суток. Через 14 суток Комплекс вернул долю His48+hCD11b/c⁺ до контрольных значений. Полиоксидоний вызвал более чем трехкратное увеличение уровня лейкоцитов и лимфоцитов через 7 суток, но при этом не оказывал значительного влияния на количество нейтрофилов, ИЛ-1 β , а также не стимулировал пролиферацию клеток CD4⁺CD25⁺. В условиях интоксикации кадмием и свинцом Полиоксидоний оставался ниже контрольных значений, а его эффективность в восстановлении доли CTLA4⁺ и уровня CTL была значительно ниже, чем у Комплекса, что свидетельствует о менее выраженной способности поддерживать иммунный ответ.

5. Результаты дискриминантного анализа показали, что через 7 суток группа Me/AB характеризуется значительными различиями по отношению к группам Me/AB/ПО и Me/AB/Комплекс, что выражается в снижении уровней лимфоцитов, а также уменьшении доли CD11⁺His⁻ и CD4⁺ лимфоцитов. Недельная коррекция Комплексом эффективнее восстанавливала процент гранулоцитарных селезеночных популяций (CD11⁺His⁺) по сравнению с полиоксидонием, тогда как лечение полиоксидонием в этот срок исследования было более эффективным по восстановлению доли CD4⁺ лимфоцитов. Через 14 суток переменные CD45⁺CD45R(B220), CD4⁺, CD4⁺CTLA4⁺ и ИЛ-6 позволяют дискриминировать группы Me/AB, Me/AB/ПО и Me/AB/Комплекс. Анализ данных показал, что к 14 суткам как Комплекс, так и полиоксидоний уменьшали активность ИЛ-6, но не способствовали восстановлению В-лимфоцитов с фенотипом CD45⁺CD45R(B220) и доли CD4⁺ лимфоцитов у крыс с асептическим воспалением. Однако Комплекс показал более высокую эффективность в модуляции CTLA4⁺, что может существенно повлиять на регуляцию иммунного ответа и контроль воспалительных процессов. Эффективность препаратов через 14 суток распределилась следующим образом: Комплекс \rightarrow полиоксидоний.

Практические рекомендации:

1. Результаты, полученные в ходе проведения экспериментальных работ, могут стать базовой основой при выполнении научно-исследовательских работ прикладного направления, решении актуальных медицинских проблем в области приоритетного направления здравоохранения.

2. Данные о механизмах токсического воздействия на организм наиболее распространенных антропогенных токсикантов, к которым относятся ацетат свинца и хлорид кадмия, могут быть полезны для врачей, работающих в экологически неблагоприятных регионах, для оценки состояния иммунной системы как мишени токсического действия любого происхождения.

3. Результаты исследования могут стать основой для дальнейшего проведения доклинических и клинических исследований для разработки новых отечественных лекарственных препаратов и дальнейшей коммерциализации.

4. Выводы, полученные в ходе выполнения диссертации, могут быть включены в комплекс учебно-методических дисциплин медицинских вузов базовых и клинических профилей, использованы образовательном процессе на медицинских и биологических факультетах, а также в программах повышения квалификации для иммунологов, терапевтов и врачей общей практики.

5. На основе проведенных исследований получен патент на изобретение и авторская модель.

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ

- 1 Adnan M. et al. Research Progress on Heavy Metals Pollution in the Soil of Smelting Sites in China // *Toxics*. – 2022. - Vol. 10, №5. – P. 231.
- 2 Zhang P. et al. Spatial-temporal variation and source analysis of heavy metals in different land use types in Beilun District // *Sci Rep*. – 2024. - Vol. 14, №1. – P. 15127.
- 3 Das T.K. et al. Review on the Use of Heavy Metal Deposits from Water Treatment Waste towards Catalytic Chemical Syntheses // *Int J Mol Sci*. – 2021. - Vol. 22, №24. – P. 13383.
- 4 Andjelkovic M, Buha Djordjevic A. et. al. Toxic Effect of Acute Cadmium and Lead Exposure in Rat Blood, Liver, and Kidney // *Int J Environ Res Public Health*. – 2019. – Vol. 16(2):274. – P. 535-568.
- 5 Commission of the European Communities (CEC) Communication from the Commission to the Council, the European Parliament and the European Economics and Social Committee, Final. Commission of the European Communities, Brussels, Belgium // *A European Environment and Health Strategy*. – 2003. – Vol. 12. – P. 678-689.
- 6 Guo Y.S. et al. Progress in quality control, detection techniques, speciation and risk assessment of heavy metals in marine traditional Chinese medicine // *Chin Med*. – 2023. - Vol. 189, №1. – P. 73.
- 7 Marselina M., Wijaya M. Heavy metals in water and sediment of Cikijing River, Rancaekek District, West Java: Contamination distribution and ecological risk assessment // *PLoS One*. – 2024. - Vol. 19, №4. – P. e0294642.
- 8 Есенбаева Ж.Ж., Саинова Г.А. Утилизация донных осадков водохранилищ // *Вестник КазНУ. Серия экологическая*. – 2022. – Т.73. - №4. – С. 25-36.
- 9 Шарипова Б.У. и др. Эколого-геохимическая оценка территории Южного Казахстана (на примере Туркестанской и Кызылординской областей) // *Вестник КазНУ. Серия экологическая*. – 2021. – Т.67, №2. – С. 31-40.
- 10 Кайненова Т.С. и др. Оценка загрязнения природной среды отходами Атырауского НПЗ // *Вестник КазНУ. Серия экологическая*. – 2021. – Т.68, №3. – С. 83-91.
- 11 Абдибатаева М. и др. Деградация почвы за счет загрязнения нефтью и нефтепродуктами и разработка способа их предотвращения // *Вестник КазНУ. Серия экологическая*. – 2019. – Т.59, №2. – С. 24-38.
- 12 Wiczorek J. et al. Assessment of the pollution and ecological risk of lead and cadmium in soils // *Environ Geochem Health*. – 2018. – Vol. 40, №6. – P. 2325-2342.
- 13 Кумар Е.А. Анализ новых государственных документов по экологическим аспектам в Казахстане // *Вестник КазНУ. Серия экологическая*. – 2022. – Т.72, №3. – С. 4-21.

14 Matović V., Buha A., Dukić-Ćosić D., Bulat Z. Insight into the oxidative stress induced by lead and/or cadmium in blood, liver and kidneys // Food Chem. Toxicol. –2015. – Vol. 15. – P. 25-31.

15 Wang G., Fowler B.A. Roles of biomarkers in evaluating interactions among mixtures of lead, cadmium and arsenic // Toxicol. Appl. Pharmacol. – 2008. – Vol. 233. – P. 92–99.

16 Абилда Ж.К. и др. Построение геоэкологической карты переноса пылевых частиц с поверхности свинцового отвала Чимкентского свинцового завода // Вестник КазНУ. Серия экологическая. – 2023. – Т.74, №1. – С. 4-15.

17 Дарибаев Ж.Е. и др. Влияние шлакохранилища свинцового завода на атмосферу // Вестник КазНУ. Серия экологическая. – 2023. - Т.75, №2. – С. 14-27.

18 Болуспаева Л.С. и др. Содержание кислоторастворимой формы тяжелых металлов в почвах г. Усть-Каменогорска // Вестник КазНУ. Серия экологическая. – 2023. – Т.77, №4. – С. 4-14.

19 Нуркеева Б. А., Адамбекова А. А. Экологическая безопасность Казахстана // Молодежный научный форум «Уфимский гуманитарный научный форум»: Сборник статей: к 70-летию Дегтярева Александра Николаевича. – 2022. – С. 428-431.

20 Васильянова Л. С. Экология Казахстана (часть 1) // Новости науки Казахстана. – 2018. – № 2(136). – С. 218-238.

21 Васильянова Л. С. Экология Казахстана (часть 2) // Новости науки Казахстана. – 2018. – № 3(137). – С. 209-224.

22 Садырова Г.А. и др. Влияние автотранспорта на уровень загрязнения атмосферного воздуха города Алматы // Вестник КазНУ. Серия экологическая. – 2022. – Т.70, №1. – С. 37-44.

23 Жадил А.Д. и др. Исследование токсической и генотоксической активности воды озера Кольсай, расположенного на территории Алматинской области Республики Казахстан // Вестник КазНУ. Серия экологическая. – 2022. – Т.73, №4. – С. 78-88.

24 Каражанова А.В. и др. Генотоксичность воды рек Есентай и Улькен Алматы на животных тест-системах // Вестник КазНУ. Серия экологическая. – 2021. – Т.66., №1. – С. 18-28.

25 Ловинская А.В. и др. Токсическая и мутагенная активность родников г. Алматы // Вестник КазНУ. Серия экологическая. – 2019. – Т.60, №3. – С. 42-53.

26 Имангалиева А.Н., Ишанова М.Н., Сейлханова Г.А. Композитные материалы на основе шрота расторопши для очистки водных растворов от ионов Pb²⁺ и Cd²⁺ // Вестник КазНУ. Серия экологическая. – 2018. – Т.56, №3. – С. 68-76.

27 WHO, Action Is Needed on Chemicals of Major Public Health Concern // Public Health Environmental. – 2018. – Vol. 1–4. – P. 1012-1028.

28 Jiang Z. et al. Source analysis and health risk assessment of heavy metals in agricultural land of multi-mineral mining and smelting area in the Karst region – a

case study of Jichangpo Town, Southwest China // *Heliyon*. – 2023. – Vol. 9, №7. – P. e17246.

29 Wu Y. et al. Health Risk Assessment of Heavy Metals in Agricultural Soils Based on Multi-Receptor Modeling Combined with Monte Carlo Simulation. *Toxics*. – 2024. - Vol. 12, №9. – P. 643.

30 Болуспаева Л.С. и др. Экологическая оценка овощных культур, выращенных на территории г. Усть-Каменогорска // *Вестник КазНУ. Серия экологическая*. – 2022. – Т.71, №2. – С. 11-20.

31 Саркулова Ж.С., Козыбаева Ф.Е. Содержание тяжелых металлов в растениях, произрастающих на территории влияния выбросов Риддерского цинкового завода // *Вестник КазНУ. Серия экологическая*. – 2019. – Т.58, №1. – С. 61-73.

32 Кенжетаев Г.Ж. и др. Оценка суммарного загрязнения почв тяжелыми металлами в прибрежной зоне мыса Песчаного // *Вестник КазНУ. Серия экологическая*. – 2019. – Т.59, №2. – С. 111-122.

33 Ebrahimi M. et al. Effects of lead and cadmium on the immune system and cancer progression // *J Environ Health Sci Eng*. – 2020. - Vol. 18, №1. – P. 335-343.

34 Bayuo J. et al. Removal of heavy metals from binary and multicomponent adsorption systems using various adsorbents - a systematic review // *RSC Adv*. – 2023. – Vol. 13, №19. – P. 13052-13093.

35 Pathak N, Khandelwal S. Role of Oxidative Stress and Apoptosis in Cadmium Induced Thymic Atrophy and Splenomegaly in Mice // *Toxicol Lett*. – 2007. – Vol. 169, №2. – P. 95–108.

36 Genchi G. et al. The Effects of Cadmium Toxicity // *Int J Environ Res Public Health*. – 2020. - Vol. 17, №11. – P. 3782.

37 ATSDR, Substance Priority List // *ATSDR*. – 2018. – Vol. 8. – P. 333-345.

38 Ibrahim IBM, Pidaparti R. Influence of Pathogens and Mechanical Stimuli in Inflammation // *Bioengineering (Basel)*. – 2019. – Vol. 6(2):55. – P. 663-667.

39 Wu KY, Kulbay M, Daigle P. et. al. Nguyen BH, Tran SD. Nonspecific Orbital Inflammation (NSOI): Unraveling the Molecular Pathogenesis, Diagnostic Modalities, and Therapeutic Interventions // *International Journal of Molecular Sciences*. – 2024. – Vol. 25(3). – P. 1553.

40 Wang Z. et. al. Effects of Cadmium Exposure on the Immune System and Immunoregulation // *Front Immunol*. – 2021. – Vol. 12. – P. 695484.

41 Horiguchi H. et al. Hypoproduction of erythropoietin contributes to anemia in chronic cadmium intoxication: Clinical study on Itai-itai disease in Japan // *Arch. Toxicol*. – 1994. – №68. – P. 632–636.

42 Fujiwara Y. et al. Cadmium induces iron deficiency anemia through the suppression of iron transport in the duodenum // *Toxicol. Lett*. – 2020. – №332. – P. 130–139.

43 Wang Z. et. al. Effects of Cadmium Exposure on the Immune System and Immunoregulation // *Front Immunol*. – 2021. – №12. – P. 695484.

44 Branca J.J. et.al. Cadmium-Induced Cytotoxicity: Effects on Mitochondrial Electron Transport Chain // *Front. Cell Dev. Biol*. – 2020. – №8. – P. 604377.

45 Cao X. et al. Cadmium Induced BEAS-2B Cells Apoptosis and Mitochondria Damage Via MAPK Signaling Pathway // *Chemosphere.* – 2021. – Vol. 263. – P. 128346.

46 Moro-García MA, Mayo JC, Sainz RM, Alonso-Arias R. Influence of Inflammation in the Process of T Lymphocyte Differentiation: Proliferative, Metabolic, and Oxidative Changes // *Front Immunol.* – 2018. – Vol. 9. – P. 339.

47 Boscolo P. et. al. Inhibitory effects of cadmium on peripheral blood mononuclear cell proliferation and cytokine release are reversed by zinc and selenium salts // *Ann Clin Lab Sci.* – 2005. – Vol. 35, №2. – P. 115-122.

48 Valentino M. et al. Effect of lead on the levels of some immunoregulatory cytokines in occupationally exposed workers // *Hum Exp Toxicol.* – 2007. – Vol. 26, №7. – P. 551–556.

49 Wending D.J. et. al. Effector memory-type regulatory T cells display phenotypic and functional instability // *Sci Adv.* – 2024. – Vol. 10, №36. – P. 3470.

50 Powrie F., Mason D. OX-22high CD4+ T cells induce wasting disease with multiple organ pathology: prevention by the OX-22low subset // *J Exp Med.* – 1990. – Vol. 172, №6. – P. 1701-1708.

51 Wu Q. et. al. Ferritin heavy chain supports stability and function of the regulatory T cell lineage // *EMBO J.* – 2024. – Vol. 43, №8. – P. 1445-1483.

52 Sharma R, Kinsey GR. Regulatory T cells in acute and chronic kidney diseases // *Am J Physiol Renal Physiol.* – 2018. – Vol. 314(5). – P. 679-698.

53 Wertheimer T. et. al. IL-23 stabilizes an effector Treg cell program in the tumor microenvironment // *Nat Immunol.* – 2024. – Vol. 25, №3. – P. 512-524.

54 Raugh A, Allard D, Bettini M. Nature vs. nurture: FOXP3, genetics, and tissue environment shape Treg function // *Front Immunol.* – 2022. – Vol. 13. – P. 911151.

55 Geginat J. et al. The CD4-centered universe of human T cell subsets // *Seminars in immunology.* Academic Press. – 2013. – Vol. 25, №4. – P. 252-262.

56 Cenerenti M. et. al. The Era of Cytotoxic CD4 T Cells // *Front Immunol.* – 2022. – Vol. 27, №13. – P. 867189.

57 Chen Y. et al. Regulatory T cell clones induced by oral tolerance: suppression of autoimmune encephalomyelitis // *Science.* – 1994. – Vol. 265, №5176. – P. 1237-1240.

58 Hori S., Nomura T., Sakaguchi S. Control of regulatory T cell development by the transcription factor Foxp3 // *Science.* – 2003. – Vol. 299, №5609. – P. 1057-1061.

59 Harrington L. E. et al. Interleukin 17–producing CD4+ effector T cells develop via a lineage distinct from the T helper type 1 and 2 lineages // *Nature immunology.* – 2005. – Vol. 6, №11. – P. 1123-1132.

60 Park H. et al. A distinct lineage of CD4 T cells regulates tissue inflammation by producing interleukin 17 // *Nature immunology.* – 2005. – Vol. 6, № 11. – P. 1133-1141.

61 Wagner H. et al. Induction of I region-restricted hapten-specific cytotoxic T lymphocytes // *The Journal of Immunology.* – 1977. – Vol. 119, № 4. – P. 1365-1368.

62 Feighery C., Stastny P. HLA-D region-associated determinants serve as targets for human cell-mediated lysis // *The Journal of experimental medicine*. – 1979. – Vol. 149, № 2. – P. 485-494.

63 Lukacher A. E. et al. Expression of specific cytolytic activity by H-2I region-restricted, influenza virus-specific T lymphocyte clones // *The Journal of experimental medicine*. – 1985. – Vol. 162, № 1. – P. 171-187.

64 Maimone M. M. et al. Features of target cell lysis by class I and class II MHC-restricted cytolytic T lymphocytes // *Journal of immunology (Baltimore, Md.: 1950)*. – 1986. – Vol. 137, № 11. – P. 3639-3643.

65 Schwarz BA, Bhandoola A. Trafficking from the bone marrow to the thymus: a prerequisite for thymopoiesis // *Immunol Rev*. – 2006. – Vol. 209. – P. 47-57.

66 Lind E.F. et al. Mapping precursor movement through the postnatal thymus reveals specific microenvironments supporting defined stages of early lymphoid development // *J Exp Med*. – 2001. – Vol. 194, №2. – P. 127–134.

67 Terstappen L.W, Huang S, Picker L.J. Flow cytometric assessment of human T-cell differentiation in thymus and bone marrow // *Blood*. – 1992. – Vol. 79, №3. – P. 666–677.

68 Laribi K. et al. Advances in the understanding and management of T-cell prolymphocytic leukemia // *Oncotarget*. – 2017. – Vol. 8, №61. – P. 104664–104686.

69 Cowan J.E., Jenkinson W.E., Anderson G. Thymus medulla fosters generation of natural Treg cells, invariant gammadelta T cells, and invariant NKT cells: What we learn from intrathymic migration // *Eur J Immunol*. – 2015. – Vol. 45, №3. – P. 652–660.

70 Snyder-Cappione J.E. et al. A comprehensive ex vivo functional analysis of human NKT cells reveals production of MIP1-alpha and MIP1-beta, a lack of IL-17, and a Th1-bias in males // *PLoS One*. – 2010. – Vol. 5, №11. – P. e15412.

71 Levelt C.N., Carsetti R., Eichmann K. Regulation of thymocyte development through CD3. II. Expression of T cell receptor beta CD3 epsilon and maturation to the CD4+8+ stage are highly correlated in individual thymocytes // *J Exp Med*. – 1993. – Vol. 178, №6. – P. 1867–1875.

72 Hadeiba H. et al. Plasmacytoid dendritic cells transport peripheral antigens to the thymus to promote central tolerance // *Immunity*. – 2012. – Vol. 36, №3. – P. 438–450.

73 Martina M.N. et al. Double negative (DN) alphabeta T cells: Misperception and overdue recognition // *Immunol Cell Biol*. – 2015. – Vol. 93, №3. – P. 305–310.

74 Charlotte M. Mousset et al. Comprehensive Phenotyping of T Cells Using Flow Cytometry // *Cytometry Part A*. – 2019. – Vol. 95, №6. – P. 647-654

75 Qin S. et al. “Infectious” transplantation tolerance // *Science*. – 1993. – Vol. 259. – P. 974–977.

76 Sakaguchi S. et al. Immunologic self-tolerance maintained by activated T cells expressing IL-2 receptor alpha-chains (CD25). Breakdown of a single mechanism of self-tolerance causes various autoimmune diseases // *J Immunol*. – 1995. – Vol. 155. – P. 1151–1164.

- 77 Romano M. et al. Past, present, and future of regulatory T cell therapy in transplantation and autoimmunity // *Front Immunol.* – 2019. – Vol. 31. – P. 43-53.
- 78 Sakaguchi S. et al. Annual review of immunology regulatory T cells and human disease // *Annu Rev Immunol.* – 2020. – Vol. 26, №38. – P. 541–566.
- 79 Shevyrev D., Tereshchenko V. Treg heterogeneity, function, and homeostasis // *Front Immunol.* – 2020. – Vol. 10. – P. 3100.
- 80 Abbas AK. et al. Regulatory T cells: Recommendations to simplify the nomenclature // *Nat Immunol.* – 2013. – Vol. 14. – P. 307–308.
- 81 Iain L., Robey E.A., Hsieh C.S. Central CD4 + T cell tolerance: deletion versus regulatory T cell differentiation // *Nat Rev Immunol.* – 2019. – Vol. 19. – P. 7–18. *68
- 82 Pellerin L. et al. Regulatory T cells and their roles in immune dysregulation and allergy // *Immunol Res.* – 2014. – Vol. 58. – P. 358–368.
- 83 Sakaguchi S. The origin of FOXP3-expressing CD4+ regulatory T cells: thymus or periphery // *J Clin Invest.* – 2003. – Vol. 112. – P. 1310–1312.
- 84 Lee H.M., Bautista J.L., Hsieh C.S. Thymic and peripheral differentiation of regulatory T cells // *Adv Immunol.* – 2011. – Vol. 112. – P. 25–71.
- 85 Chen X. et al. Co-expression of TNFR2 and CD25 identifies more of the functional CD4+FOXP3+ regulatory T cells in human peripheral blood // *Eur J Immunol.* – 2010. – Vol. 40. – P. 1099–1106.
- 86 Bianchini R. et al. CD4(+) CD25(low) GITR(+) cells: a novel human CD4(+) T-cell population with regulatory activity // *Eur J Immunol.* – 2011. – Vol. 41. – P. 2269–2278.
- 87 Wing J.B. et al. Human FOXP3(+) regulatory T cell heterogeneity and function in autoimmunity and cancer // *Immunity.* – 2019. – Vol. 50. – P. 302–316.
- 88 Ohkura N. et al. T cell receptor stimulation-induced epigenetic changes and Foxp3 expression are independent and complementary events required for Treg cell development // *Immunity.* – 2012. – Vol. 37. – P. 785–799.
- 89 Feng Y. et al. Control of the inheritance of regulatory T cell identity by a cis element in the Foxp3 locus // *Cell.* – 2014. – Vol. 158. – P. 749–763.
- 90 Fontenot J.D, Gavin M.A., Rudensky A.Y. Foxp3 programs the development and function of CD4+CD25+ regulatory T cells // *Nat Immunol.* – 2003. – Vol. 4. – P. 330–336.
- 91 Hori S., Nomura T., Sakaguchi S. Control of regulatory T cell development by the transcription factor Foxp3 // *Science.* – 2003. – Vol. 299. – P. 1057–1061.
- 92 Ziegler S.F. FOXP3: of mice and men // *Annu Rev Immunol.* – 2006. – Vol. 24. – P. 209–226.
- 93 Ohkura N. et al. Regulatory T cell-specific epigenomic region variants are a key determinant of susceptibility to common autoimmune diseases // *Immunity.* – 2020. – Vol. 52. – P. 1119–1132.
- 94 Kim S-S. et al. A comprehensive integrated post-GWAS analysis of type 1 diabetes reveals enhancer-based immune dysregulation // *PloS One.* – 2021. – P. 16.

95 Raugh A., Allard D., Bettini M. Nature vs. nurture: FOXP3, genetics, and tissue environment shape Treg function // *Front Immunol.* – 2022. – Vol. 13. – P. 911151.

96 Chatila T.A. et al JM2, encoding a fork head-related protein, is mutated in X-linked autoimmunity-allergic dysregulation syndrome // *J Clin Invest.* – 2000. – Vol. 106. – P. 75–81.

97 Baud O. et al Treatment of the immune dysregulation, polyendocrinopathy, enteropathy, X-linked syndrome (IPEX) by allogeneic bone marrow transplantation // *N Engl J Med.* – 2001. – Vol. 344. – P. 1758–1762.

98 Wildin R.S. et al. X-linked neonatal diabetes mellitus, enteropathy and endocrinopathy syndrome is the human equivalent of mouse scurfy // *Nat Genet.* – 2001. – Vol. 27. – P. 18–20.

99 Williams L.M., Rudensky A.Y. Maintenance of the Foxp3-dependent developmental program in mature regulatory T cells requires continued expression of Foxp3 // *Nat Immunol.* – 2007. – Vol. 8. – P. 277–284.

100 Kim J.Y. et al. Functional and genomic analyses of FOXP3-transduced Jurkat-T cells as regulatory T (Treg)-like cells // *Biochem Biophys Res Commun.* – 2007. – Vol. 362. – P. 44–50.

101 Deng G., Song X., Greene M.I. FoxP3 in Treg cell biology: a molecular and structural perspective // *Clin Exp Immunol.* – 2020. – Vol. 199, №3. – P. 255–262.

102 Lopes J.E. et al. Analysis of FOXP3 reveals multiple domains required for its function as a transcriptional repressor // *J Immunol.* – 2006. – Vol. 177. – P. 3133–3142.

103 Lam E.W. et al. Forkhead box proteins: tuning forks for transcriptional harmony // *Nat Rev Cancer.* – 2013. – Vol. 13. – P. 482–495.

104 Marson A. et al. Foxp3 occupancy and regulation of key target genes during T-cell stimulation // *Nature.* – 2007. – Vol. 445. P. 931–935.

105 Zheng Y. et al. Genome-wide analysis of Foxp3 target genes in developing and mature regulatory T cells // *Nature.* – 2007. – Vol. 445. – P. 936–940.

106 Konopacki C. et al. Transcription factor Foxp1 regulates Foxp3 chromatin binding and coordinates regulatory T cell function. // *Nat Immunol.* – 2019. – Vol. 20. – P. 232–242.

107 Angelin A. et al. Foxp3 reprograms T cell metabolism to function in low-glucose, high-lactate environments // *Cell Metab.* – 2017. – Vol. 25. – P. 1282–1293.

108 Bour-Jordan H, Bluestone JA. Regulating the regulators: costimulatory signals control the homeostasis and function of regulatory T cells // *Immunol Rev.* – 2009. – Vol. 229. – P. 41–66.

109 Egen J.G., Kuhns M.S., Allison J.P. CTLA-4: new insights into its biological function and use in tumor immunotherapy // *Nat Immunol.* – 2002. – Vol. 3. – P. 611–618.

110 Peggs K.S. et al. Principles and use of anti-CTLA4 antibody in human cancer immunotherapy // *Curr Opin Immunol.* – 2006. – Vol. 18. – P. 206–213.

111 Rojas-Restrepo J. et al. Functional Relevance of CTLA4 Variants: an Upgraded Approach to Assess CTLA4-Dependent Transendocytosis by Flow Cytometry // *J Clin Immunol.* – 2023. - Vol. 43, №8. – P. 2076-2089.

112 Mitsuiki N., Schwab C, Grimbacher B. What did we learn from CTLA-4 insufficiency on the human immune system // *Immunol Rev.* – 2019. – Vol.287, №1. – P. 33–49.

113 Qureshi O.S. 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.

114 Hegde S, Leader AM, Merad M. MDSC: Markers, development, states, and unaddressed complexity // *Immunity.* – 2021. – Vol. 54(5). – P. 875-884

115 Sanchez-Pino MD, Dean MJ, Ochoa AC. Myeloid-derived suppressor cells (MDSC): When good intentions go awry // *Cell Immunol.* – 2021. – Vol. 362. – P. e104302.

116 Li T, Liu T, et. al. Targeting MDSC for Immune-Checkpoint Blockade in Cancer Immunotherapy: Current Progress and New Prospects // *Clin Med Insights Oncol.* – 2021. – Vol. 5 (15). – P. 124-138.

117 van Vlerken-Ysla L, Tyurina YY, et. al. Functional states of myeloid cells in cancer // *Cancer Cell.* – 2023. – Vol. 1(3). – P. 490-504.

118 Zhu L, Zhu X, Wu Y. Effects of Glucose Metabolism, Lipid Metabolism, and Glutamine Metabolism on Tumor Microenvironment and Clinical Implications // *Biomolecules.* – 2022. – Vol. 12(4). – P. 580.

119 Li Q., Zhang P., et. al. Lead Transiently Promotes Granulocyte-Macrophage Progenitor Differentiation and Subsequently Suppresses Common Myeloid Progenitor Differentiation // *Toxicological Sciences.* – 2017. – Vol. 160 (2). – P. 268–283.

120 Zhou J, Nefedova Y, Lei A, Gabrilovich D. Neutrophils and PMN-MDSC: Their biological role and interaction with stromal cells // *Semin Immunol.* – 2018. – Vol. 35. – P. 19-28.

121 Bronte V., Wang M., et. al. Apoptotic death of CD8+ T lymphocytes after immunization: induction of a suppressive population of Mac-1+/Gr-1+ cells // *J Immunol.* – 1998. – Vol. 161(10). – P. 5313-20.

122 Tumino N, Di Pace AL, et. al. Interaction Between MDSC and NK Cells in Solid and Hematological Malignancies: Impact on HSCT // *Front Immunol.* – 2021. – Vol. 12. – P. e638841.

123 Gabrilovich DI. Myeloid-Derived Suppressor Cells // *Cancer Immunol Res.* – 2017. – Vol. 5(1). – P. 3-8.

124 Wang W, Xia X, et. al. The CCAAT/Enhancer-Binding Protein Family: Its Roles in MDSC Expansion and Function // *Front Immunol.* – 2019. – Vol. 10. – P. 1804.

125 Joshi S, Sharabi A. Targeting myeloid-derived suppressor cells to enhance natural killer cell-based immunotherapy // *Pharmacol Ther.* – 2022. – Vol. 235. – P. e108114

126 Wang JC, Sun L. PD-1/PD-L1, MDSC Pathways, and Checkpoint Inhibitor Therapy in Ph(-) Myeloproliferative Neoplasm: A Review // *Int J Mol Sci.* – 2022. – Vol. 23(10) – P. 5837.

127 Vanhaver C, van der Bruggen P, Bruger AM. MDSC in Mice and Men: Mechanisms of Immunosuppression in Cancer // *J Clin Med.* – 2021. – Vol. 10(13). –P. 2872

128 Trikha P, Carson WE 3rd. Signaling pathways involved in MDSC regulation // *Biochim Biophys Acta.* – 2014. – Vol. 1846(1). – P. 55-65.

129 Wu Y, Yi M, et. al. Myeloid-derived suppressor cells: an emerging target for anticancer immunotherapy // *Mol Cancer.* – 2022. – Vol. 21(1). – P. 184.

130 Li K, Shi H, et. al. Myeloid-derived suppressor cells as immunosuppressive regulators and therapeutic targets in cancer // *Signal Transduct Target Ther.* – 2021. Vol. 6(1). – P. 362.

131 Zhang W, Fang X, et. al. MDSCs in sepsis-induced immunosuppression and its potential therapeutic targets // *Cytokine Growth Factor Rev.* – 2023. – Vol. 69. –P. 90-103.

132 Tong L, Jiménez-Cortegana C, et. al. NK cells and solid tumors: therapeutic potential and persisting obstacles // *Mol Cancer.* – 2022. – Vol. 21(1). P. 206.

133 Kumar V, Patel S, et. al. The Nature of Myeloid-Derived Suppressor Cells in the Tumor Microenvironment // *Trends Immunol.* – 2016. – Vol. 37(3). – P. 208-220.

134 Mikhail Rayev, и др. Иммунология: миелоидные супрессорные клетки // *Пособие.* – 2020. – ISBN: 978-5-7944-3413-2

135 Ohl K, Tenbrock K. Reactive Oxygen Species as Regulators of MDSC-Mediated Immune Suppression // *Front Immunol.* – 2018. – Vol. 9. – P. 2499.

136 Oya Y, Hayakawa Y, Koike K. Tumor microenvironment in gastric cancers // *Cancer Sci.* – 2020. – Vol. 111(8). – P. 2696-2707.

137 Nakamura K, Smyth MJ. Myeloid immunosuppression and immune checkpoints in the tumor microenvironment // *Cell Mol Immunol.* – 2020. – Vol. 17(1). – P. 1-12.

138 Bruger AM, Dorhoi A, et. al. How to measure the immunosuppressive activity of MDSC: assays, problems and potential solutions // *Cancer Immunol Immunother.* – 2019 – Vol. 68(4). – P. 631-644.

139 Salminen A, Kaarniranta K, Kauppinen A. Immunosenescence: the potential role of myeloid-derived suppressor cells (MDSC) in age-related immune deficiency // *Cell Mol Life Sci.* – 2019. – 76(10). – P. 1901-1918.

140 Bizymi N, Georgopoulou A, et. al. Myeloid-Derived Suppressor Cells (MDSC) in the Umbilical Cord Blood: Biological Significance and Possible Therapeutic Applications // *J Clin Med.* – 2022. – Vol. 11(3). – P. 727.

141 Antsiferova Y, Sotnikova N, Parfenyuk E. Different effects of the immunomodulatory drug GMDP immobilized onto aminopropyl modified and unmodified mesoporous silica nanoparticles upon peritoneal macrophages of women with endometriosis // *Biomed Res Int.* – 2013. – Vol. 15. – P. 335-351.

- 142 Мынбаев О.А., Елисеева М.Ю., Масихи К.Н. и др. Гроприносин – высокоэффективный иммуностимулятор для «трудных» пациентов с нарушениями в иммунной системе // Трудный пациент. – 2009. – № 8–9. – С. 5–12.
- 143 Кулакова В.И., Серова В.Н., Рациональная фармакотерапия в акушерстве и гинекологии // Руководство для практических врачей. – 2005. – С. 724–727.
- 144 Серов В.Н., Дубницкая Л.В., Тютюнник В.Л. Воспалительные заболевания органов малого таза: диагностические критерии и принципы лечения // Русский медицинский журнал. – 2011. – № 19, 1(395). С. 46–50.
- 145 Серов В.Н., Твердикова М.А., Вересова А.А. Иммуномодуляторы в комплексной терапии воспалительных заболеваний органов малого таза. РМЖ // Мать и дитя. – 2011. – Т. 19, № 20. – С. 1218.
- 146 Под редакцией Г.М. Савельевой. М., Справочник по акушерству, гинекологии и перинатологии // «МИА». – 2006. – С.487–501.
- 147 Durcan L, Petri M. Immunomodulators in SLE: Clinical evidence and immunologic actions // J Autoimmun. – 2016. – Vol. 74. – P. 73-84.
- 148 Bazzi S, Bahr GM, Lampiasi N. Editorial: Regulation of the phenotype and function of human macrophages and dendritic cells by exogenous immunomodulators // Front Immunol. – 2023. – Vol. 14. – P. 1353765.
- 149 Lin Y-J, Jamin A, et. al. A flagellin-conjugate protein induces dual NLR4- and NLRP3-inflammasome activation which modulates inflammatory cytokine secretion from macrophages // Front. Immunol. – 2023. – Vol. 14. – P. 1136669.
- 150 Anil SM, Peeri H, Koltai H. Medical cannabis activity against inflammation: active compounds and modes of action // Front Pharmacol. – 2022. – Vol. 13. –P. 908198
- 151 Paardekooper LM, Vos W, van den Bogaart G. Oxygen in the tumor microenvironment: effects on dendritic cell function // Oncotarget. – 2019. – Vol. 10. – P. 883–96.
- 152 Bhatt K, Nukovic A, Colombani T and Bencherif SA (2023) Biomaterial-assisted local oxygenation safeguards the prostimulatory phenotype and functions of human dendritic cells in hypoxia // Front. Immunol. – 2023. – Vol. 14. – P. 1278397
- 153 Ferreira S.S., Passos C.P., Madureira P., Vilanova M., Coimbra M.A. Structure–function relationships of immunostimulatory polysaccharides: A review // Carbohydr. Polym. – 2015. – Vol. 132. – P. 378–396.
- 154 Khan T., Date A., et. al. Polysaccharides as potential anticancer agents. A review of their progress. // Carbohydr. Polym. – 2019. – Vol. 210. – P. 412–428
- 155 Wang N., Wang X., et. al. Ginseng polysaccharides: A potential neuroprotective agent // J. Ginseng Res. – 2020. – Vol. 9. – P. 15-22.
- 156 Chen F., Huang G. Antioxidant activity of polysaccharides from different sources of ginseng // Int. J. Biol. Macromol. – 2019. Vol. 125. – P. 906–908
- 157 Yoo D.-G., Kim M.-C., et al. Protective effect of ginseng polysaccharides on influenza viral infection // PLoS ONE. – 2012. – Vol. 7. – P. e33678

158 Schepetkin I.A., Quinn M.T. Botanical polysaccharides: Macrophage immunomodulation and therapeutic potential // *Int. Immunopharmacol.* – 2006. – Vol. 6. – P. 317–333.

159 Riaz M., Rahman N.U., et al. Ginseng: A dietary supplement as immunomodulator in various diseases // *Trends Food Sci. Technol.* – 2019. – Vol. 83. – P. 12–30.

160 Licciardi P.V., Underwood J.R. Plant-derived medicines: A novel class of immunological adjuvants // *Int. Immunopharmacol.* – 2011. – Vol. 11. – P. 390–398.

161 Ghosh R, Bryant DL, Farone AL. Panax quinquefolius (North American Ginseng) Polysaccharides as Immunomodulators: Current Research Status and Future Directions // *Molecules.* – 2020. – Vol. – 11. – P. 24-25.

162 Yamano T, Nedjic J, et al. Thymic B cells are licensed to present self antigens for central T cell tolerance induction // *Immunity.* – 2015. – Vol. 42(6). – P. 1048–1061.

163 Levelt C, Carsetti R, Eichmann K. Regulation of thymocyte development through CD3. II. Expression of T cell receptor beta CD3 epsilon and maturation to the CD4+8+ stage are highly correlated in individual thymocytes // *J Exp Med.* – 1993. – Vol. 178(6). – P. 1867–1875.

164 Ueno T, Saito F, et al. CCR7 signals are essential for cortex-medulla migration of developing thymocytes // *J Exp Med.* – 2004. – Vol. 200(4). – P. 493–505.

165 Kwan J, Killeen N. CCR7 directs the migration of thymocytes into the thymic medulla // *J Immunol.* – 2004. – Vol. 172(7). – P. 3999–4007.

166 Roma Kalra, Shashi 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.

167 Yu VK, Sycheva YS, Kairanbayeva GK, et al. Naphthaleneoxypropargyl-Containing Piperazine as a Regulator of Effector Immune Cell Populations upon an Aseptic Inflammation // *Molecules.* – 2023. – Vol. 11; №28(20). – P. e7023.

168 Миронов Н.А. Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств // М.: Гриф и К. – 2012. – С. 944

169 Кузденбаева Р.С., Рахимов К.Д., и др. Доклиническое изучение местноанестезирующей активности новых биологически активных веществ. Методическое пособие // Алматы. – 2000. – С. 30

170 Хабриев Р.У. Руководство по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ // Медицина. – 2005. – С. 826.

171 Беленький М.Л. Элементы количественной оценки фармакологического эффекта // Л. – 1963. – С. 152.

172 Кайранбаева Г.К., Балапанова А.Х., Амиркулова М.К., и др., Изучение острой токсичности новых химических соединений МХФ-19, МХФ-20 // *Вестник КазНМУ.* – 2020. – №4-2020. – С. 434-438.

173 Ситникова Е. А., Марданлы С. Г., Рогожникова Е. П. Результаты сравнительного доклинического изучения безопасности препаратов

ибупрофена «Доклинические и клинические исследования» // Разработка и регистрация лекарственных средств. – 2018. – № 4(25). – С. 1-55.

174 Хабриев Р.У. Руководство по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ // Медицина. – 2005. – С. 41–53.

175 Балабекова М.К. Морфологические особенности течения воспаления у опытных крыс на фоне комбинированного воздействия ванадия и хрома // Вестник КРСУ. - 2014. – Т. 14, №10. - С. 87-90.

176 Кайранбаева Г., Балабекова М., Балапанова А.Х. и др. Тимусопосредованная регуляция воспаления в условиях патогенетической коррекции комплексом // Фтизиолпульмонология. 2024. – Т. 1. - №43. – С. 140.

177 Turley A.E., Zagorski J.W., et. al. Chronic low-level cadmium exposure in rats affects cytokine production by activated T cells // Toxicology research. – 2019. – Vol. 8(2). – P. 227–237.

178 Iavicoli I., Carelli G., et. al. Below background levels of blood lead impact cytokine levels in male and female mice // Toxicology and applied pharmacology. – 2006. – Vol. 210. – P. 94–99.

179 Кайранбаева Г., Балабекова М.К., Edgaras Stankeviciu. Экспериментальная оценка селезеночных иммуноцитов при воспалении, вызванном на фоне воздействия кадмия и свинца // Фтизиолпульмонология. – 2024. – Т. 1, №43. – С. 146.

180 Peters JL, Perry MJ, et. al. The association of cadmium and lead exposures with red cell distribution width // PLoS One – 2021. – Vol. 16(1). – P. e0245173.

181 Hyogo Horiguchi, Etsuko Oguma, Fujio Kayama, Cadmium Induces Anemia through Interdependent Progress of Hemolysis, Body Iron Accumulation, and Insufficient Erythropoietin Production in Rats // Toxicological Sciences. – 2011. – Vol. 122(1). – P. 198–210.

182 Thompson WG, Meola T, et. al. Red cell distribution width, mean corpuscular volume, and transferrin saturation in the diagnosis of iron deficiency // Arch Intern Med. – 1988. – Vol. 148(10). – P. 2128–30.

183 Nabil M Ibrahim, Esam A Eweis, The effect of lead Toxicity on Experimental Male Albino Rat // Biol Trace Elementary Res. – 2011 – Vol. 144, № 1-3. – P. 1120-1132.

184 Romaniuk A, Lyndin M, et. al. Heavy metals effect on breast cancer progression // J Occupat Med Toxicol. – 2017. – P. 12(1). – P. 32.

185 Abolhassani H, Honarvar NM, et. al. Nutrition, immunity, and cancers // Cancer immunology. – 2015. – P. 12. – P. e2518455

186 Esposito F, Nardone A, et al. A systematic risk characterization related to the dietary exposure of the population to potentially toxic elements through the ingestion of fruit and vegetables from a potentially contaminated area. A case study: the issue of the "land of fires" area in Campania region, Italy // Environ Pollut. – 2018. – Vol. 243, P. 1781–1790.

187 Lafuente A., González-Carracedol A., Esquifino A.I. Differential effects of cadmium on blood lymphocyte subsets // Biometals. – 2004. – Vol. 17(4). – P. 451-456.

188 Ebrahimi M., Khalili N., et. al. Effects of lead and cadmium on the immune system and cancer progression // *Journal of Environmental Health Science and Engineering. Eng.* – 2020. – Vol. 18(1). – P. 335-343.

189 Токушева А.Н., Балабекова М.К. Влияние полиоксидония на активность В-клеток и Т-регуляторных клеток опытных крыс в динамике экспериментального воспаления // *Фтизиопульмонология.* – 2024. – Т. 1, №43. – С. 150-155.

190 Кайранбаева Г.К., Балабекова М.К., Edgaras Stankevicius. Патогенетическая модуляция иммунного ответа при асептическом воспалении // *Фтизиопульмонология.* – 2024. – №3-45 – С. 42-46.

191 Chaudhry A., Rudensky A.Y. Control of inflammation by integration of environmental cues by regulatory T cells // *J. Clin. Invest.* – 2013. – Vol. 123, № 3. – P. 939-944.

192 Robb, C.T.; Regan, et. al. Key mechanisms regulating the resolution of lung inflammation // *Semin. Immunopathol.* – 2016. – Vol. 38. – P. 425–448.

193 El-Naggar NE-A, Hamouda RA, et. al. Biosorption optimization, characterization, immobilization and application of *Gelidium amansii* biomass for complete Pb²⁺ removal from aqueous solutions // *Sci Rep.* – 2018. – Vol. 8(1). –P. e13456

194 Zhang, W., Fang, X., MDSCs in sepsis-induced immunosuppression and its potential therapeutic targets // *Rev.* – 2023. – Vol. 69. – P. 90–103.

195 Prame Kumar K., et al. Partners in crime: neutrophils and monocytes/macrophages in inflammation and disease // *Cell and Tissue Research.* – 2018. – Vol. 371 (3). – P. 551–565.

196 Barnett-Vanes A., Sharrock A., et. al. A single 9-colour flow cytometric method to characterise major leukocyte populations in the rat: validation in a model of LPS-induced pulmonary inflammation // *PLoS One.* – 2016. – Vol. 11 (1). – P. e0142520.

197 Pan C, Liu H-D, et al. Cadmium is a potent inhibitor of PPM phosphatases and targets the M1 binding site // *Sci Rep.* – 2013 – Vol. 3. – P. 2333.

198 Sadeghi F, Nasserli S, et. al. Statistical analysis of arsenic contamination in drinking water in a city of Iran and its modeling using GIS // *Environ Monit Assess.* – 2017. – Vol. 189(5). – P. 230–212.

199 Ebrahimi M., Khalili N., et al. Effects of lead and cadmium on the immune system and cancer progression // *Journal of Environmental Health Science and Engineering. Eng.* – 2020. – Vol. 18(1). – P. 335-343.

200 Feng W, Dong T, et. al. Characterization of binding behaviors of Cd²⁺ to rice proteins // *Food Chem.* – 2019. – Vol. 275. – P. 186–192.

201 Wu KY, Kulbay M, et. al. Nonspecific Orbital Inflammation (NSOI): Unraveling the Molecular Pathogenesis, Diagnostic Modalities, and Therapeutic Interventions // *Int J Mol Sci.* – 2024. – Vol. 25(3). – P. 1553.

202 Amarante-Mendes G.P., Adjemian S., et. al. Pattern Recognition Receptors and the Host Cell Death Molecular Machinery // *Front. Immunol.* – 2018. – Vol. 9. – P. 2379.

- 203 Li D., Wu M. Pattern Recognition Receptors in Health and Diseases // *Signal Transduct. Target. Ther.* – 2021. – Vol. 6. – P. 291.
- 204 Mogensen T.H. Pathogen Recognition and Inflammatory Signaling in Innate Immune Defenses // *Clin. Microbiol. Rev.* – 2009. – Vol. 22. – P. 240–273
- 205 Wladis E.J., Iglesias B.V., et. al. Toll-like Receptors in Idiopathic Orbital Inflammation // *Ophthalmic Plast. Reconstr. Surg.* – 2012. – Vol. 28. P. 273–276.
- 206 Chen Y., Lin J., et. al. Toll-like Receptor 3 (TLR3) Regulation Mechanisms and Roles in Antiviral Innate Immune Responses // *J. Zhejiang Univ. Sci. B.* – 2021. –Vol. 22. – P. 609–632.
- 207 Гурьянова С. В. Механизмы регуляции иммунного гомеостаза биорегуляторами бактериального происхождения: дисс, докт. биологических наук: 3.2.7. // ФГАОУ ВО «РУДН», Москва. – 2024. – 260 с.
- 208 Nathan K. Neutrophils and immunity: challenges and opportunities // *Nat. Rev. Immunol.* – 2006. – Vol. 6. –P. 173–182.
- 209 Wang J. Neutrophils in tissue injury and repair // *Cell Tissue Res.* – 2018. –Vol. 371. – P. 531–539.
- 210 Zhao H, Wu L, et. al. Inflammation and tumor progression: signaling pathways and targeted intervention // *Signal Transduct Target Ther.* – 2021. – Vol. 6(1). – P. 263.

ПРИЛОЖЕНИЕ А
Патент № 36782

ҚАЗАҚСТАН РЕСПУБЛИКАСЫ
РЕСПУБЛИКА КАЗАХСТАН

REPUBLIC OF KAZAKHSTAN

ПАТЕНТ
PATENT

№ 36782

ОНЕРТАБЫСҚА / НА ИЗОБРЕТЕНИЕ / FOR INVENTION

 (21) 2023/0242.1

(22) 05.04.2023

(45) 07.06.2024

(54) β-циклодекстринмен кешенді түрде иммуномодуляциялық белсенділікке ие 1-[1-(2,5-диметоксифенил)-4-(нафталин-1-илокси)бут-2-инил]-4-метилпиперазин косылысы
Соединение 1-[1-(2,5-диметоксифенил)-4-(нафталин-1-илокси)бут-2-инил]-4-метилпиперазин в комплексе с β-циклодекстрином, обладающее иммуномодулирующей активностью
Compound 1-[1-[1-(2,5-dimethoxyphenyl)-4-(naphthalene-1-yloxy)but-2-ynyl]-4-methylpiperazine in complex with β-cyclodextrin, having immunomodulatory activity

(73) «А.Б.Бектұров атындағы химия ғылымдары институты» акционерлік қоғамы (KZ)
Акционерное общество «Институт химических наук имени А.Б. Бектұрова» (KZ)
Joint-stock company «Institute of chemical sciences named after A.B. Bekturov» (KZ)

(72) Сычева Елена Сергеевна (KZ) Sycheva Elena Sergeevna (KZ)
Муканова Меруерт Сисенбековна (KZ) Mukanova Meruyert Sisenbekovna (KZ)
Ю Валентина Константиновна (KZ) Yu Valentina Konstantinovna (KZ)
Балабекова Марина Казыбаевна (KZ) Balabekova Marina Kazybayevna (KZ)
Кайранбаева Гульгүл Кайранбаевна (KZ) Kairanbaeva Gulgul Kairanbaevna (KZ)



ЭЦК қол қойылды
Подписано ЭЦП
Signed with EDS

Е. Оспанов
E. Ospanov
Y. Ospanov

«Ұлттық зияткерлік меншік институты» РМК директоры
Директор РГП «Национальный институт интеллектуальной собственности»
Director of RSE «National institute of intellectual property»

ПРИЛОЖЕНИЕ Б
Авторское свидетельство № 48776

ҚАЗАҚСТАН РЕСПУБЛИКАСЫ  РЕСПУБЛИКА КАЗАХСТАН

АВТОРЛЫҚ ҚҰҚЫҚПЕН ҚОРҒАЛАТЫН ОБЪЕКТІЛЕРГЕ ҚҰҚЫҚТАРДЫҢ
МЕМЛЕКЕТТІК ТІЗІЛІМГЕ МӘЛІМЕТТЕРДІ ЕНГІЗУ ТУРАЛЫ

КУӘЛІК
2024 жылғы «1» тамыз № 48776

Автордың (лардың) жөні, аты, әкесінің аты (егер ол жеке басын куәландыратын құжатта көрсетілсе):
КАЙРАНБАЕВА ГҰЛҰГУЛЬ КАЙРАНБАЕВНА

Авторлық құқық объектісі: **ҒЫЛЫМИ ТУЫНДЫ**

Объектінің атауы: **Экспериментальная оценка эффективности нового соединения (Комплекс) в качестве патогенетической коррекции выявленных в тимусе нарушений в условиях асептического воспаления**

Объектіні жасаған күні: **01.03.2024**





Құжат таныстырылымы <http://www.kazpatent.kz/rz/ойынтыныч>
"Авторлық құқық" Белгіленіс тексеруге болады <https://copyright.kazpatent.kz>
Подлинность документа возможно проверить на сайте [kazpatent.kz](http://www.kazpatent.kz)
в разделе «Авторское право» <https://copyright.kazpatent.kz>

ЭЦҚ қол қойылды **С. Ахметов**

ПРИЛОЖЕНИЕ Б
Авторское свидетельство № 48776 (продолжение)

КАЗАҚСТАН РЕСПУБЛИКАСЫ

РЕСПУБЛИКА КАЗАХСТАН



СВИДЕТЕЛЬСТВО
О ВНЕСЕНИИ СВЕДЕНИЙ В ГОСУДАРСТВЕННЫЙ РЕЕСТР
ПРАВ НА ОБЪЕКТЫ, ОХРАНЯЕМЫЕ АВТОРСКИМ ПРАВОМ
№ 48776 от «1» августа 2024 года

Фамилия, имя, отчество, (если оно указано в документе, удостоверяющем личность) автора (ов):
КАИРАНБАЕВА ГУЛГУЛЬ КАИРАНБАЕВНА

Вид объекта авторского права: **произведение науки**

Название объекта: **Экспериментальная оценка эффективности нового соединения (Комплекс) в качестве патогенетической коррекции вызванных в тимусе нарушений в условиях асептического воспаления**

Дата создания объекта: **01.03.2024**



Краткие функциональные ссылки: <http://www.kazpatent.kz> сайт Мининформинформации
"Авторских прав", Белгородской области: <http://copyright.kazpatent.kz>
Подлинность документа возможно проверить на сайте copyright.kazpatent.kz
в разделе «Авторское право» <http://copyright.kazpatent.kz>

Подписано ЭЦП

С. Ахметов