

**П.Ф. Забродский**

**Изменение неспецифической резистентности  
организма и иммунного статуса при остром  
отравлении арсенитами**

© П.Ф. Забродский, 2012  
ISBN 978-5 -91272-254-25

УДК 612.014.46:616-095  
ББК 52.84+52.54+52.8 Я 44  
3-133

**САРАТОВ-2012**

## ОГЛАВЛЕНИЕ

Перечень сокращений

Введение

Глава 1. Современные представления о влиянии острых отравлений мышьяксодержащими соединениями на неспецифическую резистентность организма и иммунный гомеостаз

1.1. Общая характеристика соединений трехвалентного мышьяка

1.2. Токсикологическая характеристика люизита и арсенита натрия

1.3. Общая характеристика иммунотоксичности различных ксенобиотиков.

Нарушения неспецифической резистентности организма и иммунного статуса при отравлении мышьяксодержащими соединениями

Глава 2. Материал и методы исследований

2.1. Объект исследования и применяемые препараты

2.2. Исследование интегрального состояния неспецифической резистентности организма

2.3. Определение интегрального состояния неспецифической и иммунологической резистентности организма

2.4. Бактерицидная активность сыворотки крови

2.5. Сывороточная активность лизоцима

2.6. Фагоцитарная активность нейтрофилов

2.7. Лимфоидные индексы тимуса и селезенки

2.8. Содержание Т-лимфоцитов в тимусе и лимфоцитов в селезенке, лимфатических узлах, костном мозге и циркулирующей крови

2.9. Содержание колониеобразующих единиц в селезенке

2.10. Гуморальное звено иммунного ответа

2.11. Кооперация Т- и В- лимфоцитов *in vitro*

2.12. Функция Т-лимфоцитов (по реакции торможения миграции лейкоцитов)

- 2.13. Функция Th1-лимфоцитов (по реакции гиперчувствительности замедленного типа)
- 2.14. Антителозависимая клеточная цитотоксичность
- 2.15. Активность естественных клеток-киллеров
- 2.16. Активность ацетилхолинэстеразы, неспецифических эстераз Т-лимфоцитов и перекисного окисления липидов
- 2.17. Статистическая обработка результатов исследований

### Глава 3. Влияние арсенитов на показатели антиинфекционной неспецифической и иммунологической резистентности организма

- 3.1. Изменение интегральной антиинфекционной неспецифической резистентности организма
- 3.2. Оценка интегральной антиинфекционной неспецифической и иммунологической резистентности организма при экспериментальном перитоните после острой интоксикации
- 3.3. Изменение бактерицидной активности сыворотки крови
- 3.4. Влияние арсенитов на сывороточную активность лизоцима
- 3.5. Действие острой интоксикации арсенитами на фагоцитарную активность нейтрофилов

#### Выводы по главе

### Глава 4. Действие арсенитов на содержание лимфоцитов в органах системы иммунитета

- 4.1. Изменение лимфоидных индексов тимуса и селезенки
- 4.2. Изменение числа лимфоцитов в тимусе и селезенке под влиянием арсенитов
- 4.3. Влияние арсенитов на содержание лимфоцитов в органах системы иммунитета и циркулирующей крови
- 4.4. Изучение нарушения миграции колониеобразующих единиц в селезенку

#### Выводы по главе

## Глава 5. Действие арсенитов на основные гуморальные иммунные реакции

- 5.1. Влияние арсенитов на Т-зависимый гуморальный иммунный ответ
- 5.2. Действие острого отравления арсенитами на синтез IgG
- 5.3. Исследование влияния арсенитов на Т-независимый гуморальный иммунный ответ
- 5.4. Нарушение кооперации Т- и В-клеток в формировании антителообразования *in vitro*

### Выводы по главе

## Глава 6. Оценка воздействия арсенитов на основные клеточные иммунные реакции

- 6.1. Исследование функции Т-лимфоцитов под влиянием арсенитов
- 6.2. Изменение реакции гиперчувствительности замедленного типа
- 6.3. Изучение антителозависимой клеточной цитотоксичности при остром действии арсенитов
- 6.4. Воздействие острой интоксикации арсенитами на функцию естественных клеток-киллеров
  - 6.4.1. Действие арсенитов на активность естественных клеток-киллеров селезенки *in vivo*
  - 6.4.2. Действие арсенитов на активность ЕКК селезенки *in vitro*

### Выводы по главе

## Глава 7. Роль антихолинэстеразных механизмов и перекисного окисления липидов в нарушении иммунного статуса после острой интоксикации арсенитами

- 7.4. Изменение активности эстераз Т-клеток под влиянием арсенитов
- 7.5. Изменение показателей перекисного окисления липидов после острого отравления арсенитами

## Глава 8. Коррекция нарушений иммунного гомеостаза при остром отравлении арсенитами

- 8.1. Влияние антидота мышьяксодержащих соединений унитиола на показатели НРО и иммунного статуса

8.2. Обоснование иммуностимулирующей терапии при остром  
отравлении арсенитами

8.3. Влияние имунофана на основные показатели НРО и иммунного  
статуса после острого отравления люизитом

8.4. Воздействие унитиола в комбинации с имунофаном на основные  
показатели НРО и иммунного статуса

Выводы по главе

Заключение

Выводы

Практические рекомендации

Литература

## ПЕРЕЧЕНЬ СОКРАЩЕНИЙ

АЗКЦ	- антителозависимая клеточная цитотоксичность
АОК	- антителообразующие клетки
АОС	- антиоксидантная система
АХЭ	- ацетилхолинэстераза
БОВ	— боевые отравляющие вещества
ГАМК	— гамма-аминомасляная кислота
ГГНС	- гипоталамо-гипофизарно-надпочечниковая система
ГЗТ	- гиперчувствительность замедленного типа
ГМ-КСФ	—гранулоцитарно-макрофагальный колониестимулирующий фактор
ДНК	- дезоксирибонуклеиновая кислота
ЕКК	- естественные клетки-киллеры
ЕЦ	- естественная цитотоксичность
ИКК	— иммунокомпетентные клетки
ИЛ-1 (2 и т.д.)	- интерлейкин-1 (2 и т.д.)
К-клетки	— клетки-киллеры; лимфоциты, определяющие АЗКЦ
КМ	- костный мозг
КОЕ	- колониеобразующая единица
КОЕс	- колониеобразующая единица селезенки
КонА	- конканавалин А
ЛИ	— лимфоидный индекс
НИРО	- неспецифическая и иммунологическая резистентность организма
НРО	- неспецифическая резистентность организма
ПСКК	- полипотентная стволовая кроветворная клетка
ПЯЛ	— полиморфноядерные лейкоциты
ПОЛ	- перекисное окисление липидов
РНК	— рибонуклеиновая кислота

РОК	– розеткообразующие клетки
РТМЛ	– реакция торможения миграции лейкоцитов
СКК	- стволовая кроветворная клетка
ТХВ	- токсичные химические вещества
Th1, Th2	– Т-лимфоциты- хелперы типа 1, 2
ФГА	– фитогемагглютинин
ЦНС	- центральная нервная система
ЭБ	- эритроциты барана
ЭК	- эритроциты кур
Ig	- иммуноглобулин
LD <sub>50</sub>	- средняя смертельная доза, вызывающая смертельный исход у 50% отравленных животных
Vi-антиген (Vi-Ag)	- тимуснезависимый Vi - антиген брюшнотифозной вакцины

## ВВЕДЕНИЕ

Изучение действия ксенобиотиков на иммунный гомеостаз и возможностей коррекции его нарушений при помощи иммуномодуляторов является одной из наиболее актуальных проблем патфизиологии, иммунологии и токсикологии. Это определяется использованием (наличием) в Вооруженных Силах Российской Федерации разнообразных токсичных химических веществ - ТХВ (военный аспект проблемы), загрязнением окружающей среды различными соединениями (экологический аспект проблемы), увеличением аварий на химических объектах, возможностью массовых поражений при транспортировке и хранении химических соединений (техногенный аспект), ростом отравлений ТХВ, формирующих вторичные постинтоксикационные иммунодефицитные состояния (иммунотоксикологический аспект проблемы), а также, и это один из основных аспектов проблемы, необходимостью уничтожения десятков тонн боевых отравляющих веществ (БОВ) в соответствии с Конвенцией о запрещении разработки, производстве, накоплении и применении химического оружия и его уничтожения [Александров В.Н., Емельянов В.И., 1990; Бадюгин И.С. и соавт., 1991; Саватеев Н.В., Куценко С.А., 1982, 1993; Конвенция..., 1993; Хаитов Р.М. и соавт., 1995; Калинина Н.И., 2000а; Забродский П.Ф., 1998, 2002; Vos J. G. et al., 1983; Loose L.D., 1985; Miller K., 1985; Luster M.J. et al., 1987; Sullivan J.B., 1989].

При этом первостепенную важность приобретает вопрос об иммунотоксичности арсенитов - люизита и продуктов его переработки. Это связано с тем, что на базах Министерства Обороны РФ находятся на хранении большие количества мышьяксодержащих веществ: люизита, адамсита, дифенилхлорарсина. Запасы люизита на момент начала его уничтожения согласно Конвенции о запрещении разработки, производства, накопления и применения химического оружия и о его уничтожении составляли порядка 7,5 тысяч тонн в местах его хранения в Саратовской



области и Удмуртии. На территории Саратовской области находится могильник, содержащий около 3 тысяч тонн адамситы и дифенилхлорарсина. В процессе уничтожения люизита и других мышьяк содержащих отравляющих веществ (ОВ) будет образовываться значительное количество реакционных масс, в состав которых будут входить арсенит натрия. Продукты утилизации БОВ планируется хранить на территории объектов по уничтожению химического оружия (УХО) [Алимов Н.И. и соавт., 2000а; 2000б; 2000в; Калинина Н.И., 2000б; Щербаков А.А. и соавт., 2002].

Современные проекты специализированных объектов обеспечивают безопасные условия хранения ХО и уничтожения ОВ, в частности, люизита, в штатных режимах их функционирования. Однако, при определенных обстоятельствах этот режим их работы может быть нарушен вследствие возникновения природных и стихийных бедствий, техногенных катастроф и аварий, а также в связи с возможными проявлениями терроризма и диверсий на объектах по хранению и уничтожению ХО. Данные ситуации приведут к колоссальному загрязнению окружающей среды мышьяк содержащими соединениями (МС), массовому поражению обслуживающего персонала объектов по УХО и населения близлежащих населенных пунктов [Алимов Н.И. и соавт., 2000в].

В соответствии с Федеральной программой уничтожения ХО в поселке Горный Саратовской области детоксикация и уничтожение люизита производится методом щелочного гидролиза с получением реакционных масс, в состав которых входят треххлористый мышьяк и арсенит натрия. Данный объект по уничтожению люизита 1282-ОПО относится к высокотоксичным, пожаро-взрывоопасным производствам. Токсичность производства определяется переработкой отравляющего вещества – люизита и применением веществ 2 класса опасности [Алимов Н.И. и соавт., 2000а, 2000в].

Влияние БОВ кожно-нарывного действия, в частности, люизита и продуктов его утилизации на иммунный гомеостаз изучено недостаточно

[Горшенин А.В. и соавт., 1998; Рембовский В.Р. и соавт., 2000]. Мышьяксодержащие соединения - люизит и вещества, образующиеся в ходе технологических процессов его переработки (арсенит натрия, треххлористый мышьяк), - могут снижать неспецифическую резистентность организма (НРО) и показатели системы иммунитета у персонала объектов по хранению и уничтожению химического оружия (ХО), а также у населения, проживающего вблизи данных объектов. Причем иммунотоксический эффект МС могут оказывать при воздействии достаточно низких доз ввиду высокой чувствительности иммунной системы к ксенобиотикам [Забродский П.Ф., 2002; Descotes G., 1986; 1987; Luster M. J. et al., 1987].

В настоящее время имеются многочисленные доказательства, полученные в экспериментах *in vivo* и *in vitro*, а также в процессе мониторинга за состоянием здоровья, НРО и системы иммунитета лиц, подвергающихся острому и хроническому действию ксенобиотиков, что нарушение иммунного гомеостаза (повреждение популяций и субпопуляций иммуноцитов) ТХВ приводит к инфекционным осложнениям и заболеваниям [Забродский П.Ф., 1993; 1998; 2002; Descotes G., 1986, 1987; Luster M. J. et al., 1987; Sullivan J. B., 1989]. Можно полагать, что такой же эффект вызывают люизит и продукты, получаемые при его уничтожении.

Данные литературы о влиянии арсенита натрия - одного из наиболее токсичных продуктов, образующегося в ходе уничтожения люизита, - на НРО и систему иммунитета практически отсутствуют [П.Ф. Забродский, 2002; Давыдова В.И., 1989; Descotes G., 1986].

Не вызывает сомнения, что нарушения иммунного гомеостаза при остром отравлении мышьяксодержащими соединениями (МС), в частности арсенитами, нуждаются в дальнейшем изучении.

Вопрос о фармакологической коррекции дисфункций системы иммунитета под влиянием люизита и продуктов его деструкции в постинтоксикационном периоде не исследован [Забродский П.Ф., 1998, 2002]. Необходим выбор наиболее приемлемых иммуностимуляторов из большого

арсенала препаратов этой группы, имеющихся в настоящее время. Это позволит проводить научно обоснованную профилактику и лечение возникающих при интоксикациях МС, как и при действии многочисленных ксенобиотиков, различных инфекционных, аллергических, аутоиммунных и онкологических заболеваний [Шубик 1976; Хаитов Р. М. и соавт., 1995; Забродский П. Ф., 1986; 1998; Georgiev V. S, Yamaguuchi H., 1993].

Таким образом, учитывая необходимость уничтожения люизита и связанное с ним накопление продуктов его деструкции на объектах по УХО, вероятность применения мышьяксодержащих соединений при террористических актах, существующую возможность поражения работающих на химических объектах по уничтожению БОВ и населения близлежащих населенных пунктов в случае аварий, недостаточно изученные особенности действия МС на систему иммунитета, следует заключить, что проблема исследования нарушений НРО и иммунного статуса под влиянием люизита и основного продукта его уничтожения арсенита натрия с целью обоснования способов их коррекции актуальна и важна как в теоретическом, так и в практическом отношении.

**Ц е л ь и с с л е д о в а н и я:** изучить влияние острого отравления мышьяксодержащими соединениями – люизитом и арсенитом натрия – в условиях эксперимента на животных на показатели неспецифической резистентности организма и иммунного статуса, обосновать и оценить коррекцию выявленных нарушений.

#### Задачи исследования

1. Оценить влияние острой интоксикации мышьяксодержащими соединениями – люизита и арсенита натрия – на показатели антиинфекционной неспецифической и иммунологической резистентности организма.

2. Исследовать действие арсенитов на содержание лимфоцитов в органах системы иммунитета.

3. Определить влияние арсенитов на содержание колониеобразующих единиц в селезенке.
4. Изучить изменение гуморальных иммунных реакций после острого отравления арсенитами.
5. Определить влияние острого отравления люизитом и арсенитом натрия на клеточный иммунный ответ.
6. Оценить роль антихолинэстеразных механизмов и перекисного окисления липидов мембран в нарушении иммунного статуса после острой интоксикации арсенитами.
7. Обосновать и оценить коррекцию нарушений неспецифической резистентности организма и иммунного статуса после острых отравлений мышьяксодержащими соединениями их антидотом унитиолом и иммуностимулятором имунофаном.

## ГЛАВА 1

СОВРЕМЕННЫЕ ПРЕДСТАВЛЕНИЯ О ВЛИЯНИИ ОСТРЫХ  
ОТРАВЛЕНИЙ МЫШЬЯКСОДЕРЖАЩИМИ СОЕДИНЕНИЯМИ НА  
НЕСПЕЦИФИЧЕСКУЮ РЕЗИСТЕНТНОСТЬ ОРГАНИЗМА И  
ИММУННЫЙ ГОМЕОСТАЗ

## 1.1 Общая характеристика соединений трехвалентного мышьяка

Элементарный мышьяк и его соединения широко распределены во внешней среде и в пищевых продуктах, поскольку они присутствуют в океанической воде, особенно в условиях морских лагун, вблизи промышленных районов. Среднее содержание мышьяка для незагрязненных почв составляет 2 мг/кг [Гамаюрова В.С., 1993]. Эта концентрация не представляет опасности для здоровья человека. Почвы, содержащие значительное количество мышьяка, например, в результате возможных аварий или аварийных ситуаций на объектах по хранению и уничтожению химического оружия, представляют угрозу для населения и окружающей среды. Мышьяк – это распространенный загрязнитель каменного угля и руд многих металлов, особенно меди, свинца, цинка. В промышленности источником мышьяка являются преимущественно угольные электростанции и плавильные печи. К настоящему времени синтезировано более 6000 органических и неорганических соединений мышьяка. Мышьяк применяют в производстве стекла, красителей, полупроводников, а также в различных сплавах [Ершов Ю.А., Плетнева П.В., 1989].

В большинстве продуктов присутствие мышьяка (мышьяковистого ангидрида, мышьяковокислого кальция, арсенита натрия, «парижской зелени» и других) объясняется широким использованием его соединений в сельскохозяйственной химии в качестве инсектицидов, гербицидов, фунгицидов, родентицидов, алгицидов (уничтожителей водорослей), древесных консервантов, стерилизаторов почвы [Крачковский Е.А., 1978].

Как лекарственное средство соединения мышьяка известны в течении 2000 лет. Мышьак использовался в античной Греции и Древнем Риме как терапевтическое средство и как яд. До появления пенициллинов мышьяк применялся в терапии спирохетозов (новарсенал, миарсенал, осарсол) и как тонизирующее средство в растворе Фоулера. Сегодня его терапевтическое применение ограничивается лечением трипаносомоза, поражающего центральную нервную систему [Давыдова В.И., 1989]

Хлорид мышьяка, являющийся компонентом реакционных масс, образующихся при уничтожении люизита, используется в производстве фармацевтических препаратов, а также для уничтожения личинок комаров.

В США около 1,5 миллионов рабочих потенциально подвергаются воздействию соединений мышьяка. Общее содержание мышьяка в организме взрослого человека составляет около 20 мг, а среднесуточное поглощение мышьяка из источников окружающей среды - менее 1 мг [Бертрам Г.и соавт. 2000].

Соединения мышьяка обладают высокой биологической активностью. Накопленные к настоящему времени сведения о биологической роли мышьяка свидетельствуют о том, что он обладает широким спектром токсического действия. Наиболее распространенной формой арсеноза является техногенный, обусловленный загрязнением производственной и окружающей среды [Скальная М.Г. и соавт., 1995; Charbonneau S.M. et al., 1978].

## 1.2. Общая токсикологическая характеристика соединений мышьяка

Все соединения мышьяка, его органические и неорганические производные, являются чрезвычайно (среднесмертельная концентрация – ниже 1 мг/л/2 ч среднесмертельная доза – ниже 1 мг/кг) и высокотоксичными токсичными (высокотоксичные - среднесмертельные концентрация и доза - соответственно – 1-5 мг/л/2 ч; 1-50 мг/кг) [Владимиров

В.А. и соавт., 1989]. Токсикологическое значение имеют такие химические формы мышьяка, как элементарный мышьяк, неорганический мышьяк, органические соединения мышьяка и газ арсин. Наиболее токсичными являются арсин и соединения трехвалентного мышьяка. Существует мнение, что органические производные трехвалентного мышьяка (арсеноксиды) близки по токсичности к неорганическим, а производные мышьяка пятивалентного менее токсичны. Соединения мышьяка могут быть расположены в порядке снижения токсичности: арсины ( $\text{AsH}_3$ ,  $\text{AsR}_3$ )> арсениты ( $\text{AsO}_2^-$ )>арсеноксиды ( $\text{R-As=O}$ )> арсенаты ( $\text{AsO}_2^{3-}$ )> метиларсоновая и диметиларсоновая кислоты ( $\text{AsO}_4^{3-}$ ,  $\text{HAsO}_4^{2-}$ ,  $\text{H}_2\text{AsO}_4^-$ )> $\text{As}_{\text{TB}}$ . [Ершов Ю.А., Плетнева П.В., 1989].

Все основные токсические эффекты соединений мышьяка (люизита, треххлористого мышьяка и арсенита натрия) можно отнести за счет его трехвалентной формы. Наибольшей токсичностью по сравнению с люизитом и его метаболитами, обладают первичные галоидные арсины (этилдихлорарсин, метилдихлорарсин, фенилдихлорарсин), которые применялись в качестве отравляющих веществ. К мышьяксодержащим БОВ относится стернит – адамсит [Саватеев Н.В., 1987; Бадюгин И.С. и соавт., 1992; Лудевиг Р., Лос К., 1983; Могуш Г., 1984].

Отравление мышьяком происходит при применении содержащих его медикаментов, употреблении пищи и воды, загрязненных данным элементом, вдыхании его соединений в производственных условиях, действии отравляющих веществ, содержащих мышьяк (люизит, адамсит) и продуктов образующихся при их уничтожении. На Тайване описано эндемическое поражение сосудов нижних конечностей, связанное с повышенным содержанием мышьяка в питьевой воде. В этой же популяции отмечается генерализованный атеросклероз, увеличение частоты опухолей легких, кожи, печени, мочевого пузыря и почек [Lilienfeld D.E., 1988]. Доза мышьяка, составляющая 1 мг/кг, является минимальной смертельной для человека [Ершов Ю.А., Плетнева П.В., 1989].

По токсикологической классификации мышьяк и его соединения относится к ядам кожно-резорбтивного действия, вызывающим местные воспалительные изменения в сочетании с общетоксическими явлениями; по «избирательной токсичности» - к желудочно-кишечным, по патофизиологической (по типу развивающейся гипоксии) – к вызывающим циркуляторную гипоксию (нарушение микроциркуляции крови, экзотоксический шок) [Саватеев Н.В., 1987; Лудевиг Р., Лос К., 1983; Могущ Г., 1984; Лужников Е.А., 1999; Лужников Е.А., Костомарова Л.Г., 2000; Бадюгин И.С. и соавт., 1992; Маркова И.В. и соавт., 1998].

Летальность при отравлениях соединениями мышьяка, ранее достигавшая 65-84%, при современных методах лечения составляет 15-19% [Лужников Е.А., Костомарова Л.Г., 1989].

## 1.2 Токсикологическая характеристика люизита и арсенита натрия

Люизит ( $\beta$ -хлорвинилдихлорарсин ( $\text{ClCH}=\text{CHAsCl}_2$ )) относится к отравляющим веществам кожно-резорбтивного, общетоксического и удушающего действия, является производным алкилмышьяковистой кислоты. Синтезирован в 1917 году американским химиком У. Ли Льюисом и независимо от него немецким химиком Г. Виландом [Александров В.Н., Емельянов В.И., 1990].

Свежеперегнанный люизит (чистый  $\beta$ -хлорвинилдихлорарсин) представляет собой бесцветную жидкость, почти не имеющую запаха. Через некоторое время он приобретает фиолетовую или темно-красную окраску.

На практике чаще всего мы имеем дело с техническим люизитом, являющимся смесью мышьякорганических соединений ( $\alpha$ -;  $\beta$ -;  $\gamma$ -люизитов) и треххлористого мышьяка. Содержание  $\alpha$ -люизита (2-хлорвинилдихлорарсин) составляет 65%,  $\beta$ - люизита [бис(2-хлорвинил)хлорарсин]-7-10%,  $\gamma$ -люизита [трис(2-хлорвинил)арсин]-4-12%. В свою очередь  $\alpha$ -люизит существует в форме двух пространственных изомеров, различающихся физическими



свойствами, (цис-изомер – 10%, наиболее токсичный транс-изомер – 90%). Технический люизит представляет собой темно-бурую маслянистую жидкость со своеобразным запахом, напоминающим запах листьев герани. Температура кипения  $+196,4^{\circ}\text{C}$ , температура замерзания  $-44,7^{\circ}\text{C}$ . Относительная плотность паров люизита по воздуху равна 7,2. Плотность люизита 1,92. Люизит плохо растворим в воде (не более 0,05%), хорошо растворяется в органических растворителях, в жирах, смазках, впитывается в резину, лакокрасочные покрытия, пористые материалы. Он смешивается со многими ОВ и сам растворяет их, поэтому может использоваться в качестве компонента тактических смесей [Александров В.Н., Емельянов В.И., 1990; Щербаков А.А. и соавт., 2002]

Люизит, а также органические и неорганические соединения мышьяка могут проникать через кожу и слизистые оболочки, дыхательные пути, желудочно-кишечный тракт, раневые и ожоговые поверхности, при парентеральном введении. Является отравляющим веществом быстрого действия (скрытый период практически отсутствует). Минимальная эффективная концентрация паров, вызывающая раздражение кожи у человека, находится в пределах 0,06-0,33 мг/л, газообразный люизит при концентрации 10 мг/л вызывает образование пузырей при экспозиции 15 мин крупные пузыри образуются при плотности заражения  $4\text{-}5\text{г}/\text{м}^2$ , смертельная концентрация при попадании на кожу 25 мг/кг. В парообразном состоянии уже в концентрации  $0,002\text{ г}/\text{м}^3$  вызывает резкое раздражение глаз, непереносимая концентрация люизита, раздражающая верхние дыхательные пути,  $2\cdot 10^{-2}\text{ мг}/\text{л}$ ; вдыхание его в концентрации 0,05 мг/л приводит к развитию интоксикации, концентрация 0,5 мг/л за 5 мин и 0,25 мг/л за 15 мин является смертельной ( $\text{LCt}_{100}$ ) люизита составляет примерно  $3\text{ г}\cdot\text{мин}/\text{м}^3$ ,  $\text{LCt}_{50}$  0,5 мг $\cdot\text{мин}/\text{м}^3$ . При попадании его в желудочно-кишечный тракт смертельная доза для человека составляет 5-10 мг/кг.  $\text{LD}_{50}$  составляет 20 мг/кг. Высокие концентрации люизита могут вызвать смерть сразу или в течение 10 мин.

Смертельная доза растворимых соединений мышьяка 0,1-0,2 г. [Давыдова В.И., 1989; Александров В.Н., Емельянов В.И., 1990].

Токсичность люизита связана с ацилирующей способностью его отдельных компонентов по отношению к нуклеофильным радикалам [Саватеев Н.В., 1987; Бадюгин И.С. и соавт., 1992].  $\alpha$ -люизит, являющийся кожно-нарывным отравляющим веществом со значительным общеядовитым действием, вызывает раздражение слизистых оболочек носа, гортани, дыхательных путей, поражает глаза.  $\beta$ -люизит гораздо слабее по действию на кожу, но раздражающее действие выражено значительно сильнее.  $\alpha$ - и  $\beta$ -люизиты являются сложными соединениями со смешанными функциями. Реакционная способность данных соединений определяется своеобразным распределением электронной плотности в их молекулах. Наличие положительного поляризованного атома мышьяка обуславливает возможность осуществления реакций с нуклеофильными реагентами, в то же время наличие неподеленной пары электронов на атоме мышьяка указывает на способность этих соединений вступать в реакции с электрофильными реагентами [Владимиров В.А. и соавт., 1989].

Предполагается, что люизит в организме превращается в оксид ( $\beta$ -хлорвиниларсиноксид,  $\text{ClCH}=\text{CHAs}=\text{O}$ ), сульфид ( $\text{ClCH}=\text{CHAs}=\text{S}$ ) или другие мышьяксодержащие вещества. Наибольшее значение в механизме токсического действия придают хлорвиниларсиноксиду как наиболее устойчивому метаболиту. Высокая биологическая активность этого соединения обусловлена наличием в его молекуле трехвалентного мышьяка. Хлорвиниларсиноксида по токсичности не уступает люизиту (его  $\text{LD}_{50}$  для мышей составляет 5 мг/кг) [Саватеев Н.В., 1987; Александров В.Н., Емельянов В.И., 1990; Бадюгин И.С. и соавт., 1992].

Известно, что арсениты ( $\text{As}^{3+}$ ) являются тиоловыми ядами, ингибирующими различные ферменты (холинэстеразу, амилазу, липазу, алкогольдегидрогеназу, пируватоксидазу, аденозинтрифосфатазу и другие

ферменты, участвующие в обмене АТФ [Владимиров В.А. и соавт 1989; Ершов Ю.А., Плетнева П.В., 1989, Саватеев Н.В., 1987].

Люизит и другие производные трехвалентного мышьяка в организме вступают во взаимодействие со структурными и ферментными белками, присутствующими в биосредах, содержащими SH-группы. Предполагается два возможных типа реакций. Во-первых, реакция монотиолов с соединениями трехвалентного мышьяка, образуя гидролизующиеся моно- и дитиоарсениты. Во-вторых, дитиолы реагируют с арсеноксидами или арсенитом с образованием циклических дитиоарсенитов, которые значительно стабильнее, чем моно- и дитиоарсениты, возникающие при реакции монотиолами. Особенно стабильны пятичленные кольца, возникающие при взаимодействии соединений мышьяка с 1,2-дитиолами (смежными дитиолами) [Саватеев Н.В., 1987, Ершов Ю.А., Плетнева П.В., 1989, Трахтенберг И.М., Шафран Л.М., 2002]

Арсенит натрия способен энергично реагировать с тиоловыми группами, особенно дитиолами (например, с липоевой кислотой). Блокируя окислительные ферменты, зависящие от липоевой кислоты, арсенит способствует накоплению пирувата и других  $\alpha$ -кетокислот в тканях. Через 5 и 150 минут после внутривенного введения арсенита натрия новозеландским кроликам в дозе 7 мг/кг ( $LD_{100}$ ) активность пируватдегидрогеназного комплекса возрастала с 0,088 до 0,2888 и 0,33 ммоль/л соответственно. Средненелетальные дозы арсенита натрия для крыс при пероральном и накожном поступлении составляют соответственно 41 и 150 мг/кг, для мышей при внутрибрюшинном введении и нанесении на кожу соответственно - 5 и 12-18 мг/кг ( $LD_{100}$  при поступлении в желудок – 19 мг/кг [Давыдова В.И., 1989].

Торможение некоторых ферментов (сукцинатдегидрогеназы, альдегиддегидрогеназы, глутаминсинтетазы, тиолтрансацилазы, люциферазы, ацетил-КоА-карбоксилазы) арсенитом резко усиливается в присутствии моно- и дитиолов. Вероятно, роль тиола состоит в

восстановлении дисульфидной группы белка в сближенных сульфидных группах, реагирующих с арсенитом. Высокое сродство трехвалентного мышьяка к животным тканям может быть объяснено большой скоростью взаимодействия его с тиоловыми соединениями. Например, при реакции арсенита с цистеином  $k_1=1,37 \cdot 10^{-2} \text{ с}^{-1}$  и  $k_{1/2}=52 \text{ с}$ . [Ершов Ю.А., Плетнева Т.В. 1989] с дитиолами скорость реакции выше [Торчинский Ю.М., 1977].

Образование циклических соединений может произойти в том случае, если в молекуле фермента сульфгидрильные группы находятся на двух соседних атомах углеводородной цепи (положения 1,2) или через один атом (положение 1,3). Такое расположение SH-групп имеют компоненты димеркаптосодержащей ферментной системы окисления пировиноградной кислоты – пируватоксидазы. Пируватоксидаза это сложный ферментный комплекс, состоящий из трех ферментных систем и пяти коферментов. В присутствии пируватоксидазной ферментной системы осуществляется безкислородное расщепление глюкозы через глюкозо-6-фосфат до пировиноградной кислоты, которая подвергается окислительному декарбоксилированию. Этот процесс включает расщепление кетокислот с образованием углекислого газа и присоединение остающейся ацильной группы к коферменту А. Процесс характеризуется участием двух мишеней действия арсенита–кофермента–А и липоевой кислоты, содержащих тиоловые группы [Ленинджер А., 1974; Александров В.Н., Емельянов В.И., 1990].

В процессе окисления пировиноградной кислоты дисульфид-6,8-дитиооктановой кислоты (липоевой кислоты) восстанавливается до 6,8-дитиооктановой кислоты (циклический меркаптид) - восстановленная форма фермента, которая и подвергается ацилированию люизитом или его метаболитами. Таким образом фермент исключается из участия в окислительно-восстановительных процессах. Это приводит к нарушению синтеза лимонной и щавелево-уксусной кислоты (концентрация пирувата и лактата в клетке является отражением окислительных процессов в

клетке, в клетке нарушаются процессы усвоения метаболического топлива на стадии анаэробного окисления пировиноградной кислоты. Поврежденная клетка прекращает усваивать жиры, белки, углеводы и другие виды метаболического топлива, что приводит к ее гибели [Ленинджер А., 1974; Диксон М., Уэбб Э., 1982; Страйер Л., 1985; Александров В.Н., Емельянов В.И., 1990]

Трехвалентный мышьяк влияет на митоз, синтез и распаривание ДНК. При этом механизм токсического действия преимущественно связан с блокированием тиоловых групп ДНК-полимеразы [Давыдова В.И., 1989; Трахтенберг И.М., Шафран Л.М., 2002].

Таким образом, неорганические соединения трехвалентного мышьяка, как и их элементоорганические производные, блокируют SH-группы различных биосоединений, вызывая ингибирование ряда тиолзависимых ферментных систем в различных тканях (Д-аминокислотоксидаза, моноаминоксидаза, уреазы, глюкозооксидаза, холиноксидаза, пируватоксидаза, аланинаминотрансфераза, аспартатаминотрансферазы, 2-глутаминокислотоксидаза, фумаразы, пируватдегидрогеназа, ксантиноксидаза, ДНК активированная АТФаза и др.).

При массивном поступлении мышьяка сам элемент, обладая высокой токсичностью, прямо действует на органы и ткани. Избыток мышьяка вызывает вторичный дисбаланс элементов. Так, замещая фосфор в различных биохимических реакциях фосфорилирования, он приводит к образованию нестабильного АДФ, предшественника АТФ, путем арсенилирования, являясь разобщителем фосфорилирования и окисления, в результате чего происходит нарушение тканевого дыхания и снижение энергетических ресурсов клетки. Наряду с этим мышьяк усиливает эффекты прооксидантной системы, образуя мышьяковистый радикал или действуя косвенным путем через дисбаланс микроэлементов и ослабляя антиоксидантную систему защиты. Высказано предположение, что замещение фосфора мышьяком в ДНК приводит к

нарушению хроматинного материала [Давыдова В.И., 1989; Скальная М.Г. и соавт. 1995].

Гидролазы (в том числе холинэстеразы), а так же холинорецепторы, содержащие SH-группы, могут повреждаться при проникновении в ткани люизита и соединений трехвалентного мышьяка [Давыдова В.И., 1989; Трахтенберг И.М., Шафран Л.М., 2002].

Симптоматика общетоксических проявлений при остром отравлении люизитом прежде всего связана с тяжелыми поражениями ЦНС (после кратковременного возбуждения, обусловленного болевой импульсацией, развитие глубокой апатии, адинамии, депрессии), вегетативных отделов нервной системы (тошнота, рвота, общая гипер-, или гипотермия, глубокая прогрессирующая гипотония, гипотрофия), аппарата кровообращения (первичный коллапс, экзотоксический шок, токсический миокардит и миокардиодистрофия, острая сердечная недостаточность) [Саватеев Н.В., 1987; Лудевиг Р., Лос К., 1983; Могуш Г., 1984; Лужников Е.А., Костомарова Л.Г., 1989, 2000; Бадюгин И.С. и соавт., 1992; Маркова И.В. и соавт., 1998].

Различные соединения мышьяка, в частности арсенит натрия, индуцируют бластомогенные процессы. Эпидемиологически показана связь между воздействием мышьяка и повышенной заболеваемостью человека раком кожи, респираторной, лимфатической и гемопоэтической систем, желудочно-кишечного тракта. Имеются работы, подтверждающие канцерогенную опасность мышьяка в опытах на животных [Давыдова В.И., 1989; Скальная М.Г. и соавт. 1995; Трахтенберг И.М., Шафран Л.М., 2002].

Острое отравления арсенитом натрия вызывает сонливость, ослабление дыхания, саливацию, понос, непроизвольное мочеиспускание, уменьшение диуреза, выделение мочи с примесью крови, желтушность склер, тремор, нарушение терморегуляции, координации движений, параличи, судороги. [Давыдова В.И., 1989].

Таким образом, люизит и арсенит натрия ингибируя кроме моно- и дитиоловых ферментов, гидролазы, оксидазы, энзимы, определяющие пуриновый обмен и синтез АТФ, вызывают при острой интоксикации поражение практически всех органов и систем организма.

Очевидно, что описанные механизмы токсичности способны вызывать выраженные иммунотоксические эффекты.

### 1.3. Общая характеристика иммунотоксичности различных ксенобиотиков. Нарушения неспецифической резистентности организма и иммунного статуса при отравлении мышьяксодержащими соединениями

В литературе данные в отношении действия острых отравлений мышьяксодержащими соединениями на НРО и систему иммунитета ограничены и противоречивы [Шубик В. М., 1976; Лазарева Д. Н., Алехин Е. К., 1985; Забродский П.Ф., 1998; 2002; Descotes J., 1986, 1987], поэтому представляет интерес краткая характеристика влияния токсичных химических веществ на иммунный гомеостаз.

Накопленные за несколько последних десятилетий данные о влиянии ТХВ на НРО и иммунный статус в целом определенно свидетельствуют о снижении неспецифических и специфических (иммунологических) факторов защиты организма при действии токсических агентов. Установлено уменьшение бактерицидной активности сыворотки крови, лизоцимной, комплементарной и фагоцитарной активности, а также других неспецифических факторов резистентности организма при хроническом воздействии сернистого ангидрида и фенола [Космодамианская Д. М., 1968], акролеина, окиси углерода [Стрельникова Л. А., Раткина В. Г., 1983], неорганических соединений фтора [Андропова М. Н. и соавт., 1988], стирола [Казакова В. В., 1971], севина, хлорофоса и ДДТ [Фридман Г.И., 1970], дихлорэтана [Забродский П.Ф., Киричук В.Ф., Грызунов А.В., 1997]. Исследователи вполне закономерно связывают снижение НРО с повышением

уровня заболеваемости различными инфекциями. Тяжелые металлы (ртуть, свинец, кадмий) в экспериментах на мышах, крысах и кроликах существенно увеличивают восприимчивость организма к различным инфекционным агентам [Luster M.J. et al., 1987]. Необходимо отметить, что при хроническом воздействии некоторых токсикантов регистрируется повышение активности лизоцима в сыворотке крови. Так, подобный эффект обнаружен при длительной интоксикации крыс малыми дозами гербицида симазана [Барштейн Ю.А. и соавт., 1991]. Острая интоксикация антихолинэстеразными фосфорорганическими соединениями кратковременно повышает антиинфекционную неспецифическую резистентность организма [Забродский П.Ф., 1987; 1998].

Моноцитарно-макрофагальная система (ММС), имеющая исключительно важное значение в реализации НРО и многочисленных иммунных реакциях, подвержена отрицательному действию большого числа ТХВ. К ним относятся полигалогенизированные ароматические углеводороды [Bleavins M. R., Aulerich R. J., 1983], метилизоцианат [Dwivedi P. D. et al., 1988], инсектицид токсафен [Allen A. L. et al., 1983], хлорофос [Шведов В. Л., Анисимова Г. Г., 1989], сероводород, аммиак [Дьячук И. А., 1979], различные инсектициды [Золотникова Г. П., 1980], анилин [Саноцкий И.В., 1969], гербицид 2,4-Д и карбофос [Жамсаранова С. Д. и соавт., 1988], свинец [Bagiuski B., 1985], двуокись кремния [Gennari M. et al., 1987], трихлорэтан [Sauders V.M. et al., 1985], трихлорэтилен, хлор, хлорфенол [Descotes J., 1986], оксид бутилолова [Vos J.G. et al., 1984], роданистый аммоний и тиомочевина [Савченко М.В., 1987], ацетонитрил [Забродский П.Ф., Киричук В.Ф., 1998] и другие вещества. Нарушение функции макрофагов легких вызывают оксиды свинца, никеля, ванадия, диоксиды ртути, марганца, азота, хлориды кадмия и никеля [Sullivan J. B., 1989]. Активность нейтрофилов при хронической интоксикации снижают многие пестициды, ароматические, хлорированные и фторсодержащие углеводороды, бензин, свинец, ртуть, бериллий, сероуглерод, формальдегид [Шубик В.М.,



1976]. Как правило, угнетение функции моноцитарно-макрофагальной системы сопровождается Т- и В-иммунодефицитными состояниями. Нарушение фагоцитоза может происходить вследствие действия ТХВ, в том числе и спиртов, на процессы хемотаксиса, адгезии, активации мембраны фагоцита, образования фagosомы, слияния лизосомальных гранул с фagosомой, уничтожения чужеродных клеток при помощи кислородзависимых или кислороднезависимых механизмов. Ряд химических соединений способен активировать фагоцитоз в определенные периоды хронической интоксикации или при действии относительно небольших доз (концентраций). Такими свойствами обладают хлорид марганца [Smialowicz R. J. et al., 1985], некоторые пестициды в начальном периоде интоксикации, метилмеркаптан и нитроаминосоединения [Шубик В. М. , 1976]. В отношении действия кадмия данные литературы противоречивы. Исследователи описывают и стимуляцию фагоцитоза под влиянием этого металла [Thomas P. T. et al., 1985], и его супрессию [Bagiuski B., 1985]. Дильдрин оказывает кратковременное активирующее влияние на нейтрофилы крыс [Hewett J. A., Roth R. A., 1988], севин и метафос увеличивают миграционную активность макрофагов в начальный период интоксикации [Долинская С. И. И соавт., 1989]. Установлено увеличение фагоцитарной активности под влиянием ДДТ и севина с последующим снижением данного показателя через 2-3 месяца с момента начала хронической интоксикации [Miller K., 1985]. Активацию макрофагов вызывает у мышей бенз(а)пирен в дозе 40 мг/кг [Blanton R. H. et al., 1986].

Большое значение в нарушении антиинфекционной резистентности имеет поражение ТХВ естественных клеток-киллеров (ЕКК), так как именно данные лимфоциты осуществляют защиту от различных микроорганизмов до включения основных иммунных реакций. Известно, что нетоксичные концентрации цинка снижают активность ЕКК в 6-20 раз [Ferry F., Donner M., 1984]. Аналогичным свойством обладают хлорид никеля [Smialowicz R. J. et al., 1984], растворитель пропиленгликоль [Denning D. W. et al., 1987],

оксид бутилолова [Vos J.G. et al., 1984]. В то же время, некоторые химические вещества увеличивают активность ЕКК. Так, хлорид марганца повышает естественную цитотоксичность у мышей при однократном введении в дозах 10-160 мг/кг вследствие возрастания уровня сывороточного интерферона [Smialowicz R. J. et al., 1984].

Высокие дозы (концентрации) как необходимых для организма металлов, так и не участвующих в ферментативных реакциях и токсичных, оказывают отрицательное действие на иммунный гомеостаз. Иммунотоксичность в целом прямо связана с токсичностью металлов и их солей. При избыточном накоплении в организме практически всех металлов может отмечаться повреждение всех звеньев иммунной системы. [Забродский П.Ф., 1998, 2002]

При рассмотрении действия ТХВ на иммунокомпетентные клетки (ИКК) на клеточном и субклеточном уровнях следует выделить следующие основные иммунотоксические механизмы [Смирнов В.С. и соавт., 2000; Забродский П.Ф., 1993; 1998; 2002; Spreafico F., Vecchi A., 1984; Descotes J., 1986; . Luster M.I., Blank J.A., 1987; Van Loveren. H. et al., 1990] : действие токсикантов на центральную и эндокринную системы с последующей реализацией эффектов медиаторов и гормонов, к большинству из которых на мембране иммунокомпетентной клетки (ИКК) имеются соответствующие рецепторы; инициация токсикантом перекисного окисления липидов мембран клеток, в частности, путем инактивации антиоксидантных ферментов и витаминов (супероксиддисмутазы, каталазы, глутатионтрансферазы, глутатионпероксидазы,  $\alpha$ -токоферола,  $\beta$ -каротина, витаминов А, С); взаимодействие яда с ДНК; инактивация ТХВ ферментов цитозоля и мембраны ИКК (ацетилхолинэстеразы,  $\alpha$ -нафтил-AS-ацетатэстеразы,  $\alpha$ -нафтилбутират-эстеразы, коферментов пируватоксидазной системы и др.), а также энзимов системы тканевого дыхания в митохондриях иммуноцитов; индукция или ингибирование синтеза Р-450-зависимых монооксигеназ, локализованных преимущественно

в естественных клетках-киллерах и Т-лимфоцитах; действие ТХВ на мембрану ИКК, ее повреждение с последующим образованием аутоантител, взаимодействующих с иммуноцитом.

Данные литературы позволяют предполагать, что практически все из перечисленных механизмов прямо или косвенно определяют иммунотоксичность МС.

Химические ксенобиотики по своим основным иммуотропным свойствам делятся на соединения, вызывающие Т- и В-иммунодефицитное состояние; токсические агенты, поражающие преимущественно Т- или В-систему иммунитета; яды, подавляющие функцию моноцитарно-макрофагальной системы (ММС); вещества, снижающие неспецифическую резистентность организма; токсиканты, разнонаправленно влияющие на Т-, и В-звено иммунитета и НРО. Большинство ТХВ в той или иной степени действуют как на Т- и (или) В-систему иммунитета, так и на ММС и другие факторы, определяющие НРО. В процессе иммуногенеза ТХВ могут оказывать воздействие на различные ИКК и их предшественники вплоть до полипотентной стволовой кроветворной клетки (ПСКК). В зависимости от характера дисфункции системы иммунитета при действии ТХВ для профилактики и лечения инфекционных, онкологических и других связанных с иммунодефицитными состояниями заболеваний могут использоваться соответствующие иммуностимуляторы [Смирнов В.С. и соавт., 2000; Забродский П.Ф., Киричук В.Ф., 1999; Забродский П.Ф. и соавт., 2001; Забродский П.Ф., 1998, 2002].

Как уже указывалось, арсениты являются тиоловыми ядами, ингибируют дегидролипоевую кислоту, кофермент А, нарушая цикл трикарбоновых кислот. Инактивация кетоглутаратдегидрогеназы приводит к нарушению синтеза лимонной и щавелевоуксусной кислот, а блокирование ДНК-полимеразы - к изменению синтеза и распариванию ДНК. Токсичные и иммунотоксические эффекты соединений мышьяка связаны также с ингибированием моноаминоксидазы, уреазы, пируватоксидазы,

аланинаминотрансферазы, аспартатаминотрансферазы, фумаразы. Мышьяк контактирует с фосфатами в процессе окислительного фосфорилирования, нарушает образование АТФ из АДФ, являясь разобщителем фосфорилирования и окисления [Давыдова В.И., 1989; Ершов Ю.А., Пастнева Т.В., 1989; Скальная М.Г. и соавт. 1995; Трахтенберг И.М., Шафран Л.М., 2002].

Не вызывает сомнения, что описанные механизмы токсичности способны вызывать выраженные иммунотоксические эффекты. Вероятно, эти эффекты определяют канцерогенные свойства соединений мышьяка [McCabe M.J. et al., 1983]. В опытах на мышах установлено снижение Т-зависимого первичного и вторичного иммунных ответов в 2-5 раз к эритроцитам барана при хронической пероральной интоксикации мышьяком (поступление мышьяковистого натрия в течение трех недель в дозах от 0,5 до 10 ppm) [Blackley B.R. et al., 1980]. Арсениты при концентрации 2-4 мМ увеличивают пролиферацию Т-клеток теленка под влиянием ФГА (инкубация 3 сут) и снижают данную реакцию при концентрациях 8 и 10 мМ. Аналогичные данные получены и на Т-лимфоцитах человека [McCabe M.J. et al., 1983]. Установлено снижение антиинфекционной и противоопухолевой резистентности при острой и хронической интоксикации соединениями мышьяка мышей различных линий [Gainer I.H. , 1972]. Мышьяковистый галлий (2,5-200 мг/кг, однократно) уменьшает число антителообразующих клеток (АОК) к эритроцитам барана в селезенке мышей [Burns L. A. et al., 1991, 1993], ослабляется способность к презентации антигена премированными эритроцитами барана макрофагами популяции Т-клеток. При этом супрессия антителообразования не связана с процессингом антигена макрофагами и продукцией этими клетками ИЛ-1 [Sikorski E.E. et al., 1991b]. Снижение АОК к тимуснезависимому антигену динитрофенил-фикоλλу наблюдали при введении мышьяковистого галлия в дозах 100-200 мг/кг. При этом максимальная доза снижала число АОК в селезенке на 54%, а также число Т-клеток, В-лимфоцитов и макрофагов. Супрессия

антителообразования была прямо связана с уменьшением количества макрофагов в селезенке мышей [Sikorski E.E. et al., 1991a].

А.В. Горшенин (1998) показал, что люизит обладают выраженным иммунотоксическим действием с преимущественным поражением клеточного звена иммунной системы. Автор установил, что люизит (а также ипритно-люизитная смесь) вызывают различное изменение соотношения основных популяций и субпопуляций лимфоцитов – Т- и В- лимфоцитов, Т-хелперов, Т-супрессоров - в крови экспериментальных животных (крыс и мышей). Оценивая экспериментальные данные о влиянии ОВ кожно-нарывного действия на популяционный состав лимфоцитов лабораторных животных, автор отмечает, что основной точкой приложения токсического действия люизита на клеточное звено иммунной системы являются регуляторные субпопуляции Т-лимфоцитов. При воздействии люизита отмечается преимущественное подавление Т-хелперов и изменению количества и функциональной активности Т-лимфоцитов [Рембовский В.Р., Горшенин А.В., Белобровкин Е.А., 2000].

Воздействие люизита характеризуется существенными отклонениями от нормальных значений функциональной активности лимфоцитов. При этом в ранние сроки интоксикации отмечается увеличением индексов стимуляции, а позднее наблюдается угнетение митогенного ответа лимфоцитов. При воздействии люизита уже на 1 сутки интоксикации наблюдается достоверное повышение функциональной активности В-популяции лимфоидных клеток во всех исследованных дозах. Следует отметить достоверные отклонения популяционного состава лимфоцитов и угнетение их функциональной активности в отдаленные сроки после воздействия люизита, что свидетельствует о значительной глубине поражений иммунной системы животных при интоксикации данным ОВ [Горшенин А.В., 1998].

Исследования, проведенные М.Г.Скальной и соавт (1995), показали, что в тимусе беременных мышей, получивших суммарную дозу арсенита натрия 300 мг/кг обнаружены выраженные признаки акцидентальной инволюции:

снижение абсолютной и относительной массы органа, клеточности, особенно коркового вещества, увеличение апоптозно-измененных лимфоцитов, уменьшение объемной плотности коркового вещества и увеличение – мозгового, повышение количества тимических телец, особенно кистоподобных структур, и эпителиальных канальцев на фоне снижения секреторной активности органа практически в 2 раза. При исследовании новорожденных мышей установлено, что подострая экспозиция мышьяком матерей в дозе 10 мг/кг не сопровождалась грубыми морфофункциональными изменениями тимуса у мышей, а также не влияла на численность потомства и антенатальную смертность.

Данные литературы свидетельствуют, что всестороннего анализа действия люизита и арсенита натрия на НРО и основные показатели системы иммунитета до сих пор не проведено. Не решена проблема использования антидотов и различных иммуностимуляторов для восстановления постинтоксикационных нарушений системы иммунитета после острого отравления арсенитами.

## ГЛАВА 2

### МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

#### 2.1. Объект исследования и применяемые препараты

Исследования проводились на 976 белых крысах на 337 мышах массой соответственно 180-240 и 18-22 г.

Арсениты вводили подкожно в растворе оливкового масла в дозах 0,2; 0,5 и (0,7) 1,0 LD<sub>50</sub> (LD<sub>50</sub> для люизита и арсенита натрия составляли соответственно 3,8±0,7 и 45,4±2,9 мг/кг).

Унитиол после отравления арсенитами в дозе 1,0 LD<sub>50</sub> вводили внутримышечно по общепринятой схеме: в первые сутки – 15 мг/кг (5% раствор в количестве 0,06 мл на крысу массой 200 г) 3 раза с интервалом 6 ч, во вторые сутки – по 15 мг/кг 2 раза с интервалом 8 ч; в последующие 3 сут - по 15 мг/кг 2 раза в сут. Первую дозу антидота животные получали через 10 мин после введения арсенита. В качестве иммуностимулятора использовали имунофан в дозе 10 мкг/кг, которую вводили внутримышечно ежедневно в течение 3 сут. Доза иммуностимулятора для животных обоснована данными литературы и расчетами по общепринятым методам вычисления [Рыболовлев Ю.Р., 1982]. Первую дозу животные получали через 30 мин после острой интоксикации арсинами.

Кровь для исследования факторов НРО получали из подъязычной вены животных. Лимфоидные органы (органы системы иммунитета – тимус, селезенку, лимфоузлы, клетки костного мозга) извлекали у животных после цервикальной дислокации в различные сроки после интоксикации.

Эксперименты на животных проводили в соответствии с требованиями Женевской конвенции "International Guiding Principles for Biomedical Research Involving Animals" (Geneva, 1990).

#### 2.2. Исследование интегрального состояния неспецифической резистентности организма

Интегральное состояние неспецифической резистентности организма определяли по показателям течения экспериментальной инфекции, вызванной внутрибрюшинным введением мышам суспензии суточной культуры *E. coli* в дозах 1,0; 1,5; 2,0 млрд микробных тел. Выбор данного микроорганизма обусловлен возрастанием роли условнопатогенной флоры в возникновении различных инфекционных осложнений [Бельцкий С. М., Снастина Г. И., 1985; Германчук В.Г., 2000].

Антиинфекционную НРО определяли по летальности мышей в течении 24 ч от экспериментальной инфекции по среднелетальной дозе *E. coli* ( $LD_{50}$ ) и среднеэффективному времени жизни животных ( $Et_{50}$ ) в опытной и контрольной группах, рассчитанных методом пробит-анализа [Беленький М.Л., 1963]. Введение условно-патогенных микроорганизмов производили через 24 ч после применения арсенитов. Аналогичные инфекционные защитные тесты предлагаются в качестве первичной скрининговой модели для оценки иммунотоксичности химических веществ [Забродский П. Ф., 1987, 1994; Mc Grath J., Wong S., 1987].

НРО определяется несколькими факторами защиты организма, к основным из которых относятся бактерицидная активность сыворотки крови (БАСК), системы комплемента и пропердина, сывороточная активность тромбоцитарного катионного белка - ТКБ ( $\beta$ -лизина), лизоцима, интерфероны и фагоцитоз. К факторам НРО относятся также биологические барьеры (кожные и слизистые оболочки), бактерицидные субстанции тканей, гидролитические ферменты, лактопероксидаза, лактоферин [Горизонтов П.Д., 1981а, 1981б; Петров Р.В., 1987; Кузник Б.И. и соавт., 1989; Ледванов М. Ю., Киричук В.Ф., 1996].

### 2.3. Определение интегрального состояния неспецифической и иммунологической резистентности организма



Интегральное состояние неспецифической и иммунологической резистентности организма определяли по показателям течения экспериментальной инфекции, вызванной внутрибрюшинным введением крысам суспензии суточной культуры *P.vulgaris* в дозах 5,0; 7,5; 10,0 млрд микробных тел через 4 сут после имунизации данными микроорганизмами в дозе  $10^6$  микробных тел.

Антиинфекционную иммунологическую резистентность организма определяли по летальности крыс в течении 48 ч от экспериментальной инфекции по среднелетальной дозе *E. Coli* ( $LD_{50}$ ) и среднеэффективному времени жизни животных ( $Et_{50}$ ) в опытной и контрольной группах, рассчитанных методом пробит-анализа [Беленький М.Л., 1963]. Введение *P.vulgaris* проводили через 24 ч после интоксикации арсенитами. В использованном нами тесте исследованные показатели отражают формирование гуморального и клеточного иммунного ответа, а также характеризует состояние неспецифической резистентности организма – НРО (бактерицидную активность сыворотки крови, систему комплемента, сывороточная активность тромбоцитарного катионного белка лизоцима [Каулиньш У. Я., 1982; Бухарин О.В. и соавт., 1974, 1977, 1985, 1998], фагоцитоз, бактерицидные субстанции тканей, гидролитические ферменты и др. [Ройт А., 1991]).

#### 2.4. Бактерицидная активность сыворотки крови

БАСК является интегральным показателем естественной способности крови к самоочищению от микроорганизмов. БАСК зависит от многих неспецифических факторов защиты организма и является одним из параметров, используемых для изучения влияния химических соединений на организм [Шафеев М. Ш., 1976; 1978; Забродский П. Ф., 1987]. Данный показатель является чувствительным тестом для выявления ранних изменений в организме под влиянием токсических веществ [Бухарин О. В. и

соавт., 1985]. Это доказано и более поздними исследованиями [Забродский П. Ф., 1994, 1998, 1999; Германчук В.Г., 2000].

БАСК определили ускоренным фотонепелометрическим методом по О. В. Бухарину и А. П. Луда (1972) [Ремезов А. И., Башмаков Г. А., 1976]. Бактерицидный эффект сыворотки крови крыс определяли по степени нарастания или угнетения оптической плотности микробно - сывороточной взвеси в опыте и контроле. В качестве микроорганизмов использовалась *E. Coli*. В опытную пробирку с 2,5 мл стерильного бульона Кульбака добавляли 0,5 мл исследуемой нативной сыворотки и 0.1 мл суточной культуры кишечной палочки. В контрольной пробирке вместо сыворотки крови использовался изотонический раствор (0,85%) натрия хлорида (0,5 мл).

Расчет БАСК проводили по формуле:

$$\text{БАСК, \%} = \frac{(D_2 - D_1) \times 100}{D_{K2} - D_{K1}}, \text{ где}$$

$D_1$  - оптическая плотность опытной пробы до инкубации;

$D_2$  - оптическая плотность опытной пробы через 3 ч после инкубации.

$D_{K1}$  - оптическая плотность контрольной пробы до инкубации;

$D_{K2}$  - оптическая плотность контрольной пробы через 3 ч после инкубации.

Определение оптической плотности проводили на фотоэлектроколориметре (ФЭК).

## 2.5. Сывороточная активность лизоцима

Лизоцим (мурамидаза) - один из важных факторов неспецифической защиты организма. Он был открыт в 1909 г. П.К.Лашенковым и изучен в

1922 г. А.Флемингом. Это термостабильный кристаллический белок типа муколитического энзима молекулярной массой от 10000 до 25000 Д. Содержится во многих секретах, жидкостях и тканях [Диксон М., Уэбб Э., 1982]. Ферментативная специфичность лизоцима заключается в разрушении связи между N-ацетилмураминовой кислотой и N-ацетилглюкозамином в мукополисахариде, образующем оболочку многочисленных микроорганизмов, особенно грамположительных. Образующиеся гликопептиды обладают адьювантной активностью, стимулируют продукцию антител, повышают митотическую активность иммуноцитов, индуцируют гиперчувствительность замедленного типа. Источником лизоцима являются нейтрофильные гранулоциты и моноциты [Бухарин О.В., Васильев Н.В., 1974, 1977; Гембицкий Е.В. и соавт., 1987]. Некоторые иммунологические реакции связаны с активностью лизоцима. Так, комплекс "IgA-антиген" проявляет антибактериальную и нейтрализующую активность после активации комплементом только в присутствии мурамидазы [Nouragargh S., Holt J.R.S., 1986 ].

Содержание сывороточного лизоцима определяли у крыс методом О. В. Бухарина (1971) [Ремезов П.И., Башмаков Г.А., 1976], основанным на способности лизоцима растворять индикаторный микрококк (*Micrococcus lysodeicticus*), измеряя при этом оптическую плотность опытной и контрольной суспензии микроорганизмов. Взвесь суточной агаровой культуры микрококка на 1/15 М фосфатном буфере (рН 6,2) стандартизировали по левому барабану ФЭК до оптической плотности 0,66. В опытную пробирку вносили 0,4 мл фосфатного буфера, 0,1 мл исследуемой сыворотки и 2 мл стандартной взвеси микрококка, Смесь выдерживали при 37° С 30 мин, после чего измеряли ее оптическую плотность на ФЭК по правому барабану в кювете №2 с зеленым светофильтром. Для количественной характеристики лизоцима в исследуемой сыворотке с использованием кристаллического лизоцима строили калибровочную кривую, исходя из активности фермента 2, 4, 6, 8, 10, 20, 40, 50 мкг в пробе. Во все

пробирки с различным содержанием лизоцима вносили с интервалом 30 с по 2 мл стандартизованной суспензии микрококка. Смесь инкубировали при 37° С 30 мин и в каждой пробирке, начиная с первой, измеряли оптическую плотность. Каждое последующее измерение выполняли через 30 с после предыдущего. С помощью калибровочной кривой находили количества лизоцима в исследуемой сыворотке, выраженное в абсолютных единицах. Для удобства расчетов зависимость между оптической плотностью микробной взвеси в опыте и контроле, а также содержанием лизоцима в исследуемой сыворотке использовали таблицу [Ремезов П. И., Башмаков Г. А., 1976].

## 2.6. Фагоцитарная активность нейтрофилов

Фагоцитоз относится к клеточному фактору НРО. Процесс фагоцитоза осуществляется микрофагами (гранулоцитами) и макрофагами (моноцитами крови, клетками пульпы селезенки, эндотелия кровеносных сосудов, полибластами, гистиоцитами и др.) [Solberg С. О., 1984; Ройт А. и соавт., 2000]. Функция макрофагов включает не только фагоцитоз, но и представление переработанного (модифицированного) в лизосомах антигена Т-лимфоцитам. Взаимодействие макрофагов, реэкспрессирующих в модифицированном виде антиген на клеточной мембране, Т- и В-клеток обеспечивает синтез антител на тимусзависимые антигены. Макрофаги секретируют лизоцим, компоненты комплемента (С1, С2, С3, С4, С5, С6, фактор В), интерферон, эстеразы и пр. [Забродский П.Ф., 1998; Luster M.J. et al., 1987]. Кислородзависимые антиинфекционные системы фагоцита оценивают чаще всего в НСТ-тесте (тест восстановления нитросинего тетразолия) [Гембицкий Е.В. и соавт., 1987; Park В.Н., 1971], а кислороднезависимые микробоцидные системы фагоцита - в лизосомально-катионном тесте [Elsbach P., Weise J., 1985].

Использованный нами метод оценки фагоцитарной активности нейтрофилов основан на восстановлении поглощенного фагоцитом

растворимого красителя нитросинего тетразолия (НСТ) в нерасстворимый диформаза под влиянием супероксиданиона, образующегося в НАДФ-Н-оксидазной реакции. НСТ-тест, как уже указывалось, интегрально характеризует кислородзависимые антиинфекционные системы фагоцита [Маянский Д. Н., 1983, 1986]. В исследованиях применялся цитохимический вариант этого метода [Измайлова Ф.А., 1985; Park В.Н., 1971; Segal A. W., 1974]. Учет результатов проводился путем подсчета в каждом мазке 100 нейтрофилов крыс, среди которых определялся процент клеток, содержащих отложения диформаза (НСТ - позитивные нейтрофилы). Далее рассчитывался индекс активности нейтрофилов (ИАН) по формуле:

$$\text{ИАН} = \frac{A \times 0 + B \times 1 + C \times 2 + D \times 3}{100}, \text{ где}$$

А - количество клеток, не содержащих диформазиновых отложений или содержащий их в виде пылевидных немногочисленных включений;

В - количество клеток, в которых площадь отложений диформаза не превышает 1/3 площади ядра;

С - количество клеток, в которых названные отложения занимают от 1/3 до всей величины площади ядра;

Д - количество клеток с диформазиновыми отложениями, по площади превосходящими площадь ядра.

## 2.7. Лимфоидные индексы тимуса и селезенки

Массы тимуса, селезенки определяли гравиметрическим методом. Лимфоидный индекс (ЛИ) вычислялся общепринятым способом [Гольдберг

Е. Д. и соавт., 1972; Тихонов В. Н., 1981, Германчук В.Г., 2000; Беликов В.Г., 2001] путем деления массы органа в мг на массу тела в г. Данные показатели являются косвенными критериями оценки состояния иммунной системы и могут отражать ее функциональное состояние в целом [Александров В.Н., 1983].

ЛИ тимуса и селезенки крыс определяли при дозах арсенитов, составляющих дозы 0,2; 0,5 и 1,0 ЛД<sub>50</sub>, через 2, 4, 6 сут после отравления.

## 2.8. Содержание Т-лимфоцитов в тимусе и лимфоцитов в селезенке, лимфатических узлах, костном мозге и циркулирующей крови

Содержание Т-клеток в тимусе крыс определяли общепринятым методом подсчета ядросодержащих клеток в органе, учитывая то обстоятельство, что лимфоциты в вилочковой железе представлены практически только Т-популяцией [Петров Р. В., 1987; Ройт А., 1991; Хаитов Р. М. и соавт., 2000]. Лимфоциты в селезенке, лимфатических узлах (для изучения брали паховые лимфоузлы) и костном мозге (исследовали клетки костного мозга бедренной кости) подсчитывали, исходя из их относительного содержания в мазках данного органа, окрашенных по Романовскому-Гимзе. Для определения содержания в лимфоидных органах лимфоцитов готовили клеточные суспензии из тимуса, селезенки, костного мозга и паховых лимфоузлов крыс через различное время после отравления арсенитами. Определение числа Т-лимфоцитов в тимусе и селезенке крыс проводили при дозах арсенитов, составляющих 0,2; 0,5 и 1,0 ЛД<sub>50</sub> через 2, 4 и 8 сут после интоксикации. Оценку количества лимфоцитов в крови, костном мозге и лимфоузлах исследовали через 2 сут после отравления арсенитами общепринятыми методами [Гембицкий Е.В. и соавт., 1987].

## 2.9. Содержание колониеобразующих единиц в селезенке

В течение длительного времени в качестве стволовых кроветворных клеток (СКК) рассматривали клетки, дающие колонии в селезенке облученных мышей – КОЕс. Однако в последние годы такое предположение было экспериментально опровергнуто. Примитивные СКК (П-СКК) в культуре созревают до стадии КОЕс за 4-6 нед. Несмотря на то, что ни КОЕс и ни одна из категорий клеток, способных к колониеобразованию в культуре, не относятся к классу П-СКК [Чертков И.Л. и соавт., 1990], тем не менее, согласно теории клональной саксессии (последовательная смена кроветворных клонов в результате последовательного созревания одной за другой СКК) число КОЕс, мигрировавших из КМ в селезенку, отражает функциональное состояние клона кроветворных клеток и, следовательно, функцию СКК, продуцирующей этот клон. Кроме того, по числу КОЕс можно судить и о функции лимфоидных стволовых клеток, обеспечивающих иммунопоз [Петров Р.В., Хаитов Р.М., 1981а; 1981б].

В конце прошлого столетия в литературе различные исследователи [Петров Р.В., Хаитов Р.М., 1972; Петров Р.В. и соавт., 1981а; Корнева Е.А., 1990; Забродский П.Ф., 1993; 1998; Забродский П.Ф., Киричук В.Ф. и соавт., 1997; Забродский П.Ф., Германчук В.Г., 2000] описывают содержание КОЕ в селезенке после летального облучения мышей с экранированием S голени, как отражение функции стволовых кроветворных клеток.

Влияние арсенитов на функцию СКК [в более строгой формулировке по И.Л.Черткову (1990) - на функцию КОЕс] проводили путем определения миграции КОЕс из КМ в селезенку методом эндогенного колониеобразования после летального облучения мышей в дозе 8 Гр при экранировании костного мозга задней конечности до уровня 1/2 голени. Через 30 мин после облучения животных им вводили карбофос. Через 8 сут извлекали селезенку, фиксировали ее в растворе Боуэна и подсчитывали число колониеобразующих единиц (КОЕ<sub>с</sub>) [Till J. E., Mc Culloch E. A., 1961; Петров Р.В., Хаитов Р.М., 1972].

## 2.10. Гуморальное звено иммунного ответа

Для оценки гуморальных иммунных реакций в качестве антигенов применяли эритроциты барана (ЭБ) и брюшнотифозный Vi-антиген (Vi-Ag). Использование данных антигенов позволяет рассмотреть влияние арсенитов на Т-зависимый или Т-независимый иммунный ответ в сравнительном аспекте, а также оценить роль Т-хелперов в реализации гуморального звена иммунного ответа [Утешев Б. С., 1984; Descotes J., 1986]. Данный подход широко используется для оценки действия химических соединений на систему иммунитета [Плецитый К. Д., Сухих Г.Т., 1984; 1985; Ройт А, 1991; Забродский П.Ф., Киричук В.Ф., 1998; Забродский П.Ф., Германчук В.Г., 2000].

Гуморальную иммунную реакцию к Т-зависимому и Т-независимому антигенам оценивали через 5 суток по числу АОК в селезенке [Белокрылов Г. А. и соавт., 1980; Jerne N. K., Nordin A. A., 1963] после введения арсенитов с внутрибрюшинной иммунизацией крыс ЭБ в дозе  $2 \cdot 10^8$  клеток в 0,5 мл изотонического раствора хлорида натрия и Vi-Ag в дозе 8 мкг/кг (использованный тест отражал синтез Ig М В-клетками селезенки). АОК, характеризующие продукцию иммуноглобулинов G, определяли в селезенке методом непрямого локального гемолиза в геле [Jerne N. K., Nordin A. A., 1963; Whisler R. L., Stobo J.D., 1976].

Для определения АОК к Vi-антигену последний нагружали на ЭБ при температуре  $37^0$  С в течении 1,5 часов. Конечная концентрация антигена в растворе составляла 20 мкг/мл. С целью освобождения от несвязавшегося с эритроцитами Vi-антигена эритроциты отмывали изотоническим раствором хлорида натрия на менее 8 раз. Введение арсенитов проводили через 30 мин после иммунизации. Кроме того, при исследовании Т-зависимого антителообразования по числу АОК в селезенке арсениты вводили через 3 сут после иммунизации. При этом одновременное введение арсенитов с ЭБ



позволяет оценить индуктивную фазу гуморального иммунного ответа, а через 3 сут – продуктивную [Deskotes J., 1986].

### 2.11. Кооперация Т- и В- лимфоцитов *in vitro*

Кооперация (взаимодействие) Т- и В-клеток характеризует индуктивную фазу гуморального Т-зависимого иммунного ответа. Для получения Т-клеток использовали метод фильтрования селезеночной суспензии через нейлоновую вату (“Нитрон”) [Ширшев С.В., 1998]. Для выделения В-лимфоцитов применяли реакцию комплементзависимого масс-цитоллиза. В качестве цитотоксической сыворотки использовали моноклональные антитела против Thy 1.2 антигенов Т-лимфоцитов мыши (Cedarlane Laboratories Limited; London, Canada) [Marshak-Rothstein A. et al., 1979]. Из суспензии спленоцитов макрофаги удаляли методом негативной селекции, используя их способность прилипать к стеклянной поверхности [Ширшев С.В., 1998]. Жизнеспособность клеток оценивали в тесте с трипановым синим (она составляла 95-98%). Инкубируемая по методу J. K. Thomas, T. Imamura (1986), культура содержала  $10^6$  и  $5 \cdot 10^5$  В- и Т-клеток соответственно,  $10^7$  эритроцитов барана в 0,15 мл среды Хенкса. Т- и В-лимфоциты с целью обеспечения сингенности клеток для каждого опыта получали из суспензии спленоцитов одной мыши. Антителообразующие клетки (АОК) подсчитывали в инкубационных камерах через 4 сут [Thomas J. K., Imamura T., 1986]. Данный тест отражает синтез IgM В-клетками селезенки при участии Т-хелперов типа 1 (Th1-лимфоцитов). Роль Т- и В-лимфоцитов в обеспечении антителопродукции определяли путем сравнения числа АОК после инкубации той или иной популяции лимфоцитов в течение 1 ч с различными концентрациями арсенита ( $10^{-5}$ ,  $10^{-4}$  и  $10^{-3}$  М).

## 2.12. Функция Т-лимфоцитов (по реакции торможения миграции лейкоцитов)

Исследование функции Т-лимфоцитов проводили по реакции торможения миграции лейкоцитов (РТМЛ) периферической крови в присутствии конконавалина А (КонА). РТМЛ основана на способности сенсibilизированных Т-лимфоцитов в реакциях с антигеном или митогенами (ФГА, КонА) *in vitro* выделять биологически активные субстанции – лимфокины, в том числе фактор, ингибирующий миграцию лейкоцитов (один из лимфокинов воспаления) [Фримель Х. и Брок Й, 1986].

Для исследования РТМЛ кровь у крыс получали из подъязычной вены через 1, 3, 6, 9 сут после интоксикации. В капилляры для определения С - реактивного белка набирали с часового стекла смесь, состоящую из гепаринизированной крови (0,2 мл) исследуемых крыс (опыт и контроль) и раствора КонА (0,5 мл). Концентрация митогена (КонА) в растворе составляла 100 мкг/мл. Капилляры запаивали с одного конца парафином и центрифугировали 5 мин при 1500 об/мин, затем в вертикальном положении их инкубировали 24 ч в термостате при температуре 37<sup>0</sup> С. Учет реакции проводили путем измерения длины зоны миграции основной массы лейкоцитов от границы эритроцитарного осадка в контроле и опыте [Гембицкий Е.В. и соавт., 1987]. Результат реакции оценивали в виде индекса миграции (ИМ), выраженного в процентах:

$$\text{ИМ} = \frac{\text{Длина зоны миграции с КонА}}{\text{Длина зоны миграции в контроле}} \times 100$$

Величина ИМ обратно пропорциональна функции Т-клеток.

### 2.13. Функция Th1-лимфоцитов (по реакции гиперчувствительности замедленного типа)

Для оценки влияния арсенита на формирование гиперчувствительности замедленного типа (ГЗТ) использовали модель данной реакции, в которой не используется перенос сингенных иммуноцитов. ГЗТ оценивали у белых крыс после иммунизации внутривенным введением  $2 \cdot 10^8$  эритроцитов барана (ЭБ) в 0,5 мл изотонического раствора хлорида натрия одновременно с арсенитами. Разрешающую (вызывающую реакцию) дозу ЭБ ( $5 \cdot 10^8$  в 0,05 мл изотонического раствора хлорида натрия) вводили под апоневроз задней лапы через 4 сут после иммунизации. Оценку реакции осуществляли через 24 часа по приросту массы стопы задней лапы крыс по сравнению с контрольной [Забродский П.Ф., 1993, 1998; Забродский П.Ф., Киричук В.Ф., 1998; Германчук В.Г., 2000]. Данный тест отражал функцию Th1 лимфоцитов и способность их к продукции ИЛ-1, ИЛ-3,  $\gamma$ -интерферона,  $\beta$ -фактора некроза опухоли - лимфотоксина и гранулоцитарно-макрофагального колониестимулирующего фактора (ГМ-КСФ) [Georgiev V.St., Albright J.E., 1993; Kimber I., 1996].

### 2.14. Антителозависимая клеточная цитотоксичность

Антителозависимую клеточную цитотоксичность (АЗКЦ), характеризующую функцию К-клеток (клеток-киллеров, относящихся к так называемым «нулевым» лимфоцитам [Фримель Х. и Брок Й., 1986] определяли по методу Ю. И. Зимины, В. Ф. Ляхова (1985), через 5 сут после иммунизации, осуществляемой через 30 мин после отравления арсенитами. В настоящее время доказано, что К-клетки (клетки-киллеры) - это ЕКК, использующие для усиления реакции антитела [Ройт А., 1991; Хаитов Р. М. и соавт., 2000]. При этом антитела (IgG) привлекают своим Fc-хвостом ЕКК,

имеющие для этого соответствующий FcγRIII. Возникает комплекс клетка-мишень – антитело – ЕКК, в котором ЕКК реализует свою киллерную функцию в отношении клетки-мишени [Хаитов Р. М. и соавт., 2000].

Крыс иммунизировали ЭБ ( $5 \cdot 10^8$  клеток в 0,5 мл изотонического раствора хлорида натрия), арсениты вводили одновременно с иммунизацией. Через 5 сут извлекали селезенку и тимус, готовили клеточные суспензии в растворе Хенкса, который затем фильтровали через капроновую сетку. Суспензии клеток дважды отмывали изотоническим раствором хлорида натрия по 10 мин при 400 g. Жизнеспособность клеток определяли методом суправитальной окраски 0,1 % раствором трипанового синего. В качестве клеток-мишеней использовали трижды отмытые по 10 мин при 400 g ЭБ, которые в 2,5 % суспензии смешивали с равным объемом гипериммунной антисыворотки кролика в субагглютинирующем разведении (1:5000). Смесь инкубировали 30 минут при 37°C, а затем отмывали 3 раза раствором Хенкса и доводили до необходимой концентрации. Используемую антисыворотку предварительно инактивировали в течении 30 минут при 56°C. Спленоциты (timoциты) смешивали с ЭБ в соотношении 20 : 1 (абсолютные значения соответственно  $20 \cdot 10^6$  и  $1 \cdot 10^6$ ) в 2 мл раствора Хенкса без фенолового красного и инкубировали 4 ч при 37°C. После инкубации смесь клеток центрифугировали 20 минут при 200 g, собирали супернатант. Цитопатогенность клеток-киллеров оценивали спектрофотометрическим методом по выходу гемоглобина из лизированных эритроцитов. Контролем служили пробы, содержащие эффекторы и интактные ЭБ. Измерения оптической плотности проводили при длине волны 412 нм на спектрофотометре СФ-46. Уровень АЗКЦ оценивали по индексу цитотоксичности (ИЦ) по формуле:

$$\text{ИЦ} = \frac{E_0 - E_k}{E_{\max}} \times 100, \text{ где}$$

$E_0$  - оптическая плотность проб, содержащих эффекторные клетки и сенсibilизированные клетки мишени;

$E_k$  - оптическая плотность супернатантов проб, содержащих эффекторные клетки и интактные эритроциты;

$E_{\max}$  - оптическая плотность при максимальном гемолизе соответствующего числа эритроцитов (гемолиз проводили дистиллированной водой).

## 2.15. Активность естественных клеток-киллеров

К ЕКК, открытым в 1976 году, относятся клетки, не имеющие антигенных маркеров Т- и В-лимфоцитов (так называемые, О-клетки). Предполагают, что ЕКК происходят из предшественников Т-лимфоцитов [Ройт А., 1991]. Поверхность ЕКК имеет маркерные молекулы CD16, CD56, CD57 и CD94 (преимущественно ЕКК представлены клетками с маркерами CD16 и CD56) [Хаитов Р.М. и соавт., 2000]. При контакте с клетками опухоли и клетками, пораженными вирусами или паразитами, ксеногенными клетками ЕКК способны уничтожать их. ЕКК не обладают способностью к фагоцитозу [Петров Р.В., 1987; Ройт А. и соавт, 2000].

Цитолиз клетки-мишени осуществляется проникновением ферментов из гранул ЕКК в цитоплазму клетки-мишени (порообразование перфорином). [Хаитов Р. М. и соавт., 2000; Nogueira N., 1984]. Кроме того, ЕКК способны обеспечивать уничтожение чужеродной клетки путем реализации "дыхательного взрыва" (поражение активными радикалами кислорода, гидроксильного радикала и т.п.), а также индукцией апоптоза. Активность ЕКК повышается интерферонами, интерлейкинами (ИЛ-4, ИЛ-10, ИЛ-12, ИЛ-13) [Хаитов Р. М. и соавт., 2000; Kimber I., More M., 1985; Marx J.L., 1986].

Оценка естественной цитотоксичности осуществлялась спектрофотометрическим методом [Гордиенко С. М., 1983, 1984], где

клетками-эффекторами служили спленоциты крыс, а клетками-мишенями - эритроциты кур (ЭК) [Белокрылов Г. А. и соавт., 1980]. Очищенную взвесь лимфоцитов получали, удаляя прилипающие клетки инкубацией в колонках с нейлоновой ватой. Эффекторные клетки взвешивали в концентрации  $10^7$  клеток в 1 мл питательной среды следующего состава: среда № 199 с добавлением до 10% истощенной ЭК эмбриональной телячьей сыворотки, L-глутамина (300 мкг/мл), стрептомицина (100 мкг/мл) и пенициллина (100 Ед/мл). В ходе опыта обеспечивали соотношение эффектор - мишень 10:1, Ед/мл). В ходе опыта обеспечивали соотношение эффектор - мишень 10:1, при этом концентрация клеток-мишеней (ЭК) составляла  $10^6$  в 1 мл питательной среды. Цитотоксический тест ставили в пластиковых камерах «Linbro» (76-013-05) с круглым дном. Результаты реакции учитывали по спектрофотометрическому определению концентрации гемоглобина, выделившегося из неразрушенных ЭК. В опытные лунки добавляли по 0,1 мл взвеси эффекторных клеток и по 0,1 мл взвеси ЭК. Проводили 3 контроля: эффекторные клетки в питательной среде без ЭК; питательная среда; взвесь ЭК в питательной среде без эффекторов. В конце инкубации содержимое лунок осторожно ресуспендировали и камеры центрифугировали 5 мин при 100g. 0,2 мл надосадка переносили в другие свободные ряды микропластины, а к осадку приливали 0,2 мл 0,25% раствора додецилсульфата натрия (ДСН) для лизиса ЭК, оставшихся неразрушенными в ходе цитотоксической реакции. Оптическую плотность осадков измеряли в специально изготовленных микрокуветах с длиной оптического пути 1 см и объемом 0,1 мл на СФ-46 при длине волны 413 нм. Определяли количество гемоглобина, выделившегося из неразрушенных ЕК ЭК, путем лизиса осадка 0,25% ДСН. Индекс цитотоксичности (ИЦ) определяли по формуле:

$$\text{ИЦ} = \frac{E_k - E_o}{E_k} \times 100, \text{ где}$$

$E_k$  - оптическая плотность лизированного осадка ЭК контрольной пробы без эффекторов против лизирующего раствора;

$E_o$  - оптическая плотность лизированных оставшихся в осадке опытной пробы неразрушенных ЭК против лизированного осадка эффекторных клеток без ЭК;

Функцию ЕКК оценивали через 1, 3, 6 и 9 сут после интоксикации арсенитами в различных дозах.

Естественную цитотоксичность *in vitro* определяли спектрофотометрически описанным методом после инкубации клеток-эффекторов, получаемых из спленоцитов мышей, в течение 4 ч в среде 199 с содержанием МС в концентрациях  $10^{-6}$ ,  $10^{-5}$ ,  $10^{-4}$  М. В ходе опыта обеспечивали соотношение эффектор - мишень 10:1. Результаты реакции учитывали по спектрофотометрическому определению концентрации гемоглобина, выделившегося из неразрушенных ЭК.

## 2.16. Активность ацетилхолинэстеразы, неспецифических эстераз Т-лимфоцитов и перекисного окисления липидов

Неспецифические эстеразы, как и кислые фосфатазы, являются лизосомальными ферментами. Эти энзимы играют важную роль в реализации киллерной функции Т-лимфоцитов [Ледванов М. Ю., Киричук В. Ф., 1996; Ferluga J. et al., 1972; Li C. Y. et al., 1973]. Изменение эстеразной активности в клетках отражает, с одной стороны, функциональную активность иммуноцитов, с другой - может служить количественным критерием Т-клеток в циркулирующей крови [Хейхоу Ф. Г. Дж., Кваглино Д., 1983].

Активность б-нафтил-AS-ацетатэстеразы и б-нафтил-бутиратэстеразы спленоцитов крысы (Т-клеток органа) изучали гистохимическим методом [Хейхоу Ф. Г. Дж., Кваглино Д., 1983]. Принцип метода основан на том, что эстеразы, вступая во взаимодействие с субстратом в присутствии красителя прочного синего, окрашивают эстерапозитивные клетки.

Активность ацетилхолинэстеразы (АХЭ) в Т-лимфоцитах крысы определяли методом G.M. Ellman et al. (1961), выделяя клетки путем фильтрования селезеночной суспензии через нейлоновую вату (“Нитрон”) [Ширшев С.В., 1998]. 1,5 мл суспензии, содержащей  $5 \cdot 10^8$  клеток в 1 мл 0,1 молярного фосфатного буфера (pH=8,0), добавляли 20 мкл 0,075 моль ацетилхолин-иодида и 50 мкл 0,01 моль дитио-бис-нитробензойной кислоты. После 20 мин инкубации при  $25^{\circ}\text{C}$  реакция останавливалась добавлением 100 мкл 1,5-дифтор-2,4-динитробензола и регистрировали увеличение оптической плотности спектрофотометрически (420 нм) [Szelenyi J.G. et al., 1982]. За единицу активности АХЭ принимали мкмоль ацетилхолина, гидролизованного за 1 мин в мл суспензии, содержащей  $10^9$  Т-лимфоцитов [Kutty K. M. et al., 1976]. Активность эстераз определяли через 3 сут после отравления арсенитами.

Влияние арсенитов на перекисное окисление липидов оценивали по активности каталазы и пероксидазы титрометрическим методом [Покровский А.А., 1969], содержанию малонового диальдегида в крови фотометрически на колориметре КФК-2 ( $\lambda$  -540 нм) в сантиметровой кювете против бутанола [Коробейникова Э.Н., 1989] через 3 сут после отравления.

## 2.17. Статистическая обработка результатов исследований

Полученные данные обрабатывались с использованием общепринятых статистических методов [Генес В.С. , 1964; Сепетлиев Д. Н., 1968; Урбах В. Ю., 1975; Гублер Е. В., 1978; Лапин Г. Ф., 1980]. При этом различия между средними значениями в опытной и контрольной группах считались значимыми при  $p < 0,05$ . Расчеты среднелетальных доз карбофоса проводили по методу Миллера и Тейтнера [Беленький М. А., 1963].

В исследованиях использовались параметрические методы исследования с оценкой достоверности различий по t-критерию Стьюдента. Вычислялись коэффициенты корреляции между показателями иммунного статуса и



перекисного окисления липидов, а также их средние ошибки [Урбах В.Ю., 1975].

Статистический анализ экспериментальных данных с небольшим числом животных в сериях и при отсутствии нормального распределения показателей осуществлялся с помощью непараметрических методов (Вилконсона-Манна-Уитни,  $\chi^2$ ). Расчеты проводились на персональном компьютере с использованием пакета программ Statgraphics.

## ГЛАВА 3

ВЛИЯНИЕ АРСЕНИТОВ НА ПОКАЗАТЕЛИ АНТИИНФЕКЦИОННОЙ  
НЕСПЕЦИФИЧЕСКОЙ И ИММУНОЛОГИЧЕСКОЙ РЕЗИСТЕНТНОСТИ  
ОРГАНИЗМА3.1. Изменение интегральной антиинфекционной неспецифической  
резистентности организма

В экспериментах на беспородных мышах при введении арсенитов в дозе 0,2, 0,5 и 0,7 LD<sub>50</sub>, исследовалось состояние антиинфекционной неспецифической резистентности организма (НРО). В период исследования выживаемости мышей (24 ч) она определяется преимущественно факторами НРО, так как иммунные реакции (за исключением функции естественных клеток-киллеров - ЕКК) реализуются не ранее, чем через 2-3 сут после введения антигена (инфицирования) [Ройт А. и соавт., 2000].

В результате проведенных нами опытов было установлено (табл.3.1), что острое отравление мышьяксодержащими соединениями (МС) приводило к дозозависимому увеличению летальности мышей от экспериментальной инфекции. При этом вполне закономерно уменьшались ЛД<sub>50</sub> *E. coli* и среднеэффективное время жизни животных – Et<sub>50</sub>. Так, при дозах люизита, составляющих 0,2; 0,5 и 0,7 LD<sub>50</sub>, по сравнению с контролем, при котором летальность составляла 52,2±5,8%, этот показатель увеличивался соответственно на 14,5 (p>0,05); 22,8 и 28,8% (p<0,05), а при воздействии арсенита натрия в тех же дозах – соответственно на 8,9 (p>0,05); 20,0 и 24,2% (p<0,05). При действии люизита в дозах 0,2; 0,5 и 0,7 LD<sub>50</sub> ЛД<sub>50</sub> *E. coli* уменьшалась соответственно в 1,39 (p>0,05); 1,50 и 1,62 раза (p<0,05), а Et<sub>50</sub> – соответственно в 1,30 (p>0,05); 1,44 и 1,89 раза (p<0,05). Острое отравление арсенитом натрия приводило при дозах 0,2; 0,5 и 0,7 LD<sub>50</sub> к снижению ЛД<sub>50</sub> *E. coli* соответственно в 1,29 (p>0,05); 1,51 и 1,57 раза (p<0,05), а Et<sub>50</sub> – соответственно в 1,34 (p>0,05); 1,42 и 1,62 раза (p<0,05).

Таблица 3.1

Влияние острого отравления арсенитами на летальность от экспериментального перитонита (*E. coli*), ЛД<sub>50</sub> *E. coli* и Et<sub>50</sub> у мышей (M±m)

Вещества	Доза, ЛД <sub>50</sub>	Летальность, %	ЛД <sub>50</sub> <i>E. coli</i> , 10 <sup>9</sup> микр. тел	Et <sub>50</sub>
Контроль	0	52,2±5,8 (72)	1,86±0,14 (72)	17,0±1,1 (72)
Люизит	0,2	66,7±9,6 (24)	1,34±0,24 (24)	13,1±2,1 (24)
	0,5	75,0±9,7** (20)	1,24±0,20* (20)	11,8±1,9 * (20)
	0,7	81,0±8,2* (23)	1,15±0,25 * (23)	9,0±1,5* (23)
	0,7□	4,3±4,0 (23)	-	-
Арсенит натрия	0,2	61,1±11,5 (18)	1,44±0,26 (18)	12,7±2,2 (18)
	0,5	72,2±10,5** (18)	1,23±0,19* (18)	12,0±1,7 * (18)
	0,7	76,4±10,3** (17)	1,18±0,27* (17)	10,5±1,6* (17)

Примечание: в скобках - число животных в серии; \*, \*\* - различие с контролем достоверно  $p < 0,05$  ( \*\* -  $\chi^2$ ); □ - применение МС без введения *E. coli*.

Полученные данные (табл.3.1) свидетельствуют о том, что через 24 ч после введения мышам люизита в дозе 0,7 LD<sub>50</sub> без моделирования экспериментального перитонита погибало 4,3±4,0% мышей (1 животное из серии). Этот уровень летальности практически не влияет на выявленные нами изменения данного показателя у животных от экспериментальной инфекции после острого отравления люизитом и арсенитом натрия.

Таким образом, после острой интоксикации люизитом и арсенитом натрия происходит дозозависимое увеличение летальности животных от экспериментального перитонита, вызванного *E. coli*, а также уменьшение ЛД<sub>50</sub> *E. coli* и среднеэффективного времени жизни животных, что свидетельствует о снижении неспецифической резистентности организма под влиянием мышьяксодержащих соединений. Отмечается тенденция к более

выраженному действию люизита по сравнению с арсенитом натрия в эквивалентных дозах.

### 3.2. Оценка интегральной антиинфекционной неспецифической и иммунологической резистентности организма при экспериментальном перитоните после острой интоксикации

При изучении влияния острого действия мышьяксодержащих соединений на антиинфекционную неспецифическую и иммунологическую резистентность (НИРО) организма люизит и арсенит натрия вводили одновременно с иммунизацией крыс, а через 4 сут моделировали экспериментальную инфекцию. В результате проведенных экспериментов было установлено (табл. 3.2), что МС в дозах 0,2; 0,5 и 0,7 LD<sub>50</sub> приводят к дозозависимому увеличению летальности крыс от экспериментального перитонита. Так, при дозах люизита, составляющих 0,2; 0,5 и 0,7 LD<sub>50</sub>, по сравнению с контролем, при котором летальность составляла 20,0±7,3%, этот показатель увеличивался соответственно на 8,0 (p>0,05); 10,0 и 27,6% (p<0,05), а при воздействии арсенита натрия в тех же дозах – соответственно на 4,0; 7,8 (p>0,05) и 22,1% (p<0,05).

Таблица 3.2

Влияние острого отравления арсенитами на летальность от экспериментального перитонита (*P.vulgaris*), ЛД<sub>50</sub> *P.vulgaris* и Et<sub>50</sub> у крыс после иммунизации (М±m)

Вещества	Доза, ЛД <sub>50</sub>	Летальность, %	ЛД <sub>50</sub> <i>P.vulgaris</i> , 10 <sup>9</sup> микр. Тел	Et <sub>50</sub>
Контроль	0	20,0±7,3 (30)	9,3±1,1 (20)	38,7±4,5 (20)
Люизит	0,2	28,0±9,0 (25)	7,4±1,2 (25)	31,5±3,0 (25)
	0,5	30,0±10,2** (20)	6,1±1,0* (20)	25,7±2,7*(20)
	0,7	47,6±10,9* (21)	5,5±0,8* (21)	20,1±2,2*(21)
	0,7□	4,5±4,4 (22)	-	-
	0,2	24,0±8,5 (25)	8,0±1,4 (25)	33,5±3,1 (25)

Арсенит натрия	0,5	27,8±10,6 (18)	6,4±1,2 (18)	29,7±2,9 (18)
	0,7	42,1±11,3* (19)	6,0±0,9* (19)	25,1±2,6* (19)

Примечание: в скобках - число животных в серии; \*, \*\* - различие с контролем достоверно  $p < 0,05$  ( \*\* -  $\chi^2$ ); □ - применение МС без введения *P.vulgaris*.

Увеличение летальности животных от экспериментальной инфекции сопряжено с уменьшением ЛД<sub>50</sub> *P.vulgaris* и Et<sub>50</sub>. Так, при действии люизита в дозах 0,2; 0,5 и 0,7 LD<sub>50</sub> ЛД<sub>50</sub> *P.vulgaris* уменьшалась соответственно в 1,26 ( $p > 0,05$ ); 1,52 и 1,69 раза ( $p < 0,05$ ), а Et<sub>50</sub> – соответственно в 1,23 ( $p > 0,05$ ); 1,50 и 1,93 раза ( $p < 0,05$ ). Острое отравление арсенитом натрия приводило при дозах 0,2; 0,5 и 0,7 LD<sub>50</sub> к снижению ЛД<sub>50</sub> *P.vulgaris* соответственно в 1,16; 1,45 ( $p > 0,05$ ) и 1,55 раза ( $p < 0,05$ ), а Et<sub>50</sub> – соответственно в 1,16; 1,30 ( $p > 0,05$ ) и 1,54 раза ( $p < 0,05$ ). Данные табл.3.2 свидетельствуют, что через 40 ч после введения крысам люизита в дозе 0,7 LD<sub>50</sub> без моделирования экспериментальной инфекции погибало 4,5±4,4% животных (1 крысы из серии). Этот уровень летальности практически не влияет на выявленные нами изменения выживаемости животных от экспериментальной инфекции после острого отравления МС.

Таким образом, после острого отравления люизитом и арсенитом натрия происходит дозозависимое увеличение летальности животных от экспериментального перитонита после предварительной иммунизации, дозозависимое уменьшение ЛД<sub>50</sub> *P.vulgaris* и среднеэффективного времени жизни животных, что свидетельствует о снижении под влиянием МС неспецифической и иммунологической резистентности организма. Эффект люизита в эквилетальных дозах более выражен, однако статистически не значим.

### 3.3. Изменение бактерицидной активности сыворотки крови

БАСК зависит от многих неспецифических факторов защиты организма и является одним из параметров, используемых для изучения влияния химических соединений на организм [Шафеев М. Ш., 1976; 1978; Забродский П.Ф., 1987; Германчук В.Г., 2000]. Данный показатель является чувствительным тестом для выявления ранних изменений в организме под влиянием токсических веществ [Бухарин О. В. и соавт., 1985]. Это доказано и более поздними исследованиями [Забродский П. Ф., 1998; Забродский П. Ф. и соавт., 2002].

Оценка изменения БАСК, проводившаяся у беспородных крыс под влиянием острой интоксикации арсенитами в дозах в дозах 0,2; 0,5 и 1,0 LD<sub>50</sub> (табл. 3.2), свидетельствует, что люизит и арсенит натрия приводят к дозозависимому снижению БАСК через 1-6 сут после отравления ( $p < 0,05$ ). Через 9 сут существенных отличий показателя от контрольного уровня не отмечалось, хотя при дозах люизита, составляющих 0,5 и 1,0 LD<sub>50</sub> зарегистрирован более низкий показатель ( $p > 0,05$ ) по сравнению с контролем. Так, при действии люизита в дозах 0,2; 0,5 и 1,0 LD<sub>50</sub> БАСК через 1 сут снижался соответственно в 1,18; 1,31 и 1,58 раза ( $p < 0,05$ ), а через 6 сут – соответственно в 1,15 ( $p > 0,05$ ); 1,22 и 1,30 раза ( $p < 0,05$ ). Под влиянием арсенита натрия редукция показателя в эквивалентных дозах была менее выраженной, чем при действии люизита, однако статистически значимых отличий БАСК не отмечалось.

Таблица 3.3

Изменение бактерицидной активности сыворотки крови крыс после острого отравления арсенитами, % ( $M \pm m$ ,  $n=16-21$ )

Вещества	ЛД <sub>50</sub>	Срок наблюдения, сут		
		1	6	9
Контроль	0	85,4 $\pm$ 3,8		
Люизит	0,2	72,4 $\pm$ 4,5*	74,1 $\pm$ 4,3	81,4 $\pm$ 4,0
	0,5	65,0 $\pm$ 4,4*	70,0 $\pm$ 4,6*	80,1 $\pm$ 4,6
	1,0	54,1 $\pm$ 5,2*	65,9 $\pm$ 5,1*	76,0 $\pm$ 4,7
Арсенит натрия	0,2	75,3 $\pm$ 4,2	75,0 $\pm$ 4,5	83,0 $\pm$ 3,9
	0,5	67,3 $\pm$ 4,8*	72,1 $\pm$ 4,9*	78,9 $\pm$ 4,7
	1,0	58,3 $\pm$ 5,5*	66,0 $\pm$ 5,4*	81,2 $\pm$ 4,8

Примечание: \* -  $p < 0,05$  по сравнению с контролем.

Редукция БАСК определяется активностью гуморальных и клеточных факторов НРО: сывороточной активностью лизоцима, тромбоцитарного катионного белка (ТКБ), комплемента и других факторов. При остром отравлении МС снижение БАСК может быть обусловлено супрессией данных параметров вследствие нарушения их синтеза, взаимодействием с МС, приводящим к уменьшению или потере их активности, а также снижением секреции их из клеток крови. В настоящее время доказано, что БАСК может определяться пептидными антибиотиками, синтезируемыми организмом животных и человека. Эти антибиотики, действующие на *E. Coli*, *Salmonella typhimurium*, *Streptococcus pyogenes* и другие микроорганизмы, открыты и изучены в начале 90-х годов последнего столетия [Voman H.G., 1995]. Не исключено, что МС могут инактивировать их.

Таким образом, под влиянием острого отравления арсенитами в дозах 0,2; 0,5 и 1,0 LD<sub>50</sub> происходит дозозависимое снижение БАСК в течение 6-9 сут. Через 9 сут показатель снижался по сравнению с контролем незначительно ( $p > 0,05$ ). Действие люизита в эквивалентных дозах незначительно превышает эффект арсенита натрия.

#### 3.4. Влияние арсенитов на сывороточную активность лизоцима

Ферментативная специфичность лизоцима заключается в разрушении связи между N-ацетилмураминовой кислотой и N-ацетилглюкозамином в мукополисахариде, образующем оболочку многочисленных микроорганизмов, особенно грамположительных [].

Нами в экспериментах на белых крысах было показано (табл. 3.4), что острая интоксикация мышьяксодержащими соединениями в дозах 0,2; 0,5 и 1,0 LD<sub>50</sub> дозозависимо снижает активность показателя через 1-6 сут. Через 9 сут существенных отличий показателя от контрольного уровня не

отмечалось, однако при дозах люизита, составляющих 0,2; 0,5 и 1,0 LD<sub>50</sub>, зарегистрирована более низкая активность параметра по сравнению с контролем ( $p > 0,05$ ). Так, при действии люизита в дозах 0,2; 0,5 и 1,0 LD<sub>50</sub> сывороточная активность лизоцима через 1 сут снижалась соответственно в 1,18; 1,31 и 1,58 раза ( $p < 0,05$ ), а через 6 сут – соответственно в 1,15 ( $p > 0,05$ ); 1,22 и 1,30 раза ( $p < 0,05$ ). Под влиянием арсенита натрия редукция показателя в эквивалентных дозах была менее выраженной, чем при действии люизита, однако статистически значимых отличий активности лизоцима сыворотки крови крыс не выявлено.

Таблица 3.4

Изменение активности лизоцима сыворотки крови крыс после острого отравления арсенитами, мг/л ( $M \pm m$ ,  $n=16-21$ )

Вещества	ЛД <sub>50</sub>	Срок наблюдения, сут		
		1	6	9
Контроль	0	8,9 $\pm$ 1,5		
Люизит	0,2	5,8 $\pm$ 1,2	6,5 $\pm$ 1,4	7,8 $\pm$ 1,7
	0,5	4,0 $\pm$ 1,1*	4,8 $\pm$ 1,0*	6,8 $\pm$ 1,4
	1,0	3,3 $\pm$ 0,6*	4,5 $\pm$ 1,2*	6,1 $\pm$ 1,3
Арсенит натрия	0,2	6,2 $\pm$ 1,4	7,5 $\pm$ 1,5	8,1 $\pm$ 1,8
	0,5	4,5 $\pm$ 1,3*	5,0 $\pm$ 1,1*	7,2 $\pm$ 1,5
	1,0	3,9 $\pm$ 0,8*	4,6 $\pm$ 1,3*	6,9 $\pm$ 1,6

Примечание: \* -  $p < 0,05$  по сравнению с контролем.

Редукция сывороточной активности лизоцима может быть связана с нарушением функции пируватоксидазной системы нейтрофилов вследствие ингибирования моно- и дитиоловых энзимов, в частности, сульфгидрильных групп липоевой кислоты [Страйер Л., 1985; Куценко С.А. и соавт., 2004], а также с инактивацией б-нафтил-AS-D-хлорацетатэстеразы нейтрофилов [Хейхоу Ф. Г. Дж., Кваглино Д., 1983]. Редукция синтеза лизоцима, вероятно, может происходить также вследствие воздействия арсенитов на ДНК, что приводит к нарушению нуклеинового обмена [Голиков С.Н. и соавт., 1986].

Таким образом, под влиянием арсенитов в дозах 0,2; 0,5 и 1,0 LD<sub>50</sub> происходит дозозависимое снижение активности лизоцима до 9 сут.



Существенное снижение активности показателя отмечается под влиянием мышьяксодержащих соединений в дозах 0,5 и 1,0 LD<sub>50</sub> через 6 сут после острого отравления. Эффект арсенита натрия в эквивалентных дозах менее выражен по сравнению с действием люизита ( $p > 0,05$ ).

### 3.5. Действие острой интоксикации арсенитами на фагоцитарную активность нейтрофилов

Процесс фагоцитоза осуществляется макрофагами (гранулоцитами) и макрофагами (моноцитами крови, клетками пульпы селезенки, эндотелия кровеносных сосудов, полибластами, гистиоцитами и др.) и представляет собой сложный многоступенчатый процесс [Хаитов Р.Я., Пинегин Б.В., 1995; Хаитов Р.Я. и соавт., 2000; Ройт А. и соавт., 2000]. Помимо действия ферментов уничтожение чужеродной клетки может осуществляться путем "дыхательного" (кислородного) взрыва [Nogueira N., 1984]. В настоящее время получены данные, свидетельствующие о том, что в фагоцитарной реакции активное участие принимает радикал оксида азота (NO), макрофаги продуцируют ИЛ-1, ИЛ-6, ИЛ-8, ИЛ-12 и TNF- $\beta$  ( $\beta$ -фактор некроза опухоли), простагландины, лейкотриен B<sub>4</sub> (LTB<sub>4</sub>), фактор, активирующий тромбоциты. Нейтрофилы синтезируют и выделяют в кровь TNF- $\beta$  и ИЛ-12, а также хемокин ИЛ-8 [Хаитов Р. М. и соавт., 2000].

В экспериментах на крысах нами установлено (табл. 3.5), что под влиянием арсенитов в дозах 0,2; 0,5 и 1,0 LD<sub>50</sub> происходит дозозависимое снижение активности фагоцитарно-метаболической активности нейтрофилов через 1-6 сут. Через 9 сут сохранялось незначительное снижение активности нейтрофилов при максимальной дозе МС, однако, данная редукция существенно не отличалась от контрольного уровня ( $p > 0,05$ ). Так, при действии люизита в дозах 0,2; 0,5 и 1,0 LD<sub>50</sub> фагоцитарно-метаболическая активность нейтрофилов через 1 сут снижалась соответственно в 1,28; 1,48 и 1,85 раза ( $p < 0,05$ ), а через 6 сут – соответственно в 1,19 ( $p > 0,05$ ); 1,32 и 1,61 раза ( $p < 0,05$ ). Под влиянием люизита редукция показателя в эквивалентных

дозах была более выраженной, чем при действии арсенита натрия, однако статистически достоверных отличий фагоцитарно-метаболической активности нейтрофилов крыс не выявлено.

Таблица 3.5.

Изменение фагоцитарно-метаболической активности нейтрофилов крыс после острого отравления арсенитами, индекс активности нейтрофилов [M±m, n=16-21]

Вещества	ЛД <sub>50</sub>	Срок наблюдения, сут		
		1	6	9
Контроль	0	0,37±0,02		
Люизит	0,2	0,29±0,02*	0,31±0,03	0,35±0,04
	0,5	0,25±0,02*	0,28±0,03*	0,33±0,03
	1,0	0,20±0,02*	0,23±0,02*	0,30±0,03
Арсенит натрия	0,2	0,30±0,02	0,33±0,03	0,34±0,03
	0,5	0,27±0,03*	0,28±0,02*	0,35±0,02
	1,0	0,23±0,03*	0,25±0,02*	0,32±0,03

Примечание: \* -  $p < 0,05$  по сравнению с контролем.

Снижение фагоцитарно-метаболической активности нейтрофилов крыс, видимо, обусловлено блокированием моно- и дитиоловых ферментов пируватоксидазной системы клетки [Саватеев Н.В., 1978; Страйер Л., 1985; Забродский П.Ф., 1998], а также б-нафтил-AS-D-хлорацетатэстеразы нейтрофилов [Хейхоу Ф. Г. Дж., Кваглино Д., 1983]. Кроме того, редукция данного показателя обусловлена реализацией общих механизмов токсичности – инициированием процессов перекисного окисления липидов мембран нейтрофилов, нарушением процессов тканевого дыхания и его сопряжения с окислительным фосфорилированием, мембранотоксическим эффектом [Голиков С.Н. и соавт., 1986].]. Установлено, что оксид азота, принимающий участие в реализации повреждения мембраны чужеродной клетки фагоцитом, способен вступать во взаимодействие с сульфгидрильными группами с образованием нестабильных нитрозотиолов, период полусуществования которых в организме составляет до 5 сут [Куценко С.А. и соавт., 2004].

Взаимодействие SH-групп с МС (трехвалентным мышьяком) нарушает обмен NO, что вероятно, может приводить к различным нарушениям иммунных механизмов, требующих участия оксида азота. Следует отметить, что данный механизм в настоящее время совершенно не изучен.

Выявленное снижение показателей НРО при острой интоксикации МС обусловлено ингибированием моно- и дитиоловых ферментов (в частности, дегидролипоевой кислоты пируватоксидазной системы), моноаминоксидазы, аланинаминотрансферазы, аспартатаминотрансферазы, снижением функции кофермента А, нарушением цикла трикарбоновых кислот, блокированием ДНК-полимеразы, снижением образования АТФ из АДФ (разобщением окисления и фосфорилирования) [Ершов Ю.А., Плетнева П.В., 1989; Забродский П.Ф., 1998].

Таким образом, под влиянием арсенитов в дозах 0,2; 0,5 и 1,0 LD<sub>50</sub> происходит дозозависимое снижение фагоцитарно-метаболической активности нейтрофилов до 6 сут. Тенденция к снижению показателя отмечается при дозе мышьяксодержащих соединений 1,0 LD<sub>50</sub> через 9 сут. Действие люизита в эквилетальных дозах несущественно превышает эффект арсениита натрия.

### **Выводы по главе**

1. После острой интоксикации люизитом и арсенитом натрия происходит дозозависимое увеличение летальности животных от экспериментального перитонита, вызванного *E. coli*, а также уменьшение ЛД<sub>50</sub> *E. coli* и среднеэффективного времени жизни животных, что свидетельствует о снижении неспецифической резистентности организма под влиянием мышьяксодержащих соединений. Отмечается тенденция к более выраженному действию люизита по сравнению с арсенатом натрия в эквилетальных дозах.

2. Острое отравления люизитом и арсенитом натрия вызывает

дозозависимое увеличение летальности животных от экспериментального перитонита после предварительной иммунизации, дозозависимое уменьшение ЛД<sub>50</sub> *P.vulgaris* и среднеэффективного времени жизни животных, что свидетельствует о снижении под влиянием МС неспецифической и иммунологической резистентности организма. Эффект люизита в эквивалентных дозах более выражен, однако статистически не значим.

3. Влияние острого отравления арсенитами в дозах 0,2; 0,5 и 1,0 LD<sub>50</sub> обуславливает дозозависимое снижение БАСК в течение 6-9 сут. Через 9 сут показатель снижается по сравнению с контролем незначительно ( $p>0,05$ ). Действие люизита в эквивалентных дозах незначительно превышало эффект арсениита натрия.

4. Под влиянием арсенитов в дозах 0,2; 0,5 и 1,0 LD<sub>50</sub> происходит дозозависимое снижение активности лизоцима до 9 сут. Существенное снижение активности показателя отмечается под влиянием мышьяксодержащих соединений в дозах 0,5 и 1,0 LD<sub>50</sub> через 6 сут после острого отравления. Эффект арсениита натрия в эквивалентных дозах менее выражен по сравнению с действием люизита ( $p>0,05$ ).

5. Мышьяксодержащие соединения – люизит и арсенит натрия – в дозах 0,2; 0,5 и 1,0 LD<sub>50</sub> вызывают дозозависимое снижение фагоцитарно-метаболической активности нейтрофилов до 6 сут. Тенденция к снижению показателя отмечается при дозе мышьяксодержащих соединений 1,0 LD<sub>50</sub> через 9 сут. Действие люизита в эквивалентных дозах незначительно превышает эффект арсениита натрия.

## ГЛАВА 4

ДЕЙСТВИЕ АРСЕНИТОВ НА СОДЕРЖАНИЕ ЛИМФОЦИТОВ В  
ОРГАНАХ СИСТЕМЫ ИММУНИТЕТА

## 4.1. Изменение лимфоидных индексов тимуса и селезенки

Лимфоидные индексы (ЛИ) тимуса и селезенки отражают содержание лимфоцитов в данных органах [Александров В.Н. , 1983; Descotes J. ,1986 Van Loveren.H., 1990]. Исследование влияния острой интоксикации мышьяксодержащих соединений (МС) на лимфоидные индексы (ЛИ) тимуса и селезенки беспородных белых крыс проводилось через 2, 4, 6 сут после отравления. В период 1-4 сут при острых воздействиях ядов на животных, как правило, происходит снижение ЛИ тимуса и селезенки и последующее восстановление их массы к 6–7 сут [Забродский П.Ф., 1998; Descotes J. ,1986].

Нами установлено (табл. 4.1), что при действии МС через 2-4 сут происходило прямо связанное с дозой снижение ЛИ тимуса, статистически значимое ( $p < 0,05$ ) при дозах токсикантов, составляющих 0,5 и 1,0 ЛД<sub>50</sub>. Так, ЛИ тимуса под влиянием люизита при дозах 0,2; 0,5 и 1,0 ЛД<sub>50</sub> через 2 сут уменьшался соответственно в 1,22; 1,36 и 1,47 раза, а через 4 сут - соответственно в 1,13; 1,32 и 1,37 раза. Аналогично снижался ЛИ под влиянием арсенита натрия. Существенных различий в редукции ЛИ после острого отравления люизитом и арсенитом натрия выявлено не было. Через 6 сут показатель после острого действия МС достоверно не отличался от контрольного уровня, однако, оставался более сниженным.

Проведенные нами эксперименты показали (табл. 4.2), что арсениты снижают ЛИ селезенки через 2-4 сут после острого воздействия. В целом характер изменений был аналогичен сдвигам значений ЛИ тимуса. Так, ЛИ селезенки под влиянием люизита при дозах 0,2; 0,5 и 1,0 ЛД<sub>50</sub> через 2 сут

уменьшался соответственно в 1,29 ( $p>0,05$ ); 1,35 и 1,58 раза ( $p<0,05$ ), а через 4 сут - соответственно в 1,26 ( $p>0,05$ ); 1,30 и 1,38 раза ( $p<0,05$ ).

Таблица 4.1

Влияние острого отравления арсенитами на изменение лимфоидного индекса (усл. ед.) тимуса крыс ( $M\pm m$ ,  $n=6-7$ )

Вещества	ЛД <sub>50</sub>	Срок наблюдения, сут		
		2	4	6
Контроль	0	2,65 $\pm$ 0,21		
Люизит	0,2	2,17 $\pm$ 0,19	2,23 $\pm$ 0,23	2,43 $\pm$ 0,18
	0,5	1,95 $\pm$ 0,21*	2,01 $\pm$ 0,20*	2,38 $\pm$ 0,20
	1,0	1,80 $\pm$ 0,24*	1,94 $\pm$ 0,18*	2,25 $\pm$ 0,23
Арсенит натрия	0,2	2,19 $\pm$ 0,20	2,21 $\pm$ 0,21	2,47 $\pm$ 0,19
	0,5	2,00 $\pm$ 0,22*	2,04 $\pm$ 0,19*	2,41 $\pm$ 0,22
	1,0	1,94 $\pm$ 0,18*	1,98 $\pm$ 0,20*	2,29 $\pm$ 0,25

Примечание: \* -  $p<0,05$  по сравнению с контролем.

Таблица 4.2

Влияние острого отравления арсенитами на изменение лимфоидного индекса (усл. ед.) селезенки крыс ( $M\pm m$ ,  $n=6-7$ )

Вещества	ЛД <sub>50</sub>	Срок наблюдения, сут		
		2	4	6
Контроль	0	4,43 $\pm$ 0,31		
Люизит	0,2	3,43 $\pm$ 0,32	3,50 $\pm$ 0,38	4,34 $\pm$ 0,39
	0,5	3,29 $\pm$ 0,30*	3,41 $\pm$ 0,37*	3,89 $\pm$ 0,40
	1,0	2,80 $\pm$ 0,37*	3,20 $\pm$ 0,31*	3,78 $\pm$ 0,32
Арсенит натрия	0,2	3,49 $\pm$ 0,34	3,57 $\pm$ 0,30	3,97 $\pm$ 0,36
	0,5	3,32 $\pm$ 0,32*	3,45 $\pm$ 0,34*	4,00 $\pm$ 0,37
	1,0	3,19 $\pm$ 0,36*	3,28 $\pm$ 0,35*	4,05 $\pm$ 0,33

Примечание: \* -  $p<0,05$  по сравнению с контролем.

Зарегистрированные изменения носят как неспецифический, так и специфический характер. Неспецифические изменения, вероятно, обусловлены кратковременной активацией гипоталамо-гипофизарно-надпочечниковой системы (стресс-реакция) с последующей реализацией апоптоза Т- и В-клеток [Durant S., 1986], а специфические связаны с нарушением функции пируватоксидазной системы лимфоцитов [Страйер Л., 1985; Забродский П.Ф.,

1998]. Аналогичные сдвиги были обнаружены при тяжелой механической травме [Александров В.Н., 1983] не исключают действие кортикостероидов и катехоламинов, вызывающих уменьшение массы селезенки вследствие выхода из нее лимфоцитов в циркулирующую кровь [Горизонтов П.Д., 1981a].

Таким образом, под влиянием острой интоксикации арсенитами происходит дозозависимое уменьшение лимфоидного индекса тимуса и селезенки (в диапазоне доз 0,2 – 1,0 ЛД<sub>50</sub>) в течение 4 сут с последующим увеличением этих показателей к 6 суткам.

#### 4.2. Изменение числа лимфоцитов в тимусе и селезенке под влиянием арсенитов

Оценка числа Т-лимфоцитов в тимусе показала (табл. 4.3), что в прямой зависимости от дозы арсенитов происходит снижение количества клеток в органе.

Таблица 4.3

Влияние острого отравления арсенитами  
на изменение числа Т-лимфоцитов в тимусе крыс,  $10^8$  ( $M \pm m$ ,  $n=6-7$ )

Вещества	ЛД <sub>50</sub>	Срок наблюдения, сут		
		2	4	8
Контроль	0	12,3 $\pm$ 1,1		
Люизит	0,2	9,5 $\pm$ 0,8	10,5 $\pm$ 1,2	12,0 $\pm$ 1,3
	0,5	7,8 $\pm$ 1,0*	8,7 $\pm$ 1,1*	13,9 $\pm$ 1,5
	1,0	5,5 $\pm$ 0,9*	7,9 $\pm$ 0,9*	11,7 $\pm$ 1,2
Арсенит натрия	0,2	11,0 $\pm$ 1,2	12,9 $\pm$ 1,3	13,7 $\pm$ 1,4
	0,5	8,8 $\pm$ 0,9*	9,9 $\pm$ 0,7*	10,0 $\pm$ 1,3
	1,0	7,0 $\pm$ 1,1*	8,5 $\pm$ 1,0*	12,8 $\pm$ 1,1

Примечание: \* -  $p < 0,05$  по сравнению с контролем.

Данный показатель при дозах люизита, составляющих 0,2; 0,5 и 1,0 ЛД<sub>50</sub>, уменьшался через 2 сут соответственно в 1,29 ( $p > 0,05$ ); 1,58 и 2,24 раза

( $p < 0,05$ ), а через 4 сут - в 1,17 ( $p > 0,05$ ); 1,41 и 1,56 раза ( $p < 0,05$ ) соответственно. Изменение числа Т-лимфоцитов в тимусе при действии арсенита натрия носило такой же характер, как и действие люизита. Следует отметить, что арсенит натрия вызывал незначимую менее выраженную редукцию показателя по сравнению с действием люизита. На 8 сут после острого отравления МС происходило восстановление параметра до контрольного уровня.

Под влиянием острого отравления МС характер изменения числа лимфоцитов в селезенке был такой же, как и в тимусе (табл.4.4.). Так, при дозах люизита, составляющих 0,2; 0,5 и 1,0 ЛД<sub>50</sub>, он уменьшался через 2 сут соответственно в 1,32 ( $p > 0,05$ ); 1,86 и 2,01 раза ( $p < 0,05$ ), а через 4 сут - в 1,25 ( $p > 0,05$ ); 1,64 и 1,81 раза ( $p < 0,05$ ) соответственно. Изменение числа Т-лимфоцитов в селезенке при действии арсенита натрия существенно не отличалось от редукции показателя под влиянием люизита, хотя и было менее выражено. На 8 сут после острого отравления МС происходило восстановление числа лимфоцитов в селезенке до контрольного уровня.

Таблица 4.4

Влияние острого отравления арсенитами  
на изменение числа Т-лимфоцитов в селезенке крыс,  $10^8$  ( $M \pm m$ ,  $n=6-7$ )

Вещества	ЛД <sub>50</sub>	Срок наблюдения, сут		
		2	4	8
Контроль	0	14,3 $\pm$ 1,7		
Люизит	0,2	10,8 $\pm$ 1,2	11,4 $\pm$ 1,3	16,2 $\pm$ 1,4
	0,5	7,7 $\pm$ 1,0*	8,7 $\pm$ 1,1*	15,7 $\pm$ 1,6
	1,0	7,1 $\pm$ 1,6*	7,9 $\pm$ 0,9*	13,5 $\pm$ 1,5
Арсенит натрия	0,2	12,0 $\pm$ 1,1	12,9 $\pm$ 1,3	16,7 $\pm$ 1,3
	0,5	9,0 $\pm$ 0,8*	9,9 $\pm$ 0,7*	12,3 $\pm$ 1,7
	1,0	7,8 $\pm$ 1,2*	8,5 $\pm$ 1,0*	13,0 $\pm$ 1,8

Примечание: \* -  $p < 0,05$  по сравнению с контролем.

Данные литературы дают основания полагать, что уменьшение числа лимфоцитов в селезенке обусловлено снижением в органе количества как Т-,



так и В-лимфоцитов [Забродский П.Ф., 1998, 2002]. Вероятно, уменьшение клеток в органе наряду с неспецифическими механизмами, обусловлено ингибированием моно- и дитиоловых ферментов пируватоксидазной системы лимфоцитов [Ленинджер А., 1974; Страйер Л., 1985]. Не исключено, что МС включают механизмы апоптоза лимфоцитов.

Таким образом, под влиянием острой интоксикации арсенитами (0,2; 0,5 и 1,0 LD<sub>50</sub>) происходит дозозависимое уменьшение числа лимфоцитов в тимусе и селезенке в течение 2-4 сут с последующим восстановлением этих показателей к 8 суткам.

#### 4.3. Влияние арсенитов на содержание лимфоцитов в органах системы иммунитета и циркулирующей крови

Нами экспериментально установлено (табл. 4.5), что под влиянием МС в дозах 0,2; 0,5 и 1,0 ЛД<sub>50</sub> через 2 сут происходит дозозависимое уменьшение содержания лимфоцитов в костном мозге и лимфоузлах.

Таблица 4.5

Влияние острого отравления арсенитов на число лимфоцитов в органах системы иммунитета у крыс через 2 сут, 10<sup>6</sup> (M±m, n=7-12)

Вещества	Доза, ЛД <sub>50</sub>	Органы системы иммунитета		
		Костный мозг	Лимфоузлы	Кровь, 10 <sup>9</sup> /л
Контроль	0	40,65±2,53	14,0±1,6	9,2±0,3*
Люизит	0,2	36,70±3,10	12,3±1,2	8,4±0,4
	0,5	32,53±2,78*	9,4±1,1*	7,1±0,4*
	1,0	30,02±3,21*	7,9±1,4*	6,8±0,2*
Арсенит натрия	0,2	37,05±3,14	13,4±1,5	8,0±0,4*
	0,5	32,94±2,65*	9,6±1,3*	7,8±0,4*
	1,0	32,00±3,04*	8,8±1,2*	7,2±0,3*

Примечание: \* - p<0,05 по сравнению с контролем.

Так, острое отравление люизитом в дозах 0,2; 0,5 и 1,0 ЛД<sub>50</sub> приводило к уменьшению содержания лимфоцитов в костном мозге соответственно в 1,11 (p>0,05); 1,25 и 1,35 (p<0,05) раза, а арсенитом натрия

- в 1,10 ( $p>0,05$ ); 1,23 и 1,27 ( $p<0,05$ ) раза соответственно. Острое отравление люизитом вызывало снижение содержания лимфоцитов в лимфоузлах соответственно в 1,14 ( $p>0,05$ ); 1,48 и 1,44 ( $p<0,05$ ) раза, а арсенитом натрия - в 1,04 ( $p>0,05$ ); 1,46 и 1,55 ( $p<0,05$ ) раза соответственно. При дозах, составляющих 0,5 и 1,0 ЛД<sub>50</sub>, эффект люизита был более выражен, чем острое действие арсенита натрия. Аналогично изменялось содержание лимфоцитов в циркулирующей крови. Необходимо отметить, что снижение лимфоцитов в крови сопровождалось нейтрофилезом. Так, число нейтрофилов в крови через 2 сут в контроле составляло  $2,6 \pm 0,3 \cdot 10^9/\text{л}$  ( $n=12$ ), а при действии люизита и арсенита натрия в среднелетальной дозе – соответственно  $3,8 \pm 0,4 \cdot 10^9/\text{л}$  и  $3,7 \pm 0,3 \cdot 10^9/\text{л}$  ( $n=11$ ) [ $p<0,05$ ].

Снижение лимфоцитов в крови и органах системы иммунитета можно объяснить поражением лимфоидной стволовой кроветворной клетки, а также зрелых лимфоцитов реализацией следующих механизмов: нарушением тканевого дыхания, окислительного фосфорилирования, а также эффектом разобщения этих процессов, повреждением мембран клеток и целообъясняется, замещением фосфора мышьяком в ДНК полипотентной стволовой кроветворной клетки (ПСКК) [Давыдова В.И., 1989] (и прежде всего, лимфоидной стволовой кроветворной клетки), инактивацией тиоловых ферментов лимфоцитов и эстерах Т-клеток [Страйер Л., 1985; Забродский П.Ф., 1998, 2002]. Не исключена инициация процессов апоптоза лимфоцитов [Ройт А. и соавт. 2000].

Таким образом, под влиянием острой интоксикации мышьяксодержащими соединениями в дозах 0,2; 0,5 и 1,0 LD<sub>50</sub> через 2 сут происходит дозозависимое уменьшение числа лимфоцитов в органах системы иммунитета и циркулирующей крови. В эквилетальных дозах действие люизита по сравнению с арсенитом натрия более выражено ( $p>0,05$ ).

#### 4.4. Изучение нарушения миграции колониеобразующих единиц в селезенку

До последнего времени в литературе содержание колониеобразующих единиц в селезенке (КОЕс) после летального облучения мышей с экранированием S голени описывают, как отражение функции стволовых кроветворных клеток, в частности, их способность к миграции [Петров Р.В., Хаитов Р.М., 1972; Петров Р.В. и соавт., 1981; Корнева Е.А., 1990; Забродский П.Ф., Киричук В.Ф. и соавт., 1997; Забродский П.Ф., 1993; 1998; 2000].

Проведенные нами исследования показали (табл. 4.6), что острая интоксикация люизитом в дозах 0,2; 0,5 и 1,0 LD<sub>50</sub> вызывает дозозависимое снижение числа КОЕс через 8 сут соответственно в 1,54 ( $p > 0,05$ ); 1,66 и 2,11 раза ( $p < 0,05$ ). Арсенит натрия в дозах 0,2; 0,5 и 1,0 LD<sub>50</sub> вызывал редукцию миграции КОЕс или их гибели (гибели СКК) в 1,23 ( $p > 0,05$ ); 1,54 ( $p > 0,05$ ) и 1,89 раза ( $p < 0,05$ ) соответственно.

Таблица 4.6

Влияние острого отравления арсенитами на число колониеобразующих единиц в селезенке мышей через 8 сут после интоксикации ( $M \pm m$ ,  $n=7-10$ )

Вещества	ЛД <sub>50</sub>	КОЕс
Контроль	0	10,8 $\pm$ 2,2
Люизит	0,2	7,0 $\pm$ 2,0
	0,5	6,5 $\pm$ 1,5**
	1,0	5,1 $\pm$ 1,4*
Арсенит натрия	0,2	8,4 $\pm$ 2,1
	0,5	7,0 $\pm$ 1,3**
	1,0	5,7 $\pm$ 1,5*

Примечание: \*, \*\* - различие с контролем достоверно -  $p < 0,05$ , (\*; \*\* - для расчета достоверности различий использовали соответственно  $t$  –критерий Стьюдента и непараметрический критерий U Вилкоксона-Манна- Уитни).

Снижение содержания КОЕ в селезенке после острой интоксикации МС обусловлено, возможно, гибелью СКК, КОЕс, апоптозом лимфоцитов, снижением миграции КОЕс вследствие инактивации их эстераз, нарушением пируватокислородной системы СКК (КОЕс) [Ленинджер А.. 1974; Диксон М., Уэбб Э. . 1982; Страйер Л., 1985; Хаитов Р.М. и соавт., 2000; Забродский

П.Ф., 1998, 2002]. Уменьшение миграции КОЕ из костного мозга в селезенку под влиянием МС может быть обусловлено ингибированием тканевого дыхания и окислительного фосфорилирования в СКК, лимфоидных стволовых клетках, КОЕс, нарушением функции ферментов этих клеток в результате взаимодействия с их сульфгидрильными группами, о чем свидетельствуют результаты, полученные при изучении токсикокинетики и токсикодинамики метаболитов ядовитых спиртов [Iokobsen D. et al., 1984; Gabon P.A. et al., 1986]. Трехвалентный мышьяк влияет на митоз, синтез и распаривание ДНК. Механизм токсического действия на СКК (КОЕс) может быть преимущественно связан с блокированием тиоловых групп ДНК-полимеразы [Ершов Ю.А., Плетнева П.В., 1989].

Таким образом, под влиянием острой интоксикации мышьяксодержащими соединениями в дозах 0,2; 0,5 и 1,0 LD<sub>50</sub> через 8 сут происходит дозозависимое уменьшение числа КОЕс. В эквивалентных дозах действие арсенитом натрия по сравнению с люизитом незначительно ( $p>0,05$ ) более выражено.

### **Выводы по главе**

1. Под влиянием острой интоксикации мышьяксодержащими соединениями люизитом и арсенитом натрия происходит дозозависимое уменьшение лимфоидного индекса тимуса и селезенки (в диапазоне доз 0,2 – 1,0 ЛД<sub>50</sub>) в течение 4 сут с последующим увеличением этих показателей к 6 суткам.
2. Острая интоксикация арсенитами (0,2; 0,5 и 1,0 LD<sub>50</sub>) вызывает дозозависимое уменьшение числа лимфоцитов в тимусе и селезенке в течение 2-4 сут с последующим восстановлением этих показателей к 8 суткам.
3. После острой интоксикации арсенитами в дозах 0,2; 0,5 и 1,0 LD<sub>50</sub> через 2 сут происходит дозозависимое уменьшение числа лимфоцитов в органах системы иммунитета и циркулирующей крови.

4. Острое действие мышьяксодержащими соединениями в дозах 0,2; 0,5 и 1,0 LD<sub>50</sub> через 8 сут приводит к дозозависимому уменьшению числа КОЕс.

5. В эквивалентных дозах действие люизита по сравнению с арсенитом натрия более выражено ( $p > 0,05$ ).

## ГЛАВА 5

## ДЕЙСТВИЕ АРСЕНИТОВ НА ОСНОВНЫЕ ГУМОРАЛЬНЫЕ ИММУННЫЕ РЕАКЦИИ

## 5.1. Влияние арсенитов на Т-зависимый гуморальный иммунный ответ

Известно, что Th1-лимфоциты участвуют в синтезе IgM, G<sub>2</sub> (и формировании ГЗТ), а Th2-лимфоциты способствуют синтезу Ig G<sub>1</sub>, A, E [Pfeifer C. et al., 1991; Georgiev V.St., Albright J.E., 1993]. Используемый тест позволял оценить по числу АОК к ЭБ синтез IgM.

При исследовании содержания антителообразующих клеток (АОК) в селезенке к ЭБ у белых крыс через 5 сут после острой интоксикации МС в дозах 0,2; 0,5 и 1,0 ЛД<sub>50</sub> было установлено (табл. 5.1) дозозависимое снижение показателя, позволяющая полагать, что МС вызывают супрессию синтеза IgM. В индуктивной фазе иммунного ответа, когда иммунизация ЭБ проводилась практически одновременно с введением МС острое отравление люизитом в дозах 0,2; 0,5 и 1,0 ЛД<sub>50</sub> приводило к уменьшению содержания АОК в селезенке к ЭБ у крыс соответственно в 1,42; 1,95 и 2,64 ( $p<0,05$ ) раза, а арсенитом натрия - в 1,24 ( $p>0,05$ ); 1,77 и 2,24 ( $p<0,05$ ) раза соответственно. В продуктивном периоде антителогенеза (введение МС проводили через 3 сут после иммунизации крыс ЭБ) острое отравление люизитом вызывало снижение числа АОК в селезенке к ЭБ соответственно в 1,73 ( $p>0,05$ ); 2,29 и 3,86 ( $p<0,05$ ) раза, а арсенитом натрия - в 1,64; 1,97 и 3,21 ( $p<0,05$ ) раза соответственно.

Объединение показателей при действии люизита и арсенита натрия в различные периоды антителогенеза в две единые совокупности показывает, что острое действие люизита по сравнению с эффектом арсенита натрия на синтез IgM В-клетками селезенки более выражено ( $p<0,05$ ). Так, люизит вызывает в среднем редукцию антителообразования в 3,31 раза, а арсенит натрия – в 2,01 раза.

Таблица 5.1

Влияние острого отравления арсенитами на число антителообразующих клеток к эритроцитам барана ( $10^3$ ), синтезирующих IgM, в селезенке крыс через 5 сут после иммунизации ЭБ (M±m, n=5-7)

Вещества	Доза, ЛД <sub>50</sub>	Время интоксикации после иммунизации, сут	
		0	3
Контроль	0	40,1±3,3	
Люизит	0,2	28,3±3,1*	23,2±3,0*
	0,5	20,6±2,9*	17,5±2,3*
	1,0	15,2±2,7*	10,4±2,0*
Арсенит натрия	0,2	32,5±3,3	24,5±3,1*
	0,5	22,7±2,8*	20,4±2,2*
	1,0	17,9±2,6*	12,5±2,1*

Примечание: \* -  $p < 0,05$  по сравнению с контролем.

Результаты исследований, полученные нами, свидетельствует о снижении под влиянием арсенитов функции Th1-лимфоцитов, индуцирующих синтез IgM [Pfeifer C. et al., 1991] В-клетками селезенки, в большей степени в продуктивной фазе антителогенеза по сравнению с индуктивной. Это может быть вызвано большим поражающим эффектом МС и их метаболитов на синтез IgM В-лимфоцитами (плазмócитами) спленоцитов, нарушением процессов дифференцировки В-клеток, а также их перераспределения лимфоцитов между органами системы иммунитета в период максимальной антителопродукции (3-5 сут после иммунизации). Нельзя исключить и ингибирующее синтез антител действие кортикостероидов [Claman H.N., 1993; Ройт А. и соавт., 2000; Забродский П.Ф., 1993, 1998, 2002], концентрация которых в крови при действии различных токсикантов увеличивается (стресс-реакция) [Селье Г., 1972].

Возможно, под влиянием МС в продуктивной фазе иммуногенеза по сравнению с индуктивным периодом происходит также более выраженная

редукция функции Th1-лимфоцитов, индуцирующих синтез IgM [Pfeifer C. et al., 1991; Ройт А. и соавт., 2000].

Данные литературы свидетельствуют, что цГМФ участвует в пролиферации лимфоцитов, а цАМФ – в их дифференцировке. В продуктивном периоде антителогенеза осуществляется преимущественно дифференцировка В-лимфоцитов под влиянием цАМФ. По-видимому, МС оказывают большее действие на цАМФ, чем на цГМФ, поэтому их супрессивный эффект в продуктивный период больше, чем в индуктивный [Петров Р.В., 1987; Ройт А. и соавт., 2000].

Таким образом, под влиянием острой интоксикации арсенитами в дозах, составляющих 0,2; 0,5 и 1,0 ЛД<sub>50</sub>, происходит дозозависимое снижение Т-зависимого антителообразования, оцениваемого по числу АОК к ЭБ в селезенке через 5 сут после иммунизации, преимущественно в продуктивный период антителопродукции, что свидетельствует о снижении функции Th1-лимфоцитов и В-клеток. В целом, острое действие люизита по сравнению с эффектом арсенита натрия на синтез IgM В-клетками селезенки более выражено ( $p < 0,05$ ).

## 5.2. Действие острого отравления арсенитами на синтез IgG

В наших исследованиях на белых крысах при острой интоксикации арсенитами, при которой введение токсикантов проводилось одновременно с иммунизацией ЭБ установлено (табл. 5.2), что под влиянием люизита и арсенита натрия через 8 сут происходит дозозависимое снижение синтеза IgG, оцениваемого по числу АОК, синтезирующих иммуноглобулины данного класса. Так острое отравление люизитом в дозах 0,2; 0,5 и 1,0 ЛД<sub>50</sub> приводило к уменьшению содержания АОК в селезенке, синтезирующих IgG к ЭБ, у крыс соответственно в 1,33; 1,71 и 1,99 ( $p < 0,05$ ) раза, а арсенитом натрия - в 1,24 ( $p > 0,05$ ); 1,57 и 1,76 ( $p < 0,05$ ) раза соответственно.



Таблица 5.2

Влияние острого отравления мышьяксодержащими соединениями на число антителообразующих клеток, синтезирующим IgG к эритроцитам барана, в селезенке крыс через 8 сут ( $M \pm m$ ,  $n=6-7$ )

Вещества	ЛД <sub>50</sub>	АОК, 10 <sup>3</sup>
Контроль	0	21,2 $\pm$ 2,3
Люизит	0,2	17,0 $\pm$ 2,1
	0,5	14,2 $\pm$ 1,8**
	1,0	10,4 $\pm$ 1,5*
Арсенит натрия	0,2	19,4 $\pm$ 2,2
	0,5	18,5 $\pm$ 1,6**
	1,0	12,6 $\pm$ 1,9*

Примечание: \*, \*\* - различие с контролем достоверно -  $p < 0,05$ , (\*; \*\* - для расчета достоверности различий использовали соответственно  $t$  –критерий Стьюдента и непараметрический критерий U Вилкоксона-Манна- Уитни).

Супрессия синтеза IgG под влиянием арсенитов, вероятно, обусловлены ингибированием моно- и дитиоловых энзимов лимфоцитов, а также эстераз Т-лимфоцитов и макрофагов [Хейхоу Ф.Г.Дж., Кваглино Д., 1983; Забродский П. Ф., 1998] как самими токсикантами, так и их метаболитами. Редукция синтеза IgG может быть обусловлена снижением процессов тканевого дыхания и уменьшением окислительного фосфорилирования (синтеза АТФ) в Т- и В- лимфоцитах [Давыдова В.И., 1989]. Данные литературы позволяют считать, что редукция синтеза IgG под влиянием МС обусловлена их действием на Th2-лимфоциты [Pfeifer C. Et al., 1991; Georgiev V.St., Albright J.E., 1993].

Таким образом, под влиянием острой интоксикации арсенитами в дозах, составляющих 0,2; 0,5 и 1,0 ЛД<sub>50</sub>, происходит дозозависимое уменьшение синтеза IgG плазмочитами селезенки, оцениваемого по числу АОК к ЭБ в селезенке через 8 сут после иммунизации, что свидетельствует о снижении функции Th2-лимфоцитов и В-клеток.

### 5.3. Исследование влияния арсенитов на Т-независимый гуморальный иммунный ответ

При оценке содержания АОК к Vi-Ag в селезенке у белых крыс после острой интоксикации арсенитами через 5 суток было установлено (табл. 5.3), дозозависимое снижение показателя. Редукция числа АОК к Vi-Ag свидетельствует о том, что МС вызывают супрессию синтеза IgM [Ройт А. и соавт., 2000]. В индуктивном периоде гуморальной иммунной реакции (иммунизацию Vi-Ag проводили одновременно с введением арсенитов) острое отравление люизитом в дозах 0,2; 0,5 и 1,0 ЛД<sub>50</sub> приводило к уменьшению содержания АОК в селезенке к Vi-Ag у крыс соответственно в 1,28 ( $p>0,05$ ); 1,48 и 2,01 ( $p<0,05$ ) раза, а арсенитом натрия - в 1,25 ( $p>0,05$ ); 1,30 и 1,81 ( $p<0,05$ ) раза соответственно. В продуктивной фазе антителопродукции (введение МС проводили через 3 сут после иммунизации крыс Vi-Ag) острое отравление люизитом вызывало снижение числа АОК в селезенке к Vi-Ag соответственно в 1,73; 1,99 и 2,74 ( $p<0,05$ ) раза, а арсенитом натрия - в 1,64; 1,82 и 2,48 ( $p<0,05$ ) раза соответственно.

Таблица 5.3

Влияние острого отравления мышьяксодержащими соединениями на число антителообразующих клеток к Vi-Ag ( $10^3$ ), синтезирующих IgM, в селезенке крыс через 5 сут после иммунизации ЭБ (М±m, n=5-7)

Вещества	Доза, ЛД <sub>50</sub>	Время интоксикации после иммунизации, сут	
		0	3
Контроль	0	31,2±3,2	
Люизит	0,2	24,4±2,8	18,0±2,0*
	0,5	21,1±2,7*	15,7±2,1*
	1,0	15,5±2,3*	11,4±1,9*
Арсенит натрия	0,2	25,0±3,0	19,0±1,8*
	0,5	24,0±2,3*	17,1±1,7*
	1,0	17,3±2,2*	12,6±1,6*

Примечание: \* -  $p<0,05$  по сравнению с контролем.

Острое действие люизита по сравнению с эффектом арсенита натрия на синтез IgM В-клетками селезенки более выражено ( $p > 0,05$ ). Так, люизит вызывает в среднем редукцию антителообразования к Vi-Ag в 1,88 раза, а арсенит натрия – в 1,72 раза.

Более выраженная супрессия Т-зависимого антителообразования под влиянием арсенитов, как и большинства токсикантов [Забродский П.Ф., 1998, 2002; Descotes J., 1986] обусловлена, наряду с другими механизмами, действием ксенобиотиков одновременно на макрофаги, В-лимфоциты и Т-клетки (в использованной нами экспериментальной модели на субпопуляцию Th1), участвующие в реализации данной иммунной реакции, в то время как Т-независимый иммунный ответ обеспечивается в основном функцией В-клеток, активируемых антигеном в присутствии ИЛ-1, секретируемом макрофагами [Gillbert K.M. et al., 1985]. Вполне естественно, что иммунотоксическое действие на три элемента, взаимодействующих в процессе антителообразования, проявляется значительно большим его угнетением, чем при поражении одного или двух элементов, если нет оснований предполагать реализации селективного иммуотропного эффекта.

Кроме того, снижение Т-зависимой антителопродукции под МС более выражено, чем Т-независимого антителообразования, так как для него не требуется синтеза ряда лимфокинов, синтезируемых Т-клетками (фактора BSF-1, активирующего В-клетки, росткового фактора В-клеток – BCGF-II, стимулирующего клональную экспансию активированных клеток, фактора дифференцировки В-клеток  $\mu$  (BCDF $\mu$ ), который способствует созреванию клеток с высокой скоростью секреции IgM, BCDF $\gamma$ , вызывающий преключение синтеза с IgM на IgG и высокую скорость его продукции) [Ройт А., 1991; Ройт А. и соавт., 2000].

Таким образом, под влиянием острой интоксикации арсенитами в дозах, составляющих 0,2; 0,5 и 1,0 ЛД<sub>50</sub>, происходит дозозависимое снижение Т-независимой антителопродукции, оцениваемой по числу АОК к Vi-Ag в

селезенке через 5 сут после иммунизации, преимущественно в продуктивный период, что свидетельствует о снижении функции В-лимфоцитов.

#### 5.4. Нарушение кооперации Т- и В-клеток в формировании антителообразования *in vitro*

Оценка кооперации Т- и В-лимфоцитов *in vitro* проводили по образованию АОК к Т-зависимому антигену эритроцитам барана. Роль Т- и В-клеток в обеспечении антителогенеза определяли путем сравнения числа АОК после инкубации той или иной популяции лимфоцитов в течение 1 ч с различными концентрациями МС. Кооперация Т- и В-лимфоцитов определяет Т-зависимую антителопродукцию, поэтому исследование данной реакции следует рассматривать, как определенное звено в реализации гуморального иммунного ответа. Известно, что роль клеток, представляющих антиген Т-лимфоцитам, вместо макрофагов могут выполнять В-клетки [Ройт А. и соавт., 2000; Хаитов Р.М. и соавт., 2000]. Поэтому в модели *in vitro* использовались только Т- и В-лимфоциты. При этом В-лимфоциты выполняли две функции: осуществляли переработку и представление антигена совместно с главным комплексом гистосовместимости класса II [Ройт А., 1991].

В опытах *in vitro* на спленоцитах мышей установлено (табл. 4.4), что люизит в концентрациях  $10^{-5}$ ,  $10^{-4}$  и  $10^{-3}$  М уменьшает функцию В-клеток в кооперации с Т-лимфоцитами соответственно в 1,59; 2,01 и 3,35 раза ( $p < 0,05$ ), а функцию Т-клеток - в 2,56, 2,94 и 3,98 ( $p < 0,05$ ) раза соответственно. Аналогичный, но достоверно менее выраженный эффект ( $p < 0,05$ ) оказывает арсенит натрия. Так, арсенит натрия в концентрациях  $10^{-5}$ ,  $10^{-4}$  и  $10^{-3}$  М уменьшает функцию В-клеток в кооперации с Т-лимфоцитами соответственно в 1,18 ( $p > 0,05$ ); 1,52 и 2,43 раза ( $p < 0,05$ ), а функцию Т-клеток - в 1,83, 2,11 и 4,02 ( $p < 0,05$ ) раза соответственно. МС в большей степени снижают функцию Т-лимфоцитов ( $p < 0,05$ ) при концентрациях, составляющих  $10^{-5}$ ,  $10^{-4}$  и  $10^{-3}$  М.

Таблица 5.4

Нарушение кооперации Т- и В-лимфоцитов под влиянием люизита и арсенита натрия *in vitro* (по формированию АОК иммунocyтaми мышей на  $10^6$  В-клеток) [ $M \pm m$ ,  $n=5-7$ ]

Клет- ки	К	Концентрация МС, М					
		$10^{-5}$		$10^{-4}$		$10^{-3}$	
		Л	АН	Л	АН	Л	АН
В	$52 \pm 6$		-	-		-	
В+Т	$338 \pm 30$		-	-		-	
$V^0+T$		$212 \pm 21^a$	$286 \pm 27^c$	$168 \pm 16^a$	$223 \pm 19^{ac}$	$101 \pm 10^a$	$139 \pm 14^{ac}$
$V+T^0$		$132 \pm 15^{ab}$	$185 \pm 17^{cb}$	$115 \pm 10^{ab}$	$160 \pm 17^{acb}$	$65 \pm 7^{ab}$	$84 \pm 8^{acb}$

Примечание: К – контроль; Л, АН – люизит, арсенит натрия соответственно;  $V^0$ ,  $T^0$  - в течение 1 ч до добавления ЭБ клетки инкубировали с МС, <sup>a</sup> -  $p < 0,05$  по сравнению с контролем (В+Т); <sup>b</sup> -  $p < 0,05$  по сравнению с  $V^0+T$ ; <sup>c</sup> -  $p < 0,05$  по сравнению с Л.

Таким образом, под влиянием люизита и арсенита натрия *in vitro* существенно нарушается кооперация Т- и В-лимфоцитов. Мышьяксодержащие соединения в прямой зависимости от концентрации ( $10^{-5}$ ,  $10^{-4}$  и  $10^{-3}$  М) снижают кооперацию лимфоцитов, поражая преимущественно Т-клетки. Действие люизита на кооперацию лимфоцитов по сравнению с арсенитом натрия более выражено ( $p < 0,05$ ).

### Выводы по главе

1. Под влиянием острой интоксикации арсенитами в дозах, составляющих 0,2; 0,5 и 1,0 ЛД<sub>50</sub>, происходит дозозависимое снижение Т-зависимого антителообразования, оцениваемого по числу АОК к ЭБ в селезенке через 5 сут после иммунизации, преимущественно в продуктивный период антителопродукции, что свидетельствует о снижении функции Th1-лимфоцитов и В-клеток.

2. Острая интоксикация мышьяксодержащими соединениями в дозах, составляющих 0,2; 0,5 и 1,0 ЛД<sub>50</sub>, вызывает дозозависимое увеличение

синтеза IgG плазмочитами селезенки, оцениваемого по числу АОК к ЭБ в селезенке через 8 сут после иммунизации, что свидетельствует о снижении функции Th2-лимфоцитов и В-лимфоцитов.

3. После острой интоксикации арсенитами в дозах, составляющих 0,2; 0,5 и 1,0 ЛД<sub>50</sub>, происходит дозозависимое снижение Т-независимой антителопродукции, оцениваемой по числу АОК к Vi-Ag в селезенке через 5 сут после иммунизации, преимущественно в продуктивный период иммуногенеза, что обусловлено супрессией функции В-лимфоцитов.

4. Под влиянием люизита и арсенита натрия *in vitro* существенно нарушается кооперация Т- и В-лимфоцитов. Мышьясодержащие соединения в прямой зависимости от концентрации ( $10^{-5}$ ,  $10^{-4}$  и  $10^{-3}$  М) снижают кооперацию лимфоцитов, поражая преимущественно Т-клетки. Действие люизита на кооперацию лимфоцитов по сравнению с арсенитом натрия более выражено ( $p < 0,05$ ).

## ГЛАВА 6

ОЦЕНКА ВОЗДЕЙСТВИЯ АРСЕНИТОВ НА ОСНОВНЫЕ КЛЕТОЧНЫЕ  
ИММУННЫЕ РЕАКЦИИ

## 6.1. Исследование функции Т-лимфоцитов под влиянием арсенитов

Исследование функции Т-лимфоцитов проводили по реакции торморжения миграции лейкоцитов (РТМЛ) периферической крови крыс в присутствии КонА через 1, 3, 6, 9 сут после интоксикации арсенитами. РТМЛ основана на способности сенсibilизированных Т-лимфоцитов в реакциях с антигеном или митогенами (ФГА, КонА) *in vitro* выделять биологически активные субстанции – лимфокины, в том числе фактор, ингибирующий миграцию лейкоцитов (один из лимфокинов воспаления) [Фримель Х. и Брок Й, 1986].

Нами установлено (табл. 6.1), что при оценке функции Т-лимфоцитов по РТМЛ у крыс через 1–6 сут после острой интоксикации МС (0,2; 0,5 и 0,8 ЛД<sub>50</sub>) дозозависимо увеличивают миграцию лейкоцитов (снижает функцию Т-клеток). Так, острое отравление люизитом в дозах 0,2;

Таблица 6.1

Влияние острого отравления арсенитами на функцию Т-клеток у крыс, оцениваемую по РТМЛ, % (M±m, n=9-15)

Вещества	Доза, ЛД <sub>50</sub>	Время исследования, сут			
		1	3	6	9
Контроль	0	53,1± 5,0			
Люизит	0,2	68,9± 5,5*	65,8± 4,0*	62,9± 5,0	53,6± 6,2
	0,5	74,5± 5,4*	70,1± 4,8*	68,3± 5,6	60,4± 7,1
	1,0	89,0± 5,2*	80,7± 5,1*	75,2± 5,2*	63,5± 6,3
Арсенит натрия	0,2	65,5± 6,0*	67,1± 5,8*	63,4 ± 6,0	57,5± 6,5
	0,5	78,9± 7,0*	75,2± 5,9*	69,2± 5,4	54,9± 5,8
	1,0	93,1± 6,2*	83,6± 6,2*	72,0± 5,0*	61,2± 5,4

Примечание: \* -  $p < 0,05$  по сравнению с контролем.

0,5 и 1,0 ЛД<sub>50</sub> приводило к снижению функции Т-лимфоцитов (повышению показателя РТМЛ) у крыс через 1 сут соответственно на 15,8; 21,4 и 35,9% ( $p < 0,05$ ), а арсенитом натрия – на 12,4; 25,8 и 40,0% ( $p < 0,05$ ) раза соответственно. Через 3 сут острое отравление люизитом в дозах 0,2; 0,5 и 1,0 ЛД<sub>50</sub> приводило к снижению функции Т-лимфоцитов у крыс соответственно на 12,7; 17,0 и 27,6% ( $p < 0,05$ ), а арсенитом натрия – на 14,0; 22,1 и 30,5% ( $p < 0,05$ ) раза соответственно. Через 6 сут острое отравление люизитом в дозах 0,2; 0,5 и 1,0 ЛД<sub>50</sub> приводило к снижению показателя у крыс соответственно на 9,8; 15,2 ( $p > 0,05$ ) и 22,1% ( $p < 0,05$ ), а арсенитом натрия – соответственно на 10,3; 16,1 ( $p > 0,05$ ) и 18,9% ( $p < 0,05$ ) раза. К 9 сут происходило практически полное восстановление показателя. Существенного отличия в действии люизита и арсенита натрия на функцию Т-лимфоцитов, оцениваемой по реакции торможения миграции лейкоцитов, не выявлено.

Вероятно, снижение функции Т-лимфоцитов обусловлено ингибирующим действием кортикостероидов [Забродский П.Ф., Германчук В.Г., 2000; Tiefenbach B. et al., 1983, 1985], секреция которых в течение 6-12 ч существенно увеличивается в результате стресс-реакции [Лемус В.Б., Давыдов В. В., 1974; Szot R.J., Murphy S.D. , 1970; Street J.C., Sharma R.P. , 1975; Tiefenbach B., Wichner S., 1985; Dhabhar F. S. et al., 1996], ингибированием эстераз Т-лимфоцитов [Хусинов А.А. и соавт., 1991; Забродский П.Ф., 1993; Fergula J. et al., 1972], повреждением м- и н-холинорецепторов, содержащих SH-группы, лимфоцитов и нарушением функции их пируватоксидазной системы вследствие взаимодействия МС с моно- и дитиоловыми ферментами [Трахтенберг И.М., Шафран Л.М., 2002].

Восстановление показателя к 9 сут, свидетельствует о том, что ПСКК у крыс к этому сроку после действия арсенитов обеспечивает образование числа лимфоцитов, соответствующих контрольному уровню [Чертков И.Л. и соавт., 1990].



Таким образом, под влиянием острой интоксикации арсенитами (0,2; 0,5 и 1,0 ЛД<sub>50</sub>) происходит дозозависимое снижение функции Т-клеток, оцениваемой по ингибированию миграции лейкоцитов, в течение 1-6 сут. Практически полное восстановление показателя происходило к 9 сут.

## 6.2. Изменение реакции гиперчувствительности замедленного типа

Оценка формирования ГЗТ под влиянием МС в модели, не связанной с переносом клеток, позволяет установить его действие на клеточный иммунитет, в частности, на функцию Th1 и продукцию ими ИЛ-1, ИЛ-3,  $\gamma$ -интерферона,  $\beta$ -фактора некроза опухоли и гранулоцитарно-макрофагального колониестимулирующего фактора (ГМ-КСФ) лимфоцитов [Georgiev V.St., Albright J.E., 1993], а также на участвующие в реализации гиперчувствительности IV типа Т-клетки памяти и макрофагов [Ройт А., 1991].

Нами установлено (табл. 6.2), что при острой интоксикации МС (0,2; 0,5 и 1,0 ЛД<sub>50</sub>) происходит дозозависимое снижение реакции ГЗТ. Так, дозы люизита, составляющие 0,2; 0,5 и 1,0 ЛД<sub>50</sub>, вызывали супрессию формирования ГЗТ соответственно в 1,47; 1,68 и 2,24 раза ( $p < 0,05$ ), а арсенит натрия в тех же дозах обуславливал редукцию показателя соответственно в 1,35; 1,57 и 1,99 раза ( $p < 0,05$ ).

Существенного отличия в действии люизита и арсенита натрия на реакцию ГЗТ, оцениваемую через 24 ч, не выявлено. Однако, средний

Таблица 6.2

Влияние острого отравления мышьяксодержащими соединениями на формирование гиперчувствительности замедленного типа у крыс по приросту массы задней стопы, % ( $M \pm m$ ,  $n=4-6$ )

Доза, ЛД <sub>50</sub>	Люизит	Арсенит натрия
Контроль	32,1 $\pm$ 2,1	
0,2	21,9 $\pm$ 2,6*	23,8 $\pm$ 2,7*
0,5	18,2 $\pm$ 2,5*	20,4 $\pm$ 2,8*
1,0	14,3 $\pm$ 4,3*	16,1 $\pm$ 4,0*

Примечание: \* -  $p < 0,05$  по сравнению с контролем.

показатель редукции (кратность снижения параметра по сравнению с контрольным значением) при различных дозах люизита и арсенита натрия составляет соответственно 1,80 и 1,63.

Данные литературы позволяют полагать, что Th1-лимфоциты обеспечивают реализацию реакции ГЗТ путем активации макрофагов. В основном Th1 регулируют физиологические механизмы, обеспечивающие функцию Т-звена иммунитета [Хаитов Р.М и соавт., 2000; Georgiev V.St., Albright J.E., 1993; Kimber I., 1996]. Полученные нами результаты косвенно свидетельствуют о том, что МС уменьшают способность Th1-лимфоцитов синтезировать ИЛ-1, ИЛ-3,  $\gamma$ -интерферон и  $\beta$ -фактор некроза опухоли (лимфотоксин), участвующие в реализации реакции ГЗТ [Kimber I., 1996]. Кроме того, арсениты, по-видимому, снижают активность и других клеток, обеспечивающих формирование ГЗТ, в частности, Т-клеток памяти и макрофагов [Ройт А., 1991]. Определенную роль в супрессии иммунных реакций, вероятно, играют метаболиты люизита, особенно хловиниларсеноксид.

Таким образом, острая интоксикация арсенитами в дозах, составляющих 0,2; 0,5 и 1,0 ЛД<sub>50</sub>, обуславливает дозозависимое снижение реакции ГЗТ, характеризующую первичный клеточный иммунный ответ и функцию Th1-лимфоцитов. Эффект люизита несущественно выше действия арсенита натрия.

### 6.3. Изучение антителозависимой клеточной цитотоксичности при остром действии арсенитов

Данные экспериментальных исследований в области иммунологии, позволяют полагать, что К-клетки (клетки-киллеры, кроме миелоидных) - это ЕКК, использующие для усиления реакции IgG в незначительных

концентрациях [Ройт А., 1991; Хаитов Р. М. и соавт., 2000]. Естественные клетки-киллеры (ЕКК), активированные связанными с клеткой-мишенью (например, клеткой, пораженной вирусом) антителами, уничтожают ее. Эта система получила название антителозависимая клеточная цитотоксичность (АЗКЦ). Помимо ЕКК в эту систему входят полиморфноядерные лейкоциты (ПЯЛ) – моноциты, базофилы, эозинофилы, сегментоядерные лейкоциты, а также другие фагоцитирующие и нефагоцитирующие миелоидные клетки [Ройт А., 1991]. В использованной нами модели эксперимента исследовалась вся система АЗКЦ спленоцитов: К-клетки (большие зернистые лимфоциты) и ПЯЛ.

При острой интоксикации люизитом и арсенитом натрия в дозах, составляющих 0,2; 0,5 и 1,0 ЛД<sub>50</sub>, нами установлено дозозависимое уменьшение АЗКЦ под влиянием МС. Люизит в дозах 0,2; 0,5 и 1,0 ЛД<sub>50</sub> вызывал супрессию АЗКЦ спленоцитов у крыс через 5 сут соответственно в 1,42; 1,81 и 2,84 ( $p < 0,05$ ) раза, а арсенит натрия - в 1,28 ( $p > 0,05$ ); 1,54 и 2,07 ( $p < 0,05$ ) раза соответственно.

Статистически достоверного различия в действии люизита и арсенита натрия на АЗКЦ у крыс через 5 сут не выявлено. Однако, средний показатель редукции (кратность снижения параметра по сравнению с контрольным значением) при различных дозах люизита и арсенита натрия составляет соответственно 1,82 и 1,63.

Таблица 6.3

Влияние острого отравления мышьяксодержащими соединениями на антителозависимую клеточную цитотоксичность спленоцитов у белых крыс через 5 сут, % ( $M \pm m$ ,  $n=5-7$ )

Доза, ЛД <sub>50</sub>	Люизит	Арсенит натрия
Контроль	14,5 $\pm$ 1,3	
0,2	10,2 $\pm$ 1,5*	11,3 $\pm$ 1,6
0,5	8,0 $\pm$ 1,4*	9,4 $\pm$ 1,7*
1,0	5,1 $\pm$ 1,1*	7,0 $\pm$ 1,8*

Примечание: \* -  $p < 0,05$  по сравнению с контролем.

Помимо описанных в предыдущих разделах механизмов иммуотоксичности МС, следует отметить, что данные соединения, вероятно, способны, как и ФОС (антихолинэстеразное действие, взаимодействие с холинорецепторами лимфоцитов), уменьшать АЗКЦ вследствие нарушения электролитного обмена клетки и изменения соотношения цАМФ/цГМФ [Trinchiev G., de Marchi M., 1976].

Таким образом, под влиянием острой интоксикации арсенитами в дозах, составляющих 0,2; 0,5 и 1,0 ЛД<sub>50</sub>, происходит дозозависимое уменьшение АЗКЦ, свидетельствующее о снижении функции К-клеток и ПЯЛ. Действие арсенита натрия менее выражено, чем эффект люизита ( $p > 0,05$ ).

#### 6.4. Воздействие острой интоксикации арсенитами на функцию естественных клеток-киллеров

##### 6.4.1. Действие арсенитов на активность естественных клеток-киллеров селезенки *in vivo*

Естественные клетки-киллеры характеризуются поверхностными маркерными молекулами CD16, CD56, CD57 и CD94. В настоящее время выявлены и другие молекулы на поверхности ЕКК общие с Т-клетками. ЕКК представлены преимущественно клетками с маркерами CD16, CD56 [Хаитов Р.М. и соавт., 2000; Ройт А. и соавт., 2000]. Вступая в контакт с клетками опухоли, клетками, пораженными вирусами или паразитами, ксеногенными клетками ЕКК способны уничтожать их без предварительного взаимодействия с антигенами, находящимися на их поверхности. Они узнают определенные структуры высокомолекулярных гликопротеидов, которые экспрессируются на мембране инфицированных вирусом клеток. Последние достижения в иммунологии, свидетельствуют о том, что ЕКК и К-клетки это одни и те же клетки, отличающиеся лишь механизмами реализации киллинга (убийства) клеток-мишеней. В настоящее время иммунный ответ рассматривают, как «процесс взаимодействия антигена и организма, распознавания поврежденных патогеном клеток и тканей лимфоцитами с

целью деструкции и выведения их из организма» [Хаитов Р.М. и соавт., 2000]. Исходя из данного определения, ЕКК осуществляют одну из функций иммунитета и не относятся к НРО.

При исследовании влияния токсикантов на ЕКК крыс нами установлено (табл. 6.4), что через 1–6 сут МС (0,2; 0,5 и 0,8 ЛД<sub>50</sub>) дозозависимо снижают активность естественных клеток-киллеров. Острое отравление люизитом в дозах 0,2; 0,5 и 1,0 ЛД<sub>50</sub> приводило к снижению активности ЕКК у крыс через 1 сут соответственно в 1,39; 1,90 и 3,64 раза ( $p<0,05$ ), а арсенитом натрия – в 1,32; 1,72 и 2,79 раза ( $p<0,05$ ) соответственно. Через 3 сут острое отравление люизитом в дозах 0,2; 0,5 и 1,0 ЛД<sub>50</sub> приводило к снижению активности ЕКК у крыс соответственно в 1,43; 1,80 и 2,89 раза ( $p<0,05$ ), а арсенитом натрия – в 1,24 ( $p>0,05$ ); 1,50 и 2,28 раза ( $p<0,05$ ) соответственно.

Таблица 6.4

Изменение активности естественных клеток-киллеров после острого отравления арсенитами, % ( $M\pm m$ ,  $n=5-6$ )

Вещества	Доза, ЛД <sub>50</sub>	Время исследования, сут			
		1	3	6	9
Контроль	0	33,5 $\pm$ 1,5 (30)			
Люизит	0,2	24,1 $\pm$ 3,7*	23,4 $\pm$ 3,3	25,0 $\pm$ 3,0	29,9 $\pm$ 4,1
	0,5	17,6 $\pm$ 3,5*	18,6 $\pm$ 3,6*	22,2 $\pm$ 2,9*	26,4 $\pm$ 3,7
	1,0	9,2 $\pm$ 3,1*	11,6 $\pm$ 3,4*	15,9 $\pm$ 4,0*	24,8 $\pm$ 4,0
Арсенит натрия	0,2	25,3 $\pm$ 3,8*	27,0 $\pm$ 3,0	28,4 $\pm$ 3,1	32,4 $\pm$ 4,2
	0,5	19,5 $\pm$ 3,3*	22,3 $\pm$ 3,5*	26,2 $\pm$ 3,9	30,6 $\pm$ 3,9
	1,0	12,0 $\pm$ 2,9*	14,7 $\pm$ 2,8*	17,9 $\pm$ 3,3*	31,5 $\pm$ 3,5

Примечание: в скобках – число животных; \* -  $p<0,05$  по сравнению с контролем.

Через 6 сут острое отравление люизитом в дозах 0,2; 0,5 и 1,0 ЛД<sub>50</sub> приводило к снижению показателя у крыс соответственно в 1,34 ( $p>0,05$ ); 1,51 и 2,10 раза ( $p<0,05$ ), а арсенитом натрия – соответственно в 1,18; 1,28 ( $p>0,05$ ) и 1,87 раза ( $p<0,05$ ) раза. К 9 сут происходило практически полное восстановление параметра. Статистически значимого отличия в действии люизита и арсенита натрия на активности ЕКК у крыс, не отмечалось.

Снижение активности ЕКК под влиянием МС, по-видимому, связано с ингибированием их эстераз ЕКК, как предполагаемых потомках предшественников Т-клеток [Ройт А., 1991]. Эффекты кортикостероидов и катехоламинов вследствие активации возможной активации МС гипоталамо-гипофизарно-адреналовой системы [Забродский П.Ф., 1993, 2000; Szot R.J., Murphy S.D., 1970; Tiefenbach B.et al., 1983, 1985] также обуславливают редукцию активности ЕКК [Madden K. S., Livnat S., 1991; Claman H.N., 1993]. Взаимодействие МС с сульфгидрильными группами холинорецепторов ЕКК также может являться одним из факторов, вызывающих редукцию активности ЕКК [Трахтенберг И.М., Шафран Л.М., 2002].

Супрессия функциональной активности ЕКК после острой интоксикации МС может быть связана со снижением функции некоторых ферментов ЕКК (сукцинатдегидрогеназы, альдегиддегидрогеназы, глутаминсинтетазы, тиолтрансацилазы, люциферазы, ацетил-КоА-карбоксилазы), которое резко усиливается в присутствии МС, взаимодействующих с моно- и дитиоловыми энзимами [Забродский П.Ф., 1998].

Таким образом, под влиянием острой интоксикации мышьяк содержащими соединениями (0,2; 0,5 и 1,0 ЛД<sub>50</sub>) происходит дозозависимое снижение активности ЕКК в течение 1-6 сут. Практически полное восстановление показателя происходило к 9 сут.

#### 6.4.2. Действие арсенитов на активность ЕКК селезенки *in vitro*

При оценке влияния МС на активность ЕКК селезенки белых крыс *in vitro* нами установлено (табл. 6.5), что при концентрациях люизита, составляющих  $10^{-6}$ ,  $10^{-5}$  и  $10^{-4}$  М, происходило прямо связанное с концентрацией уменьшение активности ЕКК соответственно в 1,57; 2,35 и 5,08 раза ( $p < 0,05$ ), а при действии арсенита натрия в эквимоллярных концентрациях –

соответственно в 1,34; 1,61 и 2,91 раза ( $p < 0,05$ ). Эффект люизита статистически значимо превышал действие арсенита натрия ( $p < 0,05$ ).

Таблица 6.5

Влияние арсенитов на активность ЕКК (%) у крыс *in vitro* ( $M \pm m$ ,  $n=5-6$ )

Серии опытов	Концентрация арсенитов, М		
	$10^{-6}$	$10^{-5}$	$10^{-4}$
Контроль	$29,5 \pm 2,7$		
Люизит	$16,5 \pm 1,8^*$	$11,0 \pm 1,5^*$	$5,1 \pm 1,2^*$
Арсенит натрия	$22,0 \pm 2,2^{**}$	$16,1 \pm 2,0^{**}$	$8,9 \pm 1,3^{**}$

Примечание: спленоциты в течение 1 ч инкубировали с МС, \* -  $p < 0,05$  по сравнению с контролем; \*\* -  $p < 0,05$  по сравнению с контролем и арсенитом натрия.

Выявленная супрессия активности ЕКК *in vitro* позволяет считать, что данный эффект связан с ингибированием эстераз, моно- и дитиоловых ферментов ЕКК, взаимодействием арсенитов с холинорецепторами лимфоцитов, нарушением образования NO, а также общетоксическими эффектами: нарушением тканевого дыхания, мембранотоксическим действием, инициацией перекисного окисления мембран ЕКК [Голиков С.Н. и соавт., 1986; Ройт А., 1991; Забродский П.Ф., 1998; Куценко и соавт., 2004].

Под влиянием данных изменений редукция активности ЕКК при отравлении МС может быть обусловлена блокированием проникновения гранзимов из гранул ЕКК в цитоплазму клетки-мишени, а также снижением их синтеза. Кроме того, может быть реализовано нарушение процесса порообразования перфорином ЕКК [Ройт и соавт., 2000; Nogueira N., 1984], а также индукцией апоптоза [Хаитов Р. М. и соавт., 2000; Kimber I., More M., 1985; Marx J.L., 1986].

Таким образом, мышьяксодержащие соединения *in vitro* в прямой зависимости от концентрации ( $10^{-6}$ ,  $10^{-5}$  и  $10^{-4}$  М) снижали активность ЕКК. Эффект люизита статистически достоверно превышает действие арсенита натрия ( $p < 0,05$ ).

### Выводы по главе

1. Под влиянием острой интоксикации арсенитами (0,2; 0,5 и 1,0 ЛД<sub>50</sub>) происходит дозозависимое снижение функции Т-клеток, оцениваемой по ингибированию миграции лейкоцитов, в течение 1-6 сут. Практически полное восстановление показателя происходило к 9 сут.

2. Острая интоксикация арсенитами в дозах, составляющих 0,2; 0,5 и 1,0 ЛД<sub>50</sub>, обуславливает дозозависимое снижение реакции ГЗТ, характеризующую первичный клеточный иммунный ответ и функцию Th1-лимфоцитов. Эффект люизита несущественно выше действия арсенита натрия.

3. Под влиянием острой интоксикации мышьяксодержащими соединениями в дозах, составляющих 0,2; 0,5 и 1,0 ЛД<sub>50</sub>, происходит дозозависимое уменьшение АЗКЦ, свидетельствующее о снижении функции К-клеток и ПЯЛ. Действие арсенита натрия менее выражено, чем эффект люизита ( $p > 0,05$ ) несущественно выше действия.

4. После острой интоксикации арсенитами (0,2; 0,5 и 1,0 ЛД<sub>50</sub>) происходит дозозависимое снижение активности ЕКК в течение 1-6 сут. Практически полное восстановление показателя происходило к 9 сут.

5. Арсениты *in vitro* в прямой зависимости от концентрации ( $10^{-6}$ ,  $10^{-5}$  и  $10^{-4}$  М) уменьшают активность ЕКК. Эффект люизита статистически достоверно превышает действие арсенита натрия ( $p < 0,05$ ).



## ГЛАВА 7

# РОЛЬ АНТИХОЛИНЭСТЕРАЗНЫХ МЕХАНИЗМОВ И ПЕРЕКИСНОГО ОКИСЛЕНИЯ ЛИПИДОВ В НАРУШЕНИИ ИММУННОГО СТАТУСА ПОСЛЕ ОСТРОЙ ИНТОКСИКАЦИИ АРСЕНИТАМИ

## 7.4. Изменение активности эстераз Т-клеток под влиянием арсенитов

Неспецифические эстеразы являются лизосомальными ферментами. Они играют важную роль в реализации киллерной функции Т-лимфоцитов [Ледванов М. Ю., Киричук В. Ф., 1996; Ferluga J. et al., 1972; Li C. Y. et al., 1973]. Изменение эстеразной активности в клетках отражает, с одной стороны, функциональную активность иммуноцитов, с другой - может служить количественным критерием Т-клеток в циркулирующей крови, так как именно эта субпопуляция лимфоцитов является эстеразопозитивной [Хейхоу Ф. Г. Дж., Кваглино Д., 1983; Ferluga J. et al., 1972; Li C. G et al., 1973; Kutty K. M. et al., 1976; Kullenkampff J. et al., 1977].

Нами установлено (табл. 7.1), что люизит в дозе, составляющей 1,0 ЛД<sub>50</sub>, обуславливает дозозависимое снижение активности ацетилхолинэстеразы (АХЭ) Т-клеток тимоцитов и спленоцитов соответственно в 1,32 и 1,41 раза ( $p < 0,05$ ), а арсенит натрия - соответственно в 1,20 и 1,26 раза ( $p < 0,05$ ).

Под влиянием острой интоксикации люизитом и арсенитом натрия в дозе 1,0 ЛД<sub>50</sub>, число клеток (в основном Т-лимфоцитов), содержащих б-нафтил-AS-ацетатэстеразу в спленоцитах крыс снижалось соответственно в 1,50 и 1,23 раза ( $p < 0,05$ ), а содержащих б-нафтил-бутиратэстеразу - соответственно в 1,46 и 1,31 раза ( $p < 0,05$ ).

Полученные результаты свидетельствуют о том, что преимущественное снижение функции Т-клеток в гуморальных и клеточных иммунных реакциях под влиянием арсенитов, связано с ингибированием эстераз Т-лимфоцитов.

Таблица 7.1

Влияние острого отравления арсенитов  
(1,0 ЛД<sub>50</sub>) на активность ацетилхолинэстеразы в Т- лимфоцитах  
тимуса и селезенки у крыс (мЕд/10<sup>9</sup>) через 3 сут (M±m, n=6)

Серии опытов	Тимус	Селезенка
Контроль	68,2 $\pm$ 6,3	59,5 $\pm$ 6,1
Люизит	51,5 $\pm$ 5,2**	42,1 $\pm$ 4,9*
Арсенит натрия	57,0 $\pm$ 5,0**	47,2 $\pm$ 4,5**

Примечание: \*; \*\* - различие с контролем достоверно -  $p < 0,05$ , (\*; \*\* - для расчета достоверности различий использовали соответственно  $t$  –критерий Стьюдента и непараметрический критерий U Вилкоксона-Манна- Уитни).

Таблица 7.2

Влияние острой интоксикации арсенитов (1,0 ЛД<sub>50</sub>) на содержание б--нафтил-AS-ацетатэстеразопозитивных и б--нафтил-бутиратэстеразопозитивных клеток в спленоцитах крыс через 3 сут ( $M \pm m$ ,  $n=9$ )

Серии опытов	Содержание б -нафтил-AS-ацетатэстеразопозитивных клеток, %	Содержание б -нафтил-бутиратэстеразопозитивных клеток, %
Контроль	51,2 $\pm$ 3,3	42,3 $\pm$ 3,5
Люизит	34,1 $\pm$ 3,0*	28,9 $\pm$ 3,2*
Арсенит натрия	41,5 $\pm$ 3,8**	32,2 $\pm$ 3,1*

Примечание: \*; \*\* - различие с контролем достоверно -  $p < 0,05$ , (\*; \*\* - для расчета достоверности различий использовали соответственно  $t$  –критерий Стьюдента и непараметрический критерий U Вилкоксона-Манна- Уитни).

Таким образом, под влиянием острой интоксикации арсенитами (1,0 ЛД<sub>50</sub>) происходит снижение активности ацетилхолинэстеразы Т-лимфоцитов тимуса и селезенки, а также числа б-нафтил-AS-ацетатэстеразопозитивных и б--нафтил-бутиратэстеразопозитивных спленоцитов (преимущественно Т-клеток), что свидетельствует о том, что одним из механизмов их иммунотоксичности является антихолинэстеразный эффект.

#### 7.5. Изменение показателей перекисного окисления липидов после острого отравления арсенитами

Инициация перекисного окисление липидов мембран (ПОЛ) является одним из наиболее общих механизмов токсичности и иммунотоксичности при

различных патологических процессах. Этот процесс включает следующие стадии: разрыхление гидрофобной области липидного бислоя мембран, что делает белковые компоненты более доступными для протеаз; появление в гидрофобном хвосте жирной кислоты гидрофильной перекисной группы, приводящее к конформационным изменениям в фосфолипиде и липопротеидном комплексе, что изменяет биофизические свойства мембраны и ферментативные функции липопротеидных комплексов; разрушение веществ, обладающих антиоксидантной активностью (витаминов, стероидных гормонов, убихинона) и снижении концентрации тиолов в клетке; образование по мере накопления гидроперекиси липидов трансмембранных перекисных кластеров, являющихся каналами проницаемости для ионов, в частности для ионов кальция. Формирование таких каналов патологической проницаемости может играть важную роль в возникновении избытка кальция в иммунокомпетентных клетках и реализации повреждающего действия этого катиона [Меерсон Ф.З., 1984].

В последующем происходит изменение функциональных свойств белков, входящих в состав мембран и мембраносвязанных ферментов и рецепторов, от их активации до полного ингибирования. Это может быть связано с изменением состава фосфолипидных мембран ИКК, с прямым окислением SH-групп в активных центрах мембраносвязанных ферментов, с образованием внутри- и межмолекулярных "сшивок" [Арчаков А.И., 1993].

Гидроперекиси липидов способны также трансформировать активность ряда ферментов, например, моноаминоксидазы с моноаминов на другие амины, а малоновый диальдегид может образовывать ковалентные связи со многими амидами иммунокомпетентных клеток.

С действием супероксидного аниона при ПОЛ связывают мутагенные и канцерогенные эффекты, а также нарушение многочисленных функций иммунитета [Голиков С.Н. и соавт., 1986].

Исследование активности каталазы, пероксидазы и малонового альдегида является информативным показателем ПОЛ при интоксикациях

[Кунцевич А.Д. и соавт., 1994]. При этом каталаза и пероксидаза характеризуют антиоксидантную защиту, а малоновый диальдегид является показателем активности процессов ПОЛ.

Наши исследования показали (табл. 7.3), что арсениты в дозе 1,0 ЛД<sub>50</sub> инициируют ПОЛ. Так, под влиянием люизита активность каталазы и пероксидазы снижались соответственно в 1,94 и 1,71 раза.

Таблица 7.3

Действие острой интоксикации соединениями мышьяка (1,0 ЛД<sub>50</sub>) на показатели антиоксидантной системы и перекисного окисления липидов у крыс через 3 сут (M±m, n=9-14)

	Каталаза, мккатал/мл	Пероксидаза, мкмоль/мин/л	Малоновый диальдегид, нмоль/мл
Контроль	771,5±70,2	52,4±5,7	5,12±0,25
Люизит	395,8±40,1 *	29,8± 4,2 *	6,98± 0,22 *
Арсенит натрия	450,6± 45,4 *	36,5± 4,1 *	6,40± 0,23 *

Примечание: \* - различие с контролем достоверно -  $p < 0,05$ .

Под влиянием МС снижение факторов антиоксидантной системы было сопряжено с увеличением ПОЛ, что проявлялось увеличением содержания в плазме крови малонового альдегида. Так, люизит и арсенит натрия статистически значимо ( $p < 0,05$ ) повышали содержание данного соединения соответственно в 1,36 и 1,25 раза. Полученные данные свидетельствуют, что люизит по сравнению с арсенитом натрия в большей степени активизирует ПОЛ. Изменения показателей ПОЛ в плазме крови отражают процесс свободно-радикального окисления липидов, как всех клеток различных органов в целом, так и органов системы иммунитета и, в частности, лимфоцитов.

При вычислении коэффициентов корреляции между числом АОК к ЭБ при остром отравлении люизитом и содержанием каталазы и пероксидазы в крови крыс установлено, что они составляли соответственно  $0,769 \pm 0,077$

( $p < 0,05$ ) и  $0,754 \pm 0,082$  ( $p < 0,05$ ). Коэффициенты корреляции при острых отравлениях люизитом и арсенитом натрия между числом АОК к ЭБ и содержанием МД в крови составляли соответственно  $-0,763 \pm 0,079$  ( $p < 0,05$ ) и  $-0,710 \pm 0,096$  ( $p < 0,05$ ). Значения  $r$  между другими параметрами системы иммунитета при остром действии арсенитов и показателями антиоксидантной системы (АОС) находились в пределах от 0,687 до 0,805 ( $p < 0,05$ ), а коэффициенты корреляции между содержанием малонового диальдегида в крови и показателями иммунного статуса при действии МС составляли от  $-0,667$  до  $-0,789$  ( $p < 0,05$ ).

Данные литературы позволяют считать, что стресс-реакция, приводящая к повышению уровня кортикостероидов и катехоламинов в крови под влиянием МС, может являться одним из факторов, инициирующим ПОЛ [Меерсон Ф.З., 1984; Валеева И.Х. и соавт., 2002].

Таким образом, острая интоксикация соединениями мышьяка приводит к инициации ПОЛ, что проявляется редукцией активности каталазы и пероксидазы (снижение АОС) и увеличением содержания малонового альдегида в плазме крови. Эффект люизита в эквивалентной дозе по сравнению с арсенитом натрия более выражен ( $p < 0,05$ ). Инициация ПОЛ под влиянием МС может являться одним из факторов, способствующим формированию постинтоксикационного иммунодефицитного состояния.

### **Выводы по главе**

1. Под влиянием острой интоксикации арсенитов ( $1,0 \text{ ЛД}_{50}$ ) происходит снижение активности ацетилхолинэстеразы Т-лимфоцитов тимуса и селезенки, а также числа б-нафтил-AS-ацетатэстеразопозитивных и б-нафтил-бутиратэстеразопозитивных спленоцитов (преимущественно Т-клеток), что свидетельствует о том, что одним из механизмов их иммунотоксичности является антихолинэстеразный эффект.

2. Острая интоксикация арсенитами приводит к инициации ПОЛ, что проявляется редуцией активности каталазы и пероксидазы (снижение активности антиоксидантной системы) и увеличением содержания малонового диальдегида в плазме крови. Эффект люизита в эквивалентной дозе по сравнению с арсенитом натрия более выражен ( $p < 0,05$ ). Инициация ПОЛ под влиянием МС может являться одним из факторов, способствующим формированию постинтоксикационного иммунодефицитного состояния, что доказывается высокими коэффициентами корреляции между показателями ПОЛ и основными параметрами системы иммунитета.

## ГЛАВА 8

# КОРРЕКЦИЯ НАРУШЕНИЙ ИММУННОГО ГОМЕОСТАЗА ПРИ ОСТРОМ ОТРАВЛЕНИИ АРСЕНИТАМИ

## 8.1. Влияние антидота мышьяксодержащих соединений унитиола на показатели НРО и иммунного статуса

Использование унитиола – антидота МС – можно рассматривать, как один из способов снижения редукции показателей НРО и иммунного статуса. При остром отравлении люизитом (1,0 ЛД<sub>50</sub>) (табл.8.1) после

Таблица 8.1

Влияние унитиола на НРО при остром отравлении крыс  
люизитом (1,0 ЛД<sub>50</sub>) [М±m]

Показатель	Контроль	Люизит	Люизит + унитиол	Уровень достовер- ности p<0,05
	1	2	3	4
Летальность, %	52,2±5,8 (72)	86,6±7,2 (22)	68,7±11,7 (16)	1-2, 2-3
LD <sub>50</sub> E. Coli, 10 <sup>9</sup> микр. тел	1,86±0,14 (72)	1,13±0,23 (23)	1,36±0,19 (16)	1-2, 1-3
Et <sub>50</sub> , ч	17,0±1,1 (72)	9,0±1,5 (23)	12,2±1,9 (16)	1-2, 1-3
БАСК, %	85,4±3,8 (32)	65,9±5,1 (16)	71,6±5,3 (16)	1-2, 1-3
Лизоцим, мг/л	8,9±1,5 (16)	4,5±1,2 (16)	5,2±0,9 (16)	1-2, 1-3
Индекс активности нейтрофилов (НСТ-тест)	0,37±0,02 (16)	0,23±0,02 (16)	0,30±0,02 (16)	1-2, 1-3, 2-3

Примечание: в скобках - число животных.

применения унитиола происходило увеличение выживаемости животных от экспериментальной инфекции, повышение ЛД<sub>50</sub> E.Coli и Et<sub>50</sub> (p<0,05) (оценку показателей проводили через 1 сут). При использовании унитиола после отравления крыс люизитом через 6 сут отмечалось уменьшение снижения БАСК (p>0,05), сывороточного содержания лизоцима (p>0,05), индекса

активности нейтрофилов в НСТ-тесте по сравнению с показателями при остром отравлении ( $p < 0,05$ ). При этом полного восстановления до контрольных значений, значительно сниженных действием люизита исследованных показателей НРО, не происходило. Они оставались статистически значимо более низкими, чем в контроле.

Нами установлено (табл. 8.2), что унитиол при острой интоксикации

Таблица 8.2

Влияние унитиола на НРО при остром отравлении крыс  
арсенитом натрия ( $1,0 \text{ ЛД}_{50}$ ) [ $M \pm m$ ]

Показатель	Контроль	Арсенит натрия	Арсенит натрия + унитиол	Уровень достоверности $p < 0,05$
	1	2	3	4
Летальность, %	$52,2 \pm 5,8$ (72)	$72,7 \pm 11,1$ (22)	$56,2 \pm 12,4$ (16)	1-2, 2-3; * - $\chi^2$
$\text{LD}_{50}$ E. Coli, $10^9$ микр. тел	$1,86 \pm 0,14$ (72)	$1,13 \pm 0,23$ (23)	$1,36 \pm 0,19$ (16)	1-2, 1-3, 2-3
$\text{Et}_{50}$ , ч	$17,0 \pm 1,1$ (72)	$9,0 \pm 1,5$ (23)	$12,2 \pm 1,9$ (16)	1-2, 1-3, 2-3
БАСК, %	$85,4 \pm 3,8$ (32)	$66,0 \pm 5,4$ (16)	$72,0 \pm 5,3$ (16)	1-2, 1-3
Лизоцим, мг/л	$8,9 \pm 1,5$ (16)	$4,6 \pm 1,3$ (16)	$5,0 \pm 1,0$ (16)	1-2, 1-3
Индекс активности нейтрофилов (НСТ-тест)	$0,37 \pm 0,02$ (16)	$0,25 \pm 0,02^*$ (16)	$0,31 \pm 0,02$ (16)	1-2, 1-3, 2-3

Примечание: в скобках - число животных.

арсенитом натрия существенно снижал летальность крыс по сравнению с показателем при интоксикации, при этом данный параметр существенно не отличался от контрольного значения.  $\text{LD}_{50}$  E. Coli,  $\text{Et}_{50}$ , а также БАСК, активности лизоцима и индекс активности нейтрофилов увеличивались при использовании унитиола по сравнению с показателями при остром отравлении, однако их значения оставались ниже контрольного уровня ( $p < 0,05$ ).

Таким образом, при остром отравлении мышьяксодержащими соединениями – люизитом и арсенитом натрия ( $1,0 \text{ ЛД}_{50}$ ) – их антидот унитиол в терапевтических дозах повышает основные показатели НРО,



однако, они остаются ниже контрольного уровня.

Нами экспериментально установлено (табл. 8.3), что унитиол у крыс вызывал значительно более выраженное повышение ( $p < 0,05$ ) гуморального иммунного ответа к Т-зависимому антигену (в 1,83 раз) по сравнению с реакцией на Т-независимый антиген (в 1,33 раза) по отношению к показателям при отравлении люизитом. Более выраженная супрессия Т-независимого антителообразования при действии люизита связана с большим числом клеток и реакций, участвующих в его реализации, по сравнению с тимусзависимой антителопродукцией [Забродский П. Ф., Ромащенко С.А., 1998]. Унитиол достоверно повышал, сниженную люизитом, активность ЕКК. Унитиол оказывал также выраженное защитное действие в отношении АЗКЦ и реакции ГЗТ, супрессию которых вызывал люизит.

Таблица 8.3

Влияние унитиола на гуморальные и клеточные иммунные реакции у крыс при остром отравлении люизитом ( $1,0 \text{ ЛД}_{50}$ ) [ $M \pm m$ ,  $n=5-9$ ]

Показатель	Контроль	Люизит	Люизит + унитиол	Уровень достоверности $p < 0,05$
	1	2	3	4
АОК к ЭБ, $10^3$	$40,1 \pm 3,3$	$15,2 \pm 2,7$	$27,8 \pm 3,9$	1-2, 1-3, 2-3
АОК к Vi-Ag, $10^3$	$31,2 \pm 3,2$	$15,5 \pm 2,3$	$20,6 \pm 2,5$	1-2, 1-3, 2-3
АЗКЦ, %	$14,5 \pm 1,3$	$5,1 \pm 1,1$	$9,8 \pm 1,7$	1-2, 1-3, 2-3
ЕЦ, %	$33,5 \pm 1,5$ (30)	$15,9 \pm 4,0$	$26,5 \pm 2,8$	1-2, 1-3, 2-3
ГЗТ, %	$32,1 \pm 2,1$	$14,3 \pm 4,3$	$24,7 \pm 2,0$	1-2, 1-3, 2-3

Примечание: в скобках – число животных.

Антидотная терапия унитиолом вызывала повышение показателей системы иммунитета, значительно сниженных действием люизита, однако, при этом полного восстановления, исследованных параметров не отмечалось. Они после антидотной терапии оставались ниже контрольных значений.

Аналогичное действие унитиол оказывал при остром отравлении

арсенитом натрия (табл. 8.4).

Таблица 8.4

Влияние на унитиола на гуморальные и клеточные иммунные реакции у крыс при остром отравлении арсенитом натрия (1,0 ЛД<sub>50</sub>) [M±m, n=5-9]

Показатель	Контроль	Арсенит натрия	Арсенит натрия + унитиол	Уровень достоверности $p < 0,05$
	1	2	3	4
АОК к ЭБ, $10^3$	40,1±3,3	17,9±2,6	30,0±3,4	1-2, 1-3, 2-3
АОК к Vi-Ag, $10^3$	31,2±3,2	17,3±2,2	22,6±2,3	1-2, 1-3
АЗКЦ, %	14,5±1,3	7,0±1,8	10,0±1,5	1-2, 1-3
ЕЦ, %	33,5±1,5 (30)	17,9±3,3	27,0±2,7	1-2, 1-3, 2-3
ГЗТ, %	32,1±2,1	16,1±4,0	26,0±2,1	1-2, 1-3

Примечание: в скобках – число животных.

Выявленное уменьшение иммунотоксичности люизита и арсенита натрия унитиолом, не обеспечивающего полного восстановления значительно сниженных действием этого токсиканта исследованных показателей НРО и системы иммунитета, предполагает обязательное включение в схему лечения острой интоксикации иммуностимуляторов, повышающих показатели НРО, активность ЕКК и АЗКЦ, основных гуморальных и клеточных иммунных реакций.

Таким образом, при остром отравлении мышьяксодержащими соединениями – люизитом и арсенитом натрия (1,0 ЛД<sub>50</sub>) – их антидот унитиол в терапевтических дозах, хотя и увеличивает показатели гуморального и клеточного иммунитета, однако, он не способен восстановить их до контрольных значений.

## 8.2. Обоснование иммуностимулирующей терапии при остром отравлении арсенитами

По происхождению иммуностимуляторы подразделяются на продукты жизнедеятельности микроорганизмов, растений и животных

(полисахариды, фосфолипиды мембран, гликопептиды, модифицированные токсины, ДНК и РНК микроорганизмов, вакцины и др.) [Лазарева Д.Н., Алехин Е.К., 1985; Виноградов В.М. и соавт., 1986; Khaitov R.M., 1993], пептидные эндогенные стимуляторы иммунитета (препараты тимуса, селезенки, костного мозга, интерлейкины и др.) [Арион В.Я., 1981; Морозов В.Г., Хавинсон В.Х., 1978, 1983; Хавинсон В.Х., Морозов В.Г. 1981, 1982; Яковлев Г.М. и соавт., 1987; Любимова Н.Б., Леонова Г.Н., 1995; Алехин Е.К. и соавт., 1993; Minich E. et al., 1983; Georgiev V.St. et al., 1993], синтетические стимуляторы иммунитета (левамизол, леакадин, тимоген) [Утешев Б.С. и соавт., 1995; Kimball E. S., 1993; Janik J., 1993; Sosa A. et al., 1993], стимуляторы метаболических процессов [экстраиммунная терапия] (анаболические гормоны, рибоксил, плазмол, витамины и др.) [Лазарева Д.Н., Алехин Е.К., 1985; Хаитов Р.М. и соавт., 1995].

Сравнительная характеристика действия некоторых иммуностимуляторов на НРО, клеточный и гуморальный иммунитет [Лазарева Д.Н., Алехин Е.К., 1985; Арион В.Я., 1981, 1984, 1987, 1991; Земсков В.М., 1991; Петров Р.В., 1991; Ширинский В.С., Жук Е.А., 1991; 1994; Утешев Б.С. и соавт., 1995 и др.] показывает, что для коррекции нарушений иммунного статуса после острого отравления арсенитами могут быть использованы наиболее перспективные иммуностимуляторы тимоген, Т-активин, миелопид и имунофан.

Необходимо учитывать, что практически все иммуностимуляторы имеют те или иные нежелательные побочные эффекты. При применении тимогена, Т-активина и имунофана они не выявлены. Миелопид может вызывать головокружение, слабость, тошноту, гиперемия и болезненность в месте введения, повышение температуры тела [Хавинсон В.Х. и соавт., 1990; Забродский П.Ф. и соавт., 2001].

Нарушение клеточный иммунитет, который поражается при интоксикации арсенитами, может корригироваться тималином, Т-активином, тимоптином, тимогеном и другими препаратами, полученными из тимуса, и

их синтетическими аналогами [Морозов В.Г., Хавинсон В.Х., 1978, 1983; Арион В.Я., 1981, 1991; Хавинсон В.Х., Морозов В.Г. 1981, 1982; Лазарева Д.Н., Алехин Е.К., 1985; Виноградов В.М. и соавт., 1986; Яковлев Г.М. и соавт., 1987; 1989; 1990; Базарный В.В., Ястребов А.П., 1990; Белокрылов Г.А. и соавт., 1991; Утешев Б.С. и соавт., 1995; Забродский П.Ф., Киричук В.Ф., 1999; Minich E. et al., 1983; Georgiev V.St. et al; 1993; Khaitov R.M., 1993; Kimball E. S., 1993; Janik J., 1993; Stevens G., 1993; Sosa A. et al., 1993].

Изучение иммуностимулирующих характеристик различных препаратов [Хавинсон В.Х. и соавт., 1990; Яковлев Г.М. и соавт., 1990; Гюллинг Э.В. и соавт., 1991; Земсков В.М., 1991; Петров Р.В., 1991; Ширинский В.С., Жук Е.А., 1991; 1994; Семина О.В. и соавт., 1993, 1997; Юшков В.В. и соавт., 1993; Утешев Б.С. и соавт., 1995; Ершов Ф.И., 1995; Невидимова Т.И. и соавт., 1995; Жук Е.А. и соавт., 1996; Старченко А.А. и соавт., 1996; Забродский П.Ф. и Киричук В.Ф., 1999] показывает, что наиболее эффективным при нарушении Т-звена иммунитета и снижении активности ЕКК являются тимоген и Т-активин. Существуют основания считать, что для восстановления показателей В-системы иммунитета после острых интоксикаций МС может быть применен миелопид [Михайлова А.А. и соавт., 1997; Мухамбетов Д.Д. и соавт., 1990].

Тимоген оказывает регулирующее влияние на реакции клеточного, гуморального иммунитета и НРО, стимулирует процессы регенерации в случаях их угнетения, а также улучшает течение клеточного метаболизма, усиливает процессы дифференцировки антигенов на поверхности лимфоцитов и нормализует их количество и соотношение при различных иммунодефицитных состояниях, стимулирует, практически, на все звенья дифференцировки Т-лимфоцитов (от стволовой клетки до эффекторов клеточного иммунитета), что выражается в значительном повышении функции клеточного и гуморального звеньев иммунитета и НРО [Осипова Л.О., 1990; Яковлев Г.М., Хавинсон В.Х. 1989; Хавинсон В.Х. и соавт., 1990; Яковлев Г.М. и соавт., 1990; Гюллинг Э.В. и соавт., 1991; Юшков В.В. и

соавт., 1993; Утешев Б.С. и соавт., 1995; Ершов Ф.И., 1995; Невидимова Т.И. и соавт., 1995; Жук Е.А. и соавт., 1996; Старченко А.А. и соавт., 1996; Семина О.В. и соавт., 1993, 1997; Забродский П.Ф., 1999; Забродский П.Ф., Киричук В.Ф., 1999].

Т-активин является иммуномодулирующим препаратом полипептидной природы, полученный из вилочковой железы крупного рогатого скота. При иммунодефицитных состояниях (в том числе, постинтоксикационных [Вахидова Г.А. и соавт., 1990]) нормализует количественные и функциональные показатели Т-системы иммунитета, стимулирует продукцию лимфокинов, в том числе интерферонов, нормализует другие показатели клеточного иммунитета, а также повышает функцию макрофагов [Арион В.Я. и соавт., 1989; Таранов В.А., Короткова М.И., 1989; Шляхов Э.Н., Гылка В.В., 1989; Мухамбетов Д.Д. и соавт., 1990; Стасий Е.Д. и соавт., 1990; Арион В.Я., Иванушкин Е.Ф., 1991; Большаков и соавт., 1991; Борисова А.М. и соавт., 1991; Базарный В.В., Ястребов Ф.П., 1993; Кирилличева Г.Б. и соавт., 1993; Машковский М.Д., 1993].

Миелопид - иммуностимулирующий препарат пептидной природы, получаемый из культуры клеток костного мозга млекопитающих (свиней или телят). При иммунодефицитных состояниях миелопид восстанавливает показатели В- и Т-систем иммунитета, стимулирует продукцию антител и функциональную активность иммунокомпетентных клеток и способствует восстановлению ряда других показателей гуморального звена иммунитета, регулирует дифференцировку кроветворных клеток-предшественников у мышей с экспериментальным Т-иммунодефицитом, обладает стресспротективным действием [Руднева Т.Б. и соавт., 1989; Подосинников И.С. и соавт., 1991; Степаненко Р.Н. и соавт., 1991; Турсунов Б.С. и соавт., 1992; Михайлова А.А., 1997; Кирилина Е.А. и соавт., 1998; Mikhailova A.A. et al., 1990],.

Имунофан (аргинил-альфа-аспартил-лизил-тирозил-аргинин) — гексапептид с молекулярной массой 836 Д. Препарат относится к

синтетическим иммуностимулятором, обладает иммуннорегулирующим, детоксикационным, гепатопротективным действием и вызывает инактивацию свободнорадикальных и перекисных соединений. Фармакологическое действие пептидного иммунооксидредуктанта основано на достижении коррекции иммунной и окислительно-антиокислительной системы организма. Действие препарата начинает развиваться в течение 2-3 часов (быстрая фаза) и продолжается до 4 мес (средняя и медленная фазы). В течение быстрой фазы (продолжительность до 2-3 суток) проявляется прежде всего детоксикационный эффект – усиливается антиоксидантная защита организма путем стимуляции продукции церулоплазмينا, лактоферрина, активности каталазы, препарат нормализует перекисное окисление липидов, ингибирует распад фосфолипидов клеточной мембраны и синтез арахидоновой кислоты с последующим снижением уровня холестерина крови и продукции медиаторов воспаления. При токсическом и инфекционном поражении печени, препарат предотвращает цитолиз, снижает активность трансаминаз и уровень билирубина в сыворотке крови, восстанавливает показатели иммунного статуса при иммунодефицитных состояниях, нарушениях иммунного гомеостаза при различных заболеваниях, в частности, инфекционных [Бажигитова Б.Б., Шортанбаев А.А., 2003; Михайлова М.Н. и соавт., 2003; Попова Е.А. и соавт., 2003;; Щеглова М.Ю., Макарова Г.А., 2003].

В течение средней фазы (начинается через 2-3 суток, продолжительность – до 7-10 суток) происходит усиление реакций фагоцитоза и гибели внутриклеточных бактерий и вирусов, увеличение продукции иммуноглобулинов [Забродский П.Ф. и соавт., 2001; Бажигитова Б.Б., Шортанбаев А.А., 2003; Михайлова М.Н. и соавт., 2003].

Сравнительная характеристика наиболее часто используемых в клинике иммуностимуляторов свидетельствует о том, что иммунофан при острой интоксикации арсенитами может являться препаратом выбора. Необходимо подчеркнуть, что имунофан способен оказывать не только

иммуностимулирующее влияние на все звенья системы иммунитета, но и обеспечивать детоксицирующий, гепатопротективный и антиоксидантный эффекты при острых отравлениях МС.

### 8.3. Влияние имунофана на основные показатели НРО и иммунного статуса после острого отравления люизитом

Вышеизложенные результаты экспериментальных исследований и анализ иммуностимулирующих свойств различных препаратов позволяет предположить, что применение имунофана в дозе 10 мкг/кг в течение 3 сут изолированно (или в комбинации с унитиолом) способно восстановить нарушения НРО и иммунного гомеостаза, вызванные МС. Доза препарата для крыс обоснована данными литературы и вычислениями, исходя из высшей суточной дозы для человека [Рыболовлев Ю.Р., 1982; Машковский М.Д., 1993].

Учитывая более выраженную иммунотоксичность люизита по сравнению с арсенитом натрия, исследования проводились после острого отравления крыс люизитом.

Нами установлено (табл. 8.5), что имунофан также как и унитиол частично восстанавливает основные показатели НРО.

Таблица 8.5

Влияние имунофана на НРО при остром отравлении крыс люизитом (1,0 ЛД<sub>50</sub>) [M+m]

Показатель	Контроль	Люизит	Люизит + имунофан	Уровень достоверности p<0,05
	1	2	3	
Летальность, %	52,2 $\pm$ 5,8 (72)	86,6 $\pm$ 7,2 (22)	61,1 $\pm$ 12,9 (18)	1-2
LD <sub>50</sub> E. Coli, 10 <sup>9</sup> микро. тел	1,86 $\pm$ 0,14 (72)	1,13 $\pm$ 0,20 (23)	1,39 $\pm$ 0,17 (18)	1-2, 1-3
Et <sub>50</sub> , ч	17,0 $\pm$ 1,1 (72)	9,0 $\pm$ 1,5 (23)	13,0 $\pm$ 1,5 (18)	1-2, 1-3
БАСК, %	85,4 $\pm$ 3,8 (32)	65,9 $\pm$ 5,1 (16)	70,2 $\pm$ 5,0 (18)	1-2, 1-3

Лизоцим, мг/л	8,9 $\pm$ 1,5 (16)	4,5 $\pm$ 1,2 (16)	4,9 $\pm$ 1,0 (18)	1-2, 1-3
Индекс активности нейтрофилов (НСТ-тест)	0,37 $\pm$ 0,02 (16)	0,23 $\pm$ 0,02 (16)	0,29 $\pm$ 0,02 (18)	1-2, 1-3, 2-3

Примечание: в скобках - число животных.

После применения имунофана происходило увеличение выживаемости животных от экспериментальной инфекции, а также ЛД<sub>50</sub> E.Coli и Et<sub>50</sub> (p<0,05) (оценку показателей проводили через 1 сут). При использовании имунофана после отравления крыс люизитом через 6 сут отмечалось уменьшение снижения БАСК (p>0,05), сывороточного содержания лизоцима, активности нейтрофилов в НСТ-тесте по сравнению с показателями после острого отравления МС (p<0,05). При этом полного восстановления до контрольных значений, значительно сниженных действием люизита исследованных показателей НРО, не происходило. Данные параметры оставались статистически значимо более низкими, чем в контроле.

Нами установлено (табл. 8.6), что имунофан вызывал увеличение (p<0,05) гуморального иммунного ответа к Т-зависимому и Т-независимому антигенам. Применение имунофана статистически значимо повышало, сниженную люизитом, активность ЕКК, АЗКЦ и реакцию. ГЗТ.

Таблица 8.6

Влияние имунофана на гуморальные и клеточные иммунные реакции у крыс при остром отравлении люизитом (1,0 ЛД<sub>50</sub>) [М $\pm$ m, n=5-9]

Показатель	Контроль	Люизит	Люизит + имунофан	Уровень достоверности p<0,05
	1	2	3	4
АОК к ЭБ, 10 <sup>3</sup>	40,1 $\pm$ 3,3	15,2 $\pm$ 2,7*	27,8 $\pm$ 3,9	1-2, 1-3, 2-3
АОК к Vi-Ag, 10 <sup>3</sup>	31,2 $\pm$ 3,2	15,5 $\pm$ 2,3*	20,6 $\pm$ 2,5	1-2, 1-3, 2-3
АЗКЦ, %	14,5 $\pm$ 1,3	5,1 $\pm$ 1,1*	9,8 $\pm$ 1,7	1-2, 1-3, 2-3
ЕЦ, %	33,5 $\pm$ 1,5 (30)	15,9 $\pm$ 4,0*	26,5 $\pm$ 2,8	1-2, 1-3, 2-3
ГЗТ, %	32,1 $\pm$ 2,1	14,3 $\pm$ 4,3*	24,7 $\pm$ 2,0	1-2, 1-3, 2-3

Примечание: в скобках – число животных.



Хотя введение имунофана крысам после острой интоксикации люизитом приводило к увеличению показателей системы иммунитета, значительно сниженных действием токсиканта, однако, при этом полного восстановления до контрольного уровня, исследованных параметров не отмечалось. После иммуностимулирующей терапии они оставались ниже контрольных значений.

Эффект имунофана обусловлен его иммуностимулирующим, детоксикационным, гепатопротективным действием, инактивацией свободнорадикальных и перекисных соединений, усилением антиоксидантной защиты организма путем стимуляции продукции церулоплазмينا, лактоферрина, активности каталазы. [Бажигитова Б.Б., Шортанбаев А.А., 2003; Михайлова М.Н. и соавт., 2003; Попова Е.А. и соавт., 2003;; Щеглова М.Ю., Макарова Г.А., 2003]. Данным эффектом облают многие низкомолекулярные пептиды [Чейдо М.А. и соавт., 1990].

Таким образом, при остром отравлении люизитом (1,0 ЛД<sub>50</sub>) иммуностимулятор имунофан повышает основные показатели НРО, гуморального и клеточного иммунитета, однако, он не способен восстановить их до контрольных уровня.

#### 8.4. Воздействие унитиола в комбинации с имунофаном на основные показатели НРО и иммунного статуса

В опытах на белых мышах установлено (табл. 8.7.), комбинированное применение унитиола и имунофана полностью восстанавливало показатели НРО.

Таблица 8.7

Влияние унитиола в комбинации с имунофаном на НРО при остром отравлении крыс люизитом (1,0 ЛД<sub>50</sub>) [M±m]

Показатель	Контроль	Люизит	Люизит + унитиол+ имунофан	Уровень достовер- ности p<0,05
------------	----------	--------	----------------------------------	---

	1	2	3	4
Летальность, %	52,2 $\pm$ 5,8 (72)	86,6 $\pm$ 7,2 (22)	46,7 $\pm$ 12,9 (15)	1-2, 2-3
LD <sub>50</sub> E. Coli, 10 <sup>9</sup> микр. тел	1,86 $\pm$ 0,14 (72)	1,13 $\pm$ 0,20 (23)	1,97 $\pm$ 0,20 (15)	1-2, 2-3
Et <sub>50</sub> , ч	17,0 $\pm$ 1,1 (72)	9,0 $\pm$ 1,5 (23)	18,2 $\pm$ 1,7 (15)	1-2, 2-3
БАСК, %	85,4 $\pm$ 3,8 (32)	65,9 $\pm$ 5,1 (16)	87,5 $\pm$ 5,7 (15)	1-2, 2-3
Лизоцим, мг/л	8,9 $\pm$ 1,5 (16)	4,5 $\pm$ 1,2 (16)	9,1 $\pm$ 1,6 (15)	1-2, 2-3
Индекс активности нейтрофилов (НСТ-тест)	0,37 $\pm$ 0,02 (16)	0,23 $\pm$ 0,02 (16)	0,40 $\pm$ 0,02 (15)	1-2, 2-3

Примечание: в скобках - число животных.

Использование антидота люизита унитиола и иммуностимулятора имунофана приводило к полному восстановлению основных показателей гуморально и клеточного иммунитета (табл. 8.8.).

Таблица 8.8

Влияние унитиола в комбинации с имунофаном на гуморальные и клеточные иммунные реакции у крыс при остром отравлении люизитом (1,0 ЛД<sub>50</sub>) [M $\pm$ m, n=5-9]

Показатель	Контроль	Люизит	Люизит + унитиол+ имунофан	Уровень достовер- ности p<0,05
	1	2	3	4
АОК к ЭБ, 10 <sup>3</sup>	40,1 $\pm$ 3,3	15,2 $\pm$ 2,7	42,0 $\pm$ 4,3	1-2, 2-3
АОК к Vi-Ag, 10 <sup>3</sup>	31,2 $\pm$ 3,2	15,5 $\pm$ 2,3	33,4 $\pm$ 3,1	1-2, 2-3
АЗКЦ, %	14,5 $\pm$ 1,3	5,1 $\pm$ 1,1	15,9 $\pm$ 1,8	1-2, 2-3
ЕЦ, %	33,5 $\pm$ 1,5 (30)	15,9 $\pm$ 4,0	35,0 $\pm$ 3,6	1-2, 2-3
ГЗТ, %	32,1 $\pm$ 2,1	14,3 $\pm$ 4,3	33,6 $\pm$ 2,4	1-2, 2-3

Примечание: в скобках – число животных.

Учитывая то, что супрессия показателей НРО и иммунного статуса при остром отравлении арсенитом натрия менее выражена, можно вполне обоснованно полагать, что при острой интоксикации арсенитом натрия комбинированное использование унитиола и имунофана полностью

обеспечит восстановление показателей НРО, гуморального и клеточного иммунитета.

Таким образом, при остром отравлении люизитом (1,0 ЛД<sub>50</sub>) комбинированное применение его антидота унитиола и иммуностимулятора имунофана полностью восстанавливает основные показатели НРО, Т-, В-звена иммунитета, АЗКЦ и активность ЕКК.

### **Выводы по главе**

1. При остром отравлении мышьяксодержащими соединениями – люизитом и арсенитом натрия (1,0 ЛД<sub>50</sub>) – их антидот унитиол в терапевтических дозах повышает основные показатели НРО, однако, они остаются ниже контрольного уровня.

2. Применение антидота унитиола в терапевтических дозах при острой интоксикации люизитом и арсенитом натрия в дозе 1,0 ЛД<sub>50</sub> хотя и увеличивает показатели гуморального и клеточного иммунитета, однако, он не восстанавливает их до контрольных значений.

3. Сравнительная характеристика наиболее часто используемых в клинике иммуностимуляторов свидетельствует о том, что имунофан при острой интоксикации арсенитами является препаратом выбора.

4. Применение после острого отравления люизитом в дозе 1,0 ЛД<sub>50</sub> (как наиболее иммунотоксичным арсенитом) иммуностимулятора имунофана частично восстанавливает основные показатели НРО, гуморального и клеточного иммунитета.

5. При остром отравлении люизитом (1,0 ЛД<sub>50</sub>) комбинированное применение его антидота унитиола и иммуностимулятора имунофана полностью восстанавливает основные показатели НРО, Т-, В-звена иммунитета, АЗКЦ и активность ЕКК.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Острые и хронические интоксикации соединениями трехвалентного мышьяка может происходить при его применении в различных областях промышленности, получении и использовании пестицидов, содержащих его лекарственных средств, употреблении пищи и воды, содержащих данный элемент, вдыхании его соединений в производственных условиях, действии боевых отравляющих веществ (БОВ), содержащих мышьяк (люизит, адасит) и соединений образующихся при их уничтожении. В большинстве продуктов присутствие мышьяка объясняется широким использованием его соединений (мышьяковистый ангидрид, мышьяковистый кальций, мышьяковистокислый натрий, парижская зелень и др.), обладающих высокой биологической активностью, в сельскохозяйственной химии в качестве родентицидов, инсектицидов, фунгицидов, древесных консервантов и стерилизаторов почвы. Мышьяк применяют в производстве стекла, красителей, полупроводников [Ершов Ю.А., Плетнева П.В., 1989; Забродский П. Ф., 1998]. в-хлорвинилдихлорарсин (люизит) относится к БОВ кожно-нарывного действия, которые широко принялись в период первой мировой войны и ряде локальных вооруженных конфликтов 20 столетия [Саватеев Н.В., 1978; Александров В.Н., Емельянов В.И., 1990; Бадюгин И.С. и соавт., 1991; Munro N.B. et al., 1990]. В настоящее время развитые страны, имеющие на вооружении данное БОВ, активно ведут его уничтожение. Ряд продуктов деструкции люизита являются сильно токсичными химическими соединениями и способны в случае аварий на химических предприятиях оказывать поражение организма в целом такое же, как и острое отравление в-хлорвинилдихлорарсином.

Высокая токсичность трехвалентных соединений мышьяка и, прежде всего, люизита при острых отравлениях обуславливает их значительную тяжесть. Данные интоксикации могут сопровождаться высокой смертностью, одной из причин которой могут являться инфекционные осложнения,

связанные со снижением показателей системы иммунитета. В настоящее время нарушения иммунного гомеостаза при остром действии соединениями трехвалентного мышьяка исследованы недостаточно [Забродский П. Ф., 1998, 2002; Bums L.A. et al., 1993]. При этом иммунотоксичность продуктов утилизации в-хлорвинилдихлорарсином, в частности, арсенита натрия практически не изучена.

Люизит, так и соединения, образующиеся в ходе технологических процессов переработки химического оружия (ХО) (арсенит натрия, треххлористый мышьяк), могут оказывать иммунотоксическое действие на персонал объектов по хранению и уничтожению ХО, а также население, проживающее вблизи подобных объектов. Иммунотоксический эффект эти вещества могут проявлять при воздействии достаточно низких доз ввиду высокой чувствительности иммунной системы к ксенобиотикам [Забродский П.Ф., 2002; Descotes G., 1986; Luster M. J. et al., 1987].

Актуальность исследования иммунотоксичности люизита и продуктов его переработки очевидна. Это связано с тем, что на базах Министерства Обороны РФ находятся на хранении большие количества мышьяксодержащих веществ: люизита, адамсита, дифенилхлорарсина. Запасы люизита на момент начала его уничтожения согласно Конвенции о запрещении разработки, производства, накопления и применения химического оружия и о его уничтожении, составляют порядка 7,5 тысяч тонн в местах его хранения в Саратовской области и Удмуртии. Кроме того, на территории Саратовской области находится могильник, содержащий около 3 тысяч тонн адамсита и дифенилхлорарсина.

Вышеизложенное в полной мере обосновывает необходимость оценки нарушений НРО и иммунного гомеостаза после острых отравлений мышьяксодержащими химическими веществами, в частности люизитом и арсенитом натрия.

Необходим выбор наиболее приемлемых иммуностимуляторов из большого арсенала препаратов этой группы, имеющихся в настоящее время,

что позволит проводить научно обоснованную профилактику и лечение возникающих при интоксикациях мышьяксодержащими соединениями многочисленных инфекционных, аллергических, аутоиммунных и онкологических заболеваний [Шубик 1976; Каган Ю.С., 1977; Хаитов Р. М. и соавт., 1995; Забродский П. Ф., 1986; 1998; Georgiev V. S, Yamaguuchi H., 1993].

По токсикологической классификации мышьяк и его соединения относится к ядам кожно-резорбтивного действия, вызывающим местные воспалительные изменения в сочетании с общетоксическими явлениями; по «избирательной токсичности» - к желудочно-кишечным, по патофизиологической (по типу развивающейся гипоксии) – к вызывающим циркуляторную гипоксию (нарушение микроциркуляции крови, экзотоксический шок) [Саватеев Н.В., 1978; Мошкин Е.А. и соавт., 1980; Лужников Е.А., 1982; Лудевиг Р., Лос К., 1983; Могуш Г., 1984; Лужников Е.А., Костомарова Л.Г., 1989, 2000; Бадюгин И.С. и соавт., 1992; Маркова И.В. и соавт., 1998].

Симптоматика общетоксических проявлений при остром отравлении люизитом прежде всего связана с тяжелыми поражениями ЦНС (после кратковременного возбуждения, обусловленного болевой импульсацией, развитие глубокой апатии, адинамии, депрессии), вегетативных отделов нервной системы (тошнота, рвота, общая гипер-, или гипотермия, глубокая прогрессирующая гипотония, гипотрофия), аппарата кровообращения (первичный коллапс, экзотоксический шок, токсический миокардит и миокардиодистрофия, острая сердечная недостаточность) [Саватеев Н.В., 1978; Мошкин Е.А. и соавт., 1980; Лужников Е.А., 1982; Лудевиг Р., Лос К., 1983; Могуш Г., 1984; Лужников Е.А., Костомарова Л.Г., 1989, 2000; Бадюгин И.С. и соавт., 1992; Маркова И.В. и соавт., 1998].

Летальность при отравлениях соединениями мышьяка, ранее достигавшая 65-84%, при современных методах лечения составляет 15-19% [Лужников Е.А., Костомаров Л.Г. 1989].

Острое отравления арсенитом натрия вызывает сонливость, ослабление дыхания, саливацию, понос, непроизвольное мочеиспускание, уменьшение диуреза, выделение мочи с примесью крови, желтушность склер, тремор, нарушение терморегуляции, координации движений, параличи, судороги . [Давыдова В.И., 1989].

Таким образом, люизит и арсенит натрия ингибируя кроме моно- и дитиоловых ферментов, гидролазы, оксидазы, энзимы, определяющие пуриновый обмен и синтез АТФ, вызывают при острой интоксикации поражение практически всех органов и систем организма.

Данные литературы свидетельствуют, что всестороннего анализа действия люизита и арсенита натрия на НРО и основные показатели системы иммунитета до сих пор не проведено. Не решена проблема использования антидотов и различных иммуностимуляторов для восстановления постинтоксикационных нарушений системы иммунитета.

Нами показано, что, после острой интоксикации люизитом и арсенитом натрия происходит дозозависимое увеличение летальности животных от экспериментального перитонита, вызванного *E. coli*, а также уменьшение ЛД<sub>50</sub> *E. coli* и среднеэффективного времени жизни животных, что свидетельствует о снижении неспецифической резистентности организма под влиянием мышьяксодержащих соединений. Отмечается тенденция к более выраженному действию люизита по сравнению с арсенатом натрия в эквивалентных дозах.

Нами экспериментально установлено, что после острого отравления люизитом и арсенитом натрия происходит дозозависимое увеличение летальности животных от экспериментального перитонита после предварительной иммунизации, дозозависимое уменьшение ЛД<sub>50</sub> *P. vulgaris* и среднеэффективного времени жизни животных, что свидетельствует о снижении под влиянием МС неспецифической и иммунологической резистентности организма. Эффект люизита в эквивалентных дозах более выражен, однако статистически не значим.

Под влиянием острого отравления мышьяксодержащими соединениями в дозах 0,2; 0,5 и 1,0 LD<sub>50</sub> происходит дозозависимое снижение БАСК в течение 6-9 сут. Через 9 сут показатель снижался по сравнению с контролем незначительно ( $p>0,05$ ). Действие люизита в эквивалентных дозах незначительно превышает эффект арсенита натрия.

БАСК зависит от многих неспецифических факторов защиты организма и является одним из параметров, используемых для изучения влияния химических соединений на организм [Шафеев М. Ш., 1976; 1978; Евсеев В. А., Магаева Е. В., 1985; Забродский П. Ф., 1987]. Данный показатель является чувствительным тестом для выявления ранних изменений в организме под влиянием токсических веществ [Бухарин О. В. и соавт., 1985]. Это доказано и более поздними исследованиями [Забродский П. Ф., 1998, Забродский П. Ф. и соавт., 2002].

Редукция БАСК определяется активностью гуморальных и клеточных факторов НРО: сывороточной активностью лизоцима, тромбоцитарного катионного белка (ТКБ), комплемента и других факторов. При остром отравлении МС снижение БАСК может быть обусловлено супрессией данных параметров вследствие нарушения их синтеза, взаимодействием с МС, приводящим к уменьшению или потере их активности, а также снижением секреции их из клеток крови. В настоящее время доказано, что БАСК может определяться пептидными антибиотиками, синтезируемыми организмом животных и человека. Эти антибиотики, действующие на *E.Coli*, *Salmonella typhimurium*, *Streptococcus pyogenes* и другие микроорганизмы, открыты и изучены в начале 90-х годов последнего столетия [Voman H.G., 1995]. Не исключено, что МС могут инактивировать их.

Под влиянием арсенитов в дозах 0,2; 0,5 и 1,0 LD<sub>50</sub> происходит дозозависимое снижение активности лизоцима до 9 сут. Существенное снижение активности показателя отмечается под влиянием мышьяксодержащих соединений в дозах 0,5 и 1,0 LD<sub>50</sub> через 6 сут после



острого отравления. Эффект арсениита натрия в эквивалентных дозах несущественно менее выраженный, чем действие люизита.

Ферментативная специфичность лизоцима заключается в разрушении связи между N-ацетилмураминовой кислотой и N-ацетилглюкозамином в мукополисахариде, образующем оболочку многочисленных микроорганизмов, особенно грамположительных [О.В.Бухарин, Васильев Н.В., 1974]. Супрессия сывороточной активности лизоцима под влиянием арсенитов может быть связана с нарушением функции пируватоксидазной системы нейтрофилов вследствие ингибирования моно- и дитиоловых энзимов, в частности, сульфгидрильных групп липоевой кислоты [Страйер Л., 1985; Куценко С.А. и соавт., 2004], а также с инактивацией б-нафтил-AS-D-хлорацетатэстеразы нейтрофилов [Хейхоу Ф. Г. Дж., Кваглино Д., 1983]. Редукция синтеза лизоцима, вероятно, может происходить также вследствие воздействия МС на ДНК, что приводит к нарушению нуклеинового обмена [Голиков С.Н. и соавт., 1986].

Арсениты – люизит и арсенит натрия – в дозах 0,2; 0,5 и 1,0 LD<sub>50</sub> вызывают дозозависимое снижение фагоцитарно-метаболической активности нейтрофилов до 6 сут. Тенденция к снижению показателя отмечается при дозе мышьяксодержащих соединений 1,0 LD<sub>50</sub> через 9 сут. Действие люизита в эквивалентных дозах несущественно превышает эффект арсениита натрия.

В настоящее время получены данные, свидетельствующие о том, что в фагоцитарной реакции активное участие принимает радикал оксида азота (NO<sub>x</sub>), макрофаги продуцируют ИЛ-1, ИЛ-6, ИЛ-8, ИЛ-12 и TNF-б (б-фактор некроза опухоли), простагландины, лейкотриен В<sub>4</sub> (LTB<sub>4</sub>), фактор, активирующий тромбоциты. Нейтрофилы синтезируют и выделяют в кровь TNF-б и ИЛ-12, а также хемокин ИЛ-8 [Хаитов Р. М. и соавт., 2000].

Снижение фагоцитарно-метаболической активности нейтрофилов крыс, видимо, обусловлено блокированием моно- и дитиоловых ферментов пируватоксидазной системы клетки [Саватеев Н.В., 1978; Страйер Л., 1985;

Забродский П.Ф., 1998], а также б-нафтил-AS-D-хлорацетатэстеразы нейтрофилов [Хейхоу Ф. Г. Дж., Кваглино Д., 1983]. Кроме того, редукция данного показателя обусловлена реализацией общих механизмов токсичности – инициированием процессов перекисного окисления липидов мембран нейтрофилов, нарушением процессов тканевого дыхания и его сопряжения с окислительным фосфорилированием, мембранотоксическим эффектом [Голиков С.Н. и соавт., 1986].], Установлено, что оксид азота, принимающий участие в реализации повреждения мембраны чужеродной клетки фагоцитом, способен вступать во взаимодействие с сульфгидрильными группами с образованием нестабильных нитрозотиолов, период полусуществования которых в организме составляет до 5 сут [Куценко С.А. и соавт., 2004]. Взаимодействие SH-групп с МС (трехвалентным мышьяком) нарушает обмен NO, что вероятно, может приводить к различным нарушениям иммунных механизмов, требующих участия оксида азота. Следует отметить, что данный механизм в настоящее время совершенно не изучен.

Выявленное снижение показателей НРО при острой интоксикации МС обусловлено ингибированием моно- и дитиоловых ферментов (в частности, дегидролипоевой кислоты пируватоксидазной системы), моноаминоксидазы, аланинаминотрансферазы, аспартатаминотрансферазы, снижением функции кофермента А, нарушением цикла трикарбоновых кислот, блокированием ДНК-полимеразы, снижением образования АТФ из АДФ (разобщением окисления и фосфорилирования) [Ершов Ю.А., Пастнева Т.В., 1989; Забродский П.Ф., 1998].

Лимфоидные индексы (ЛИ) тимуса и селезенки отражают содержание лимфоцитов в данных органах [Descotes J. ,1986 Van Loveren. H.]. Исследование влияния острой интоксикации мышьяксодержащих соединений (МС) на лимфоидные индексы (ЛИ) тимуса и селезенки беспородных белых крыс проводилось через 2, 4, 6 сут после отравления. В период 1-4 сут при острых воздействиях ядов на животных, как правило, происходит

снижение ЛИ тимуса и селезенки и последующее восстановление их массы к 6–7 сут [Забродский П.Ф., 1998; Descotes J., 1986].

Под влиянием острой интоксикации мышьяксодержащими соединениями люизитом и арсенитом натрия происходит дозозависимое уменьшение лимфоидного индекса тимуса и селезенки (в диапазоне доз 0,2 – 1,0 ЛД<sub>50</sub>) в течение 4 сут с последующим увеличением этих показателей к 6 суткам.

Зарегистрированные изменения носят как неспецифический, так и специфический характер. Неспецифические изменения, вероятно, обусловлены кратковременной активацией гипоталамо-гипофизарно-надпочечниковой системы (стресс-реакция) с последующей реализацией апоптоза Т- и В-клеток [Durant S., 1986], а специфические связаны с нарушением функции пируватоксидазной системы лимфоцитов [Страйер Л., 1985; Забродский П.Ф., 1998]. Аналогичные сдвиги были обнаружены при тяжелой механической травме [Александров В.Н., 1983] не исключают действие кортикостероидов и катехоламинов, вызывающих уменьшение массы селезенки вследствие выхода из нее лимфоцитов в циркулирующую кровь [Горизонтов П.Д., 1981a].

Острая интоксикация мышьяксодержащими соединениями (0,2; 0,5 и 1,0 ЛД<sub>50</sub>) вызывает дозозависимое уменьшение числа лимфоцитов в тимусе и селезенке в течение 2-4 сут с последующим восстановлением этих показателей к 8 суткам.

Данные литературы дают основания полагать, что уменьшение числа лимфоцитов в селезенке обусловлено снижением в органе количества как Т, так и В-лимфоцитов [Забродский П.Ф., 1998, 2002]. Вероятно, уменьшение клеток в органе наряду с неспецифическими механизмами, обусловлено ингибированием моно- и дитиоловых ферментов пируватоксидазной системы лимфоцитов [Ленинджер А., 1974; Страйер Л., 1985].

После острой интоксикации мышьяксодержащими соединениями в дозах 0,2; 0,5 и 1,0 LD<sub>50</sub> через 2 сут происходит дозозависимое уменьшение числа лимфоцитов в органах системы иммунитета и циркулирующей крови.

Уменьшение лимфоцитов в крови и органах системы иммунитета можно объяснить поражением лимфоидной стволовой кроветворной клетки, а также зрелых лимфоцитов реализацией следующих механизмов: нарушением тканевого дыхания, окислительного фосфорилирования, а также эффектом разобщения этих процессов, повреждением мембран клеток и целообъясняется, замещением фосфора мышьяком в ДНК полипотентной стволовой кроветворной клетки (ПСКК) [Давыдова В.И., 1989] (и прежде всего, лимфоидной стволовой кроветворной клетки), инактивацией тиоловых ферментов лимфоцитов и эстерах Т-клеток [Страйер Л., 1985; Забродский П.Ф., 1998, 2002]. Не исключена инициация процессов апоптоза лимфоцитов [Ройт А. и соавт. 2000].

До последнего времени в литературе содержание колониеобразующих единиц в селезенке (КОЕс) после летального облучения мышей с экранированием S голени описывают, как отражение функции стволовых кроветворных клеток, в частности, их способность к миграции [Петров Р.В., Хаитов Р.М., 1972; Петров Р.В. и соавт., 1981; Корнева Е.А., 1990; Забродский П.Ф., Киричук В.Ф. и соавт., 1997; Забродский П.Ф., 1993; 1998; 2000].

Острое действие мышьяксодержащими соединениями в дозах 0,2; 0,5 и 1,0 LD<sub>50</sub> через 8 сут приводит к дозозависимому уменьшению числа КОЕс. В эквилетальных дозах действие арсенитом натрия по сравнению с люизитом о более выражено ( $p > 0,05$ ).

Снижение содержания КОЕ в селезенке после острой интоксикации МС обусловлено, возможно, гибелью СКК, КОЕс, апоптозом лимфоцитов, снижением миграции КОЕс вследствие инактивации их эстераз, нарушением пируватокислородной системы СКК (КОЕс) [Ленинджер А., 1974; Диксон М., Уэбб Э., 1982; Страйер Л., 1985; Хаитов Р.М. и соавт., 2000; Забродский П.Ф., 1998, 2002]. Уменьшение миграции КОЕ из костного мозга в селезенку

под влиянием арсенитов может быть обусловлено ингибированием тканевого дыхания и окислительного фосфорилирования в СКК, лимфоидных стволовых клетках, КОЕс, нарушением функции ферментов этих клеток в результате взаимодействия с их сульфгидрильными группами, о чем свидетельствуют результаты, полученные при изучении токсикокинетики и токсикодинамики метаболитов ядовитых спиртов [Iokobsen D. et al., 1984; Gabon P.A. et al., 1986]. Трехвалентный мышьяк влияет на митоз, синтез и распаривание ДНК. Механизм токсического действия на СКК (КОЕс) может быть преимущественно связан с блокированием тиоловых групп ДНК-полимеразы [Ершов Ю.А., Плетнева П.В., 1989].

В целом при исследовании вышеописанных иммунных реакций в эквивалентных дозах действие люизита по сравнению с арсенитом натрия более выражено ( $p > 0,05$ ).

Под влиянием острой интоксикации арсенитами в дозах, составляющих 0,2; 0,5 и 1,0 ЛД<sub>50</sub>, происходит дозозависимое снижение Т-зависимого антителообразования, оцениваемого по числу АОК к ЭБ в селезенке через 5 сут после иммунизации, преимущественно в продуктивный период антителопродукции. В целом, острое действие люизита по сравнению с эффектом арсенита натрия на синтез IgM В-клетками селезенки более выражено ( $p < 0,05$ ).

Результаты проведенных нами исследований свидетельствуют о снижении под влиянием МС функции Th1-лимфоцитов, индуцирующих синтез IgM [Pfeifer C. et al., 1991] В-клетками селезенки, в большей степени в продуктивной фазе антителогенеза по сравнению с индуктивной. Это может быть вызвано большим поражающим эффектом арсенитов и их метаболитов на синтез IgM В-лимфоцитами (плазмоцитами) спленоцитов, нарушением процессов дифференцировки В-клеток, а также их перераспределения лимфоцитов между органами системы иммунитета в период максимальной антителопродукции (3-5 сут после иммунизации). Нельзя исключить и ингибирующее синтез антител действие кортикостероидов [Claman H.N.,

1993; Ройт А. и соавт., 2000; Забродский П.Ф., 1993, 1998, 2002], концентрация которых в крови при действии различных токсикантов увеличивается (стресс-реакция) [Селье Г., 1972].

По-видимому, под влиянием арсенитов в продуктивной фазе иммуногенеза по сравнению с индуктивным периодом происходит также более выраженная редукция функции Th1-лимфоцитов, индуцирующих синтез IgM [Pfeifer C. et al., 1991; Ройт А. и соавт., 2000]. Данные литературы свидетельствуют, что цГМФ участвует в пролиферации лимфоцитов, а цАМФ – в их дифференцировке. В продуктивном периоде антителогенеза осуществляется преимущественно дифференцировка В-лимфоцитов под влиянием цАМФ. По-видимому, МС оказывают большее действие на цАМФ, чем на цГМФ, поэтому их супрессивный эффект в продуктивный период больше, чем в индуктивный [Петров Р.В., 1982; Ройт А. и соавт., 2000].

Острая интоксикация мышьяксодержащими соединениями в дозах, составляющих 0,2; 0,5 и 1,0 ЛД<sub>50</sub>, вызывает дозозависимое увеличение синтеза IgG плазмócитами селезенки, оцениваемого по числу АОК к ЭБ в селезенке через 8 сут после иммунизации, что свидетельствует о снижении функции Th2-лимфоцитов и В-клеток.

Редукция синтеза IgG под влиянием арсенитов, видимо, обусловлены ингибированием моно- и дитиоловых энзимов лимфоцитов, а также эстераз Т-лимфоцитов и макрофагов [Хейхоу Ф.Г.Дж., Кваглино Д., 1983; Забродский П. Ф., 1998] как самими токсикантами, так и их метаболитами. Редукция синтеза IgG может быть обусловлена снижением процессов тканевого дыхания и уменьшением окислительного фосфорилирования (синтеза АТФ) в Т- и В- лимфоцитах [Ротенберг Ю.С., 1980; Давыдова В.И., 1989]. Данные литературы позволяют считать, что редукция синтеза IgG под влиянием МС обусловлена их действием на Th2-лимфоциты [Pfeifer C. Et al., 1991; Georgiev V.St., Albright J.E., 1993].

После острой интоксикации мышьяксодержащими соединениями в дозах, составляющих 0,2; 0,5 и 1,0 ЛД<sub>50</sub>, происходит дозозависимое снижение

Т-независимой антителопродукции, оцениваемой по числу АОК к Vi-Ag в селезенке через 5 сут после иммунизации, преимущественно в продуктивный период иммуногенеза, что обусловлено супрессией функции В-лимфоцитов.

Под влиянием люизита и арсенита натрия *in vitro* существенно нарушается кооперация Т- и В-лимфоцитов. Мышьяксодержащие соединения в прямой зависимости от концентрации ( $10^{-5}$ ,  $10^{-4}$  и  $10^{-3}$  М) снижают кооперацию лимфоцитов, поражая преимущественно Т-клетки. Действие люизита на кооперацию лимфоцитов по сравнению с арсенитом натрия более выражено ( $p < 0,05$ ).

Установленная нами более выраженная супрессия Т-зависимого антителообразования под влиянием арсенитов, как и большинства токсикантами [Забродский П.Ф., 1998, 2002; Descotes J., 1986] обусловлена, наряду с другими механизмами, действием ксенобиотиков одновременно на макрофаги, В-лимфоциты и Т-клетки (в использованной нами экспериментальной модели на субпопуляцию Th1), участвующие в реализации данной иммунной реакции, в то время как Т-независимый иммунный ответ обеспечивается в основном функцией В-клеток, активируемых антигеном в присутствии ИЛ-1, секретируемом макрофагами [Gillbert K. M. et al., 1985]. Вполне естественно, что иммунотоксическое действие на три элемента, взаимодействующих в процессе антителообразования, проявляется значительно большим его угнетением, чем при поражении одного или двух элементов, если нет оснований предполагать реализации селективного иммунотропного эффекта.

Кроме того, снижение Т-зависимой антителопродукции под арсенитов более выражено, чем Т-независимого антителообразования, так как для него не требуется синтеза ряда лимфокинов, синтезируемых Т-клетками (фактора BSF-1, активирующего В-клетки, росткового фактора В-клеток – BCGF-II, стимулирующего клональную экспансию активированных клеток, фактора дифференцировки В-клеток  $\mu$  (BCDF $\mu$ ), который способствует созреванию клеток с высокой скоростью секреции IgM, BCDF $\gamma$ , вызывающий

прекращение синтеза с IgM на IgG и высокую скорость его продукции) [Ройт А., 1991].

Под влиянием острой интоксикации мышьяксодержащими соединениями (0,2; 0,5 и 1,0 ЛД<sub>50</sub>) происходит дозозависимое снижение функции Т-клеток, оцениваемой по ингибированию миграции лейкоцитов, в течение 1-6 сут. Практически полное восстановление показателя происходило к 9 сут.

Вероятно, снижение функции Т-лимфоцитов обусловлено ингибирующим действием кортикостероидов [Забродский П.Ф и соавт., 2000; Tiefenbach B. et al., 1983, 1985], секреция которых в течение 6-12 ч существенно увеличивается в результате стресс-реакции [Лемус В.Б., Давыдов В. В., 1974; Street J.C., Sharma R.P. , 1975; Tiefenbach B. , Wichner S., 1985; Dhabhar F. S. et al., 1996], ингибированием эстераз Т-лимфоцитов [Хусинов А.А. и соавт., 1991; Забродский П.Ф., 1993; Fergula J. et al., 1972], повреждением м- и н-холинорецепторов, содержащих SH-группы, лимфоцитов и нарушением функции их пируватоксидазной системы вследствие взаимодействия МС с моно- и дитиоловыми ферментами [Трахтенберг И.М., Шафран Л.М., 2002].

Восстановление показателя к 9 сут, свидетельствует о том, что ПСКК у крыс к этому сроку после действия МС обеспечивает образование числа лимфоцитов, соответствующих контрольному уровню [Чертков И.Л. и соавт., 1990].

Оценка формирования ГЗТ под влиянием МС в модели, не связанной с переносом клеток, позволяет установить его действие на клеточный иммунитет, в частности, на функцию Th1 и продукцию ими ИЛ-1, ИЛ-3,  $\gamma$ -интерферона,  $\beta$ -фактора некроза опухоли и гранулоцитарно-макрофагального колониестимулирующего фактора (ГМ-КСФ) лимфоцитов [Georgiev V.St., Albright J.E., 1993], а также на участвующие в реализации гиперчувствительности IV типа Т-клетки памяти и макрофагов [Ройт А., 1991].



Острая интоксикация мышьяксодержащими соединениями в дозах, составляющих 0,2; 0,5 и 1,0 ЛД<sub>50</sub>, обуславливает дозозависимое снижение реакции ГЗТ, характеризующую первичный клеточный иммунный ответ и функцию Th1-лимфоцитов. Эффект люизита несущественно выше действия арсенита натрия.

Данные литературы позволяют полагать, что Th1-лимфоциты обеспечивают реализацию реакции ГЗТ путем активации макрофагов. В основном Th1 регулируют физиологические механизмы, обеспечивающие функцию Т-звена иммунитета [Хаитов Р.М и соавт., 2000; Georgiev V.St., Albright J.E., 1993; Kimber I., 1996]. Полученные нами результаты косвенно свидетельствуют о том, что МС уменьшают способность Th1-лимфоцитов синтезировать ИЛ-1, ИЛ-3,  $\gamma$ -интерферон и  $\beta$ -фактор некроза опухоли (лимфотоксин), участвующие в реализации реакции ГЗТ [Kimber I., 1996]. Кроме того, МС, по-видимому, снижают активность и других клеток, обеспечивающих формирование ГЗТ, в частности, Т-клеток памяти и макрофагов [Ройт А., 1991]. Определенную роль в супрессии иммунных реакций, вероятно, играют метаболиты люизита, особенно хловиниларсеноксид. Можно предположить, что арсениты нарушают регуляцию функции Т-клеток вследствие взаимодействия с сульфгидрильными группами их м- и н-холинорецепторов, играющими очень важную роль в обмене циклических нуклеотидов Т-лимфоцитов и их пролиферации [Richman D.P., Arnason B.G.W., 1979].

Под влиянием острой интоксикации мышьяксодержащими соединениями в дозах, составляющих 0,2; 0,5 и 1,0 ЛД<sub>50</sub>, происходит дозозависимое уменьшение АЗКЦ, свидетельствующее о снижении функции К-клеток и ПЯЛ. Действие арсенита натрия менее выражено, чем эффект люизита ( $p > 0,05$ ) несущественно выше действия.

Помимо описанных в предыдущих разделах механизмов иммунотоксичности арсенитов, следует отметить, что данные соединения, вероятно, способны, как и ФОС (антихолинэстеразное действие,

взаимодействие с холинорецепторами лимфоцитов), уменьшать АЗКЦ вследствие нарушения электролитного обмена клетки и изменения соотношения цАМФ/цГМФ [Trinchiev G., de Marchi M., 1976].

Естественные клетки-киллеры характеризуются поверхностными маркерными молекулами CD16, CD56, CD57 и CD94. В настоящее время выявлены и другие молекулы на поверхности ЕКК общие с Т-клетками. ЕКК представлены преимущественно клетками с маркерами CD16, CD56 [Хаитов Р.М. и соавт., 2000; Ройт А. и соавт., 2000]. Вступая в контакт с клетками опухоли, клетками, пораженными вирусами или паразитами, ксеногенными клетками ЕКК способны уничтожать их без предварительного взаимодействия с антигенами, находящимися на их поверхности. Они узнают определенные структуры высокомолекулярных гликопротеидов, которые экспрессируются на мембране инфицированных вирусом клеток. Последние достижения в иммунологии, свидетельствуют о том, что ЕКК и К-клетки это одни и те же клетки, отличающиеся лишь механизмами реализации киллинга (убийства) клеток-мишеней. В настоящее время иммунный ответ рассматривают, как «процесс взаимодействия антигена и организма, распознавания поврежденных патогеном клеток и тканей лимфоцитами с целью деструкции и выведения их из организма» [Хаитов Р.М. и соавт., 2000]. Исходя из данного определения, ЕКК осуществляют одну из функций иммунитета и не относятся к НРО.

После острой интоксикации мышьяксодержащими соединениями (0,2; 0,5 и 1,0 ЛД<sub>50</sub>) происходит дозозависимое снижение активности ЕКК в течение 1-6 сут. Практически полное восстановление показателя происходило к 9 сут. Статистически значимого отличия в действии люизита и арсенита натрия на активности ЕКК у крыс, не отмечалось.

Снижение активности ЕКК под влиянием МС, по-видимому, связано с ингибированием их эстераз ЕКК, как предполагаемых потомках предшественников Т-клеток [Ройт А., 1991]. Эффекты кортикостероидов и катехоламинов вследствие активации возможной активации МС гипоталамо-

гипофозарно-адреналовой системы [Забродский П.Ф., 1993, 2000; Szot R.J., Murphy S.D., 1970; Tiefenbach B. et al., 1980, 1983, 1985] также обуславливают редукцию активности ЕКК [Madden K. S., Livnat S., 1991; Claman H.N., 1993]. Взаимодействие МС с сульфгидрильными группами холинорецепторов ЕКК также может являться одним из факторов, вызывающих редукцию активности ЕКК [Трахтенберг И.М., Шафран Л.М., 2002].

Супрессия функциональной активности ЕКК после острой интоксикации арсенитами может быть связана со снижением функции некоторых ферментов ЕКК (сукцинатдегидрогеназы, альдегиддегидрогеназы, глутаминсинтетазы, тиолтрансацилазы, люциферазы, ацетил-КоА-карбоксилазы), которое резко усиливается в присутствии МС, взаимодействующих с моно- и дитиоловыми энзимами [Забродский П.Ф., 1998].

Мышьяксодержащие соединения *in vitro* в прямой зависимости от концентрации ( $10^{-6}$ ,  $10^{-5}$  и  $10^{-4}$  М) уменьшают активность ЕКК. Эффект люизита статистически достоверно превышает действие арсенита натрия ( $p < 0,05$ ).

Выявленная супрессия активности ЕКК *in vitro* позволяет считать, что данный эффект связан с ингибированием эстераз, моно- и дитиоловых ферментов ЕКК, взаимодействием МС с холинорецепторами лимфоцитов, нарушением образования NO, а также общетоксическими эффектами: нарушением тканевого дыхания, мембранотоксическим действием, инициацией перекисного окисления мембран ЕКК [Голиков С.Н. и соавт., 1986; Ройт А., 1991; Забродский П.Ф., 1998; Куценко и соавт., 2004].

Под влиянием данных изменений редукция активности ЕКК при отравлении арсенитов может быть обусловлена блокированием проникновения гранзимов из гранул ЕКК в цитоплазму клетки-мишени, а также снижением их синтеза. Кроме того, может быть реализовано нарушение процесса порообразования перфорином ЕКК [Ройт и соавт., 2000;

Nogueira N., 1984], а также индукцией апоптоза [Хаитов Р. М. и соавт., 2000; Kimber I., More M., 1985; Marx J.L., 1986].

Неспецифические эстеразы являются лизосомальными ферментами. Они играют важную роль в реализации киллерной функции Т-лимфоцитов [Ледванов М. Ю., Киричук В. Ф., 1996; Ferluga J. et al., 1972; Li C. Y. et al., 1973]. Изменение эстеразной активности в клетках отражает, с одной стороны, функциональную активность иммуноцитов, с другой - может служить количественным критерием Т-клеток в циркулирующей крови, так как именно эта субпопуляция лимфоцитов является эстеразопозитивной [Хейхоу Ф. Г. Дж., Кваглино Д., 1983; Ferluga J. et al., 1972; Li C. G et al., 1973; Kutty K. M. et al., 1976; Kullenkampff J. et al., 1977].

Под влиянием острой интоксикации арсенитами (1,0 ЛД<sub>50</sub>) происходит снижение активности ацетилхолинэстеразы Т-лимфоцитов тимуса и селезенки, а также числа б-нафтил-AS-ацетатэстеразопозитивных и б-нафтил-бутиратэстеразопозитивных спленоцитов (преимущественно Т-клеток), что свидетельствует о том, что одним из механизмов их иммунотоксичности является антихолинэстеразный эффект. Полученные нами результаты исследований свидетельствуют о том, что преимущественное снижение функции Т-клеток в гуморальных и клеточных иммунных реакциях под влиянием арсенитов, связано с ингибированием эстераз Т-лимфоцитов.

Исследование активности каталазы, пероксидазы и малонового альдегида является информативным показателем ПОЛ при интоксикациях [Кунцевич А.Д. и соавт., 1994]. При этом каталаза и пероксидаза характеризуют антиоксидантную защиту, а малоновый диальдегид является показателем активности процессов ПОЛ.

Острая интоксикация соединениями мышьяка приводит к инициации ПОЛ, что проявляется редукцией активности каталазы и пероксидазы (снижение активности антиоксидантной системы) и увеличением содержания малонового диальдегида в плазме крови. Эффект люизита в эквилетальной

дозе по сравнению с арсенитом натрия более выражен ( $p < 0,05$ ). Инициация ПОЛ под влиянием арсенитов может являться одним из факторов, способствующим формированию постинтоксикационного иммунодефицитного состояния, что доказывается высокими коэффициентами корреляции между показателями ПОЛ и основными параметрами системы иммунитета.

Полученные данные свидетельствуют, что люизит по сравнению с арсенитом натрия в большей степени активирует ПОЛ. Изменения показателей ПОЛ в плазме крови отражают процесс свободно-радикального окисления липидов, как всех клеток различных органов в целом, так и органов системы иммунитета и, в частности, лимфоцитов.

При вычислении коэффициентов корреляции между числом АОК к ЭБ при остром отравлении люизитом и содержанием каталазы и пероксидазы в крови крыс установлено, что они составляли соответственно  $0,769 \pm 0,077$  ( $p < 0,05$ ) и  $0,754 \pm 0,082$  ( $p < 0,05$ ). Коэффициенты корреляции при острых отравлениях люизитом и арсенитом натрия между числом АОК к ЭБ и содержанием малонового диальдегида в крови составляли соответственно  $-0,763 \pm 0,079$  ( $p < 0,05$ ) и  $-0,710 \pm 0,096$  ( $p < 0,05$ ). Значения  $r$  между другими параметрами системы иммунитета при остром действии арсенитов и показателями антиоксидантной системы находились в пределах от 0,687 до 0,805 ( $p < 0,05$ ), а коэффициенты корреляции между содержанием в крови и показателями иммунного статуса при действии МС составляли от  $-0,667$  до  $-0,789$  ( $p < 0,05$ ).

Данные литературы позволяют считать, что стресс-реакция, приводящая к повышению уровня кортикостероидов и катехоламинов в крови под влиянием арсенитов, может являться одним из факторов, инициирующим ПОЛ [Меерсон Ф.З., 1984; Валеева И.Х. и соавт., 2002].

При остром отравлении мышьяксодержащими соединениями – люизитом и арсенитом натрия ( $1,0 \text{ ЛД}_{50}$ ) – их антидот унитиол в терапевтических дозах повышает основные показатели НРО, однако, они остаются ниже

контрольного уровня.

Применение антидота унитиола в терапевтических дозах при острой интоксикации люизитом и арсенитом натрия в дозе 1,0 ЛД<sub>50</sub> хотя и увеличивает показатели гуморального и клеточного иммунитета, однако, он не восстанавливает их до контрольных значений.

Сравнительная характеристика наиболее часто используемых в клинике иммуностимуляторов свидетельствует о том, что имунофан при острой интоксикации МС является препаратом выбора. Необходимо подчеркнуть, что имунофан способен оказывать не только иммуностимулирующее влияние на все звенья системы иммунитета, но и обеспечивать детоксицирующий, гепатопротективный и антиоксидантный эффекты при острых отравлениях МС [Забродский П.Ф. и соавт., 2001].

Применение после острого отравления люизитом (1,0 ЛД<sub>50</sub>) иммуностимулятора имунофана частично восстанавливает основные показатели НРО, гуморального и клеточного иммунитета.

Как уже указывалось, синтетический иммуностимулятор имунофан обеспечивает восстановление показателей НРО и системы иммунитета, вследствие его иммуностимулирующих, детоксикационных эффектов, а также инактивации свободнорадикальных и перекисных соединений. Фармакологическое действие данного пептидного иммунооксидредуктанта при острых отравлениях арсенитами основано на достижении коррекции иммунной и окислительно-антиокислительной системы организма. Препарат в течение 2-3 часов (быстрая фаза) оказывает детоксикационный эффект, инициирует антиоксидантную защиту организма путем стимуляции продукции церулоплазмينا, лактоферрина, активности каталазы, ингибирования перекисного окисления липидов, распада фосфолипидов клеточной мембраны и синтеза арахидоновой кислоты [Забродский П.Ф. и соавт., 2001; Бажигитова Б.Б., Шортанбаев А.А., 2003; Михайлова М.Н. и соавт., 2003; Попова Е.А. и соавт., 2003;; Щеглова М.Ю., Макарова Г.А., 2003]. Учитывая очень быстрое течение биохимических реакций у

грызунов, в отличие от человека, можно предположить, что иммунорегулирующее действие имунофана проявляется не с 7-10 сут, а в несколько раз быстрее (то есть в течение трех суток его использования обеспечивается и детоксицирующее, и антиоксидантное, и иммуностимулирующее действие). Данным эффектом обладают многие низкомолекулярные пептиды [Чейдо М.А. и соавт., 1990].

При остром отравлении люизитом (1,0 ЛД<sub>50</sub>) комбинированное применение его антидота унитиола и иммуностимулятора имунофана полностью восстанавливает основные показатели НРО, Т-, В-звена иммунитета, АЗКЦ и активность ЕКК.

Таким образом, основными механизмами редукции НРО и показателей системы иммунитета арсенитами в дозах 0,2–1,0 ЛД<sub>50</sub>, приводящими к постинтоксикационному иммунодефицитному состоянию, являются: снижение содержания иммуноцитов в органах системы иммунитета; нарушение кооперации Т- и В-лимфоцитов, приводящее к снижению антителообразования вследствие преимущественного поражения Т-лимфоцитов; ингибирование арсенитами ацетилхолинэстеразы Т-клеток тимуса и селезенки, а также б-нафтил-AS-ацетатэстеразы и б-нафтил-бутиратэстеразы спленоцитов (преимущественно Т-клеток); инициация ПОЛ мембран иммуноцитов. Не исключен неспецифический эффект вследствие постинтоксикационной стресс-реакции, приводящий к иммуносупрессивному действию кортикостероидов. Комбинированное применение антидота арсенитов унитиола и иммуностимулятора имунофана способно полностью восстанавливать основные показатели НРО, Т-, В-звена иммунитета, АЗКЦ и активность ЕКК после острого отравления арсенитами.

## ВЫВОДЫ

1. При остром отравлении арсенитами – люизитом и арсенитов натрия – в условиях эксперимента на животных происходит дозозависимая редукция антиинфекционной неспецифической и иммунологической резистентности организма, супрессия преимущественно Т-зависимой гуморальной иммунной реакции преимущественно в продуктивной фазе антителогенеза, функции Т-клеток, антителозависимой клеточной цитотоксичности, активности естественных клеток-киллеров. Коррекция выявленных нарушений достигается комбинированным применением антидота мышьяксодержащих соединений унитиола и иммуностимулятора имунофана.

2. Острая интоксикация люизитом и арсенитом натрия вызывает дозозависимое увеличение летальности животных от экспериментального перитонита, вызванного *E. coli*, а также уменьшение ЛД<sub>50</sub> *E. coli* и среднеэффективного времени жизни животных, а также данных показателей при использовании *P. vulgaris* после предварительной иммунизации, что свидетельствует о снижении неспецифической и иммунологической резистентности организма под влиянием мышьяксодержащих соединений. Под влиянием арсенитов в дозах 0,2; 0,5 и 1,0 LD<sub>50</sub> происходит дозозависимое снижение бактерицидной активности сыворотки крови, сывороточного содержания лизоцима, фагоцитарно-метаболической активности нейтрофилов до 6 - 9 сут.

3. Под влиянием острой интоксикации люизитом и арсенитом натрия происходит дозозависимое уменьшение лимфоидного индекса тимуса и селезенки (в диапазоне доз 0,2 – 1,0 ЛД<sub>50</sub>) в течение 4 сут с последующим увеличением этих показателей к 6 суткам. Острая интоксикация арсенитами (0,2; 0,5 и 1,0 LD<sub>50</sub>) вызывает дозозависимое уменьшение числа лимфоцитов в тимусе и селезенке в течение 2-4 сут с последующим восстановлением этих показателей к 8 суткам.. После острого действия арсенитов в дозах 0,2; 0,5 и



1,0 LD<sub>50</sub> через 2 сут происходит дозозависимое уменьшение числа лимфоцитов в органах системы иммунитета и циркулирующей крови.

4. Острое действие люизита и арсенита натрия в дозах 0,2; 0,5 и 1,0 LD<sub>50</sub> через 8 сут приводит к дозозависимому уменьшению числа коллинеобразующих единиц в селезенке.

5. После острой интоксикации арсенитами в дозах, составляющих 0,2; 0,5 и 1,0 LD<sub>50</sub>, происходит дозозависимое снижение Т-зависимого антителообразования через 5 и 8 сут после иммунизации, что свидетельствует о снижении функции Th1 и Th2-лимфоцитов и В-клеток. Редукция показателя более выражена при действии арсенитов в продуктивный период антителопродукции. Острое отравление арсенитами в дозах, составляющих 0,2; 0,5 и 1,0 LD<sub>50</sub>, вызывает дозозависимое снижение Т-независимой антителопродукции, преимущественно в продуктивный период иммуногенеза, что обусловлено супрессией функции В-лимфоцитов. Под влиянием люизита и арсенита натрия *in vitro* существенно нарушается кооперация Т- и В-лимфоцитов. Арсениты *in vitro* в прямой зависимости от концентрации ( $10^{-5}$ ,  $10^{-4}$  и  $10^{-3}$  М) снижают кооперацию лимфоцитов, поражая преимущественно Т-клетки.

6. Острое отравление арсенитами (0,2; 0,5 и 1,0 LD<sub>50</sub>) приводит к дозозависимому снижению функции Т-клеток и активности естественных клеток-киллеров до 9 сут; реакции гиперчувствительности замедленного типа, характеризующей первичный клеточный иммунный ответ и функцию Th1-лимфоцитов, антителозависимой клеточной цитотоксичности. Арсениты *in vitro* в прямой зависимости от концентрации ( $10^{-6}$ ,  $10^{-5}$  и  $10^{-4}$  М) уменьшают активность естественных клеток-киллеров. При этом эффект люизита статистически достоверно превышает действие арсенита натрия ( $p < 0,05$ ).

7. Под влиянием острой интоксикации арсенитами (1,0 LD<sub>50</sub>) происходит снижение активности ацетилхолинэстеразы Т-лимфоцитов тимуса и селезенки, а также числа б-нафтил-AS-ацетатэстеразопозитивных и б--

нафтил-бутиратэстеразопозитивных спленоцитов (преимущественно Т-клеток), что свидетельствует о том, что одним из механизмов их иммунотоксичности является антихолинэстеразный эффект. Острая интоксикация арсенитами приводит к инициации перекисного окисления липидов (ПОЛ). Эффект люизита в эквилетальной дозе по сравнению с арсенитом натрия более выражен ( $p < 0,05$ ). Инициация ПОЛ под влиянием арсенитов может являться одним из факторов, способствующим формированию постинтоксикационного иммунодефицитного состояния после их острого действия, что доказывается высокими коэффициентами корреляции между показателями ПОЛ и основными параметрами системы иммунитета.

8. При остром отравлении арсенитами – люизитом и арсенитом натрия ( $1,0 \text{ ЛД}_{50}$ ) – их антидот унитиол и иммуностимулятор имунофан в терапевтических дозах при изолированном применении повышают основные показатели антиинфекционной неспецифической резистентности организма, гуморального и клеточного звена иммунитета, однако, они остаются ниже контрольного уровня. Комбинированное использование унитиола и имунофана полностью восстанавливает основные показатели неспецифической резистентности организма, гуморального и клеточного иммунного ответа.

## ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

1. В экспериментах на животных наиболее информативными показателями для оценки иммуносупрессивных эффектов арсенитов являются: содержание лимфоцитов в тимусе и селезенке, активность естественных клеток-киллеров, АЗКЦ, тимусзависимый гуморальный иммунный ответ в продуктивной фазе антителогенеза, функция Т-клеток в реакции гиперчувствительности замедленного типа, активность ацетилхолинэстеразы Т-лимфоцитов тимуса и селезенки, число б-нафтил-AS-ацетатэстеразопозитивных и б--нафтил-бутиратэстеразопозитивных спленоцитов, показатели ПОЛ.

2. После острого отравления арсенитами происходит дозозависимое снижение показателей неспецифической резистентности организма и иммунного статуса, которое при острой интоксикации средней, тяжелой и очень тяжелой степени тяжести (дозы арсенитов – 0,5-1,0 ЛД<sub>50</sub>) требует применения средств профилактики и лечения постинтоксикационного иммунодефицитного состояния, так как возможно возникновение инфекционных осложнений и заболеваний.

3. После острого отравления арсенитами для восстановления неспецифической резистентности организма, основных показателей гуморального и клеточного иммунного ответа целесообразно применять унитиол в дозах адекватных степени тяжести отравления в комбинации с иммуностимулятором имунофаном.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Александров В.Н. Гуморальный иммунный ответ после травмы различной тяжести // Пат. физиол. и эксперим. терапия. – 1983. - №4. – с. 70-72.
2. Александров В.Н., Емельянов В.И. Отравляющие вещества. М., Военное издательство, 1990.- 271 с.
3. Алимов Н.И., Лобур А.Ю., Солодкова Л.Н. Разработка алгоритма комплексного анализа почвы, зараженной люизитом и продуктами его деструкции // Доклады академии военных наук. Серия Прикладные проблемы уничтожения запасов химического оружия и военной экологии. Поволжское отделение. – Саратов, «Слово».- 2000а.- с. 14-21.
4. Алимов Н.И., Павлов А.Ю., Тараскин К.А., Жиров А.А., Ивашев И.П., Труфанов В.Н., Парфенов Д.А. Разработка метода получения триалкиларсенитов – продуктов утилизации мышьяксодержащих ОВ// Доклады академии военных наук. Серия Прикладные проблемы уничтожения запасов химического оружия и военной экологии. Поволжское отделение. – Саратов, «Слово».- 2000б.- с.34-39.
5. Алимов Н.И., Фролов В.Н., Антохин А.М. «Обеспечение безопасности граждан и защита окружающей природной среды при возникновении запроектных аварий на объектах уничтожения и хранения химического оружия// Доклады академии военных наук. Серия Прикладные проблемы уничтожения запасов химического оружия и военной экологии. Поволжское отделение. – Саратов, «Слово».- 2000в. - с.39-43.
6. Алехин Е.К., Лазарева Д.Н., Сибиряк С.В., Иммунотропные свойства лекарственных средств. – Уфа, БГМИ, 1993. - 208 с.
7. Андропова М. Н., Башкирцев А. С., Орницан Э. Ю., Абламунец К. Я. Показатели минерального обмена и неспецифической резистентности организма на фоне различных рационов питания при воздействии неорганических соединений фтора //Актуал. пробл. питания пром. раб.- Л., 1988.-С. 61-67.

8. Арион В.Я. Иммунологически активные факторы тимуса // Медиаторы иммунной системы.- М.: ВИНТИ, 1981. – (Итоги науки и техники. Сер. Иммунология; Т.9).- с. 232.
9. Арион В.Я., Иванушкин Е.Ф. Принципы иммунокорректирующей терапии препаратом тимуса Т-активин // Хирургия.- 1984.- №11.- с. 44-48.
10. Арион В.Я., Иванушкин Е.Ф. Принципы иммунокорректирующей терапии препаратом тимуса Т-активин: А. с. 1673122 СССР, МКИ<sup>5</sup> А 61 К 35/26; Красноярский мед. ин-т. - № 4452382/12; Заявл. 31.05.88; Оpubл. 30.08.91, Бюл. №32.
11. Арион В.Я., Караулов Ю.В., Хроменков Ю.И. и др. Изменения некоторых иммунологических и биохимических параметров Т-активина у безмикробных животных // Бюл. эксперим. биол. и мед. -1987.-Т. 104, N 9. -С. 332-334.
12. Арчаков А.И. Оксигенация биологических мембран. – М.: Медицина, 1993.
13. Бадюгин И.С., Забродский П.Ф., Поляруш В.П. и др. Военная токсикология, радиология и защита от оружия массового поражения.- М.: Военное издательство, 1992. – 360 с.
14. Бажигитова Б.Б., Шортанбаев А.А. Динамика иммунологических показателей у больных с частыми повторными заболеваниями респираторного тракта в результате применения имунофана // International J. on Immunorehabilitation. Физиология и патология иммунной системы. – 2003.- Т. 5, №2.- с. 205.
15. Базарный В.В., Ястребов А.П. К механизму иммуотропного эффекта аспарагиновой кислоты //Бюл. эксперим. биол. и мед. -1990.-Т. 110, N 11. - С. 468-471.
16. Базарный В.В., Ястребов А.П. Действие некоторых иммуномодуляторов на гемопоэз // Бюл. эксперим. биол. и мед. -1993.-Т. 115, N 2. -С. 53-54.
17. Барштейн Ю. А., Палий Г. К., Персидский Ю.В. и др. Имунофармакологический анализ длительной интоксикации малыми

- дозами гербицида симазана //Бюл. exper. биол.-1991.-N 12.-С. 657-659.
18. Беленький М. Л. Элементы количественной оценки фармакологического эффекта: 2-е изд., – Л.: Медицина, 1963. – 235 с.
  19. Беликов В.Г. Коррекция тимогеном нарушений физиологических механизмов регуляции иммуногенеза при остром отравлении токсичными химическими веществами // Дисс. ... канд. мед. наук. – Саратов, СГМУ. - 2001.- 149 с.
  20. Белокрылов Г.А., Попов Н.В., Молчанова О.А. и др. Неоднозначность действия пептидов и составляющих их аминокислот на антителообразование и фагоцитарную активность нейтрофилов у мышей //Бюл. эксперим. биол. и мед.-1991.-N 1.-С. 53-55.
  21. Белокрылов Г.А., Попова О.Я., Сорочинская Е.И. Сходство иммуно-, фагоцитозмодулирующих и антитоксических свойств дипептидов и составляющих их аминокислот //Бюл. эксперим. биол. и мед.-1999.-Т.127, № 6.-С. 674-676.
  22. Белокрылов Г. А., Хавинсон В. Х., Морозов В. Г. Влияние веществ полипептидной природы, выделенных из тимуса и коры головного мозга, на первичный иммунный ответ у мышей к тимусзависимому и тимуснезависимому антигену // Журн. микробиол. и эпидемиол.-1980.- №3.- с. 97-99.
  23. Бельцкий С. М., Снастина Г. И. Механизм защиты от гнойной инфекции // Иммунология. – 1985. - №2. - с. 14-20.
  24. Бертрам Г. Базисная клиническая фармакология. – СПб., «Невский диалект», 2000.- Т. 2. - 672 с.
  25. Большаков И.Н., Хороших Л.В., Арион В.Я., Лопухин Ю.М. Влияние тактивина на антителообразующие клетки селезенки // Бюл. эксперим. биол. и мед. - 1991. - № 6. - с. 644 - 646.
  26. Борисова А.М. Алексева А.Б., Сидоров М.З. др. Роль естественной цитотоксичности в иммунопатогенезе рецидивирующей герпетической инфекции и влияние иммуномодуляторов на клинкоиммунологический

- статус // Иммунология. – 1991.-№6.- С. 60-62.
27. Бухарин О. В., Васильев Н. В. Лизоцим и его роль в биологии и медицине. – Томск, 1974. – 209 с.
  28. Бухарин О. В., Васильев Н. В. Система  $\beta$ -лизина и его роль в клинической и экспериментальной медицине. – Томск, 1977. – 166 с.
  29. Бухарин О. В., Сетко Н. П., Желудева Г. Н. Иммунологические сдвиги у экспериментальных животных при воздействии комплекса химических веществ // Гигиена труда.-1985.-№3.-с. 45-46.
  30. Бухарин О. В., Сулейманов К. Г., Чернова О. Л., Иванов Ю. Б. Способность микроорганизмов к инаktivации бактерицидного действия тромбоцитарного катионного белка ( $\beta$ -лизина) // Бюл. exper. биол. и мед.-1998.-№7.-с. 66-67.
  31. Валеева И.Х., Зиганшина Л.Е., Бурнашова З.А., Зиганшин А. У. Влияние димесфосфона и ксидифона на показатели перекисного окисления липидов и антиоксидантной системы крыс, длительно получавших преднизолон // Эксперим. и клин. фармакология.- 2002.- Т.65, N 2.-С. 40-43.
  32. Вахидова Г.А., Мельстер Е.Ш., Васильева Ф.В. Иммуномодулирующая терапия при заболеваниях органов дыхания у больных с наличием в крови хлорорганических соединений (ХОС) // Тез. 1 Всесознного конгресса по болезням органов дыхания.- Киев, 9-12 окт., 1990.- Киев, 1990.- С. 750.
  33. Виноградов В.М., Гембицкий Е.В., Мухин Е.А., Фролов С.Ф. Фармакология (общая, частная и основы клинической) / Под ред. В.М.Виноградова.- 2 изд., доп. и перераб.– Л.:Изд-во ВМА, 1986– 515 с.
  34. Виноградов В.М., Гембицкий Е.В., Мухин Е.А., Фролов С.Ф. Фармакология средств с преимущественным действием на обмен веществ и противомикробных препаратов. – Л.:Изд-во ВМА, 1986– 404 с.
  35. Владимиров В.А. Сильнодействующие ядовитые вещества и защита от них.- М., Военное издательство.- 1989. - 176 с.
  36. Гамаюрова В.С. Мышьяк в экологии и биологии. - М., Наука, 1993. –

208с.

37. Гембицкий Е.В., Кожемякин Л.А., Королюк А.М., Морозов В.Г., Хавинсон В.Х. Оценка иммунного статуса организма в лечебных учреждениях Советской Армии и Военно-Морского Флота/ Метод. пособ.- 1987.- М.: Изд-во ЦВМУ МО СССР. – С.24-25.
38. Генес В. С. Таблицы достоверных различий между группами наблюдений по качественным показателям. – М.: Медицина, 1964. – 80 с.
39. Германчук В.Г. Нарушения регуляции физиологических механизмов иммуногенеза при остром отравлении нитрилами// Дисс. ... канд. мед. наук. – Саратов, СВРХБЗ. -2000.- 121 с.
40. Голиков С.Н., Саноцкий И.В., Тиунов Л.А. Общие механизмы токсического действия/ АМН СССР. -Л.: Медицина, 1986. –280 с.
41. Гольдберг Е. Д., Штернберг И. Б., Михайлова Т. Н. Состояние лимфоидной ткани при введении рубомицина С //Пат. физиол. и эксперим. терапия.–1972.-№2.-с. 67-686.
42. Гордиенко С.М. Приемлемый для клинической практики метод оценки активности естественных антителозависимых киллерных клеток //Лаб. дело.-1983.-N 9.-С. 45-48.
43. Гордиенко С. М. Нерадиометрические методы оценки естественной цитотоксичности на эритроцитарные клетки-мишени // Иммунология.- 1984.-№1.-с. 31-36.
44. Горизонтов П. Д. Система крови как основа резистентности и адаптации организма // Физиол. журн. – Киев.- 1981а.-Т 27.-№3.-с. 317-321.
45. Горизонтов П. Д. Стресс. Система крови в механизме гомеостаза. Стресс и болезни. / В кн.: Гомеостаз. – М.:Медицина, 1981б.- С. 538-573.
46. Горшенин А.В., Перевозчикова Н.В., Лоскутова Н.Д. Исследование состояния иммунной системы при воздействии токсичных факторов окружающей среды // Экология, здоровье, человек: Тез. докл. Всероссийской научной конференции, посвященной 70-летию военного полигона г. Шиханы.- Шиханы, «Слово».- 1998.- С. 56.



47. Гублер Е. В. Вычислительные методы анализа и распознавания патологических процессов. – Л.: Медицина, 1978.-296 с.
48. Гудзь О.В. Сравнительное изучение влияния эфиров этиленгликоля на морфологический состав и функциональное состояние клеток периферической крови белых крыс //Фармакол. и токсикол.-1988.-N 23.-С. 110-115.
49. Гюллинг Э.В., Гоц Т.Ю., Гремяков В.А. Модуляция реактивности базофилов низкомолекулярными тимическими препаратами //Докл. АН УССР.-1991.-N 6.-С. 174-175.
50. Давыдова В.И. Мышьяк и его соединения. – В кн.: Вредные химические вещества. Неорганические соединения V –VIII групп: Справ. изд./ А.Л. Бандман, Н.В. Волкова, Т.Д. Грекова и др.; Под ред. В.А. Филова и др. – Л.: Химия.- 1989.- с.82-102.
51. Диксон М., Уэбб Э. Ферменты / Пер. с англ. - М.: Мир, 1982.-Т 2.- 806 с.
52. Долинская С. И., Лурье Л. М., Таги-заде Р. К. Влияние пестицидов на миграционную активность макрофагов и некоторые показатели метаболизма //Гигиена и сан.-1989.-N 7.-С. 76-77.
53. Дьячук И. А. Состояние иммунобиологической реактивности организма работников индейководческих птицефабрик //Гигиена. труда.-1979.-N 2.- С. 53-55.
54. Ершов Ф.И. Иммуномодуляторы – новое поколение противовирусных средств // Эксперим. и клин. фармакол.-1995.-Т.58, N 2.2.-С. 74-78.
55. Ершов Ю.А., Плетнева П.В. Механизмы токсического действия неорганических соединений.- М., Медицина, 1989.- 272 с.
56. Жамсаранова С. Д., Лебедева С. Н., Ляшенко В.А. Оценка функциональной активности макрофагов при воздействии карбофоса и 2,4-Д //Сб. науч. тр. ВНИИ гигиены и токсикол. пестицидов, полимеров и пласт. масс.-1988.-N 18.-С. 143-147.
57. Жук Е.А., Галенюк В.А. Тимоген в лечении сахарного диабета I типа//

- Тер. Архив.- 1996.-Т.68,№10.- С.12-14.
58. Забродский П. Ф. Влияние армина на факторы неспецифической резистентности организма и первичный гуморальный ответ //Фармакол. и токсикол. – 1987.- Т 49.-№2.-с. 57-60.
59. Забродский П.Ф. Механизмы иммуотропных эффектов фосфорорганических соединений //Бюл. эксперим. биол. и мед. – 1993.- Т 116.-№8.-С. 181-183.
60. Забродский П. Ф. Влияние острого воздействия ацетонитрилом и нагревающего микроклимата на неспецифическую и иммунологическую резистентность организма //Мед. труда и пром. экол. – 1994.-№5-6.-С. 12-14.
61. Забродский П. Ф. Иммуотропные свойства ядов и лекарственных средств.- Саратов : Изд. СГМУ, 1998.-213 с.
62. Забродский П.Ф. Влияние тимогена на постинтоксикационное иммунодефицитное состояние, вызванное острым отравлением ацетонитрилом //Эксперим. и клин. фармакол. – 1999.-Т 62.-№3.-С. 48-49.
63. Забродский П.Ф. Механизмы иммуотропных эффектов фосфорорганических соединений // Бюл. эксперим. биол. и мед. – 1993.-Т 116.-№8.-С. 181-183.
64. Забродский П. Ф. Иммуотоксические эффекты при остром отравлении метанолом // Токсикол. Вестник.-1999, №2.- С. 8-11.
65. Забродский П. Ф. Влияние ксенобиотиков на иммунный гомеостаз.- В кн.: Общая токсикология / Под редакцией Б.А. Курляндского, В.А. Филова – М.: Медицина, 2002. - 352-384 с.
66. Забродский П. Ф., Германчук В.Г. Оценка роли кортикостерона в реализации иммуносупрессивных эффектов при остром отравлении токсичными химическими веществами //Бюл. эксперим. биол. и мед. – 2000.-Т. 129.-№5.-С. 552-555.
67. Забродский П. Ф., Германчук В.Г. Иммуотоксические эффекты при остром отравлении этиленгликолем // Бюл. эксперим. биол. и мед. – 2000.-

- Т. 130.-№10.-С. 415-417.
68. Забродский П. Ф., Киричук В.Ф. Фармакологическая коррекция постинтоксикационных иммунодефицитных состояний // Докл. АВН.-1999.-№2.-С. 45-54.
  69. Забродский П. Ф., Германчук В.Г. Иммунотоксические эффекты при остром отравлении этиленгликолем // Бюлл. exper. биол. и мед.-2000.-Т.130, №10.-С.415-417.
  70. Забродский П. Ф., Киричук В. Ф. Изменение показателей неспецифической резистентности организма, гуморальных и клеточных иммунных реакций после острого отравления ацетонитрилом //Бюл. эксперим. биол. и мед. – 1998.-Т 125.-№5.-С. 548-550.
  71. Забродский П. Ф., Киричук В. Ф., Грызунов А. В. Изменение неспецифической и иммунологической резистентности организма при остром отравлении дихлорэтаном //Бюл. эксперим. биол. и мед. – 1997.-Т. 123.-№1.-С. 51-53.
  72. Забродский П. Ф., Ромащенко С. А. Влияние тиосульфата натрия на неспецифическую резистентность организма и иммунные реакции при остром отравлении акрилонитрилом //Эксперим. и клин. фармакол. – 1998.-Т 61.-№5.-с. 56-58.
  73. Забродский П.Ф., Германчук В.Г., Трошкин Н.М. Иммуностимуляторы. – Саратов, «Аквариус». – 2001.- 109 с.
  74. Земсков В.М. Неспецифические иммуностимуляторы //Успехи современной биологии.-1991.-Т. 111, N 5.-С. 707-721.
  75. Зимин Ю. И., Ляхов В. Ф. Эффект кооперации в реакции зависимой от антител клеточной цитотоксичности // Иммунология.-1985.-№1.- с. 27-30.
  76. Золотникова Г. П. О нарушении иммунологической реактивности организма под воздействием пестицидов в условиях теплиц //Гигиена труда.-1980.-N 3.-С. 38-40.
  77. Измайлова Ф. А. Упрощенный метод химического исследования дегидрогеназ с применением П-нитротетразолия фиолетового (методика Р.

- П. Нарциссова) // Здравоохранение Таджикистана. –1985.-№1. - с. 93.
78. Каулиныш У. Я. Лизоцим: (Обзор) сост. У. Я. Каулиныш.-Рига, 1982.- 51 с.
  79. Казакова В. В. Влияние стирола на некоторые показатели естественного иммунитета у лабораторных животных //Гигиена. труда.-1971.-N 2.-С. 53-54.
  80. Калинина Н.И. О Конвенции по запрещению химического оружия. Что о ней надо знать.- М., ЗАО «Агенство Ракурс», 2000а. - 35 с.
  81. Калинина Н.И. Химическое разоружение России и его нормативно-правовое обеспечение. М., ЗАО «Агенство Ракурс», 2000б. – 52 с.
  82. Кирилина Е.А., Михайлова А.А., Малахов А.А. Гурьянов С.А., Ефремов М.А. Механизм иммунокорректирующего действия миелопида // Иммунология. -1998. - № 4.- с. 27 - 29.
  83. Кирилличева Г.Б., Батурина И.Г., Митькин В.В. и др. Особенности влияния Т-активина на активность 5- нуклеотидазы макрофагов и уровень кортизола крови в зависимости от времени суток // Бюл. эксперим. биол. и мед. -1990. - Т. 110, № 11. - с. 468 - 471.
  84. Конвенция о запрещении разработки, производства, накопления и применения химического оружия и его уничтожения. Международная конференция по подписанию Конвенции. – Париж, 1993.
  85. Корнева Е.А. Нарушение нейрогуморальной регуляции функций иммунной систем // Вест. АМН СССР.- 1990.- №11.- С. 36-42.
  86. Коробейникова Э.Н. Фотометрический метод определения молюновогo альдегида // Лаб. дело.- 1989.- №7.- С.8-10.
  87. Космодамианская Д. М. Влияние атмосферных загрязнений на здоровье населения //Гигиена. и санитария.-1968.-N 2.-С. 100-101.
  88. Крачковский Е.А. Гигиена применения ядохимикатов. - Киев, Здоров'я.- 1978.- 240 с.
  89. Крылова Ю.Ф. Энциклопедия лекарств, регистр лекарственных средств.- М., РЛС, 2001. - 1504с.

90. Кузник Б. И., Васильев Н. В., Цыбиков Н. Н. Иммуногенез, гомеостаз и неспецифическая резистентность организма. – М: Медицина, 1989. – 256 с.
91. Кунцевич А.Д., Баулин С.И., Головков В.Ф. и др. Сравнительный анализ изменений жирового обмена, перекисного окисления липидов и системы гемостаза при действии полихлорированных дибензо-п-диоксинов и радиации // Докл. Академии наук.- 1994.- Т.335, №3.- С. 378-381.
92. Курляндский Б.А. Филов В.А. Общая токсикология. – М.: Медицина, 2002.- 608 с.
93. Куценко С.А., Бутомо Н.В., Гребенюк А.Н. и др. Военная токсикология, радиобиология и медицинская защита. – СПб: ООО Изд. «Фолиант», 2004.- 528 с.
94. Лазарев Н.В., Гадаскина И.Д. Вредные вещества в промышленности, Л.: Химия - 1977. - 608 с.
95. Лазарев Н. В. Вредные вещества в производстве. -Л: Химия, 1976.- Т 2.- с. 94-125.
96. Лазарева Д. Н., Алехин Е. К. Стимуляторы иммунитета.- М.: Медицина, 1985.-256 с.
97. Лапин Г. Ф. Биометрия.- М.: Высш. шк., 1980.- 293 с.
98. Ледванов М. Ю., Киричук В. Ф. Введение в клиническую иммунологию.- М: Медицина, 1996.- 141 с.
99. Лемус В. Б., Давыдов В. В. Нервные механизмы и кортикостероиды при ожогах. Л.: Медицина. Ленингр. отд-ние, 1974. -182 с.
100. Ленинджер А. Биохимия: Молекулярные основы структуры и функции клетки / Под ред. А.А. Баева, Я.В.Варшавского. Пер. с англ. – М.: Мир, 1974. – 957 с.
101. Лудевиг Р., Лос К. Острые отравления: Пер. с нем. –М.: Медицина, 1983.- 560 с.
102. Лужников Е.А. Клиническая токсикология. М.:Медицина, 1999. – 416 с.
103. Лужников Е.А., Костомарова Л.Г. Острые отравления: Руководство для

- врачей.- М.:Медицина. 1989. – 432 с.
104. Лужников Е.А., Костомарова Л.Г. Острые отравления: Руководство для врачей. 2-е изд., перераб и доп. - М.:Медицина. 2000. – 434 с.
  105. Любимова Н.Б., Леонова Г.Н. Гормоны тимуса в лечении и профилактике флавивирусной инфекции в условиях эксперимента//Ж. микробиол., эпидемиол. и иммунобиол. –1995.- №5.- С.105-108.
  106. Маркова И.В., Афанасьева В.В., Цыбульский Э.К., Неженцев М.В. Клиническая токсикология детей и подростков. – Санкт-Петербург, Интермедика, 1998. – 304 с.
  107. Машковский М.Д. Лекарственные средства. Ч.2. – 12-е изд., перераб. и доп.- М.: Медицина, 1993.- 685 с.
  108. Маянский А. Н., Маянский Д. Н. Очерки о нейтрофиле и макрофаге.- Новосибирск: Наука, 1983.-254 с.
  109. Маянский Д. Н. Система фагоцитов: методологические проблемы //Пат. физиол. и эксперим. терапия.–1986.-Вып. 2.-с. 83-86.
  110. Меерсон Ф.З. Патогенез и предупреждение стрессорных и ишемических повреждений сердца.-М.: Медицина,1984.- 345 с.
  111. Михайлова А.А. Миелопиды и иммунореабилитация // Internatinal J. Immunorehabilitation. - 1997. - № 5. - с. 5.
  112. Михайлова М.Н., Меркулова Л.М., Стручко Г.Ю., Иванова Н.Н. Использование имунофана для коррекции изменений гематологических показателей, вызванных циклофосфаном // Internatinal J. on Immunorehabilitation. Физиология и патология иммунной системы. – 2003.- Т. 5, №2.- с. 230.
  113. Могуш Г. Острые отравления /Пер. с рум.- Бухарест, Медицинское издательство, 1984. – с. 440-464.
  114. Морозов В.Г., Хавинсон В.Х. Характеристика и изучение механизма действия фактора тимуса (тимарина) // Докл. АН СССР. – 1978.- Т.240, № 4. – С. 339-346.
  115. Морозов В.Г., Хавинсон В.Х. Новый класс биологических регуляторов

- многоклеточных систем - цитомедины // Успехи совр. биологии.- 1983.- Т. 96, №3. – 1004-1007.
116. Мухамбетов Д.Д., Шайдаров М.З., Абрахманова Х.М. Коррекция иммуномодуляторами постреанимационной иммуносупрессии // Терминальные состояния и постреанимационная патология в эксперименте и клинике. - Алма-Ата. - 1990. - с. 38 - 39.
  117. Невидимова Т.И., Н.И. Суслов. Психотропные эффекты тимогена // Бюл. эксперим. биол. и мед.- 1995.- Т.119, №2.-С. 199-200.
  118. Осипов С.Г., Титов В.Н. Биологические функции системы комплемента //Иммунология.-1984.-N 6.-С. 82-83.
  119. Осипова Л.О. Исследование влияния иммуномодулятора тимогена на функцию «активных» розеткообразующих лимфоцитов *in vitro* у больных туберкулезом легких // Матер. 18 науч.-практич. конф. учен. и спец. КГИУВ/Киев. гос. ин-т усо- верш. врачей.-Киев, 1990.-С 3-4.
  120. Петров Р.В. Иммунология.-М: Медицина, 1987.-416 с.
  121. Петров Р.В. Синтетические иммуномодуляторы .-М., 1991.-199с.
  122. Петров Р.В., Хаитов Р.М. Миграция стволовых клеток из экранированного костного мозга у неравномерно облученных мышей //Радиология.-1972.-N 1.-С. 69-76.
  123. Петров Р. В., Хаитов Р. М., Манько В. М., Михайлова А. А. Контроль и регуляция иммунного ответа. – М.: Медицина, 1981а. – 312 с.
  124. Петров Р. В., Хаитов Р. М. Иммунологические механизмы клеточного гомеостаза // В кн. Гомеостаз. – М.: Медицина, 1981б.- с. 312-365.
  125. Плечитый К.Д., Сухих Г.Г. Витамин А стимулирует иммунный ответ к тимусзависимым антигенам и повышает активность естественных киллеров //Докл. АН СССР.-1984.-Т. 278, N 4.-С. 1017-1019.
  126. Плечитый К.Д., Сухих Г.Т. Экспериментальный анализ иммунностимулирующих свойств витамина А. // Бюл. exper. биол. и медицины.– 1985.- Т 100.- №11.- с. 600-602.
  127. Подосинников И.С., Гурина О.П., Бабаченко И.В. Влияние миелопида

- на функциональную активность лейкоцитов периферической крови // Пат. физиол. и эксперим. терапия. - 1991. - №4. - с. 9 - 12.
128. Покровский А.А. Биохимические методы исследования в клинике. Справочник.- М.: Медицина, 1969.- 651 с.
  129. Попова Е.А., Лисун И.И., Алимов А.Д. и др. Иммунофармакотерапия имунофаном в лечении больных с гнойными менингитами // Internatinal J. on Immunorehabilitation. Физиология и патология иммунной системы. – 2003.- Т. 5, №2.- с. 252.
  130. Резников К.М., Винокурова О.В. Антиаритмические свойства тимогена//Эксперим. и клин. фармакология.--1994.-Т.57,N 6.-С. 31-33.
  131. Рембовский В.Р., Горшенин А.В., Белобровкин Е.А. Анализ иммуотропного действия кожно-нарывных отравляющих веществ // Доклады академии военных наук. Серия Прикладные проблемы уничтожения запасов химического оружия и военной экологии. Поволжское отделение. – Саратов, «Слово».- 2000.- с.137-143.
  132. Ремезов А. И., Башмаков Г. А. Методы определения естественной (неспецифической) резистентности организма.-Л.,1976.- 65 с.
  133. Ройт А. Основы иммунологии: Пер. с англ. М.: Мир, 1991.-327 с.
  134. Ройт А., Бростофф Дж., Мейл Д. Иммунология. Пер. с англ.- М.: Мир, 2000. – 582 с.
  135. Ротенберг Ю.С. Токсиколого-гигиенические аспекты биоэнергетики // Всесоюзн. учред. конф. по токсикологии. Тез. докл.- М., 1980.- С.108.
  136. Руднева Т.Б. Осипова Е.Ю., Михайлова А.А., Манько В.М. Коррекция миелопидами дифференцировки кроветворных клеток предшественников у мышей с экспериментальным Т-иммунодефицитом // Бюл. экспер. биол. и мед. - 1989. - Т. 107, № 6. - с. 718 - 720.
  137. Рыболовлев Ю.Р. Прогнозирование действия ксенобиотиков на человека // Фармакол. и токсикол. – 1982.- №1.- С. 110-114.
  138. Саватеев Н.В. Военная токсикология, радиология и медицинская защита. – Л.: ВмедА, 1987.- 355 с.



139. Саватеев Н.В., Куценко С.А. Характеристика токсического действия веществ, представляющих опасность при разрушении промышленных объектов.-Л.: ВмедА им. С.М. Кирова, 1982.- 44 с.
140. Саватеев Н.В., Куценко С.А. Ядовитые вещества, выделяющиеся при разрушении промышленных объектов, и мероприятия по оказанию медицинской помощи пострадавшим // Воен.-мед. журн. – 1993.- №6.-С. 36-40.
141. Савченко М. В. Влияние роданистого аммония и тиомочевины на иммунологическую систему организма //Гигиена и санитария.-1987.-N 11.- С. 29-32.
142. Саноцкий И. В. Пути разработки ускоренных методов установления предельно допустимых концентраций в воздухе рабочей зоны //Гигиена труда.-1969.-N 7.-С. 4-7.
143. Селье Г. На уровне целостного организма. Пер. с англ.- М.,-1972.
144. Семина О.В., Семенец В.И. Замена аксессуарных Т-лимфоцитов синтетическими пептидами в процессе формирования селезеночных кроветворных колоний //Бюл. эксперим. биол. и мед.- 1993.- №2.-С. 298-299.
145. Семина О.В., Семенец В.И., Дейгин В.И. Стимуляция тимогеном (GW-дипептидом) восстановления кроветворения у облученных и подвергнутых действию цитостатика мышей//Иммунология.- 1997.-№1.- С.33-35.
146. Сепетлиев Д. Н. Статистические методы в научных медицинских исследованиях.-М.: Медицина, 1975.- 296 с.
147. Скальная М.Г., Жаворонков А.А., Скальный А.В., Рябчиков О.П., Морфологическая характеристика тимуса беременных и новорожденных мышей при экспозиции арсенитом натрия. // Архив патологии. –1995.- Т.57, N 2.- с.52 – 58
148. Смирнов В.С., Петленко С.В., Сосюкин А.Е. Иммунотоксические эффекты химических ксенобиотиков // Иммунодефицитные состояния / ред. – В.С. Смирнов и И.С.Фрейдлин.- СПб: «Фолиант», 2000.- 337-367.

149. Старченко А.А., Красковская С.В. Система индивидуальной психо- и иммунотерапии в нейроанестезиологической практике// Анестезиол. и реаниматол.- 1996. -№3.- С.53-57.
150. Стасий Е.Д., Балаболин И.И., Ботвиньева, Степаненко Р.Н. Иммуномодулирующая терапия при пищевой инфекции у детей // Иммунология. – 1990. - №5. – С. 45-48.
151. Степаненко Р.Н., Рязанов Н.К., Молдокулов О.А., Власенко Р.Я. Миелопид; иммунокоррегирующая активность при переломах лицевых костей и травматическом остеомиелите // Иммунология. - 1991. - № 1. - с.44 - 47.
152. Страйер Л. Биохимия : Пер. с нем. –М.: Мир, 1985.-Т 2.- с. 71-82.
153. Стрельникова Л. А., Раткина В. Г. Влияние атмосферных загрязнений на активность лизоцина слюны и бактерицидность кожи у детей // Тр. Томск. мед. ин-т.,1983. - Т. 31.-С. 240-243.
154. Таранов В.А., Короткова М.Н. Действие Т-активина на макрофаги in vitro // Интерлейкины и другие медиаторы в клинической иммунологии. – М., 1989. – С. 56-60.
155. Тихонов В. Н. К оценке изменений массы внутренних органов животных в токсикологических исследованиях //Гигиена и санит. –1981.- №7.-с. 58-59.
156. Торчинский Ю.М. Сера в белках. – М., Наука, 1977. – с.43-46.
157. Трахтенберг И.М., Шафран Л.М. Тиоловые яды. В кн.: Общая токсикология / Под редакцией Б.А. Курляндского, В.А. Филова – М.: Медицина, 2002. - 111-176 с.
158. Турсунов Б.С., Махмудов К.Д., Туйчиев Д.А. Целесообразность применения миелопида (В-активина) в комплексном лечении ожоговой болезни // Иммунология. - 1992. - № 6.- с. 42 - 43.
159. Урбах В. Ю. Статистический анализ в биологических и медицинских исследованиях. – М.: Медицина, 1975.- 295 с.
160. Утешев Б. С. О некоторых методологических вопросах скрининга

- иммуностропных средств // Фармак. и токсикол.- 1984.-№3.- с. 5-13.
161. Утешев Б.С., Сергеев А.С., Коростелев С.А. Анализ современных направлений в создании иммуностропных средств // Эксперим. и клин. фармакол.-1995.-Т.58, №3.- С.3-7.
  162. Феерман И.С., Бонгард Э.М., Лашенко Н.С. К вопросу о хронической интоксикации хлорофосом //Гиг. труда.-1964.-N 11.-С. 36-38.
  163. Фридман Г.И. Влияние севина, хлорофоса и ДДТ на некоторые специфические иммунологические показатели иммунобиологической и общей реактивности организма (к проблеме токсических воздействий малой интенсивности) //Вопросы гигиены и токсикологии пестицидов. М.: Медицина, 1970.-С. 139-145.
  164. Фримель Х., Брок Й. Основы иммунологии: Пер. с нем. –5-е изд. – М.: Мир, 1986.- 254 с.
  165. Хавинсон В.Х, Морозов В.Г. Серый С.В. Иммунокорректирующая терапия тимогеном при заболеваниях и травмах// Взаимодействие нервной и иммунной систем. Тез. Докладов всесоюзного симпозиума (Оренбург, 28-30 августа 1990 г.- Л. – Ростов- на- Дону.- 1990,-С.163.
  166. Хавинсон В.Х., Морозов В.Г. Иммуномодулирующее действие фактора тимуса в патологии // Иммунология. – 1981. - № 5. – С. 28-31.
  167. Хавинсон В.Х., Морозов В.Г. Экспериментальное клиническое изучение нового иммуномодулирующего препарата - тималина // Воен.-мед. журн. –1982.- № 5. – С. 37-39.
  168. Хавинсон В.Х, Морозов В.Г. Серый С.В. Иммунокорректирующая терапия тимогеном при заболеваниях и травмах// Взаимодействие нервной и иммунной систем. Тез. Докладов всесоюзного симпозиума (Оренбург, 28-30 августа 1990 г.- Л. – Ростов- на- Дону.- 1990. -С.163.
  169. Хаитов Р. М., Пинегин Б. В. Современные подходы к оценке основных этапов фагоцитарного процесса // Иммунология. –1995.- №4.- с. 3-8.
  170. Хаитов Р.М., Пинегин Б.В., Истамов Х.И. Экологическая иммунология.- М.: Изд-во ВНИРО, 1995.- 219 с.

171. Хаитов Р. М., Игнатьева Г.А., Сидорович И.Г. Иммунология. – М.: Медицина, 2000.- 430 с.
172. Хейхоу Ф. Г. Дж., Кваглино Д. Гематологическая цитохимия. – М.: Медицина, 1983.- 319 с.
173. Хусинов А.А., Хайдарова Д.С., Гушин Г.В., Лесникова М.П. Нейроэндокринная система и специфические факторы иммунитета при отравлении пестицидами //Бюл. эксперим. биологии и мед.-1991.-Т. 111, N 12.-С. 623-624.
174. Чейдо М.А., Идова Г.В., Папсуевич О.С. Участие низкомолекулярных пептидов и их аналогов в иммуномодуляции //Ин-т. физиол. СО АМН СССР.-Новосибирск, 1990.-12 с.-Деп. в ВИНТИ 27.07.9., N 4278-B90.
175. Чертков И.Л., Дерюга Е.И., Дризе Н.И. Прimitивная стволовая кроветворная клетка// Вест. АМН СССР. –1990.- №9. С.35-37.
176. Шафеев М.Ш. Влияние хлорофоса на некоторые показатели иммунологической реактивности организма//Изучение экстремальных состояний.-Казань, 1976.-С. 60-63.
177. Шафеев М. Ш. Влияние некоторых пестицидов и их комбинаций на показатели иммунитета и неспецифической реактивности организма: Автореф. дис. канд. мед. наук.- Казань, 1978.-26 с.
178. Шведов В. Л., Анисимова Г. Г. Изменение некоторых показателей клеточного иммунитета у крыс при хроническом радиационно-химическом поражении //Гигиена и сан.-1989.-N 7.-С. 16-19.
179. Щеглова М.Ю., Макарова Г.А. Клиническая эффективность пименения иммунофана у больных бронхиальной астмой // Internatinal J. on Immunorehabilitation. Физиология и патология иммунной системы. – 2003.- Т. 5, №2.- с. 222.
180. Щербаков А.А., Любунь Е.В., Кузнецов П.Е., Костерин П.В. Трансформация люизита в объектах окружающей среды. - Саратов, Научная книга, 2002. - 80 с.
181. Ширинский В.С., Жук Е.А. Проблемы иммуностимулирующей терапии

- //Иммунология.-1991.-N 3.-С. 7-10.
182. Ширинский В.С., Жук Е.А. Проблемы фармакодинамики и фармакокинетики иммуностимулирующих препаратов //Иммунология.-1994.-N 6.-С. 27-29.
  183. Ширшев С.В. Зависимость внутриклеточного уровня цАМФ интактных спленоцитов от популяционного состава клеточной суспензии и активности циклооксигеназы // Бюл. эксперим. биол. и мед. -1998.- №6.- с. 666-669.
  184. Шляхов Э. Н., Гылка В.В. Тактивин – иммуномодулирующий препарат тимуса // Здоровоохранение (Кишинев).-1989.- С. 20-23.
  185. Шубик В. М. Проблемы экологической иммунологии.-Л., 1976.- 216с.
  186. Юшков В.В., Хавинсон В.Х. Выявление и анализ противовоспалительной активности иммуномодуляторов // Патол. физиол. и эксперим. терапия.-1993.-N 2.-С. 11-13.
  187. Яковлев Г.М., Морозов В.Г., Хавинсон В.Х. Современные представления о цитомединах и проблемы биорегулирующей терапии // Воен.-мед. журн. – 1987.- № 6. –С.37-40.
  188. Яковлев Г.М., Новиков В.С., Хавинсон В.Х.// Резистентность, стресс, регуляция. Л., Наука, 1990.-237 с.
  189. Яковлев Г.М., Хавинсон В.Х. Коррекция тимогеном стресс-индуцированных дисфункций иммунной системы//Стресс и иммунитет: Тез. Докл. Всес. Конф. «Стресс и иммунитет (психонейроиммунол.)», Ростов на Дону, 31 авг.-1 сент., 1989.-Л., 1989.-С. 54.
  190. Allen A. L., Koller L. D., Pollock I. A. Effect of foxaphene exposure on immune responses in mice //J. Toxicol and Environ. Health.-1983.-Vol. 11, N 1.-P. 61-69.
  191. Bagiuski B. Einflub von Blei und Cadmium anf die Vitalitat und Phagozytosefahigkeit humaner polymorphkerniger Zenkoryten //Zbl. Bakteriол.-1985.-Bd. 181, N 6.-S. 461-468.
  192. Blackley B.R., Sisodia C.S., Mukkur T.K. The effect of methylmercury,

- tetraethyllead and sodium arsenite on the humoral immune response in mice //Toxicol. Appl. Pharmacol.-1980.-Vol. 52, N 1.- P. 245-250.
193. Blanton R. H., Myers M. J., Bick P. H. Definition of the cellular targets of benzo-(A)-pyrene immunotoxicity //Toxicologist.-1986.-Vol. 6, N 1.-P. 166.
  194. Bleavins M. R., Aulerich R. J. Immunotoxicologic effects of polychlorinated biphenyls on the cell-mediated and humoral immune systems //Residue Rev.-Vol. 90, New York e.a.-1983.-P. 57-67.
  195. Boman H.G. Peptid antibiotics and their role in innate immunity // Ann. Rev. Immunol.-1995.- Vol. 13.-P. 61-92.
  196. Burns L. A., Butterworth L. F., Munson A.R. Reversal of gallium arsenide-induced suppression of the antibody response by a mixed disulfide metabolite of meso-2,3-dimercaptosuccinic acid //J. Pharmacol. and Exp. Ther.-1993.-Vol. 264, N 2.-P. 695-700.
  197. Burns L.A., Sikorski E.E., Saady J.J., Munson A.E. Evidence for arsenic as the immunosuppressive component of gallium arsenide //Toxicol. and Appl. Pharmacol.-1991.-Vol. 110, N 1.-P. 157-169.
  198. Charbonneau S.M., Spenser K., Bryce F., Santi E. Arsenic excretion by monkeys dosed with Arsenic – containing fish or with inorganic arsenic // Bull. Environ. Contam. Toxicol. – 1978. – Vol. 20. – P 470-477.
  199. Claman H.N. Corticosteroids as immunomodulators //Immunomodulation drugs / Ann. of the N.-Y. Acad. Sci. – 1993.-Vol. 685. –P. 288-292.
  200. Denning D. W., Webster A., David B. Detrimental effect of propylene glycol on natural killer cell and neutrophil function //J. Pharm. and Pharmacol.-1987.-Vol. 39, N 3.-P. 236-238.
  201. Descotes J. Immunotoxicology of drugs and chemicals. – Amsterdam- -N. Y- Oxford: Elsvier, 1986.- 400 p.
  202. Descotes J., Mazue G. Immunotoxicology // Adv. Vet. Sci. a Comp. Med. – 1987.- Vol. 31.-.p. 95-119.
  203. Dhabhar F. S., Millerr A. H., Mc Even B. S., Spenser R. L. Stress –induced in blood leukocyte distribution: A role of adrenal steroid hormones // J.

- Immunol.-1996. – Vol.157.- No 4.- P. 1638-1644.
204. Durant S. In vivo effects of catecholamines and glucocorticoids on mouse thymic cAMP content and thymolysis// Cell Immunol. -1986.-Vol. 102, N 1. -P. 136-143.
  205. Dwivedi P. D., Mishra A., Gupta G. S. D. et al. Inhalation toxicity studies of methyl isocyanate (MIC) in rats. Part IV. Immunologic response of rats one week after exposure: effect on body and organ weights, phagocytic and DTH response //Indian J. Exp. Biol.-1988.-Vol. 26, N 3.-P. 191-194.
  206. Ellman G.M., Countney K.D., Anders V. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity // Biochem. Pharm. -1961.- Vol. 7, N 1. – P. 88.
  207. Elsbach P., Weise J. Oxygen-dependent and oxygen-independent mechanisms of microbiological activity of neutrophils // Immunol.- Lett. - 1985.- Vol. 11.- No 3-4. - P. 159-163.
  208. Fergula J., Asherson G. L., Becker E. L. The effect of organophosphorus inhibitors, p-nitrophenol and cytochalasin-B on cytotoxic killing of tumor cells and the effect of shaking //Immunol. - 1972.- Vol. 23.- No 4. - P. 577 - 590.
  209. Ferry F., Donner M. In vitro modulation of murine natural killer cytotoxicity by zinc //Scand. J. Immunol.-1984.-Vol. 19, N 5.-P. 435-445.
  210. Gabon P.A. et al. Organic acids in ethylene glycol intoxication// Annals of Internal Medicine.-1986.- Vol.105, № 1.- P. 16-20.
  211. Gainer I.H. Increased mortality in encephalomyocarditis virus - infected mice consuming cobalt sulfate: tissue concentrations of cobalt //Amer. J. Vet. Res.-1972.-Vol. 33, N 3.-P. 2067-2070.
  212. Gennari M., Bouthillier Y., Ibanez O. M. et al. Effect of silica on the genetic regulation of antibody responsiveness //Ann. Inst. Pasteur. Immunol.-1987.- Vol. 138, N 3.-P. 359-370.
  213. Georgiev V.St., Yamaguchi H. Immunomodulation drugs / Ann. of the N.-Y. Acad. Sci. – 1993.-Vol. 685. – 816 p.
  214. Georgiev V.St., Albright J.E. Cytokines // Immunomodulation drugs / Ann.

- of the N.-Y. Acad. Sci. – 1993.-Vol. 685. –P.284-602.
215. Gilbert R.V., Hoffmann M.K. cAMF is essential signal in the induction of antibody production by B cells but inhibits helper function of T cells// J. Immunol.-1985.-Vol.135, №3.-P.2084-2089.
  216. Hewett J. A., Roth R. A. Dieldrin activates rat neutrophils in vitro //Toxicol. and Appl. Pharmacol.-1988.- Vol. 96, N 2.-P. 269-278.
  217. Iokobsen D. et al. Glikolat caused the acidosis in the ethylen glycol poisoning // Acta Med. Skand.- 1984.-Vol.216, № 3.- P. 409-416.
  218. Janik G. Kopp W.C. Levamisol-induced neopterin synthesis //Immunomodulation drugs / Ann. of the N.-Y. Acad. Sci. – 1993.-Vol. 685. – P.252-258.
  219. Jerne N. K., Nordin A. A. Plaque formation in agar by sirgte antibody producing cells //Seince.- 1963.- Vol. 140.- No 4. - P. 405.
  220. Khaitov R.M. Vaccines based on synthetic polyions and peptides//Immunomodulation drugs / Ann. of the N.-Y. Acad. Sci. – 1993.-Vol. 685. –P. 788-802.
  221. Kimball E.S. Experimental modulatio of IL-1 production and cell surface molecule expression by levamisol //Immunomodulation drugs / Ann. of the N.-Y. Acad. Sci. – 1993.-Vol. 685. –P.259-268.
  222. Kimber I. Chemical – Induced Hypersensitivity //In.: Exper. Immun.- Boca Raton, New York, London, Tokyo.- 1996.- P. 391-417.
  223. Kimber I., Moore M. Mechanism and regulation of natural cytotoxiciti. Minireview on cancer research // Exp. Cell Biol.-1985.-Vol. 53, N 2.-P. 69-84.
  224. Kullenkampff J., Janossy G., Greanes M.F. Acid esterase in human lymphoid cells and leukaemic blasts: a marker for T-lymphocytes //Brit. J. Haemat.- 1977.-Vol. 36, N 2.-P. 231-240.
  225. Kutty K. M., Chandra R. K., Chandra S. Acethylcholinesterase in erythrocytes and lymphocytes: its contribution to cell membrane structure and function //Experientia. - 1976.- Vol. 32.- No 3. - P. 289.
  226. Li C. G., Lam R. W., Gam L. T. Esterases in human leucocytes //J.



- Histochem. Cytochem.- 1973.- Vol. 21.- No 1. - P. 1-12.
227. Lilienfeld D.E. Arsenic, geographical isolates, environmental epidemiology, and arteriosclerosis //Arteriosclerosis.-1988.-Vol. 8, N 5.-P. 449-451.
  228. Loose L.D. Immunotoxicology-1985 //Year Immunol.- 1985-1986.-Vol. 2.- Basel e.a., 1986.-P. 365-370.
  229. Luster M. J., Blank J. A., Dean J. H. Molecular and cellular basis of chemically induced immunotoxicity //Annu. Rev. Pharmacol. and Toxicol.-Vol. 27.-Palo Alto, Calif.-1987.-P. 23-49.
  230. Madden K. S., Livnat S. Catecholamine action and immunologic reactivity // In: Psychoneuroimmunology, Second Edition.- academic Press, Inc.-1991.- 283-310.
  231. Marshak-Rothstein A., Fink P., Gridley T. et al. Properties and application of monoclonal antibodies directed against determinants of the Thy-1 locus // J.Immunol. -1979.-Vol.122.-P. 2491-2497.
  232. Marx J.L. How killer cells kill their targets. //Science.-1986.-Vol. 231, N 4744.-P. 1367-1369.
  233. McCabe M.J, Maguire D., Nowak M. The effects of arsenic compounds on human and bovine lymphocyte mitogenesis in vitro //Environ. Res.-1983.-Vol. 31, N 2.-P. 323-331.
  234. Mc Grath J., Wong S. Immunotoxicology of inhalants and methods of evaluation //Inhal. Toxicol.: Res. Meth., Appl., and Eval.-New York, Basel, 1987.- P. 255-291.
  235. Miller K. Immunotoxicology //Clin. and Exp. Immunol.-1985.-Vol 61, N 2.- P. 219-223.
  236. Minich E., Fefer A. Biologocal, response modifiers: subcombite report //Nat. Cancer Inst. Monograf. – 1983.-Vol. 63. – P. 1-252.
  237. Mikhailova A.A. Fonina L.A. Myelopeptides – immunoregulatory cytokines produces by the bone marrow cells // Eur. Jed. Immunol. Soc.10<sup>th</sup> Meet., Edinburg, 10-12 Sept., 1990: Abstr.- Edinburg, 1990.- P.125.
  238. Munro N.B., Watson A.P., Ambrose K.R., Griffin G.D. Treating exposure to

- chemical warfare agents: implications for health care providers and community emergency planning // *Environmental Health Perspectives.* - 1990. - Vol. 89. – P. 205-215.
239. Nogueira N. Intracellular mechanisms of killing // *Immunobiol. Parasit. and Parasitic. Infec.* - New York-London, 1984.-P. 53-69.
  240. Nouragargh S., Holt J.R.S. Ingibition of human neutrophil degranulation by forskolin in the presence phosfodiesterase inhibitors// *Eur. J. Pharmacol.*- 1986.- Vol. 222, N2.-P. 205-212.
  241. Park B. H. The use and limitations of the nitroblue tetrasolium test as a diagnostic aid // *L. Pediatr.*- 1971.- Vol. 72.- No 2.- P. 375-378.
  242. Pfeifer C., Murrey J., Madri J., Bottomly K. Selective activation of Th1- and Th2-like cells in vivo: Response to human collagen IV // *Immunol. Rev.* – 1991.- Vol. 123, No 2. - P. 65-84.
  243. Richman D.P., Arnason B.G.W. Nicotinic acetylcholine receptor: evidence for a functionally distinct receptor on human lymphocytes // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*-1979.-Vol. 76, N 9.-P. 4632-4635.
  244. Sauders V. M., White K. L., Shopp G. M. Munson A.E. Humoral and cell-mediated immune status of mice exposed to 1,1,2-trichloroethane // *Drug and Chem. Toxicol.*-1985.-Vol. 8, N 5.-P. 357-372.
  245. Segal A. W. Nitroblue – tetrasolium test // *Lancet.* - 1974.- Vol. 2. - No 7891. - P. 1248-1252.
  246. Sikorski E.E., Burns L.A., Stern M.L. et al. Splenic cell targets in gallium arsenide-induced suppression of the primary antibody response // *Toxicol. and Appl. Pharmacol.*-1991a.-Vol. 110, N 1.-P. 129-142.
  247. Sikorski E.E., Burns L.A., McCoy K.L. et al. Suppression of splenic accessory cell function in mice exposed to gallium arsenide // *Toxicol. and Appl. Pharmacol.*-1991b.-Vol. 110, N 1.-P. 143-156.
  248. Smialowicz R. J., Rogers R. R., Riddle M. M. et al. Manganese chloride enhances murine cell-mediated cytotoxicity: effects on natural killer cells // *J. Immunopharmacol.*-1984.-Vol. 6, N 1-2.-P. 1-23.

249. Smialowicz R. J., Rogers R. R., Riddle M. M. Stott G., A. Immunologic effects of nickel. I. Suppression of cellular and humoral immunity //Environ. Res.-1984.-Vol. 33, N 2.-P. 413-427.
250. Smialowicz R. J., Luebke R. W., Rogers R. R. et al. Manganese chloride enhances natural cell-mediated immune effector cell function: effects on macrophages //Immunopharmacology.-1985.-Vol. 9, N 1.-P. 1-11.
251. Spreafico F., Vecchi A. Immunomodulation by xenobiotics: the open field of immunotoxicology /Immunomodul. Front. and Adv. Proc. Symp. Recent Adv. Immunomodul., Viareggio, 14-16 May, 1982.-New York; London, 1984.-P. 311-329.
252. Solberg C. O. Phagocytic cell in host defence //Acta oto-laryngel.- 1984.- Vol. 98. - No 407. - P. 5-13.
253. Sosa M., Sana A. Immunopharmacologic properties of inosine 5'- methyl monophosphate (MIMP) //Immunomodulation drugs / Ann. of the N.-Y. Acad. Sci. – 1993.-Vol. 685. –P. 458-463.
254. Stevens G. Immunomodulation drugs: where and whither//Immunomodulation drugs / Ann. of the N.-Y. Acad. Sci. – 1993.-Vol. 685. –P. 430-431.
255. Street J.C., Sharma R.P. Alteration of induced cellular and humoral immune responses by pesticides and chemicals of environmental concern: quantitative studies of immunosuppression by DDT, aroclor 1254, cirbarul //Toxicol. Appl. Pharmacol.-1975.-Vol. 32, N 3.-P. 587-602.
256. Sullivan J. B. Immunological alterations and chemical exposure //J. Toxicol-Clin. Toxicol.-1989.-Vol. 27, N 6.-P. 311-343.
257. Szelenyi J.G., Bartha E., Hollan S.R. Acetylcholinesterase activity of lymphocytes: an enzyme characteristic of T-cells // Brit. J. Haematol.- 1982.- Vol. 50, N 2. - P. 241-245.
258. Szot R.J., Murphy S.D. Phenobarbital and doxamethasone inhibition of the adrenocortical response of rats to toxic chemicals and other stresses //Toxicol. Applied Pharmacol.-1970.- Vol. 17, N 3.-P. 761-773.

259. Tephly T.R. The biochemical toxicology of metanol //Toxicol. Lett. - 1983.- Vol. 18, No 7. - P. 34-36.
260. Thomas I.K., Imamura T. Immunosuppressive effect of an impurity of malathion: inhibition of murine side effect of an impurity of malathion inhibition of murine T and B lymphocyte responses by O,O,S-trimethyl phosphorothioate //Toxicol. and Appl. Pharmacol.-1986a.-Vol. 83, N 3.-P. 456-464.
261. Thomas P. T., Ratajczak H. V., Aranvic C. et al. Evaluation of host resistance and immunefunction in cadmium exposed mice //Toxicol. and Appl. Pharmacol.-1985.-Vol. 80, N 3.-P. 446-456.
262. Tiefenbach B., Hennighauzen G., Lange P. Zum Mechanismus der akuten Wirkungen phosphororganischer Pestizide auf das Immunsystem //Zbl. Pharm.-1983.-Bd. 122, H. 2.-S. 156.
263. Tiefenbach B., Wichner S. Dosisabhängigkeit und Mechanismus der acuten Wirkung von Methamidophos auf das Immunsystem der Maus //Z. gesamte Hyg. und Grenzdeb.-1985.-Bd. 31, N 4.-S. 228-231.
264. Till J.E., McCulloch E.A. A direct measurement of the radiation sensitivity of normal mouse bone marrow cells //Rad. Research. -1961. -Vol. 14, N 2. -P. 213-222.
265. Trinchievi G., de Marchi M. Antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity in humans III. Effect of protease inhibitors and substrates //J. Immunol.-1976.-Vol. 116, N 4.-P. 885-891.
266. Van Loveren. H., Kraine E. I., Kraine-Franken M. A. M., Vos J.G. Immunotoxicity assessment in the rat: a tiered approach //Pharmacol. and Toxicol. Suppl.-1990.-Vol. 66, N 5.-P. 18.
267. Vos J.G., Klerk A., Krajnc E.I. et al. Immunotoxicity of TBTO. II. Suppression of lymphocyte transformation, activity of macrophages and natural killer cells // Pharm. Weekbl. Sci. Ed.- 1984.-Vol. 6, N 4.-P. 183.
268. Vos J. G., Kraing E. I., Beekhot P. K., Van Logten M. J. Methods for testing immune effects of toxic chemicals: evaluation of the immunotoxicity of various

- pesticides in the rat. Pestic. Chem.: Hum. Welfare and Environ. // Proc. 5-th Int. Congr., Kyoto, Japan, 29 Aug. –4 Sept., 1982. –Vol. 3.- Oxford e.a. –1983.- P. 497-504.
269. Whisler R. L.. Stobo J.D. Heterogeneity of murine regulatory T cells // J. Exp. Med.-1976.-Vol. 144, N 2.-P. 398-413.