

П.Ф. Забродский, А.В. Абаймов

**Иммунотоксические свойства метаарсенита
натрия**

**П.Ф. Забродский, 2009
© А.В. Абаймов, 2009**

ISBN 978–5 –91272-254-74

УДК 612.014.46:616–033
ББК 52.84+52.54+52.8 Я 28
3–045

Саратов – 2009

ОГЛАВЛЕНИЕ

	стр.
Перечень сокращений.....	5
Введение.....	7
Глава 1. Современные представления о действии мышьяксодержащих соединений на неспецифические факторы защиты организма и иммунный статус.....	15
1.1.Общая характеристика соединений трехвалентного мышьяка.....	15
1.2.Токсикологическая характеристика метаарсенита натрия.....	18
1.3. Общая характеристика нарушений доиммунных механизмов защиты и иммунного статуса метаарсенита натрия и другими мышьяксодержащими соединениями.....	23
Глава 2. Материал и методы исследований.....	29
2.1. Объект исследования и применяемые препараты.....	29
Глава 3. Действие метаарсенита натрия на показатели антиинфекционной неспецифической и иммунологической резистентности организма.....	44
3.1. Изменение интегральной антиинфекционной неспецифической резистентности организма.....	44
3.2. Оценка интегральной антиинфекционной неспецифической и иммунологической резистентности организма при экспериментальной инфекции после острой интоксикации.....	47
3.3. Изменение бактерицидной активности сыворотки крови.....	50
3.4. Действие метаарсенита натрия на сывороточную активность лизоцима.....	52
3.5. Действие острой интоксикации метаарсенита натрия на фагоцитарную активность нейтрофилов.....	54
Глава 4. Действие метаарсенита натрия на содержание лимфоцитов в	

органах системы иммунитета.....	59
4.1. Влияние метаарсенита натрия на содержание лимфоцитов в органах системы иммунитета.....	59
4.2. Изучение нарушения миграции Т-лимфоцитов из тимуса и В-клеток из костного мозга.....	63
Глава 5. Действие метаарсенита натрия на клеточные иммунные реакции	66
5.1. Изучение функции Т-лимфоцитов под влиянием метаарсенита натрия.....	66
5.2. Оценка функции Th1-клеток по реакции гиперчувствительности замедленного типа.....	68
5.3. Изучение антителозависимой клеточной цитотоксичности при действии метаарсенита натрия.....	71
5.4. Воздействие метаарсенита натрия на функцию естественных клеток-киллеров.....	74
5.4.1. Действие метаарсенита натрия на активность естественных клеток-киллеров селезенки <i>in vivo</i>	74
5.4.2. Влияние метаарсенита натрия на активность естественных клеток-киллеров селезенки <i>in vitro</i>	76
Глава 6. Влияние метаарсенита натрия на гуморальный иммунный ответ	79
6.1. Действие на Т-зависимые гуморальные иммунные реакции.....	79
Глава 7. Роль кортикостерона, перекисного окисления липидов, ингибирования эстераз и относительной функции Th1-, Th2-лимфоцитов в нарушении иммунного статуса после воздействия метаарсенита натрия	92
7.1. Оценка содержания кортикостерона в плазме крови.....	92
7.2. Исследование влияния кортикостерона на показатели системы иммунитета.....	93
7.3. Изменение показателей перекисного окисления липидов.....	95
7.4. Инактивация эстераз иммуноцитов под влиянием метаарсенита натрия.....	98

7.5. Роль редукции Th1-, Th2-лимфоцитов в редукции иммунных реакций под влиянием метаарсенита натрия.....	101
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	105
ВЫВОДЫ	112
ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ	113
ЛИТЕРАТУРА	114

ПЕРЕЧЕНЬ СОКРАЩЕНИЙ

БОВ (ОВ)	- боевое отравляющее вещество (отравляющее вещество)
ТХ	- токсичные химикаты
ХО	- химическое оружие
МАН	- метаарсенит натрия
НРО	- неспецифическая резистентность организма
НИРО	- неспецифическая и иммунологическая резистентность организма
ПОЛ	- перекисное окисление липидов
БАСК	- бактерицидная активность сыворотки крови
ЕКК	- естественные клетки-киллеры
ФМАН	- фагоцитарно-метаболическая активность нейтрофилов
ГЗТ	- гиперчувствительность замедленного типа
АЗКЦ	- антителозависимая клеточная цитотоксичность
АОК	- антителообразующие клетки
КС	- кортикостерон (кортикостероиды)
АОС	- антиоксидантная система
ММС	- моноцитарно-макрофагальная система
ГГНС	- гипоталамо-гипофизарно-надпочечниковая система
ИФН- γ	- γ - интерферон
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
ММС	- моноцитарно-макрофагальная система
ПСКК	- полипотентная стволовая кроветворная клетка
ПЯЛ	- полиморфноядерные лейкоциты
КОЕ	- колониеобразующие единицы
РТМЛ	- реакция торможения миграции лейкоцитов

ОДЛТА	- отрицательный десятичный логарифм титра антител
СКК	- стволовая кроветворная клетка
АХЭ	- ацетилхолинэстераза
ЭБ (ЭК)	- эритроциты барана (эритроциты кур)
СПР	- суммарная продукция радикалов
САС	- симпатико-адреналовая система
Ig	- иммуноглобулин
Et ₅₀	- среднеэффективное время жизни животных
LD ₅₀	- средняя смертельная доза, вызывающая смертельный исход у 50% отравленных животных
Th1, Th2	- Т-лимфоциты - хелперы типа 1, 2
Vi-антиген (Vi-Ag)	- тимуснезависимый Vi - антиген брюшнотифозной вакцины

ВВЕДЕНИЕ

Изучение действия ксенобиотиков на доиммунные факторы защиты организма от инфекций (неспецифическую резистентность организма - НРО) и иммунный статус является одной из наиболее актуальных проблем экологии. Обеспечение с помощью современных технологий материальных потребностей общества входит в явное противоречие с еще недостаточно изученными последствиями антропогенного и техногенного загрязнения окружающей среды (Хаитов и др, 1995; Забродский, Мандыч, 2007).

Согласно оценкам независимых экспертов, большинство крупных промышленных регионов мира уже многие годы представляют собой кризисные экологические зоны с характерной для них повышенной заболеваемостью. Поскольку кардинальное разрешение экологического кризиса представляется в настоящее время весьма проблематичным, а единственным путем снижения антропогенного прессинга и профилактики глобальных экологических катастроф является комплексный мониторинг состояния природной среды и ее обитателей, одним из элементов которого является оценка действия ксенобиотиков на иммунную систему организма как наиболее чувствительную к токсикантам (Хаитов и др., 1995; Забродский, 1998, 2002, 2005; Vos et al., 1983; Loose, 1985; Miller, 1985; Luster et al., 1987; Sullivan, 1989; Hermann, Kim, 2005).

Иммунная система животных, находящихся в экологически неблагоприятных зонах, испытывает двойную нагрузку - как вследствие прямого действия загрязняющих факторов, так и в результате возрастающего персистентного потенциала микроорганизмов, нарушающих доиммунные и иммунные механизмы защиты от инфекций. В результате значительно возрастает вероятность поражения НРО и системы иммунитета, возникновение вторичных иммунопатологических состояний и обусловленных ими инфекционных осложнений и заболеваний (McManus, Tersago et al., 2004; Huebner, 2005).

Конференция ООН в Рио-де-Жанейро в 1992 г. показала, что нельзя больше рассматривать окружающую среду и социально-экономическое

развитие как изолированные области деятельности. Поэтому в принятой программе «Повестка дня на XXI век» определены пути всемирного сотрудничества в целях гармоничного достижения высокого качества окружающей среды и здоровой экономики для всех народов мира. Одной из задач программы является прекращение и запрещение применения химикатов повышенной опасности, отличающихся токсичностью и стойкостью (Курляндский и др., 2005).

В положениях «Концепции федеральной целевой программы «Национальная система химической и биологической безопасности Российской Федерации (2009 - 2013 годы)» указано, что появились новые биологические и химические угрозы для национальной безопасности страны. Целью государственной политики в области обеспечения химической и биологической безопасности является последовательное снижение до приемлемого уровня риска воздействия опасных химических и биологических факторов на биосферу, техносферу и экологическую систему.

В настоящее время частота аварий на химических объектах растет, увеличивается вероятность массовых поражений при транспортировке и хранении химических соединений, существует необходимость уничтожения десятков тонн токсичных химикатов (ТХ), в том числе боевых отравляющих веществ (БОВ), в частности, люизита в соответствии с Конвенцией о запрещении разработки, производства, накопления и применения химического оружия (ХО) и его уничтожения (Саватеев, Куценко, 1982, 1993; Александров, Емельянов, 1990; Бадюгин и др., 1991; Конвенция..., 1993; Хаитов и др., 1995; Забродский, 1998, 2002, 2005; Калинина, 2000а). При этом первостепенную важность приобретает вопрос об иммунотоксичности метаарсенита натрия (МАН) - продукта переработки люизита. Это связано с тем, что на арсеналах Министерства обороны РФ находятся на хранении большие количества мышьяксодержащих веществ. Запасы люизита на момент начала его уничтожения, составляли порядка 7,5 тыс. т в местах его хранения в Саратовской области и Удмуртии (Алимов и

др., 2000 а, б, в). На территории Саратовской области находится могильник, содержащий около 3 тыс. т адамсита и дифенилхлорарсина. В процессе уничтожения люизита и других мышьяксодержащих отравляющих веществ образуется значительное количество реакционных масс, в состав которых входит и МАН. В настоящее время, продукты утилизации ТХ хранятся на территории объектов по уничтожению ХО (Калинина, 2000 б; Щербаков и др., 2002).

В соответствии с Федеральной программой уничтожения ХО в пос. Горный Саратовской области после детоксикации и уничтожения люизита методом щелочного гидролиза получены реакционные массы, в состав которых входят треххлористый мышьяк и МАН (Алимов и др., 2000 а, в).

Хроническое отравление мышьяком признают важной проблемой мирового здравоохранения, так как длительное воздействие неорганического мышьяка стимулирует канцерогенез, в частности, снижая иммунную защиту организма (Yu et al., 2006).

Действие МАН на иммунный гомеостаз изучено недостаточно (Горшенин и др., 1998; Рембовский и др., 2000; Василенко, 2004). МАН может снижать доиммунные факторы защиты организма (НРО) и показатели системы иммунитета у персонала объектов по хранению и уничтожению ХО, а также у животных, находящихся вблизи данных объектов. Причем, иммунотоксический эффект МАН может оказывать при воздействии достаточно низких доз ввиду высокой чувствительности иммунной системы к токсикантам (Василенко, 2004; Забродский, Мандыч, 2007; Descotes, 1986, 1987; Luster et al., 1987; Hermann, Kim, 2005).

Существуют многочисленные доказательства, полученные в процессе мониторинга за состоянием здоровья и системы иммунитета животных, подвергающихся острому и хроническому действию токсичных химических веществ, что нарушение иммунного гомеостаза (повреждение популяций и субпопуляций лимфоцитов) приводит к инфекционным осложнениям и заболеваниям (Забродский, Мандыч, 2007; Descotes, 1986, 1987; Luster et al.,

1987; Sullivan, 1989; McManus, Tersago et al., 2004; Huebner, 2005). Не вызывает сомнения, что нарушения иммунного гомеостаза при отравлении мышьяксодержащими соединениями, в частности МАН, нуждаются в дальнейшем изучении.

Таким образом, учитывая широкое распространение МАН в химической промышленности, недостаточно изученные особенности действия данного токсиканта на механизмы иммунорезистентности организма, накопление продуктов деструкции люизита на специальных объектах, вероятность применения мышьяксодержащих соединений при террористических актах, существующую возможность поражения работающих на химических объектах по уничтожению ТХ и населения близлежащих населенных пунктов в случае аварий, следует заключить, что проблема исследования нарушений иммунорезистентности организма животных под влиянием МАН 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. Исследовать влияние МАН на неспецифическую резистентность организма и иммунный статус.

Глава 1. СОВРЕМЕННЫЕ ПРЕДСТАВЛЕНИЯ О ДЕЙСТВИИ МЫШЬЯКСОДЕРЖАЩИХ СОЕДИНЕНИЙ НА НЕСПЕЦИФИЧЕСКИЕ ФАКТОРЫ ЗАЩИТЫ ОРГАНИЗМА И ИММУННЫЙ СТАТУС

1.1 Общая характеристика соединений трехвалентного мышьяка

Элементарный мышьяк и его соединения широко распределены во внешней среде и в пищевых продуктах, поскольку они принадлежат к группе «рассеянных» элементов, присутствующих во всех экосистемах. Среднее содержание мышьяка для незагрязненных почв составляет 2 мг/кг (Гамаюрова, 1993). Эта концентрация не является опасной для здоровья человека. Почвы, содержащие значительное количество мышьяка, например, в результате возможных аварий или аварийных ситуаций на объектах по хранению и уничтожению ХО, представляют угрозу для населения и окружающей среды. 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 металлических сплавах (Ершов, Плетенева, 1989).

В большинстве продуктов присутствие мышьяка (мышьяковистого ангидрида, мышьяковокислого кальция, МАН, «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, 1978; Chavan et al., 2007). Как лекарственное средство соединения мышьяка известны в течении 2000 лет. Мышьяк 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, 1989). Ведутся разработки по исследованию применения триоксида мышьяка в качестве иммуномодулятора в лечении миеломной болезни (Kalmadi, Hussein, 2006). Общее содержание мышьяка в организме взрослого человека составляет около 20 мг, а среднесуточное поглощение его из источников окружающей среды - менее 1 мг (Бертрам и др., 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 и др., 1995; Charbonneau et al., 1978).

Соединения мышьяка были обнаружены в альбатросах в северной части Тихого океана. Присутствие в птицах солей мышьяка связаны со снижением у них фагоцитоза и являются следствием загрязнения окружающей среды тяжелыми металлами (Finkelstein et al., 2007).

Присутствие мышьяка в воде подавляет доиммунные механизмы защиты у рыб *Danio rerio*. Ряд авторов предлагают изучение иммуотоксичности ксенобиотиков (ядовитых веществ окружающей среды), в частности низких уровней мышьяка, используя модели устойчивости эмбрионов рыб к бактериальной и вирусной инфекции (Nayak et al., 2007).

Степень загрязнения окружающей среды мышьяком и другими тяжелыми металлами столь высока, что экологами установлены высокие показатели корреляции между изменениями набора биомаркеров (массовые индексы органов, ферменты печени, концентрация стероидных гормонов, функция макрофагов) и концентрацией загрязнителей воды (мышьяком, кадмием, свинцом и другими металлами) в десяти местах обитания северной щуки (*Esox lucius*) в штате Аляска (Hinck et al., 2007)

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 (высокотоксичные – среднесмертельные концентрация и доза – соответственно – 1-5 мг/л/2 ч; 1-50 мг/кг) (Владимиров и др., 1989). Токсикологическое значение имеют такие химические формы мышьяка, как элементарный и 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 пятивалентного мышьяка менее токсичны. Соединения мышьяка могут быть расположены в порядке снижения токсичности: арсины (AsH_3 , AsR_3) > арсениты (AsO_2^-) > арсеноксиды (R-As=O) > арсенаты (AsO_2^{3-}) > метиларсоновая и диметиларсоновая кислоты (AsO_4^{3-} , HAsO_4^{2-} , H_2AsO_4^-) > As (Ершов, Плетнева, 1989).

Все основные токсические эффекты соединений мышьяка (трихлористого 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. Также к мышьяксодержащим БОВ относится стернит – адамсит (Лудевиг, Лос, 1983; Могуш, 1984; Саватеев, 1987; Бадюгин и др., 1992).

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 о.Тайване описано эндемическое поражение сосудов нижних конечностей, связанное с повышенным содержанием мышьяка в питьевой воде. В этой же популяции людей

отмечается генерализованный атеросклероз, увеличение частоты опухолей легких, кожи, печени, мочевого пузыря и почек (Lilienfeld, 1988). Доза мышьяка, составляющая 1 мг/кг, является минимальной смертельной для человека (Ершов, Плетнева, 1989). Хроническое отравление мышьяком признают важной проблемой мирового здравоохранения, так как длительное воздействие неорганического мышьяка (потребление питьевой воды) стимулирует раковые образования в легком, мочевом пузыре, почках, печени и коже (Yu et al., 2006).

По токсикологической классификации мышьяк и его соединения относятся 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) (Лудевиг, Лос, 1983; Могуш, 1984; Саватеев, 1987; Бадюгин и др., 1992; Маркова и др., 1998; Лужников, 1999; Лужников, Костомарова, 2000). Летальность при отравлениях соединениями мышьяка составляет 65-84% (Лужников, Костомарова, 1989).

1.2. Токсикологическая характеристика метаарсенита натрия

Известно, что арсениты (As^{3+}) являются тиоловыми ядами, ингибирующими различные ферменты (холинэстеразу, амилазу, липазу, алкогольдегидрогеназу, пируватоксидазу, аденозинтрифосфатазу и другие ферменты), участвующие в обмене АТФ (Саватеев, 1987; Владимиров и др., 1989; Ершов, Плетнева, 1989).

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, 1987; Ершов, Плетнева, 1989; Трахтенберг, Шафран, 2002.)

МАН 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 α -кетокислот в тканях. Через 5 и 150 мин 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. LD_{50} МАН для крыс при пероральном и подкожном поступлении составляют соответственно 150 и 41 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, 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. Высокая токсичность трехвалентного мышьяка объясняется 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, Плетнева, 1989) с дитиолами скорость реакции выше (Торчинский, 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. Пируватоксидазная ферментная система осуществляет 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, 1974; Александров, Емельянов, 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 действию МАН. Таким образом, фермент исключается из участия в окислительно-восстановительных процессах. Это приводит к нарушению синтеза лимонной и щавелевоуксусной 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 и углеводы, что приводит к ее гибели (Ленинджер, 1974; Диксон, Уэбб, 1982; Страйер, 1985; Александров, Емельянов, 1990).

Установлено влияние трехвалентного мышьяка на митоз, синтез и распаривание ДНК. При этом механизм токсического действия

преимущественно связан с блокированием тиоловых групп ДНК-полимеразы (Давыдова, 1989; Трахтенберг, Шафран, 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, аспартатаминотрансфераза, 2-глутаминокислотоксидаза, фумараза, 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, 1989; Скальная и др., 1995).

Существуют основания полагать, что гидролазы (в том числе холинэстеразы), а также холинорецепторы, содержащие SH-группы, могут взаимодействовать с МАН при проникновении его в ткани (Давыдова, 1989; Трахтенберг, Шафран, 2002; Куценко, 2004).

Симптоматика общетоксических проявлений при остром отравлении МАН прежде всего связана с тяжелыми поражениями ЦНС (после кратковременного возбуждения, обусловленного болевой импульсацией, развитием глубокой апатии, адинамией, 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) (Лудевиг, Лос, 1983; Могущ, 1984; Саватеев, 1987; Лужников, Костомарова, 1989, 2000; Бадюгин и др., 1992; Маркова и др., 1998).

МАН способен индуцировать бластомогенные процессы. Эпидемиологические исследования показали связь между воздействием мышьяка и повышенной заболеваемостью животных и человека раком кожи, респираторной, лимфатической и гемопозитической систем, желудочно-кишечного тракта. Имеются работы, подтверждающие канцерогенную опасность мышьяка в опытах на животных (Давыдова 1989; Скальная и др., 1995; Трахтенберг, Шафран, 2002).

В последнее время доказано, что тяжелые металлы, в частности, мышьяк увеличивали вероятность поражения печени афлатоксином В1, а также способствовали развитию других заболеваний (Sayed et al., 2005). Острое отравление МАН 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, 1989).

Таким образом, МАН, ингибируя, кроме моно- и дитиоловых ферментов, гидролазы, оксидазы, энзимы, определяющие пуриновый обмен и синтез АТФ, вызывает поражение практически всех органов и систем организма. Несомненно, что описанные механизмы токсичности способны вызывать выраженные иммунотоксические эффекты.

1.3. Общая характеристика нарушений доиммунных механизмов защиты и иммунного статуса метаарсенитом натрия и другими мышьяксодержащими соединениями

Накопленные за несколько последних десятилетий данные о влиянии ТХ на факторы НРО (доиммунные механизмы защиты) и иммунный статус в целом определенно свидетельствуют о снижении неспецифических и специфических (иммунологических) факторов защиты организма при действии токсических агентов, в частности МАН. Установлено уменьшение БАСК, лизоцимной, комплементарной и фагоцитарной активности, а также других неспецифических факторов резистентности организма при хроническом воздействии многих ксенобиотиков, в том числе мышьяксодержащих (Фридман, 1970; Казакова, 1971; Стрельникова, Раткина, 1983; Андропова и др., 1988; Забродский и др., 1997, 2002, 2005; Hermann, Kim, 2005).

Исследователи вполне закономерно связывают снижение НРО с повышением уровня заболеваемости различными инфекциями. Тяжелые металлы (мышьяк, ртуть, свинец, кадмий) в экспериментах на мышах, крысах и кроликах существенно увеличивают восприимчивость организма к различным инфекционным агентам (Luster et al., 1987).

Моноцитарно-макрофагальная система (ММС), имеющая исключительно важное значение в реализации НРО и многочисленных иммунных реакциях, подвержена отрицательному действию большого числа ТХ, в частности мышьяксодержащих веществ, причем наряду с кратковременной стимуляцией реакций (в ряде случаев), в последующем наступает стойкий иммунодефицит (Саноцкий, 1969; Шубик, 1976; Золотникова, 1980; Жанакаранова и др., 1988; Долинская и др., 1989; Шведов, Анисимова, 1989; Забродский, 1998, 2002; Василенко, 2004; Allen et al., 1983; Aulerich, 1983; Bleavins et al., 1984; Vos et al., 1984; Bagiuski, 1985; Miller, 1985; Sauders et al., 1985; Smialowicz et al., 1984, 1985; Thomas et al., 1985;

Blanton et al., 1986; Descotes, 1986; Denning et al., 1987; Gennari et al., 1987; Hewett, Roth, 1988; Dwivedi et al., 1988; Sullivan, 1989; Hermann, Kim, 2005).

Как правило, угнетение функции ММС сопровождается Т- и В-иммунодефицитными состояниями. Нарушение фагоцитоза может происходить вследствие действия токсикантов, в том числе и спиртов, на процессы хемотаксиса, адгезии, активации мембраны фагоцита, образования фагосомы, слияния лизосомальных гранул с фагосомой, 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) (Забродский и др., 2005).

Высокие дозы (концентрации) металлов как необходимых для организма, так и не участвующих в ферментативных реакциях и токсикантов 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 многих основных звеньев иммунной системы. (Забродский, 1998, 2002).

При рассмотрении действия мышьяксодержащих соединений на ИКК на клеточном и субклеточном уровнях следует выделить следующие основные иммунотоксические механизмы: действие токсикантов на центральную и эндокринную системы с последующей реализацией эффектов медиаторов и гормонов, к большинству из которых на мембране ИКК имеются соответствующие рецепторы; инициация токсикантом ПОЛ мембран клеток, в частности, путем инактивации антиоксидантных ферментов и витаминов (супероксиддисмутаза, каталаза, глутатионтрансферазы, глутатионпероксидазы, α -токоферола, β -каротина, витаминов А, С); взаимодействие яда с ДНК; инактивация токсикантами ферментов цитозоля и мембраны ИКК, а также энзимов системы тканевого дыхания в митохондриях

иммуноцитов; индукция или ингибирование синтеза Р-450-зависимых монооксигеназ, локализованных преимущественно в ЕКК и Т- лимфоцитах; действие МАН на мембрану иммуноцита, ее повреждение с последующим образованием аутоантител, взаимодействующих с белками ИКК (Забродский, 1993, 1998, 2002; Смирнов и др., 2000; Spreafico, Vecchi, 1984; Descotes, 1986; Luster, Blank, 1987; Van, Loveren et al., 1990; Hermann, Kim, 2005).

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 ММС; вещества, снижающие НРО; токсиканты, разнонаправленно влияющие на Т- и В-звено иммунитета и НРО. Большинство токсикантов 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 токсиканты могут оказывать воздействие на различные ИКК и их предшественники вплоть до ПСКК. В зависимости от характера дисфункции системы иммунитета при действии ТХ для профилактики и лечения инфекционных, онкологических и других связанных с иммунодефицитными состояниями заболеваний могут использоваться соответствующие иммуностимуляторы (Забродский, 1998, 2002; Забродский, Киричук, 1999; Смирнов и др., 2000;).

Как уже указывалось, МАН является тиоловым ядом, ингибирует 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, 1989; Ершов, Пастнева, 1989; Скальная и др., 1995; Трахтенберг, Шафран, 2002).

Не вызывает сомнения, что описанные механизмы токсичности способны вызывать выраженные иммунотоксические эффекты. Вероятно, эти эффекты определяют канцерогенные свойства соединений мышьяка (McCabe et al., 1983). В опытах на мышах установлено снижение Т-зависимого первичного и вторичного иммунных ответов в 2-5 раз к ЭБ при хронической пероральной интоксикации мышьяком (поступление мышьяковистого натрия в течение трех недель в дозах от 0.5 до 10 ppm) (Blackley et al., 1980). МАН при концентрации 2-4 мМ увеличивают пролиферацию Т-клеток телят 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 et al., 1983). Установлено снижение антиинфекционной и противоопухолевой резистентности при острой и хронической интоксикации соединениями мышьяка мышей различных линий (Gainer, 1972). Мышьяковистый галлий (2.5-200 мг/кг, однократно) уменьшает число АОК к ЭБ в селезенке мышей (Burns et al., 1991, 1993), ослабляет способность к презентации антигена премированными ЭБ макрофагами популяции Т-клеток. При этом супрессия антителообразования не связана с процессингом антигена макрофагами и продукцией этими клетками ИЛ-1 (Sikorski et al., 1991b). Снижение АОК к тимуснезависимому антигену динитрофенил-фиколлу 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 et al., 1991a).

На *Clarias batrachus* в течение 150 суточной экспозиции было показано, что мышьяк в концентрации 42 мкМ вызывает нарушение функции ЕКК, в частности продукцию ими ИЛ-4 (Ghosh et al., 2007).

В экспериментах на крысах Вистар установлено, что хлорид мышьяка при однократном внутрижелудочном введении в дозе $0.5LD_{50}$ приводит к снижению основных показателей иммунного статуса: антителообразования преимущественно к Т-зависимому антигену, АЗКЦ, реакции ГЗТ, активности ЕКК, способности макрофагов индуцировать гуморальный иммунный ответ. Редукция показателей системы иммунитета имеет высокую прямую связь с параметрами ПОЛ (Забродский и др., 2003). Редукция ГЗТ под влиянием мышьяка была установлена в экспериментах на мышах (Patterson et al., 2004).

Показано, 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 (Скальная и др., 1995).

Выявлена супрессия активности субпопуляций лимфоцитов и снижение ими продукции цитокинов у детей (Soto-Peña et al., 2006). Установлено поражение моноцитов и макрофагов при действии неорганического арсенита у людей, что связывают с формированием иммунодефицита (Sakurai et al., 2004, 2005, 2006). В частности, нарушение функции перитонеальных макрофагов выявлено у мышей при хроническом потреблении арсенитов с питьевой водой (Arkusz et al., 2005). Ряд авторов выявляют и поражение легких у людей при потреблении воды, содержащей соли мышьяка (De et al., 2004). Отдельные нарушения функций системы иммунитета обусловлены поражением мышьяком $CD4^+$ и $CD8^+$ Т-лимфоцитов, при этом возможна в

определенном диапазоне доз активация этих клеток (Tenorio, Saavedra, 2005). Установлено, изменение активности мононуклеаров периферической крови *in vitro* при воздействии различных соединений мышьяка (Di Giampaolo et al., 2004).

Данные литературы свидетельствуют, что всестороннее изучение острого, подострого и хронического действия МАН на доиммунные механизмы защиты от инфекций (НРО) и показатели системы иммунитета до сих пор проведено не достаточно.

Глава 2. МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

2.1. Объект исследования и применяемые препараты

Объекты исследования и применяемые препараты. Исследования проводились в 2002-2008гг. на 745 крысах и 72 белых мышах обоего пола. Масса крыс и мышей составляла соответственно 180-240 и 18-22 г. Эксперименты на животных проводили в соответствии с требованиями Женевской конвенции "International Guiding Principles for Biomedical Research Involving Animals" (Geneva, 1990).

МАН вводили подкожно в дозах 0.25, 0.50 и 0.75 LD_{50} (LD_{50} МАН для мышей и крыс составляла соответственно 40.2 ± 2.0 и 47.1 ± 2.2 мг/кг). Подострое действие моделировалось введением МАН в течение 6 сут в дозе $1/7 LD_{50}$, а хроническое - в дозе $0.01 LD_{50}$ в течение 30 сут. Эти дозы (соответственно – 0.47 мг/кг для крыс и мышей) обоснованы расчетными данными при аварийных ситуациях на химических объектах общепринятыми методами (Заугольников, 1978). Эти методы позволяют перевести ингаляционную токсодозу при экспозиции 24 ч в дозы, получаемые животными однократно в течение определенного времени. Используемая нами доза формирует зону экологического неблагополучия и превышает воздействие ПДК в несколько раз (эта доза моделирует экологическую ситуацию при авариях на объектах, соответствующих I и II степени химической опасности).

Роль супрессии функции Th1- , Th2-лимфоцитов в редукции иммунных реакций при действии МАН исследовали при подостром отравлении токсикантом. При этом МАН вводили белым крысам в дозах $1/4$ и $1/13 LD_{50}$ ежедневно подкожно в течение соответственно 4 и 13 сут для оценки синтеза АОК спленоцитов соответственно IgM и IgG. Концентрацию цитокинов γ -интерферона (ИФН- γ) и ИЛ-4, характеризующих функцию соответственно Th1- и Th2-лимфоцитов (Ройт и др., 2000), определяли в крови крыс

соответственно на 5 и 14 сут после первой инъекции МАН методом ферментного иммуносорбентного анализа (ELISA), используя наборы (ELISA Kits) фирмы «BioSource Int».

Эксперименты проводили в светлое время суток (с 9.00 до 15.00 ч), характеризующееся минимальным содержанием КС в плазме крови крыс (Dhabhar et al, 1985). Кровь для исследования титра антител получали из подъязычной вены животных. Лимфоидные органы извлекали у животных после цервикальной дислокации в различные сроки после интоксикации.

Исследование интегрального состояния антиинфекционной НРО при действии МАН. Интегральное состояние НРО определяли по показателям течения экспериментальной инфекции, вызванной внутрибрюшинным введением мышам и крысам суспензии суточной культуры кишечной палочки в дозах 1.5, 2.0, 2.5 млрд. микробных тел без предварительной иммунизации (Забродский, 1987, 1998, 2002). Антиинфекционную НРО оценивали по летальности крыс в течение 48 ч от экспериментальной инфекции, а также по среднелетальной дозе *E. coli* (LD_{50}) и среднеэффективному времени жизни животных (Et_{50}) в опытной и контрольной группах, рассчитанных методом пробит-анализа (Беленький, 1963). Введение условно-патогенных микроорганизмов производили через 24 ч после острой интоксикации и через 6 сут – после подострой. При хроническом воздействии иммунизацию проводили на 25 сут. Следует отметить, что данный показатель характеризует именно НРО, так как иммунная реакция введения микроорганизмов реализуется после 2-х сут (Ройт и др., 2000; Хаитов и др., 2002).

Исследование интегрального состояния антиинфекционной неспецифической и иммунологической резистентности организма при действии МАН. Интегральное состояние НИРО определяли по показателям течения экспериментальной инфекции, вызванной внутрилегочным введением крысам суспензии суточной культуры *P. vulgaris* в дозах 4.0, 6.0 и 9.0 млрд. микробных тел в объеме 4-6 мл изотонического раствора хлорида натрия через 4 сут после иммунизации данными микроорганизмами в дозе 10^6

микробных тел в объеме 0.5 мл. Проводилось также введение *P.vulgaris* в дозах 3.5, 5.0, 6.5 млрд. микробных тел в ткань легкого с предварительной иммунизацией данной культурой (10^6 микробных тел в объеме 0.5 мл изотонического раствора хлорида натрия). Выбор *E. coli* и *P.vulgaris* обусловлен большой значимостью условнопатогенной флоры в возникновении различных инфекционных осложнений (Бельцкий, Снастина, 1985; Хаитов и др., 1995).

Антиинфекционную НИРО оценивали по таким же показателям, как и НРО. При хроническом воздействии иммунизацию проводили на 25 сут.

Сывороточная активность лизоцима. Лизоцим (мурамидаза) - один из важных факторов НРО доиммунной защиты организма. Источником лизоцима являются нейтрофильные гранулоциты и моноциты (Бухарин, Васильев, 1974; Гембицкий и др., 1987; Хаитов, 2002). Использование показателя лизоцимной активности для оценки неблагоприятного действия химических факторов на организм свидетельствуют о высокой чувствительности данного теста (Измеров и др., 1977; Генес и др., 1981; Бухарин и др., 1985; Забродский, 1998; Германчук, 2000; Кадушкин, 2007). Как правило, химические соединения вызывают снижение лизоцимной активности сыворотки крови (Забродский, 1998, 2002). Некоторые иммунологические реакции связаны с активностью лизоцима. Так, комплекс "IgA-антиген" проявляет антибактериальную и нейтрализующую активность после активации комплементом только в присутствии мурамидазы (Nouragargh, Holt, 1986).

Содержание сывороточного лизоцима определяли методом основанном на способности лизоцима растворять индикаторный микрококк (*Micrococcus lysodeicticus*), измеряя при этом оптическую плотность опытной и контрольной суспензии микроорганизмов (Ремезов, Башмаков, 1976). 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 37⁰С 30 мин, после чего измеряли ее оптическую плотность на ФЭК по правому барабану в кювете № 2 с зеленым светофильтром. Для удобства расчетов зависимость между оптической плотностью микробной взвеси в опыте и контроле, а также содержанием лизоцима в исследуемой сыворотке использовали таблицу (Ремезов, Башмаков, 1976).

Фагоцитарно-метаболическая активность нейтрофилов.

Использованный нами метод оценки фагоцитарной активности нейтрофилов основан на восстановлении поглощенного фагоцитом растворимого красителя нитросинего тетразолия (НСТ) в нерастворимый диформаза под влиянием супероксиданиона, образующегося в НАДФ-Н-оксидазной реакции. НСТ-тест, как уже указывалось, интегрально характеризует кислородзависимые антиинфекционные системы фагоцита (Бровкина и др., 2004; Рыбников и др., 2004). В исследованиях применялся цитохимический вариант этого метода (Хаитов и др., 1995). Учет результатов проводился путем подсчета в каждой мазке 100 нейтрофилов, среди которых определялся процент клеток, содержащих отложения диформаза (НСТ – позитивные нейтрофилы). Далее рассчитывался индекс активности нейтрофилов (ИАН) по формуле:

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

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

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

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

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

Фагоцитарно-метаболическую активность ПЯЛ, кроме того, определяли путем оценки фагоцитарного показателя (ФП) и фагоцитарного числа (ФЧ) общепринятыми методами в том числе, используя НСТ-тест, в котором нейтрофилы активировались зимозаном (Хаитов и др., 1995; Сакаева, Лазарева, 1998; Белокрылов, Попова, 2002; Бровкина и др., 2004 а,б; Рыбников и др., 2004).

Оценка содержания лимфоцитов в органах системы иммунитета. Содержание Т-клеток в тимусе крыс определяли общепринятым методом подсчета ядросодержащих клеток в органе, учитывая то обстоятельство, что лимфоциты в вилочковой железе представлены в основном их Т- популяцией (до 90%) (Петров, 1987; Ройт, 2000; Хаитов и др., 2002). 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 клеточные суспензии из тимуса, селезенки, костного мозга и паховых лимфоузлов крыс готовили после действия МАН. Содержание лимфоцитов в крови крыс определяли через 1, 3, 6 и 9 сут после воздействия МАН общепринятыми методами (Гембицкий и др., 1987; Забродский, Мандыч, 2007). При хроническом действии МАН показатели оценивали через 30 сут.

Оценка функции Т-лимфоцитов. Исследование функции Т-лимфоцитов проводили по 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, Брок, 1986).

Для исследования РТМЛ кровь у крыс получали из подъязычной вены через 1, 3 и 6 сут после интоксикации, а также через 30 сут после

хронического воздействия. 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°C. Учет реакции проводили путем измерения длины зоны миграции основной массы лейкоцитов от границы эритроцитарного осадка в контроле и опыте (Гембицкий и др., 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 активности Т-клеток.

Исследование функции Th1-лимфоцитов по реакции ГЗТ. Оценка формирования ГЗТ после действия МАН позволяет установить действие токсиканта на клеточный иммунитет, в частности на функцию Th1-лимфоцитов (Ройт и др., 2000), а также на участвующие в реализации ГЗТ Т-клетки памяти, моноциты и макрофаги (Ройт, 1991, 2000; Хаитов и др., 2002; Забродский, Мандыч, 2007).

ГЗТ оценивали у крыс после иммунизации внутривенным введением 2×10^8 ЭБ в 0.5 мл изотонического раствора хлорида натрия одновременно с действием МАН. Разрешающую (вызывающую реакцию) дозу ЭБ ($5 \cdot 10^8$ в 0.05 мл изотонического раствора хлорида натрия) вводили под апоневроз задней лапы на 4 сут после иммунизации. Оценку реакции осуществляли через 24 ч по приросту массы стопы задней лапы крыс по сравнению с контрольной (Брюхин и др., 1990). Данный тест отражал функцию Th1- лимфоцитов и способность их к продукции ИЛ-3, γ -интерферона, β -фактора некроза опухоли – лимфотоксина и гранулоцитарно-макрофагального

колониестимулирующего фактора (ГМ-КСФ) (Забродский, Мандыч, 2007; Georgiev, Albright, 1993; Kimber, 1996). При оценке подострого и хронического действия МАН в течение 30 сут иммунизацию проводили через 2 и 25 сут после ежедневного введения МАН. Исследование ГЗТ осуществляли на 5 сут после иммунизации (на 7 и 30 сут после действия МАН). За 1 сут до исследования вводили разрешающую дозу антигена.

При исследовании формирования ГЗТ у крыс-реципиентов (линии Август) после переноса им спленоцитов ($5 \cdot 10^8$), иммунизированных ЭБ (10^8) сингенных доноров, подвергавшихся действию МАН, крыс-реципиентов через 1 ч сенсibilизировали внутривенным введением ЭБ (10^8). Через 4 сут под апоневроз стопы реципиентов вводили разрешающую дозу ЭБ ($5 \cdot 10^8$) с последующей оценкой реакции через 24 ч. Спленоциты получали через 5 сут после иммунизации доноров. В данном эксперименте формирование ГЗТ отражало влияние МАН на вторичный иммунный ответ в модели адаптивной реакции, связанной с переносом иммунных спленоцитов крысам-реципиентам. Доноры подвергались воздействию МАН в тех же дозах и при таких же экспозициях, как и при оценке ГЗТ без переноса клеток.

Исследование антителозависимой клеточной цитотоксичности. В настоящее время доказано, что К-клетки – это ЕКК, использующие для усиления реакции антитела (Ройт и др., 2000; Хаитов и др., 2002).

АЗКЦ, характеризующую функцию К-клеток (Фримель, Брок, 1986), определяли по методу Ю.И. Зимина, В.Ф. Ляхова (1985) через 5 сут после иммунизации, осуществляемой через 30 мин после введения МАН (оценка действия МАН в индуктивной фазе иммуногенеза). Кроме того, МАН применяли через 2 сут после иммунизации ЭБ (оценка действия яда в продуктивной фазе иммуногенеза). При оценке хронического действия МАН иммунизацию проводили через 25 сут после ежедневного введения МАН в дозе $0.01 LD_{50}$; исследование АЗКЦ осуществлялось через 5 сут после иммунизации (на 30 сут после действия МАН).

Крыс иммунизировали ЭБ (5×10^8 клеток в 0.5 мл изотонического раствора хлорида натрия). 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 мин при 37°C, а затем отмывали 3 раза раствором Хенкса и доводили до необходимой концентрации. Используемую антисыворотку предварительно инактивировали в течение 30 мин при 56°C. Спленоциты (timoциты) смешивали с ЭБ в соотношении 20:1 (абсолютные значения составляли соответственно 20×10^6 и 1×10^6) в 2 мл раствора Хенкса без фенолового красного и инкубировали 4 ч при 37°C. После инкубации смесь клеток центрифугировали 20 мин при 200 g, собирали супернатант. Цитопатогенность 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).

Исследование активности ЕКК. Оценка естественной цитотоксичности осуществлялась спектрофотометрическим (нерадиационным) методом (Гордиенко, 1983, 1984), где клетками-эффекторами служили спленоциты крыс, а клетками-мишенями – эритроциты кур (ЭК). 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, 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 100 g; 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 ЕКК ЭК, путем лизиса осадка 0.25% ДСН. ИЦ определяли по формуле:

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

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

E_0 - оптическая плотность лизированных оставшихся в осадке опытной пробы неразрушенных ЭК против лизированного осадка эффекторных клеток без них.

Функцию ЕКК оценивали через 1, 3 и 6 сут после острой интоксикации МАН, а также через 30 сут после хронического ее действия.

Исследование гуморальных иммунных реакций. Для оценки гуморальных иммунных реакций в качестве антигенов применяли ЭБ и брюшнотифозный Vi-антиген (Vi-Ag). Использование данных антигенов позволяет рассмотреть влияние МАН на Т-зависимый или Т-независимый иммунный ответ, а также оценить роль Т-хелперов в реализации гуморального звена иммунного ответа (Утешев, 1984; Забродский и др., 2005; Забродский, Мандыч, 2007; Descotes, 1986).

Исследование показателей тимусзависимого гуморального иммунного ответа проводили через 5, 8 и 14 и 20 сут после острой интоксикации МАН. Иммунизацию ЭБ проводили путем их внутрибрюшинного введения в дозе $2 \cdot 10^8$ клеток одновременно с введением МАН. Тимуснезависимую гуморальную иммунную реакцию оценивали через 5 сут после иммунизации брюшнотифозным Vi-антигеном (Vi-Ag) в дозе 8 мкг/кг по числу АОК к Vi-Ag в селезенке, отражающему синтез IgM к данному антигену (Ройт и др., 2000; Casale et al., 1984). МАН вводили практически одновременно с Vi-антигеном. Титры антител к ЭБ определяли в реакции гемолиза эритроцитов

в присутствии комплемента. Гуморальный иммунный ответ оцениваемый по ОДЛТА отражает способность органов системы иммунитета синтезировать IgM к ЭБ через 5 сут и IgG через 8, 14 (пик иммунного ответа) и 20 сут (Ройт и др., 2000; Хаитов и др., 2002; Casale et al., 1983).

При подострой интоксикации МАН иммунизацию антигенами осуществляли на 2 сут после первого введения МАН (исследование проводили на 7 сут). При хроническом действии МАН иммунизацию делали соответственно на 26 сут хронической интоксикации (исследование проводили на 31 сут).

Гуморальную иммунную реакцию к тимусзависимому и тимуснезависимому антигенам оценивали также через 5 сут по числу АОК в селезенке (Белокрылов и др., 1980; Jerne, Nordin, 1963) после воздействия МАН с одновременной (или через 3 и 25 сут после действия МАН) внутрибрюшинной иммунизацией крыс ЭБ в дозе $2 \cdot 10^8$ клеток в 0.5 мл изотонического раствора хлорида натрия и брюшнотифозного Vi-Ag в дозе 8 мкг/кг (использованный тест отражал синтез IgM В-клетками селезенки). АОК, характеризующие продукцию IgG к Т-зависимому антигену, определяли в селезенке методом непрямого локального гемолиза в геле (Ройт и др., 2000) через 8, 14 и 20 сут после интоксикации (при подостром действии – в эти же сроки после первого введения МАН).

Практически одновременное введение МАН с ЭБ после иммунизации позволяло оценить их влияние на индуктивную фазу гуморального иммунного ответа, а через 3 сут – на продуктивную (Корнева, 1985; Ройт и др., 2000; Забродский, Мандыч, 2007; Deskotes, 1986).

При оценке хронического действия МАН иммунизацию проводили через 25 сут после его ежедневного введения. Исследование гуморальной иммунной реакции (АОК, характеризующие продукцию IgM) к тимусзависимому и тимуснезависимому антигенам оценивали через 5 сут после иммунизации (на 30 сут после действия МАН). При определении числа АОК, характеризующих синтез спленоцитами IgG, иммунизацию ЭБ

проводили через 23, 17 и 11 сут с момента первого введения токсиканта при хроническом действии МАН в дозе $0.01 LD_{50}$ в течение 30 сут, т.е. срок исследования после иммунизации составлял 8, 14 и 20 сут., а после первого введения яда – 31 сут.

Определение миграции Т-клеток из тимуса и В-клеток из костного мозга оценивали на мышах линии СВА (Петров и др., 1981). Показателем миграции Т-клеток из тимуса и В-клеток из костного мозга являлось содержание АОК в селезенке через 8 сут, которые определяли по методу Jerne, Nordin (1963). МАН в дозе $0.5 LD_{50}$ применяли подкожно через 30-40 мин после облучения ионизирующим излучением в дозе 8 Гр. Сингенные Т-клетки ($2 \cdot 10^7$) или клетки костного мозга (10^7) вводили одновременно с ЭБ ($2 \cdot 10^8$) в объеме 0.5 мл изотонического раствора хлорида натрия внутривенно через 1 сут после облучения. Миграцию Т- и В-клеток исследовали при летальном облучении и экранировании соответственно тимуса или задней конечности до уровня коленного сустава. Без воздействия ионизирующего облучения под влиянием МАН определяли АОК в селезенке мышей линии СВА через 5 сут (Jerne, Nordin, 1963).

Оценка кооперации Т- и В- лимфоцитов. При исследовании кооперации Т- и В-клеток использовались клетки мышей в модели *in vitro*. Для получения Т-клеток использовали метод фильтрования селезеночной суспензии через нейлоновую вату (“Нитрон”) (Ширшев, 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 et al., 1979). Из суспензии спленоцитов макрофаги удаляли методом негативной селекции, используя их способность прилипать к стеклянной поверхности (Ширшев, 1998). Жизнеспособность клеток оценивали в тесте с трипановым синим (она составляла 95-98%). Инкубируемая по методу J. K. Thomas и T. Imamura (1986a), культура содержала 10^6 и $5 \cdot 10^5$ В- и Т-клеток соответственно, 10^7 ЭБ в 0.15 мл среды

Хенкса. АОК подсчитывали в инкубационных камерах через 4 сут (Thomas, Imamura, 1986a). Данный тест отражает синтез IgM В-клетками селезенки при участии Т-хелперов типа 1 (Th1-лимфоцитов). Роль антигенпредставляющих клеток выполняли В-лимфоциты (Ройт и др., 2000).

Изучение способности макрофагов индуцировать гуморальный иммунный ответ. Способность макрофагов к индукции гуморального иммунного ответа оценивали через 5 сут по числу АОК к ЭБ у крыс-реципиентов Август после введения токсиканта сингенным крысам-донорам. Макрофаги от крыс-доноров переносили реципиентам через 1 сут после острой интоксикации, через 6 и 30 сут после подострой и хронической интоксикации соответственно. За 1.5 ч до переноса перитонеальных макрофагов в брюшную полость крысам вводили $2.5 \cdot 10^8$ ЭБ в 0.1 мл изотонического раствора хлорида натрия (Argyris, 1967).

Оценка активности эстераз Т-лимфоцитов, моноцитов и макрофагов и состояния ПОЛ. Изменение эстеразной активности в клетках системы иммунитета отражает функциональную активность иммуноцитов и может служить количественным критерием Т-клеток в циркулирующей крови (Хейхоу, Кваглино, 1983).

Активность α -нафтил-AS-ацетатэстеразы и α -нафтил-бутиратэстеразы спленоцитов крысы (Т-клеток, моноцитов и макрофагов) изучали гистохимическим методом (Хейхоу, Кваглино, 1983). Активность АХЭ в Т-лимфоцитах крысы определяли методом Ellman et al. (1961), выделяя клетки путем фильтрования селезеночной суспензии через нейлоновую вату ("Нитрон") (Ширшев, 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°C реакция останавливалась добавлением 100 мкл 1,5-дифтор-2,4-динитробензола и регистрировали увеличение оптической плотности спектрофотометрически (420 нм) (Szelenyi et al., 1982). За единицу активности АХЭ принимали 1 мкмоль ацетилхолина, гидролизованного за 1

мин в мл суспензии, содержащей 10^9 Т-лимфоцитов (Kutty et al., 1976). Активность эстераз определяли через 2 сут после отравления МАН, а также через 30 и 60 сут после хронического действия МАН. ПОЛ оценивали по активности каталазы и пероксидазы, СПР и содержанию МДА в крови (Коробейникова, 1989; Валеева и др., 2002).

Исследование концентрации кортикостерона в плазме крови. Состояние ГГНС после действия МАН оценивали путем измерения уровня КС в плазме крови крыс флюорометрическим методом. Определяли уровень неконъюгированных 11-оксикетостероидов (Давыдов, 1970), в частности, КС через 1 и 5 ч после интоксикации МАН, а также через 30 сут после его хронического действия.

Экстракция КС из анализируемых образцов плазмы крови проводилась четыреххлористым углеродом. Для удаления пигментов плазмы и нестероидных соединений экстракты промывались с помощью 0.1% раствора NaOH и дистиллированной воды. Затем верхний слой, включающий в себя КС, переносился, выпаривался и повторно экстрагировался 6 мл метиленхлорида или хлороформа. Для образования флюоресцентных комплексов использовалась смесь концентрированной серной кислоты и этанола в соотношении 3:1. После развития флюоресценции растворы исследовались на флюориметре с использованием интерферентных фильтров: первичного с пропусканием волн длиной 470 нм и вторичного – 540 нм.

Методы статистической обработки результатов исследований. Полученные данные обрабатывались с применением общепринятых статистических методов (Урбах, 1975; Гублер, 1978; Лакин, 1980). При этом различия между средними значениями в опытной и контрольной группах считались значимыми при $p < 0.05$. Расчеты среднелетальной дозы МАН проводили по методу Миллера и Тейтнера (Беленький, 1963). В исследованиях использовались параметрические методы исследования с оценкой достоверности различий по t-критерию Стьюдента. Статистический анализ экспериментальных данных с небольшим числом животных в сериях и

при отсутствии нормального распределения показателей осуществлялся с помощью непараметрических методов (Уилкинсон-Манни-Уитни, χ^2). Расчеты проводились на персональном компьютере с использованием пакета программ Statgraphics.

Глава 3. ДЕЙСТВИЕ МЕТААРСЕНИТА НАТРИЯ НА ПОКАЗАТЕЛИ АНТИИНФЕКЦИОННОЙ НЕСПЕЦИФИЧЕСКОЙ И ИММУНОЛОГИЧЕСКОЙ РЕЗИСТЕНТНОСТИ ОРГАНИЗМА

3.1 Изменение интегральной антиинфекционной неспецифической резистентности организма

В экспериментах на беспородных мышах при введении МАН в дозе 0.1, 0.2, 0.5, 0.8 LD_{50} , исследовалось состояние антиинфекционной НРО. В период исследования выживаемости мышей (24 ч) она определяется преимущественно факторами НРО, так как иммунные реакции (за исключением функции ЕКК) реализуются не ранее, чем через 2-3 сут после введения антигена (инфицирования) (Ройт и др., 2000).

В результате проведенных нами опытов было установлено, что острое отравление МАН приводило к дозозависимому увеличению летальности мышей от экспериментальной инфекции. При этом вполне закономерно уменьшались LD_{50} *E. coli* и среднеэффективное время жизни животных – Et_{50} . Так, при действии МАН в дозах 0.1, 0.2, 0.5, 0.8 LD_{50} (табл.3.1) среднелетальная доза *E. coli* уменьшалась соответственно в 1.35 ($p > 0.05$), 1.58, 1.63 и 1.69 раза ($p < 0.05$), а Et_{50} – соответственно в 1.46, 1.61, 1.92 и

Таблица 3.1

Влияние острого отравления МАН на LD_{50} *E. coli* и Et_{50} у мышей (М+m)

Токсикант	Доза, LD_{50}	LD_{50} <i>E. coli</i> , 10^9 микр. тел	Et_{50}
МАН	Контроль	1.91±0.16 (70)	19.0±1.3 (7)
	0.1	1.42±0.25 (19)	13.0±2.0 (19)
	0.2	1.21±0.17* (19)	11.8±1.6* (19)
	0.5	1.17±0.25* (16)	9.9±1.5* (16)
	0.8	1.13±0.25* (15)	9.0±1.3* (15)

Примечание: в скобках - число животных в серии: * - различие с контролем достоверно $p < 0.05$

2.11 раза ($p<0.05$). При дозах МАН, составляющих 0.1, 0.2, 0.5, 0.8 LD_{50} (рис.3.1), по сравнению с контролем, при котором летальность составляла $55.7\pm 5.9\%$, этот показатель увеличивался соответственно на 2.2 ($p>0.05$), 18.0, 30.9 и 25.6% ($p<0.05$).

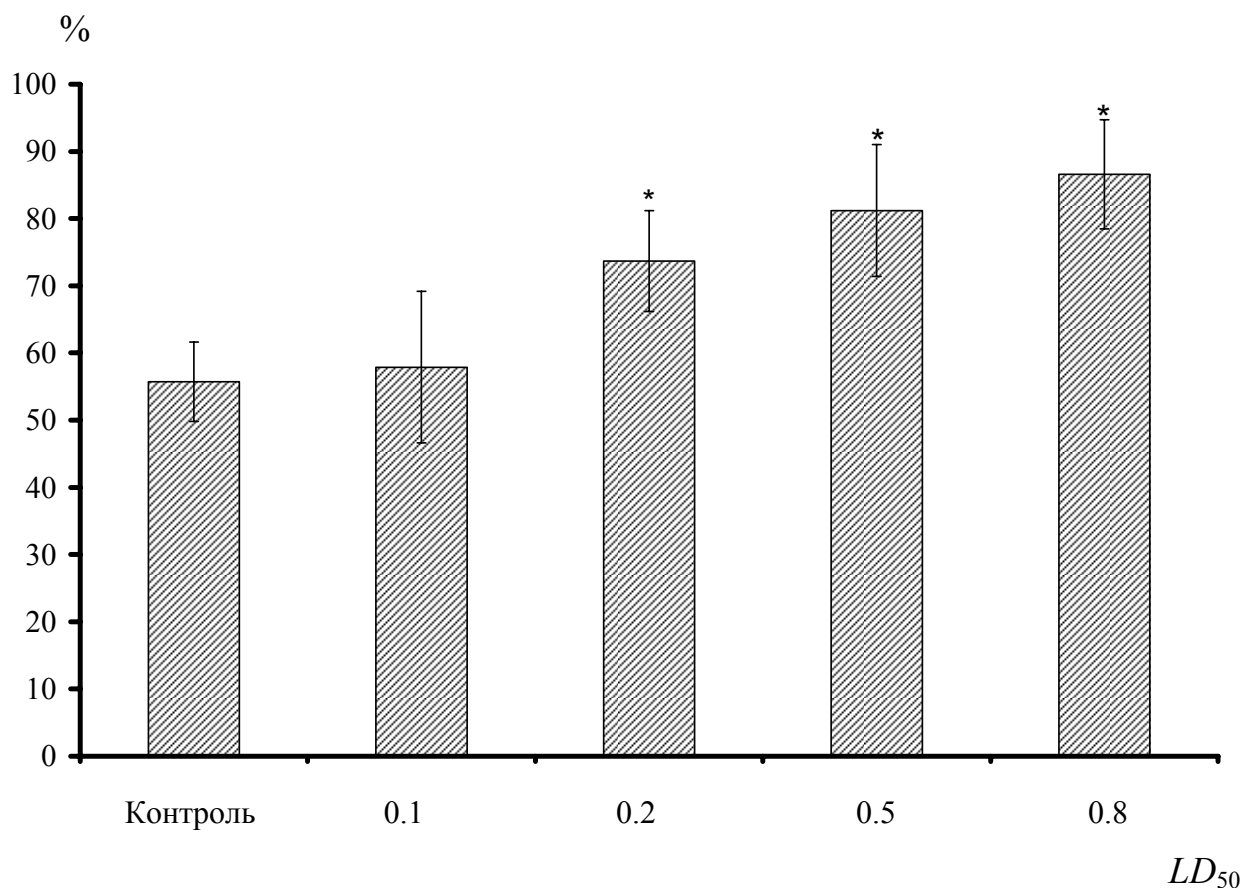


Рис.3.1. Влияние острого отравления МАН на летальность от экспериментального перитонита (*E. coli*)

В каждой серии использовалось 15 – 19 животных; * - различие с контролем достоверно - $p<0.05$. По оси абсцисс - LD_{50} МАН; по оси ординат – летальность, %

При подостром ($1/7 LD_{50}$ в течение 6 сут) и хроническом действии МАН летальность крыс увеличивалась по сравнению с контролем соответственно на 24.9 и 49.9% ($p<0.05$) (рис. 3.2). При данных воздействиях МАН статистически значимо уменьшались LD_{50} *E. coli* и Et_{50} ($p<0.05$) (табл. 3.2).

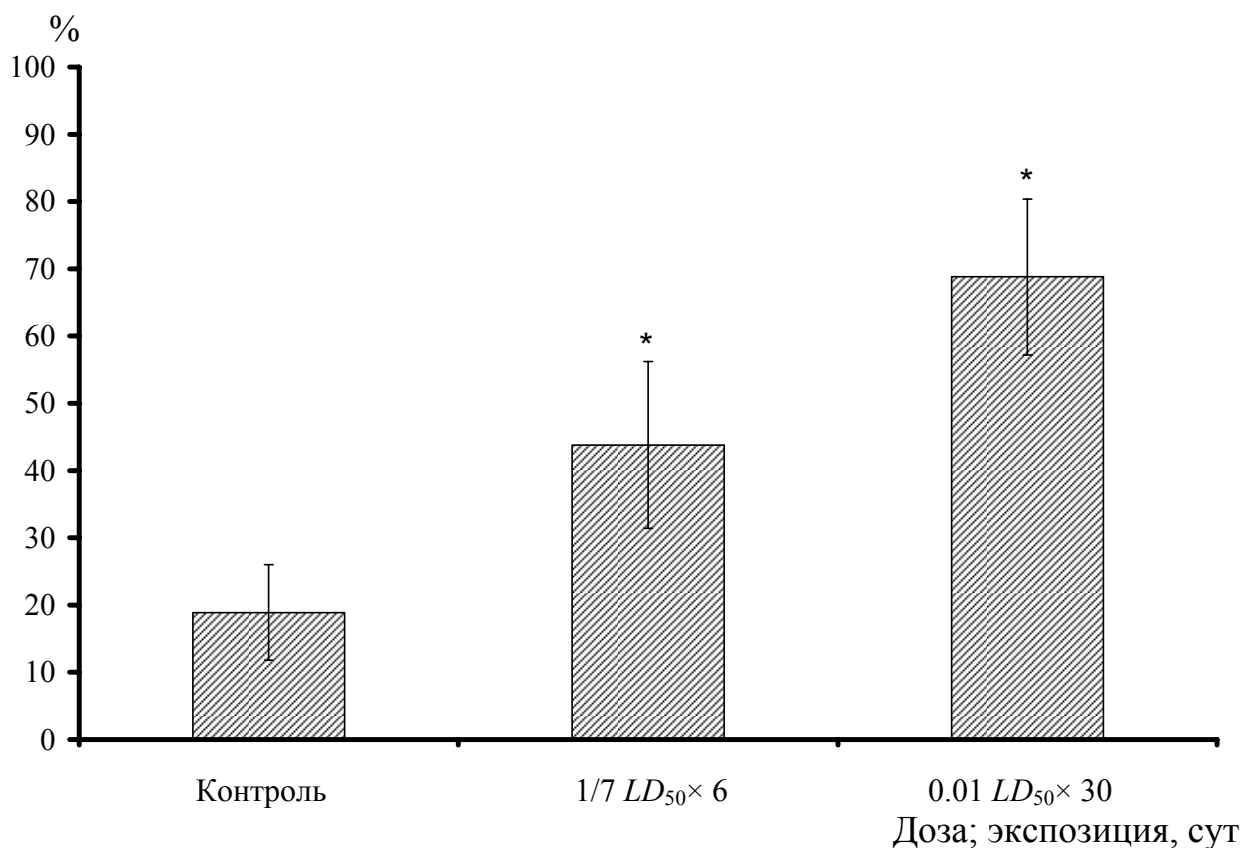


Рис.3.2. Влияние (подострого и хронического отравления МАН) на летальность от экспериментального перитонита (*E. coli*)

В каждой серии использовалось 15 – 16 животных; * - различие с контролем достоверно - $p < 0.05$. По оси абсцисс - LD₅₀ МАН; экспозиция, сут; по оси ординат – летальность, %

Таблица 3.2

Влияние МАН на LD₅₀ *E. coli* и Et₅₀ у крыс без иммунизации (M±m)

Дозы; экспозиция, сут	LD ₅₀ <i>E.coli</i> (×10 ⁹ микр. тел)	Et ₅₀ , ч
Контроль	10.1±1.0 (32)	40.0±4.1 (32)
1/7 LD ₅₀ × 6	6.0±0.7* (16)	23.9±2.5* (16)
0.01 LD ₅₀ × 30	5.4±0.6* (16)	22.1±2/4* (16)

Примечание: в скобках - число животных в серии; * - различие с контролем достоверно $p < 0.05$

Таким образом, после острой, подострой и хронической интоксикации МАН происходит дозозависимое увеличение летальности животных от экспериментального перитонита, вызванного *E. coli*, а также уменьшение

LD_{50} *E. coli* и Et_{50} жизни животных, что свидетельствует о снижении НРО под влиянием МАН.

3.2. Оценка интегральной антиинфекционной неспецифической и иммунологической резистентности организма при экспериментальной инфекции после острой интоксикации

При изучении влияния острого действия МАН на антиинфекционную НИРО организма токсикант вводили одновременно с иммунизацией крыс, а через 4 сут моделировали экспериментальную инфекцию. В результате проведенных экспериментов было установлено (рис. 3.3), что МАН в дозах 0.1, 0.2, 0.5, 0.8 LD_{50} приводит к дозозависимому увеличению летальности крыс от экспериментальной пневмонии.

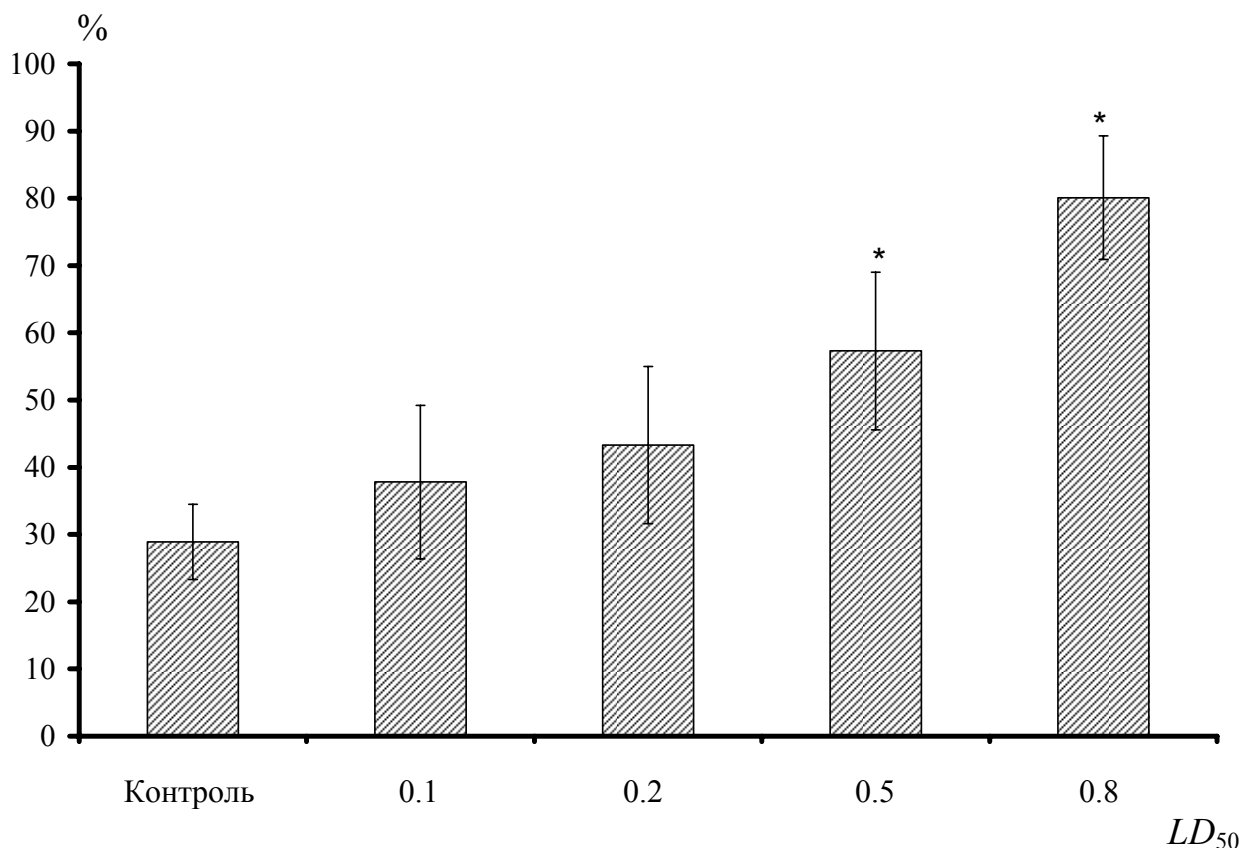


Рис.3.3. Влияние острого отравления МАН на летальность от экспериментальной пневмонии (*P. vulgaris*)

В каждой серии использовалось 18 – 19 животных; * - различие с контролем достоверно - $p < 0.05$. По оси абсцисс - LD_{50} МАН; по оси ординат – летальность, %

Таблица 3.3

Влияние острого отравления МАН на LD_{50} *P.vulgaris* и Et_{50} у крыс после иммунизации (М+m)

Токсикант	Доза, LD_{50}	LD_{50} <i>P.vulgaris</i> , 10^9 микр. тел	Et_{50}
МАН	Контроль	11.2±1.1 (32)	48.5±4.6 (32)
	0.1	9.1±1.3 (18)	40.1±3.1 (18)
	0.2	7.0±1.1* (18)	37.0±2.5* (18)
	0.5	6.2±0.9* (18)	34.7±2.3* (18)
	0.8	5.9±0.8* (19)	27.9±2.2* (19)

Примечание: в скобках - число животных в серии; * - различие с контролем достоверно $p < 0.05$

Так, при дозах МАН, составляющих 0.1, 0.2, 0.5, 0.8 LD_{50} , по сравнению с контролем, при котором летальность составляла 28.9±5.6 % этот показатель увеличивался соответственно на 8.9 ($p > 0.05$), 14.4, 28.4 и 51.2% ($p < 0.05$). Увеличение летальности животных от экспериментальной инфекции сопряжено с уменьшением LD_{50} *P.vulgaris* и Et_{50} . Так, при действии МАН в дозах 0.1, 0.2, 0.5, 0.8 LD_{50} *P.vulgaris* уменьшалась в 1.23 ($p > 0.05$), 1.60, 1.80 и 1.90 раза ($p < 0.05$), а Et_{50} – в 1.21 ($p > 0.05$), 1.31, 1.40 и 1.74 раза ($p < 0.05$) соответственно (табл. 3.3).

При подостром и хроническом действии МАН (рис. 3.4) летальность крыс увеличивалась по сравнению с контролем соответственно на 37.4 и 41.1% ($p < 0.05$). При данных воздействиях МАН статистически значимо уменьшались LD_{50} *P.vulgaris* и Et_{50} ($p < 0.05$). Так, при подостром и хроническом отравлении МАН LD_{50} *P. vulgaris* уменьшалась в 1.49 и 1.66 раза ($p < 0.05$), а Et_{50} в 1.73 и 1.62 раза ($p < 0.05$) соответственно (табл. 3.4). Существенных различий исследованных показателей при подостром и хроническом действии МАН при исследованных дозах и экспозициях не выявлено.

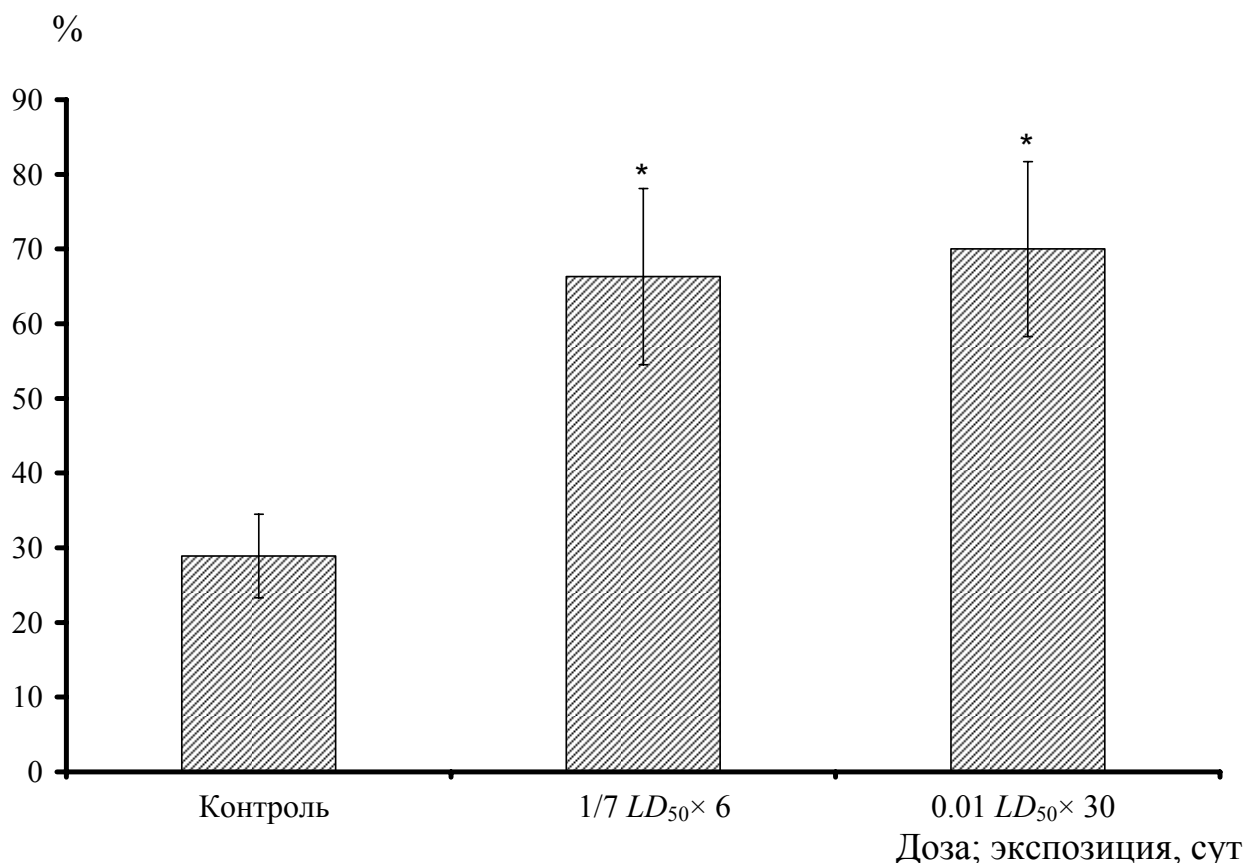


Рис. 3.4. Влияние МАН на летальность мышей от экспериментальной пневмонии (*P. vulgaris*)

В каждой серии использовалось 15 – 16 животных; * - различие с контролем достоверно - $p < 0.05$. По оси абсцисс - LD₅₀ МАН; экспозиция, сут; по оси ординат – летальность, %

Таблица 3.4

Влияние МАН на LD₅₀ *P. vulgaris* и Et₅₀ у крыс после иммунизации (M+m)

Дозы; экспозиция, сут	LD ₅₀ <i>P. vulgaris</i> (×10 ⁹ микр. тел)	Et ₅₀ , ч
Контроль	11.2±1.1 (32)	48.5±4.6 (32)
1/7 LD ₅₀ × 6	6.8±0.8* (16)	28.0±3.3* (16)
0.01 LD ₅₀ × 30	6.1±0.6* (15)	30.0±3.1* (15)

Примечание: в скобках - число животных в серии; * - различие с контролем достоверно $p < 0.05$

Изменения НРО под влиянием МАН могут быть обусловлены взаимодействием МАН с дегидролипоевой кислотой пируватоксидазной системы клеток-макрофагов, моноцитов и ЕКК и других клеток крови (Ленинджер, 1974; Страйер, 1985; Забродский, 2002) самим ядом или его

метаболитами. Выявленные изменения НРО под влиянием МАН могут быть также обусловлены ингибированием некоторых энзимов, например эстераз клеточных элементов, в частности, клеток крови (Хейхоу, Кваглино, 1983; Забродский, 1987) как самим ядом, так и его метаболитами. При этом, вероятно, помимо снижения продукции неспецифических факторов защиты организма, уменьшается также устойчивость клеток тканей к микроорганизмам и их токсинам (Горизонтов, 1981a). Не исключено, что помимо ингибирования эстераз макрофагов, моноцитов и ЕКК редукция НРО обусловлена снижением процессов тканевого дыхания и уменьшением окислительного фосфорилирования (синтеза АТФ) (Голиков и др., 1986) в лейкоцитах, обеспечивающих НРО, и других клетках организма, что приводит к снижению их устойчивости к развитию воспаления брюшины и сепсису.

Таким образом, под влиянием острого, подострого и хронического отравления МАН происходит дозозависимое увеличение летальности крыс и мышей от экспериментальной пневмонии с предварительной иммунизацией, прямо связанное с дозой снижение LD_{50} *P. vulgaris* и Et_{50} жизни животных, что свидетельствует о редукции под влиянием МАН неспецифической и иммунологической резистентности организма.

3.3. Изменение бактерицидной активности сыворотки крови

БАСК является одним из параметров, используемых для изучения влияния химических соединений на организм (Шафеев, 1976, 1978; Германчук, 2000; Забродский, 1987, 2002, 2005; Кадушкин, 2007). Данный показатель является чувствительным тестом для выявления ранних изменений в организме под влиянием токсических веществ (Бухарин и др., 1985), что доказано и более поздними исследованиями (Забродский, 1998, 2002, 2005).

Оценка изменения БАСК, проводившаяся у беспородных крыс под влиянием острой интоксикации МАН в дозах 0.25, 0.50 и 0.75 LD_{50} ,

свидетельствует (табл. 3.5), что действие токсиканта приводит к дозозависимому снижению БАСК через 1-9 сут после отравления ($p<0.05$). Так, при действии МАН в этих же дозах БАСК через 1 сут снижался в 1.18, 1.31 и 1.58 раза ($p<0.05$), а через 6 сут - в 1.15 ($p>0.05$), 1.22 и 1.30 раза ($p<0.05$) соответственно.

Таблица 3.5

Изменение БАСК крыс после острого отравления МАН, % (M+m, n=17-23)

Токсикант	Доза, LD_{50}	Срок наблюдения, сут		
		1	6	9
МАН	Контроль	86.3±3.9		
	0.25	74.1±4.0	75.0±4.3	80.0±3.0
	0.50	67.3±4.8*	70.0±4.7*	73.0±4.5*
	0.75	55.1±5.4*	64.0±5.3*	68.7±4.1*

Примечание: * - $p<0.05$ по сравнению с контролем

При подостром и хроническом отравлении МАН при экспозиции 30 сут (рис. 3.5) БАСК уменьшалась соответственно в 1.39 и 1.50 раза ($p<0.05$). Редукция БАСК определяется активностью гуморальных и клеточных факторов НРО: сывороточной активностью лизоцима, тромбоцитарного катионного белка (ТКБ), комплемента и других факторов. При остром отравлении МАН снижение БАСК может быть обусловлено супрессией данных параметров вследствие нарушения их синтеза, взаимодействием с МАН, 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 гг. прошлого столетия (Voman, 1995). Вполне вероятно, что МАН может их инактивировать.

Таким образом, под влиянием острого в дозах 0.25, 0.50 и 0.75 LD_{50} , подострого и хронического отравления МАН происходит снижение БАСК в течение 9 сут (дозозависимое при остром действии).

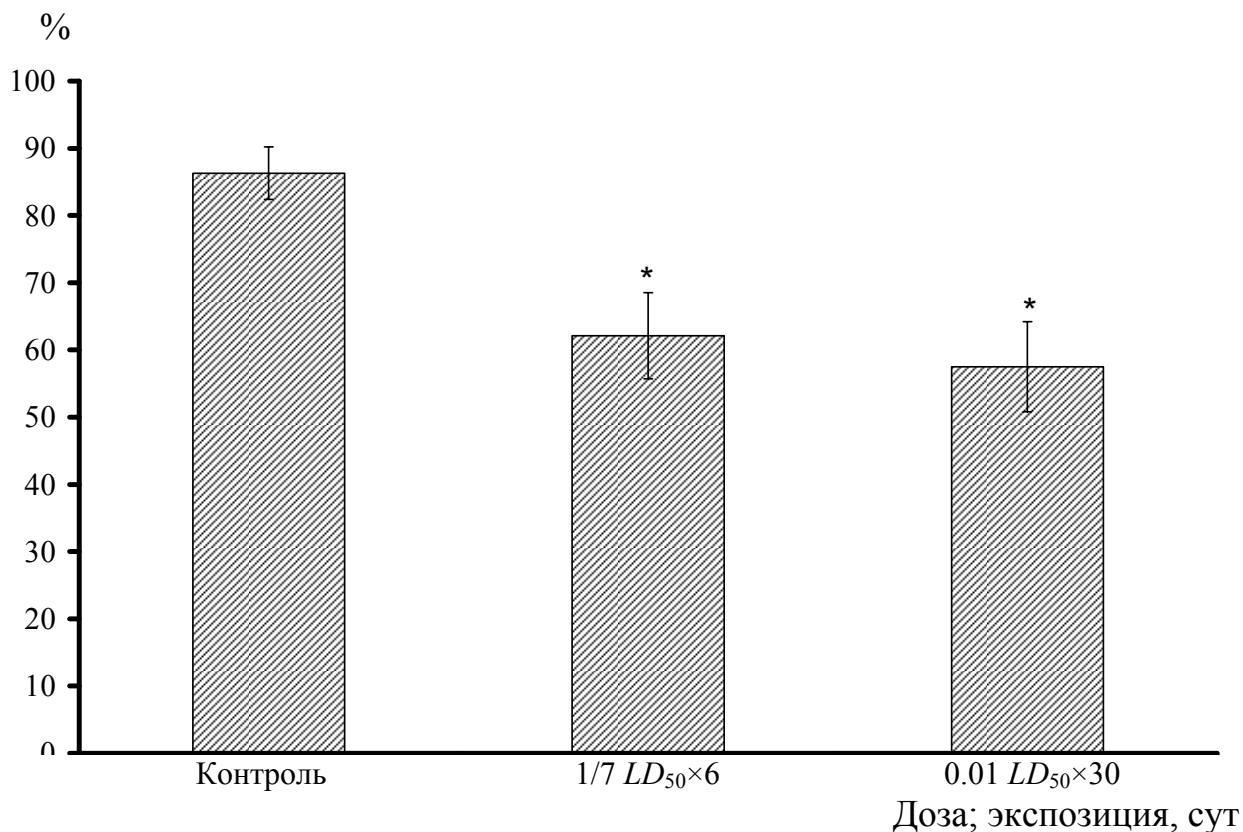


Рис. 3.5. Влияние подострого и хронического действия МАН на БАСК, % ($M \pm m$)

В каждой серии использовалось 8 – 9 животных; * - различие с контролем достоверно - $p < 0.05$. По оси абсцисс - LD_{50} МАН; экспозиция, сут; по оси ординат – БАСК, %

3.4. Действие метаарсенита натрия на сывороточную активность лизоцима

Нами в экспериментах на белых крысах было показано (табл. 3.6), что острая интоксикация МАН в дозах 0.25, 0.50 и 0.75 LD_{50} дозозависимо снижает активность показателя через 1-9 сут. Так, при действии МАН в этих дозах сывороточная активность лизоцима через 1 сут снижалась в 1.69, 2.38 и 2.84 раза ($p < 0.05$), через 6 сут – в 1.47 ($p > 0.05$), 2.05 и 2.20 раза ($p < 0.05$), а через 9 сут - в 1.26 ($p > 0.05$), 1.38 и 1.69 раза ($p < 0.05$) соответственно.

Таблица 3.6

Изменение активности лизоцима сыворотки крови крыс после острого отравления МАН, мг/л ($M \pm m$, $n=17-23$)

Токсикант	Доза, LD_{50}	Срок наблюдения, сут		
		1	6	9
МАН	Контроль	8.8 ± 1.3		
	0.25	$5.2 \pm 1.1^*$	6.0 ± 1.2	7.0 ± 1.5
	0.50	$3.7 \pm 1.09^*$	$4.3 \pm 1.0^*$	6.4 ± 1.2
	0.75	$3.1 \pm 0.5^*$	$4.0 \pm 1.1^*$	$5.2 \pm 0.8^*$

Примечание: * - $p < 0.05$ по сравнению с контролем

При подостром и хроническом отравлении МАН при экспозиции 30 сут (рис. 3.6.) активность лизоцима в сыворотке крови уменьшалась соответственно в 2.38 и 2.51 раза ($p < 0.05$).

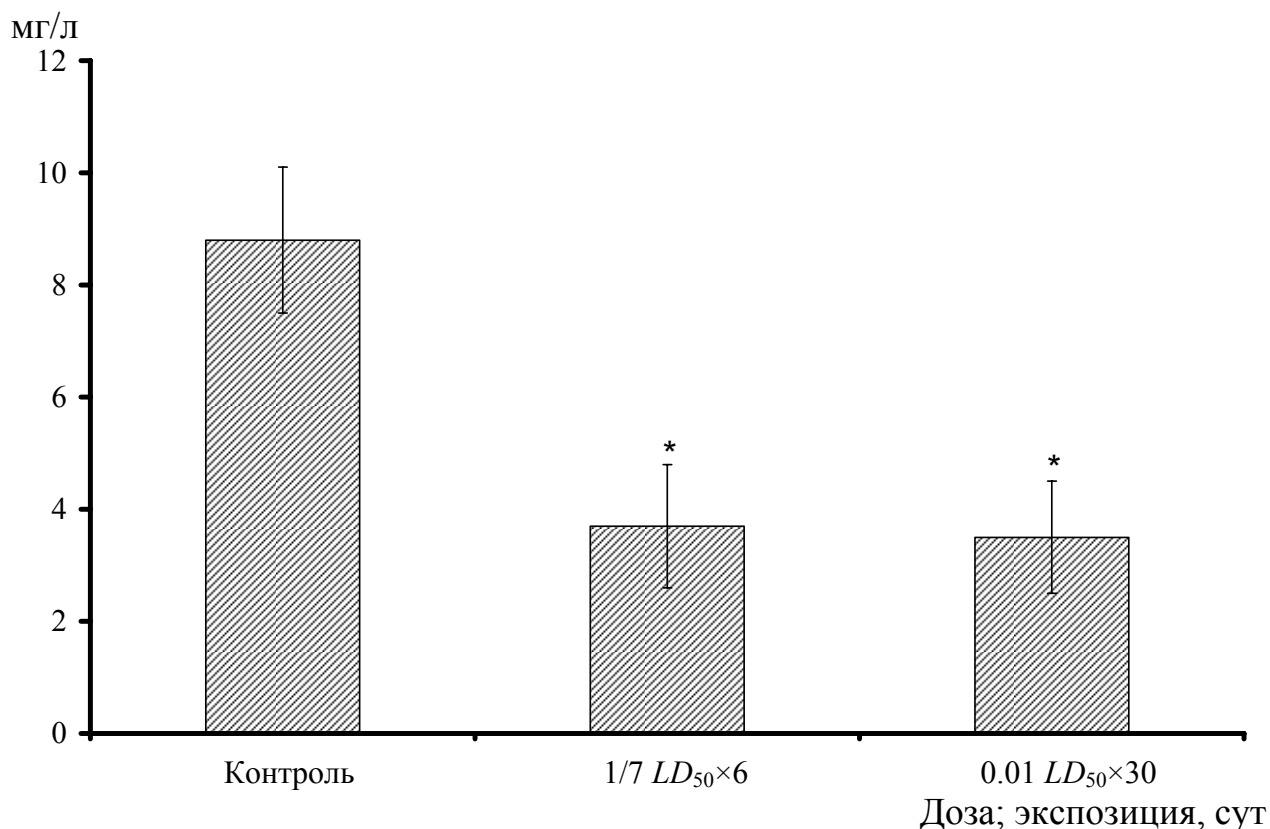


Рис.3.6. Влияние МАН на активность лизоцима сыворотки крови крыс, мг/л

В каждой серии использовалось 8 – 9 животных; * - различие с контролем достоверно - $p < 0.05$. По оси абсцисс - LD_{50} МАН; экспозиция, сут; по оси ординат – активность лизоцима, мг/л

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, 1985; Куценко и др., 2004), а также с инактивацией α -нафтил-AS-D-хлорацетатэстеразы нейтрофилов (Хейхоу, Кваглино, 1983). Редукция синтеза лизоцима, вероятно, может происходить также вследствие воздействия МАН на ДНК, что приводит к нарушению нуклеинового обмена (Голиков и др., 1986).

Таким образом, под влиянием острого, подострого и хронического действия МАН происходит дозозависимое (при остром воздействии) снижение активности лизоцима до 9 сут.

3.5. Действие острой интоксикации МАН на фагоцитарную активность нейтрофилов

Процесс фагоцитоза осуществляется микрофагами (гранулоцитами) и макрофагами (моноцитами крови, клетками пульпы селезенки, эндотелия кровеносных сосудов, полибластами, гистиоцитами и др.) и представляет собой сложный многоступенчатый процесс (Хаитов, Пинегин, 1995; Хаитов и др., 2000; Ройт и др., 2000). Помимо действия ферментов, уничтожение чужеродной клетки может осуществляться путем "дыхательного" (кислородного) взрыва (Nogueira, 1984). В настоящее время получены данные свидетельствующие о том, что в фагоцитарной реакции активное участие принимает радикал оксида азота (NO^{\cdot}); макрофаги продуцируют ИЛ-1, ИЛ-6, ИЛ-8, ИЛ-12 и $\text{TNF-}\alpha$ (α -фактор некроза опухоли), простагландины, лейкотриен B_4 (LTB_4), фактор, активирующий тромбоциты. Нейтрофилы синтезируют и выделяют в кровь $\text{TNF-}\alpha$ и ИЛ-12, а также хемокин ИЛ-8 (Хаитов и др., 2002).

В экспериментах на крысах нами установлено (табл. 3.7), что под влиянием МАН в дозах 0.25, 0.50 и 0.75 LD_{50} происходит дозозависимое

снижение активности ФМАН через 1-9 сут. Так, при действии МАН в дозах 0.25, 0.50 и 0.75 LD_{50} ФМАН через 1 сут снижалась в 1.39, 1.70 и 1.16 раза ($p<0.05$), а через 6 сут – в 1.30, 1.50 и 1.86 раза ($p<0.05$) соответственно.

Таблица 3.7

Изменение ФМАН крыс после острого отравления МАН, индекс активности нейтрофилов ($M \pm m$, $n=15-22$)

Доза, LD_{50}	Срок наблюдения, сут		
	1	6	9
Контроль	0.39 \pm 0.02		
0.25	0.28 \pm 0.02*	0.30 \pm 0.03*	0.34 \pm 0.03
0.50	0.23 \pm 0.02*	0.26 \pm 0.03*	0.30 \pm 0.02*
0.75	0.18 \pm 0.02*	0.21 \pm 0.02*	0.27 \pm 0.03*

Примечание: * - $p<0.05$ по сравнению с контролем

После подострого и хронического действия МАН в дозе 0.01 LD_{50} (при экспозиции 30 сут) показатели ФМАН существенно снижались по сравнению с контролем ($p<0.05$), причем степень ее снижения приблизительно соответствовала редукции параметров после острого действия МАН в дозе 0.75 LD_{50} через 1 сут (табл. 3.8).

Таблица 3.8

Изменение ФМАН ПЯЛ крыс под влиянием подострого и хронического воздействия МАН через 1 сут после воздействия

Показатели	Контроль	1/7 $LD_{50} \times 6$	0.01 $LD_{50} \times 30$
ФП	31.3 \pm 2.1	16.4 \pm 1.6*	18.7 \pm 2.1*
ФЧ	1.85 \pm 0.19	0.65 \pm 0.15*	0.80 \pm 0.24*
НСТ сп	0.30 \pm 0.02	0.14 \pm 0.02*	0.21 \pm 0.02*
НСТ инд	0.59 \pm 0.03	0.25 \pm 0.02*	0.28 \pm 0.03*

Примечание: ФП, ФЧ – соответственно фагоцитарный показатель, фагоцитарное число; НСТ – НСТ-тест спонтанный и индуцированный – индекс активности ПЯЛ; в каждой серии использовалось 8-15 животных; * - различие с контролем достоверно $p<0.05$

Снижение ФМАН крыс, видимо, обусловлено блокированием моно- и дитиоловых ферментов пируватоксидазной системы клетки (Саватеев, 1978; Страйер, 1985; Забродский, 1998), а также α -нафтил-AS-D-хлорацетатэстеразы нейтрофилов (Хейхоу, Кваглино, 1983). Кроме того, редукция данного показателя обусловлена реализацией общих механизмов

токсичности – инициированием процессов ПОЛ мембран нейтрофилов, нарушением процессов тканевого дыхания и его сопряжения с окислительным фосфорилированием и мембранотоксическим эффектом (Голиков и др., 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 и др., 2004). Взаимодействие SH-групп с МАН (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 практически не изучен (Pineda-Zavaleta et al., 2004).

Выявленное снижение показателей доиммунных факторов защиты организма (НРО) при острой интоксикации МАН 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, Плетенева, 1989; Забродский, 1998, 2002).

Поражение ФМАН МАН может быть связано и с ингибированием токсикантом ФАД^+ , $\text{ФАД}\cdot\text{H}$, восстановленного и окисленного убихинона и цитохрома b_{245} лейкоцитов. Возможны и иные механизмы нарушения функционирования НАДФ·Н-оксидазного комплекса нейтрофилов. Возможно, МАН, кроме кислородзависимых антиинфекционных систем фагоцитоза, поражает и кислороднезависимые микробицидные системы фагоцитов (Забродский, 1998, 2002; Кадушкин, 2007).

В редукции ФМАН определенную роль играет дисфункция ГГНС под влиянием МАН. При этом возможно изменение реактивности организма и

снижение функции фагоцитов (угнетение их цитотоксичности) (Петров, 1987; Брюхин, Михайлова, 1990; Гребенюк и др., 1998; Германчук, 2001; Кадушкин, 2007). В экспериментах на животных показано, что глюкокортикоиды снижают суммарную фагоцитарную активность фагоцитов, причем существенную роль в данном феномене играет адреналин (Шилов, 2001). Данные литературы позволяют полагать, что МАН может снижать функцию ГНС. Редукция активности ФМАН может быть связана с мембранотоксическим действием МАН, инициацией ПОЛ мембран нейтрофилов, взаимодействием продуктов МАН с различными радикалами на мембране макрофагов и микрофагов, супрессией функции ферментов тканевого дыхания митохондрий токсикантом (Ротенберг, 1980, 1982; Лудевиг, Лос, 1983; Голиков и др., 1986; Забродский, 1998, 2002). Не исключено ингибирование МАН эстераз нейтрофилов (Забродский, 1998, 2002; Кадушкин, 2007; Li et al., 1973).

Таким образом, под влиянием острого действия МАН происходит дозозависимое снижение ФМАН до 9 сут. После подострого и хронического действия МАН в дозе $0.01 LD_{50}$ показатели ФМАН существенно снижались приблизительно также как и после острого его действия в дозе $0.75 LD_{50}$ через 1 сут.

*

*

*

После острой интоксикации МАН происходит дозозависимое увеличение летальности животных от экспериментального перитонита, вызванного *E. coli*, а также уменьшение LD_{50} *E. coli* и Et_{50} жизни животных, что свидетельствует о снижении НРО под влиянием токсиканта. Острое отравление МАН вызывает дозозависимое увеличение летальности животных от экспериментальной пневмонии после предварительной иммунизации, дозозависимое уменьшение LD_{50} *P. vulgaris* и Et_{50} жизни животных, что свидетельствует о снижении под влиянием МАН НИРО. Действие острого

отравления МАН в дозах 0.25, 0.50 и 0.75 LD_{50} обуславливает дозозависимое снижение БАСК, активности лизоцима и ФМАН в течение 9 сут. После подострого и хронического действия МАН дозе 0.01 LD_{50} показатели ФМАН существенно уменьшались по сравнению с контролем ($p < 0.05$), причем степень их снижения приблизительно соответствовала редукции параметров после острого действия МАН в дозе 0.75 LD_{50} через 1 сут.

Глава 4. ДЕЙСТВИЕ МЕТААРСЕНИТА НАТРИЯ НА СОДЕРЖАНИЕ ЛИМФОЦИТОВ В ОРГАНАХ СИСТЕМЫ ИММУНИТЕТА

4.1. Влияние МАН на содержание лимфоцитов в органах системы иммунитета

Нами установлено (табл. 4.1), что после действия МАН в дозах 0.25, 0.50 и 0.75 LD_{50} происходит дозозависимое уменьшение содержания лимфоцитов в тимусе через 1 сут после интоксикации в 1.45, 1.82 и 2.06 раза соответственно. Эти сдвиги статистически значимы при дозах 0.5 и 0.75 LD_{50} ($p < 0.05$). Содержание лимфоцитов в селезенке, костном мозге и лимфоузлах изменялось аналогично. Так, в селезенке происходило уменьшение содержания лимфоцитов в тимусе через 1 сут после интоксикации в 1.30, 1.64 и 1.83 раза соответственно. Достоверное ($p < 0.05$) снижение числа лимфоцитов отмечалось в селезенке, костном мозге и лимфоузлах при дозах МАН, составляющих 0.5 и 0.75 LD_{50} .

Таблица 4.1

Влияние острого отравления МАН на число лимфоцитов в органах системы
иммунитета у крыс через 1 сут

Доза, LD_{50}	Органы системы иммунитета			
	Тимус ($\times 10^9$)	Селезенка ($\times 10^8$)	Костный мозг ($\times 10^6$)	Лимфоузлы ($\times 10^8$)
Контроль	1.42 \pm 0.13	3.61 \pm 0.25	41.20 \pm 3.07	0.14 \pm 0.01
0.25	0.98 \pm 0.10	2.78 \pm 0.22	35.23 \pm 3.08	0.12 \pm 0.02
0.50	0.78 \pm 0.06*	2.20 \pm 0.18*	29.02 \pm 3.11*	0.07 \pm 0.02*
0.75	0.69 \pm 0.05*	1.97 \pm 0.23*	27.12 \pm 3.06*	0.06 \pm 0.02*

Примечание: в каждой серии использовалось от 6 до 9 крыс; * - различие с контролем достоверно – $p < 0.05$

После острого действия МАН в дозе 0.75 LD_{50} , изменения числа лимфоцитов в органах системы иммунитета, выявленные через 1-6 сут, к 9 сут восстанавливались до контрольных значений (табл. 4.2). В лимфоидных органах через 1 и 6 сут при дозе МАН 0.75 LD_{50} происходило снижение содержания лейкоцитов, статистически значимое в тимусе (через 1-6 сут), селезенке (через 1-6 сут), костном мозге (через 1 сут) и лимфоузлах (через 1-6 сут) ($p < 0.05$). Через 9 сут отмечалось восстановление параметров до

контрольного значения (табл. 4.2).

Таблица 4.2

Изменение содержания лимфоцитов в органах системы иммунитета крыс под влиянием острого отравления МАН ($0.75 LD_{50}$) через 1-9 сут

Срок наблюдения, сут	Тимус ($\times 10^9$)	Селезенка ($\times 10^8$)	Костный мозг ($\times 10^6$)	Лимфоузлы ($\times 10^8$)
Контроль	1.42 ± 0.13	3.61 ± 0.25	41.20 ± 3.07	0.14 ± 0.01
1	$0.68 \pm 0.05^*$	$1.99 \pm 0.23^*$	$28.05 \pm 3.11^*$	$0.07 \pm 0.01^*$
6	$0.59 \pm 0.06^*$	$2.10 \pm 0.20^*$	33.98 ± 3.08	$0.09 \pm 0.02^*$
9	1.32 ± 0.12	3.31 ± 0.22	38.00 ± 3.15	0.15 ± 0.02

Примечание: в каждой серии использовалось от 6 до 11 крыс; * – различие с контролем достоверно - $p < 0.05$

В крови под влиянием острой интоксикации МАН число лимфоцитов статистически значимо снижалось через 1-4 сут (рис.4.1).

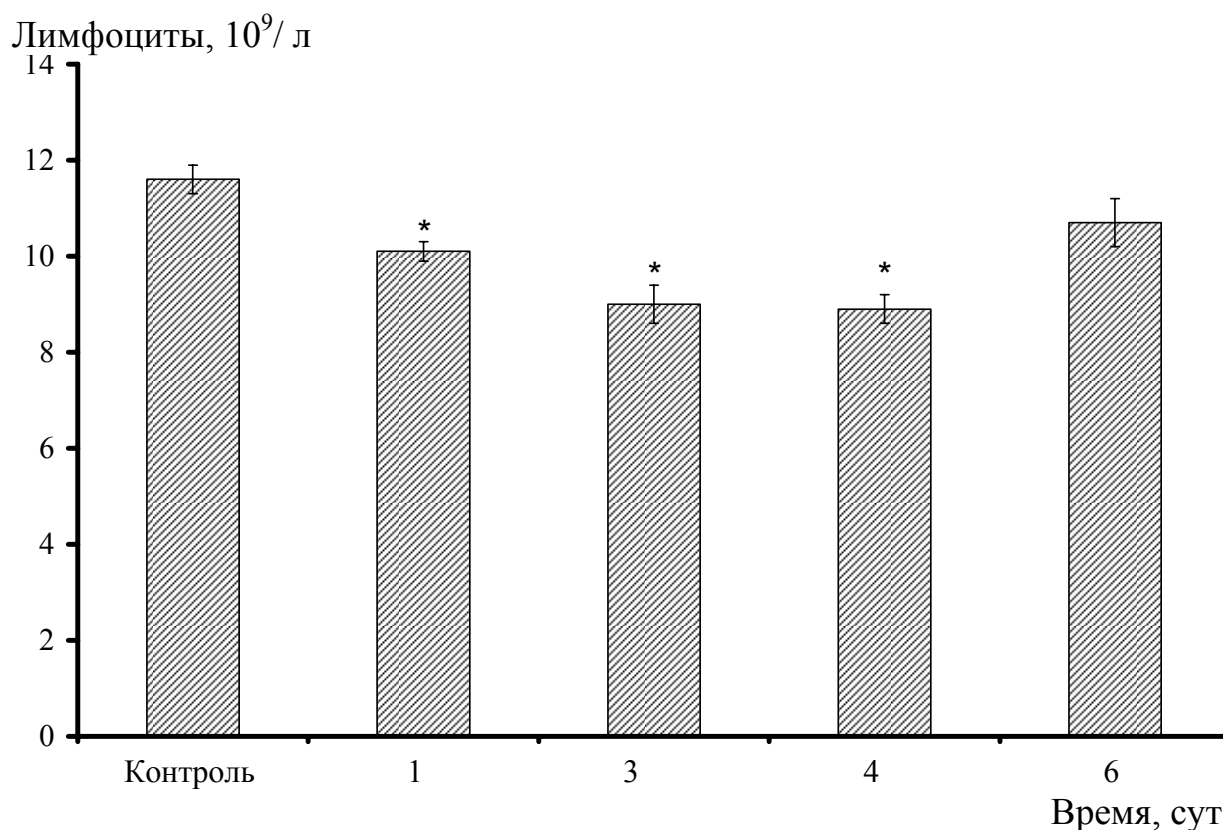


Рис.4.1. Влияние острого отравления МАН ($0.75 LD_{50}$) на число лимфоцитов в циркулирующей крови у крыс

В каждой серии использовалось от 7 до 11 животных; * - различие с контролем достоверно - $p < 0.05$. По оси абсцисс - время, сут; по оси ординат – число лимфоцитов, $10^9/\text{л}$

Снижение лимфоцитов в крови и органах системы иммунитета можно объяснить поражением лимфоидной стволовой кроветворной клетки, а также зрелых лимфоцитов реализацией следующих механизмов: подавлением пролиферации иммуноцитов в результате ингибирования ферментов тканевого дыхания митохондрий ИКК (Ротенберг, 1980, 1982; Забродский и др., 1998), а также инактивацией МАН многочисленных ферментных систем лимфоцитов (Куценко, 2004), повреждением мембран клеток, замещением фосфора мышьяком в ДНК ПСКК (Давыдова, 1989), инактивацией тиоловых ферментов лимфоцитов и эстеразах Т-клеток (Страйер, 1985; Забродский, 1998, 2002).

Кроме того, механизмы, определяющие снижение лимфоцитов в органах иммунной системы после интоксикации МАН, могут быть связаны с изменением функции ГГНС (Гурин, 1970; Горизонтов, 1981*а, б*; Забродский, 2002), холинергической и САС (Дорошевич, 1971; Денисенко, 1980), с действием МАН на ферменты иммуноцитов, инициацией ПОЛ. Эти изменения могут вызывать нарушение гомеостаза и гибель иммуноцитов (апоптоз) (Петров и др., 1981*а, б*; Петров, 1987; Ройт и др., 2000; Хаитов и др., 2000, 2002; Мутускина и др., 2001; Забродский, 2002; Молотков, 2002; Madden, Livnat, 1991; Claman, 1972, 1993; Durant, 1986; Dhabhar et al., 1996; Liao et al., 2004; Li, Kawada, 2006). Кроме того, МАН, вероятно, способен нарушать процесс позитивной (положительной) селекции Т-лимфоцитов (Fink, Bevan, 1995). При подостром и хроническом действии МАН в дозе 0.01 LD_{50} в течение 30 сут отмечалась приблизительно такая же редукция показателей, как и при его действии в дозе 0.75 LD_{50} через 1–6 сут (табл. 4.3).

Можно полагать, что при остром, подостром и хроническом действии МАН активация ГГНС, САС, ингибирование эстераз Т-лимфоцитов и инициация ПОЛ также приводят к апоптозу лимфоцитов.

Анализ данных литературы (Молотков, 2002; Хаитов и др., 2002) позволяет считать, что действие МАН реализуется вследствие увеличения миграции тимоцитов из тимуса в результате действия КС. При отравлении

Таблица 4.3

Влияние подострого и хронического действия МАН на число лимфоцитов в органах системы иммунитета у крыс (M±m)

Дозы; экспозиция, сут	Органы системы иммунитета			
	Тимус ($\times 10^9$)	Селезенка ($\times 10^8$)	Костный мозг ($\times 10^6$)	Лимфоузлы ($\times 10^8$)
Контроль	1.42±0.13	3.61±0.25	41.20±3.07	0.14±0.01
1/7 LD ₅₀ ×6	0.60±0.05*	2.00±0.23*	27.11±3.15*	0.07±0.02*
0.01 LD ₅₀ ×30	0.68±0.06*	2.15±0.22*	25.05±3.09*	0.06±0.03*

Примечание: в каждой серии использовалось от 8 до 11 крыс; * - различие с контролем достоверно - $p < 0.05$

МАН из селезенки происходит миграция лимфоцитов в результате активации α -адренорецепторов этого органа адреналином и норадреналином (концентрация данных гормонов в крови увеличивается в результате активации САС) (Горизонтов, 1981а; Забродский, 2005).

Необходимо отметить, что миграция лимфоцитов из органов системы иммунитета весьма динамичный процесс, зависящий от времени суток (Dhabhar et al., 1996) и различных физических и химических факторов, в частности от изменения функционального состояния органов системы иммунитета по влиянием холинергической системы (Забродский и др., 2005), ГГНС и САС, регулирующих соответственно концентрацию в крови КС (Горизонтов, 1981б; Claman, 1972, 1993; Dhabhar et al., 1996) и катехоламинов (Madden, Livnat, 1991).

Вышеизложенные соображения позволяют заключить, что зарегистрированные изменения под влиянием МАН носят как неспецифический, так и специфический характер. Неспецифические изменения, вероятно, обусловлены кратковременной активацией ГГНС (стресс-реакция) с последующей реализацией апоптоза Т- и В-клеток (Durant, 1986), а специфические связаны с нарушением функции пируватоксидазной системы лимфоцитов ингибированием моно- и дитиоловых ферментов пируватоксидазной системы лимфоцитов (Ленинджер, 1974; Страйер, 1985; Забродский, 2007).

Таким образом, под влиянием острой, подострой и хронической интоксикации МАН происходит уменьшение числа лимфоцитов в лимфоидных органах.

4.2. Изучение нарушения миграции Т-лимфоцитов из тимуса и В- клеток из костного мозга

Проведенные нами исследования показали (табл. 4.4), что острая интоксикация МАН в дозах 0.25, 0.50, 0.75 LD_{50} вызывает дозозависимое снижение миграции Т-клеток из тимуса (по числу АОК в селезенке) через 8 сут соответственно в 1.24 ($p>0.05$), 1.66 и 2.11 ($p<0.05$) раза. МАН в этих же дозах вызывал редукцию миграции В-клеток из костного мозга (по числу АОК в селезенке) в 1.23 ($p>0.05$), 1.54 и 1.89 раза ($p<0.05$) соответственно.

Таблица 4.4

Влияние острого отравления МАН на миграцию Т- и В- клеток через 8 сут после интоксикации, число АОК в селезенке ($M \pm m$, $n=9-11$)

Доза, LD_{50}	Миграция Т-клеток	Миграция В-клеток
Контроль	1889 \pm 184	1245 \pm 163
0.25	1527 \pm 142	1012 \pm 147
0.50	1138 \pm 134*	808 \pm 83*
0.75	895 \pm 82*	658 \pm 69*

Примечание: * - различие с контролем достоверно - $p<0.05$

При подостром и хроническом отравлении МАН (табл. 4.5) миграция Т-клеток из тимуса уменьшалась в 1.87 и 1.91 ($p<0.05$) раза, а В-клеток в 1.40 и 1.34 ($p<0.05$) раза соответственно.

Снижение миграции Т-лимфоцитов из тимуса и В- клеток из костного мозга после острой интоксикации МАН обусловлено, возможно, гибелью СКК, апоптозом лимфоцитов, снижением миграции лимфоцитов вследствие инактивации их эстераз, нарушением пируватоксидазной системы СКК

(Ленинджер, 1974; Диксон, Уэбб, 1982; Страйер, 1985; Забродский, 1998, 2002, 2005; Хаитов и др., 2000).

Таблица 4.5

Влияние подострого и хронического отравления МАН на миграцию Т- и В-клеток, число АОК в селезенке ($M \pm m$, $n=7-9$)

Доза; экспозиция, сут	Срок исследования после воздействия МАН, сут	Миграция Т-клеток	Миграция В-клеток
Контроль	-	1889 \pm 184	1245 \pm 163
1/7 $LD_{50} \times 6$	1	1010 \pm 132*	887 \pm 80*
0.01 $LD_{50} \times 30$	1	987 \pm 128*	931 \pm 85*

Примечание: * - различие с контролем достоверно - $p < 0.05$

Уменьшение миграции Т-лимфоцитов и В-клеток из костного мозга под влиянием МАН может быть обусловлено ингибированием тканевого дыхания и окислительного фосфорилирования в СКК, лимфоидных стволовых клетках, КОЕ, с 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 et al., 1984; Gabon et al., 1986). Трехвалентный мышьяк влияет на митоз, синтез и распаривание ДНК. Механизм токсического действия на СКК может быть преимущественно связан с блокированием тиоловых групп ДНК-полимеразы (Ершов, Плетенева, 1989).

Таким образом, под влиянием острой интоксикации МАН в дозах 0.25, 0.50 и 0.75 LD_{50} через 8 сут происходит дозозависимое уменьшение миграции Т- и В-клеток из костного мозга. При подостром и хроническом отравлении МАН миграция Т- и В-клеток из костного мозга также существенно уменьшается.

*

*

*

Острая, подострая и хроническая интоксикация МАН уменьшает число лимфоцитов в лимфоидных органах. При остром отравлении МАН данная редукция носит дозозависимый характер. Под влиянием острой интоксикации МАН в дозах 0.25, 0.50 и 0.75 LD_{50} через 8 сут происходит дозозависимое уменьшение миграции Т-лимфоцитов из тимуса и В-клеток из костного мозга. Подострое и хроническое действие МАН приводит к снижению миграция Т-лимфоцитов из тимуса и В-клеток из костного мозга.

Глава 5. ДЕЙСТВИЕ МЕТААРСЕНИТА НАТРИЯ НА КЛЕТОЧНЫЕ ИММУННЫЕ РЕАКЦИИ

5.1. Изменение функции Т-лимфоцитов под влиянием метаарсенита натрия

Исследование функции Т-лимфоцитов проводили по РТМЛ периферической крови крыс в присутствии КонА через 1, 6, 9 и 12 сут после интоксикации МАН. 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, Брок, 1986; Забродский, Мандыч, 2007).

В настоящее время цитокины доиммунного воспаления делятся на две подгруппы. К первой относятся первично провоспалительные цитокины – IL-1, TNF α , IL-6 (продуцируют макрофаги и лимфоидные дендритные клетки покровных тканей в очаге внедрения патогена). IL-1, TNF α действуют преимущественно локально, IL-6 индуцирует синтез белков острой фазы в печени. Вторая подгруппа включает вторично провоспалительные цитокины – хемокины (обеспечивают локомоторное передвижение лейкоцитов в тканях, поддерживают ангиогенез и продукцию коллагенов соединительной тканью (регенерацию) (Хаитов и др., 2002).

Нами экспериментально установлено (табл. 5.1), что при оценке функции Т-лимфоцитов по РТМЛ у крыс через 1–12 сут после острой интоксикации МАН (0.25, 0.50 и 0.75 LD₅₀) дозозависимо увеличивается миграция лейкоцитов (снижает функцию Т-клеток). Так, острое отравление МАН уменьшало функцию Т-клеток через 1 сут соответственно на 19.5 (p>0.05), 21.8 (p<0.05) и 37.2% (p<0.05). Снижение показателя сохранялось до 12 сут, причем оно было статистически значимым (p<0.05) при дозе МАН, составляющей 0.5 и 0.75 LD₅₀ в течение 9 сут.

Таблица 5.1

Влияние острого отравления МАН на функцию Т-клеток у крыс, оцениваемую по РТМЛ, % ($M \pm m$, $n=8-15$)

Токсикант	Доза, LD_{50}	Время исследования, сут			
		1	6	9	12
МАН	Контроль	50.2 ± 5.1			
	0.2	$69.7 \pm 5.3^*$	$68.0 \pm 4.1^*$	$66.1 \pm 5.2^*$	63.6 ± 6.2
	0.5	$72.0 \pm 5.2^*$	$70.3 \pm 4.9^*$	$67.1 \pm 5.5^*$	$66.4 \pm 5.0^*$
	0.75	$87.4 \pm 5.4^*$	$81.8 \pm 5.0^*$	$74.5 \pm 5.3^*$	$68.5 \pm 5.5^*$

Примечание: * - $p < 0.05$ по сравнению с контролем

Через 6 сут острое отравление МАН в дозах 0.25, 0.50 и 0.75 LD_{50} приводило к снижению функции Т-лимфоцитов у крыс соответственно на 17.8, 20.1 и 31.6% ($p < 0.05$). Через 9 сут острое отравление МАН в тех же дозах приводило к снижению показателя у крыс соответственно на 15.9, 16.9 и 24.3% ($p < 0.05$). Снижение показателя сохранялось до 12 сут, причем оно было статистически значимым ($p < 0.05$) при дозе МАН, составляющей 0.5 и 0.75 LD_{50} .

При подостром и хроническом действии МАН (табл. 5.2) отмечалось снижение функции Т-клеток соответственно на 33.3 и 34.0% ($p < 0.05$). Следует отметить, что данные воздействия МАН, оцениваемые по РТМЛ, существенно не отличались.

Таблица 5.2

Влияние подострого и хронического действия МАН на функцию Т-клеток у крыс, оцениваемую по РТМЛ, %

Доза; экспозиция, сут	Время после интоксикации, сут	
	7	31
Контроль	50.2 ± 5.1	53.4 ± 4.7
$1/7 LD_{50} \times 6$	$83.5 \pm 6.8^*$	-
$0.01 LD_{50} \times 30$	-	$87.4 \pm 6.1^*$

Примечание: в скобках – число крыс; в каждой серии использовалось 9 крыс; * - различие с контролем достоверно - $p < 0.05$

По-видимому, снижение функции Т-лимфоцитов обусловлено ингибирующим действием КС (Забродский, Германчук, 2000; Tiefenbach et al., 1983, 1985), секреция которых в течение 6-12 ч существенно увеличивается в результате стресс-реакции (Лемус, Давыдов, 1974; Szot, Murphy, 1970; Street, Sharma, 1975; Tiefenbach, Wichner, 1985; Dhabhar et al., 1996), ингибированием эстераз Т-лимфоцитов (Хусинов и др., 1991; Забродский 1993; Fergula et al., 1972), повреждением м- и н-холинорецепторов, содержащих SH-группы, лимфоцитов и нарушением функции их пируватоксидазной системы вследствие взаимодействия МАН с моно- и дитиоловыми ферментами (Трахтенберг, Шафран, 2002).

Частичное восстановление показателя к 12 сут, свидетельствует о том, что полипатентные стволовые клетки костного мозга у крыс к этому сроку после действия МАН обеспечивают образование числа лимфоцитов, соответствующих контрольному уровню (Забродский, Мандыч, 2007).

Таким образом, под влиянием острой интоксикации МАН происходит дозозависимое снижение функции Т-клеток, оцениваемой по ингибированию миграции лейкоцитов, в течение 1-12 сут. Подострое и хроническое действие МАН в течение 30 сут существенно снижает функцию Т-клеток. Эта редукция показателя приблизительно соответствует острому воздействию МАН в дозе $0.75 LD_{50}$ через 1-6 сут.

5.2. Оценка функции Th1-клеток по реакции гиперчувствительности замедленного типа

Оценка формирования ГЗТ под влиянием МАН проводили в моделях с переносом клеток и без переноса их от донора к реципиенту. Данная реакция позволяет оценить действие МАН не только на Th1-лимфоциты, но и косвенно на продукцию ими ИЛ-3, γ -интерферона, β -фактора некроза опухоли и гранулоцитарно-макрофагального колониестимулирующего фактора (ГМ-КСФ) лимфоцитов (Ройт и др., 2000; Georgiev, Albright., 1993), а

также на участвующие в реализации ГЗТ (гиперчувствительности IV типа) Т-клеток памяти и макрофагов (Хаитов и др., 2002).

Нами установлено (табл. 5.3), что при острой интоксикации МАН происходит дозозависимое снижение реакции ГЗТ. Так, дозы МАН, составляющие 0.25, 0.50 и 0.75 LD_{50} , вызывали супрессию формирования ГЗТ соответственно в 1.73, 2.05 и 2.70 раза ($p < 0.05$). При переносе клеток крысам-реципиентам от доноров отмечалось дозозависимое снижение реакции ГЗТ соответственно в 1.44, 1.75 и 1.90 раза ($p < 0.05$) (рис. 5.1).

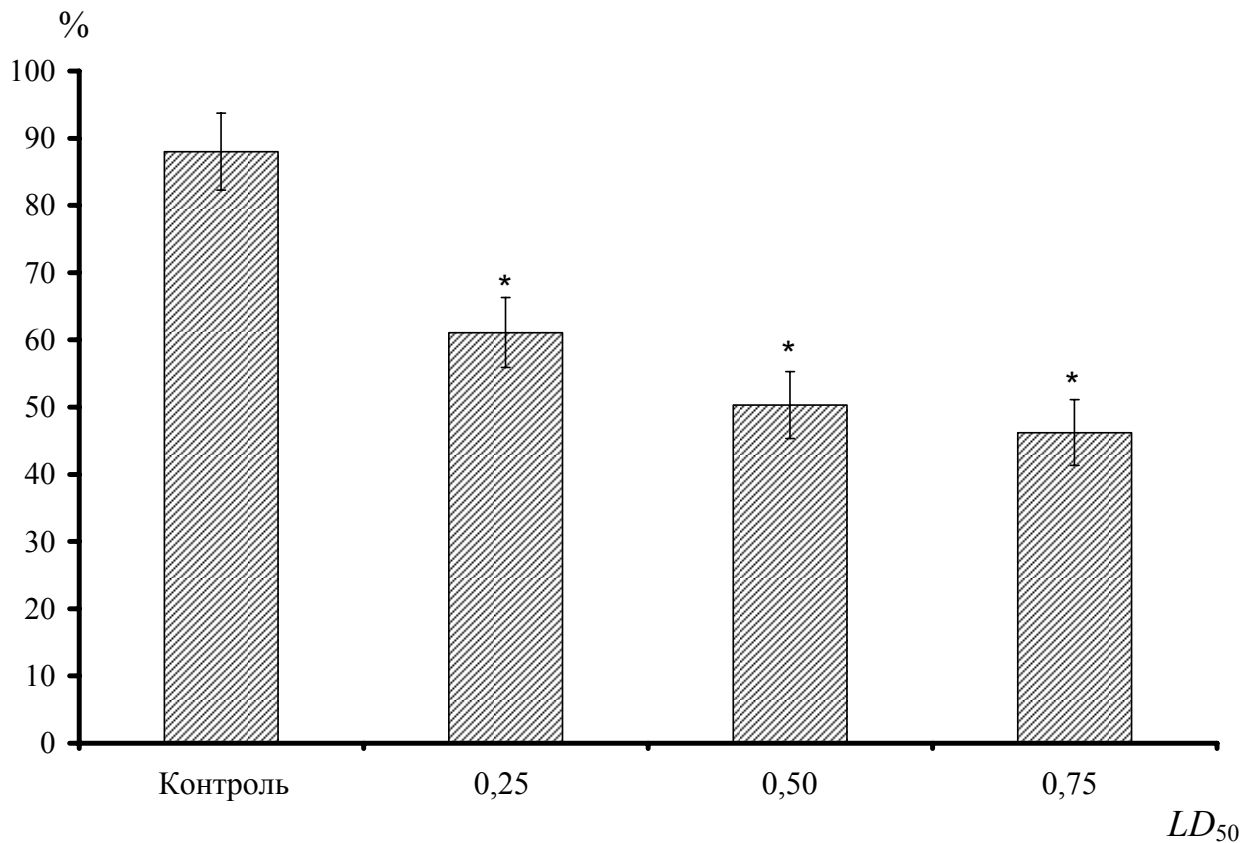


Рис. 5.1. Влияние острой интоксикации МАН на функцию Th1-лимфоцитов по реакции ГЗТ у крыс, с переносом клеток после иммунизации реципиентам

В каждой серии использовалось 7 - животных; * - различие с контролем достоверно - $p < 0.05$. По оси абсцисс - доза; по оси ординат - реакция ГЗТ, %

Таблица 5.3

Влияние острой интоксикации МАН на функцию Th1-лимфоцитов по реакции ГЗТ у крыс, %

Доза, LD_{50}	Модель реакции ГЗТ	
	ГЗТ без переноса клеток	ГЗТ с переносом клеток после иммунизации реципиентам
Контроль	39.9±3.5	88.0±5.7
0.25	23.1±2.1*	61.1±5.2*
0.50	19.5±2.3*	50.3±5.0*
0.75	14.8±1.9*	46.2±4.9*

Примечание: в каждой серии использовалось от 7 до 8 крыс; * - различие с контролем достоверно - $p < 0.05$

Установленные изменения формирования ГЗТ позволяют заключить, что МАН в дозах 0.25, 0.50 и 0.75 LD_{50} вызывает супрессию Th1-лимфоцитов в реализации как первичного, так и вторичного клеточного иммунного ответа. Th1-лимфоциты обеспечивают реализацию реакции ГЗТ путем активации макрофагов (Ройт др., 2000; Хаитов и др., 2002), а также обеспечивают формирование клеточного иммунитета путем продукции цитокинов (Ройт и др., 2000; Хаитов и др., 2002; Georgiev, Albright, 1993; Kimber, 1996). МАН, вероятно, вызывает редукцию, кроме лимфоцитов Th1-типа Т-клеток памяти и макрофагов (Kimber, 1996; Ройт и др., 2000), которые также участвуют в реакции ГЗТ.

Таблица 5.4

Влияние подострого и хронического действия МАН на функцию Th1-лимфоцитов (по РТМЛ, %)

Доза; экспозиция, сут	Время после интоксикации, сут	
	7	31
Контроль	39.1±3.7	42.0±3.5
1/7 $LD_{50} \times 6$	16.7±2.1*	-
0.01 $LD_{50} \times 30$	-	15.2±2.3*

Примечание: в каждой серии использовалось 7 крыс; * - различие с контролем достоверно - $p < 0.05$

При подостром и хроническом действии МАН в дозе 0.01 LD_{50} (табл. 5.4) отмечалось снижение функции Th1-клеток в первичном клеточном

иммунном ответе соответственно в 2.34 и 2.76 раза ($p < 0.05$). Интенсивность воздействия МАН на Th1-лимфоциты при подостром и хроническом действии существенно не отличались и приблизительно соответствовали острому действию яда при дозе $0.75 LD_{50}$.

Снижение функции Th1-лимфоцитов, оцениваемой по реакции ГЗТ, может быть обусловлено взаимодействием МАН с моно- и дитиоловыми ферментами (Трахтенберг, Шафран, 2002) пируватоксидазной системы лимфоцитов, снижением активности Th1-клеток вследствие инициации ПОЛ мембран лимфоцитов (Забродский, Мандыч 2007). Это происходит по-видимому, в результате незначительной инактивации МАН эстераз, локализованных преимущественно в Т-хелперах (в частности, в Th1-лимфоцитах) (Хейхоу, Кваглино, 1983; Германчук, 2000), а также нарушением функции стволовых кроветворных клеток и созревания пре-Т-клеток в костном мозге и Т-лимфоцитов в тимусе (Петров и др., 1981; Ройт и др., 2000; Хаитов и др., 2002).

Таким образом, острая интоксикация МАН дозозависимо снижает функцию Th1-лимфоцитов. Подострое (в течение 6 сут) и хроническое действие МАН в течение 30 сут вызывает супрессию функции Th1-клеток, практически соответствующую острому действию токсиканта в дозе $0.75 LD_{50}$.

5.3. Изучение (**изменение**) антителозависимой клеточной цитотоксичности при действии метаарсенита натрия

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, 1991; Хаитов и др., 2000). ЕКК, активированные связанными с клеткой-мишенью (например, клеткой, пораженной вирусом) антителами, уничтожают ее. Эта система получила название

антителозависимая клеточная цитотоксичность. Помимо ЕКК в эту систему входят ПЯЛ – моноциты, базофилы, эозинофилы, сегментоядерные лейкоциты, а также другие фагоцитирующие и нефагоцитирующие миелоидные клетки (Ройт и др., 2000). В использованной нами модели эксперимента исследовалась вся система АЗКЦ спленоцитов: К-клетки (большие зернистые лимфоциты) и ПЯЛ (French, Yokoyama, 2003; Lanier, 2003; Hansasuta et al., 2004; Lee et al., 2004; Garrity et al., 2005; MacFarlane, Campbell, 2006).

При острой интоксикации МАН нами установлено дозозависимое уменьшение АЗКЦ под влиянием токсиканта. Так, МАН в дозах 0.25, 0.50 и 0.75 LD_{50} (рис. 5.2) вызывал редукцию АЗКЦ спленоцитов у крыс через 5 сут соответственно в 1.55, 1.85 и 3.20 ($p < 0.05$) раза.

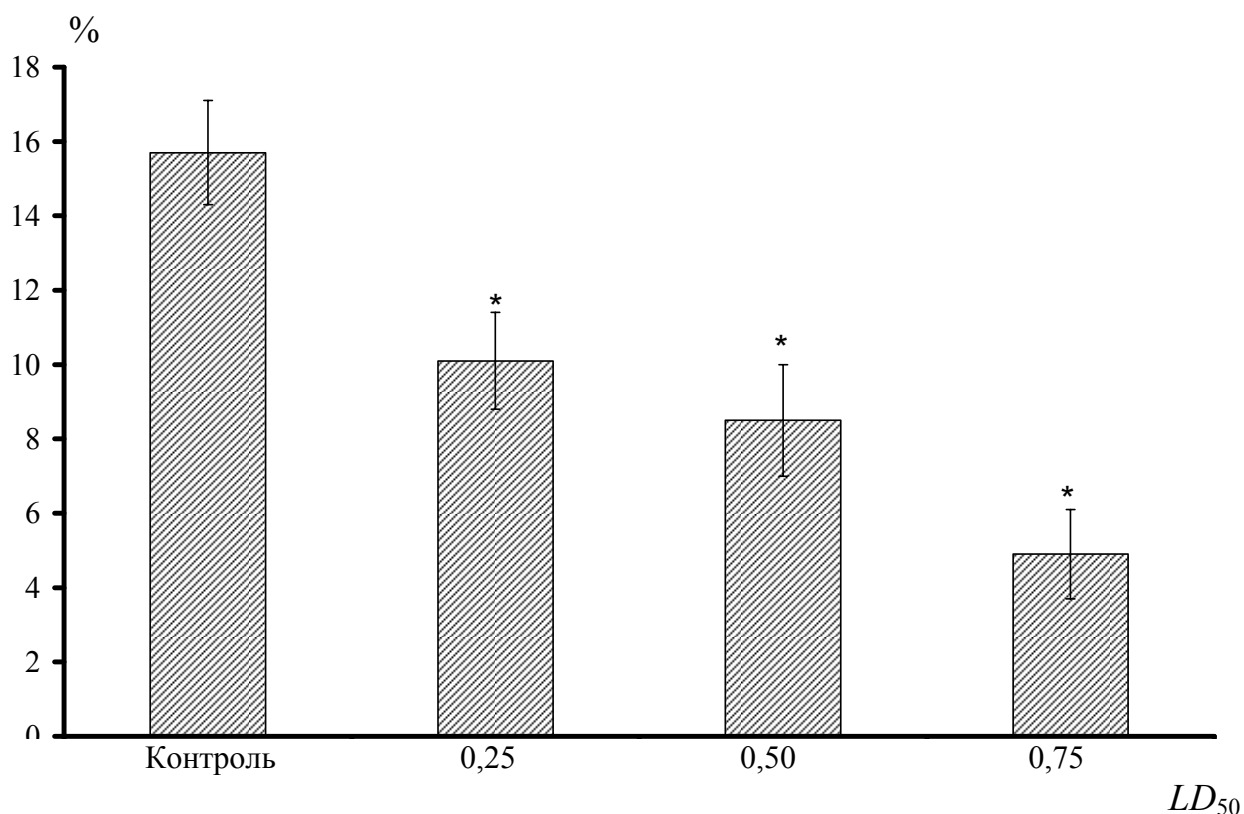


Рис. 5.2. Влияние острого отравления МАН на АЗКЦ спленоцитов у белых крыс через 5 сут, %

В каждой серии использовалось 7 - 8 животных; * - различие с контролем достоверно - $p < 0.05$. По оси абсцисс - доза; по оси ординат – АЗКЦ, %

При подостром и хроническом действии МАН в дозе $0.01 LD_{50}$ (табл. 5.6) отмечалось уменьшение АЗКЦ спленоцитов в 1.80 и 1.76 раза ($p < 0.05$), а тимоцитов - в 2.10 и 1.96 раза ($p < 0.05$) соответственно.

Таблица 5.6

Влияние подострого и хронического действия МАН на АЗКЦ, %

Доза; экспозиция, сут	Время после интоксикации, сут		
		7	31
Контроль	1	15.7 ± 1.4	17.4 ± 1.7
	2	10.1 ± 1.1	14.1 ± 1.5
$1/7 LD_{50} \times 6$	1	$8.7 \pm 1.2^*$	-
	2	$4.8 \pm 1.3^*$	-
$0.01 LD_{50} \times 30$	1	-	$9.8 \pm 2.0^*$
	2	-	$7.2 \pm 1.2^*$

Примечание: 1 – АЗКЦ спленоцитов; 2 – АЗКЦ тимоцитов; в каждой серии использовалось 6 крыс; * - различие с контролем достоверно - $p < 0.05$

Помимо описанных в предыдущих разделах механизмов иммуотоксичности МАН, следует отметить, что данные соединения, вероятно, способны оказывать антихолинэстеразное действие на К-клетки, взаимодействовать с холинорецепторами лимфоцитов, уменьшать АЗКЦ вследствие нарушения электролитного обмена клетки и изменения соотношения цАМФ/цГМФ (Забродский, Мандыч, 2007; Trinchiev, de Marchi, 1976).

Таким образом, острая интоксикация МАН дозозависимо снижает АЗКЦ. Подострое и хроническое действие МАН вызывает супрессию АЗКЦ, приблизительно соответствующую острому действию МАН в дозе $0.50 LD_{50}$.

5.4. Воздействие метаарсенита натрия на функцию естественных клеток-киллеров

5.4.1. Действие метаарсенита натрия на активность естественных клеток-киллеров селезенки *in vivo*

ЕКК 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 и др., 2000; Ройт и др., 2000). Вступая в контакт с клетками опухоли, а также 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 и др., 2000). Исходя из данного определения, ЕКК осуществляют одну из функций иммунитета и не относятся к НРО (Хаитов и др., 2002).

При исследовании влияния токсикантов на ЕКК крыс нами установлено (табл. 5.7), что через 1–6 сут МАН дозозависимо снижают активность ЕКК. Острое отравление МАН в дозах 0.25, 0.50 и 0.75 LD_{50} приводило к снижению активности ЕКК у крыс через 1 сут соответственно в 1.35, 1.89 и 2.77 раза ($p < 0.05$). Через 3 сут острое отравление МАН в этих же дозах снижало активность ЕКК у крыс соответственно в 1.51, 2.02 и 2.89 раза ($p < 0.05$).

Таблица 5.7

Изменение активности ЕКК после острого отравления МАН, % ($M \pm m$, $n=5-6$)					
Токсикант	Доза, LD_{50}	Время исследования, сут			
		1	3	6	9
МАН	Контроль	34.1 ± 1.4 (31)			
	0.25	$25.2 \pm 3.6^*$	22.6 ± 3.2	$23.0 \pm 3.0^*$	29.9 ± 4.1
	0.50	$18.0 \pm 3.4^*$	$16.9 \pm 3.5^*$	$20.3 \pm 2.7^*$	$26.2 \pm 3.7^*$
	0.75	$12.3 \pm 3.0^*$	$11.8 \pm 3.3^*$	$14.8 \pm 4.1^*$	$23.5 \pm 3.9^*$

Примечание: в скобках – число животных; * - $p < 0.05$ по сравнению с контролем

Через 6 сут острое отравление МАН в дозах 0.25, 0.50 и 0.75 LD_{50} приводило к снижению показателя у крыс соответственно в 1.48, 1.68 и 2.30 раза ($p < 0.05$). К 9 сут при дозах 0.50 и 0.75 LD_{50} исследованный параметр оставался сниженным.

При подостром и хроническом действии МАН в дозе 0.01 LD_{50} (табл. 5.8) отмечалась редукция ЕКК соответственно в 2.42 и 2.04 раза ($p < 0.05$).

Таблица 5.8

Влияние подострого и хронического действия МАН на ЕКК, %		
Доза; экспозиция, сут	Время после интоксикации, сут	
	7	31
Контроль	34.1 ± 1.4 (31)	34.1 ± 1.4 (31)
$1/7 LD_{50} \times 6$	$14.1 \pm 2.7^*$	-
$0.01 LD_{50} \times 30$	-	$16.7 \pm 2.8^*$

Примечание: в скобках – число животных; в каждой серии использовалось 9 крыс;
* - различие с контролем достоверно - $p < 0.05$

Снижение активности ЕКК под влиянием МАН обусловлено нарушением функции их пируватоксидазной системы вследствие взаимодействия токсиканта с моно- и дитиоловыми ферментами (Трахтенберг, Шафран, 2002), но не исключено ингибированием их эстераз ЕКК (Ройт и др., 2000; Забродский, 2002). Эффекты КС и катехоламинов вследствие активации возможной активации МАН ГГНС (Забродский, 1993, 2000; Забродский, Мандыч, 2007; Szot, Murphy, 1970; Tiefenbach et al., 1983,

1985) также обуславливают редукцию активности ЕКК (Madden, Livnat, 1991; Claman, 1993). Взаимодействие МАН с сульфгидрильными группами холинорецепторов ЕКК также может являться одним из факторов, вызывающих редукцию активности ЕКК (Трахтенберг, Шафран, 2002).

Супрессия функциональной активности ЕКК после острой интоксикации МАН может быть связана со снижением функции некоторых ферментов ЕКК (сукцинатдегидрогеназы, альдегиддегидрогеназы, глутаминсинтетазы, тиолтрансацилазы, люциферазы, ацетил-кокарбоксилазы), которая резко усиливается в присутствии МАН, взаимодействующих с моно- и дитиоловыми ферментами (Забродский, 1998; 2002), а также нарушением кальциевого обмена в ЕКК (Goytia-Acevedo et al., 2003).

Таким образом, под влиянием острой интоксикации МАН происходит дозозависимое снижение активности ЕКК до 9 сут. При подостром и хроническом действии МАН в дозе $0.01 LD_{50}$ отмечается редукция ЕКК, соответствующая супрессии функции ЕКК через 1-6 сут при остром воздействии в дозе $0.75 LD_{50}$.

5.4.2. Влияние метаарсенита натрия на активность естественных клеток-киллеров селезенки *in vitro*

При оценке влияния МАН на активность ЕКК селезенки белых крыс *in vitro* нами установлено (табл. 5.9), что при концентрациях МАН, составляющих 10^{-6} , 10^{-5} и 10^{-4} М, происходило прямо связанное с концентрацией токсиканта уменьшение активности ЕКК соответственно в 1.54, 2.14 и 3.41 раза ($p < 0.05$).

Установленная редукция активности ЕКК *in vitro* позволяет считать, что данный эффект связан с ингибированием моно- и дитиоловых ферментов ЕКК, вследствие взаимодействия МАН с холинорецепторами лимфоцитов, нарушением образования NO, а также общетоксическими эффектами яда:

нарушением тканевого дыхания, мембранотоксическим действием, инициацией перекисного окисления мембран ЕКК (Голиков и др., 1986; Ройт, 1991; Забродский, 1998; Куценко и др., 2004).

Таблица 5.9

Влияние МАН на активность ЕКК (%) у крыс *in vitro* ($M \pm m$, $n=6-7$)

Токсикант	Концентрация, М		
	10^{-6}	10^{-5}	10^{-4}
Контроль	31.0 ± 2.8		
МАН	$20.1 \pm 2.0^*$	$14.5 \pm 2.1^*$	$9.1 \pm 1.4^*$

Примечание: спленоциты в течение 1 ч инкубировали с МАН; * - $p < 0.05$ по сравнению с контролем

Под влиянием данных изменений редукция активности ЕКК при отравлении МАН 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 (Хаитов и др., 2002; Nogueira, 1984; French, Yokoyama, 2003; Garrity et al., 2005; Li, Kawada, 2006), а также индукцией апоптоза (Хаитов и др., 2000; Kimber, More, 1985; Marx, 1986; Delves, Roitt, 2000; Garrity et al., 2005; MacFarlane, Campbell, 2006).

Таким образом, МАН *in vitro* в прямой зависимости от концентрации (10^{-6} , 10^{-5} и 10^{-4} М) снижал активность ЕКК.

*

*

*

Под влиянием острой интоксикации МАН происходит дозозависимое снижение функции Т-клеток, оцениваемой по ингибированию миграции лейкоцитов, в течение 1-12 сут. Подострое и хроническое действие МАН существенно снижает функцию Т-клеток. Эта редукция показателя приблизительно соответствует острому воздействию МАН в дозе $0.75 LD_{50}$ через 1-6 сут.

Под влиянием острого отравления МАН дозозависимо уменьшается функция Th1-лимфоцитов. Подострое и хроническое действие МАН вызывает супрессию функции Th1-клеток приблизительно соответствующую острому действию МАН в дозе $0.75 LD_{50}$. После острой интоксикации МАН происходит дозозависимое снижение активности ЕКК до 9 сут. При подостром и хроническом действии МАН в дозе $0.01 LD_{50}$ отмечается редукция ЕКК, соответствующая супрессии функции ЕКК через 1-6 сут при остром воздействии в дозе $0.75 LD_{50}$. МАН *in vitro* в прямой зависимости от концентрации (10^{-6} , 10^{-5} и 10^{-4} М) снижает активность ЕКК.

Глава 6. ВЛИЯНИЕ МЕТААРСЕНИТА НАТРИЯ НА ГУМОРАЛЬНЫЙ ИММУННЫЙ ОТВЕТ

6.1. Действие на Т-зависимые гуморальные иммунные реакции

Оценка воздействия МАН на антителообразование к тимусзависимому антигену в динамике по титру антител в крови. В экспериментах на белых крысах оценивали действие острого отравления МАН в дозах 0.25, 0.50 и 0.75 LD_{50} на иммунный ответ к тимусзависимому антигену - ЭБ по титру антител через 5, 8, 14 и 20 сут при иммунизации ЭБ, проводившейся одновременно с интоксикацией за 3 сут до отравления. Через 5 сут после введения ЭБ отмечается пик иммунного ответа, связанный с синтезом IgM; через 8 сут титр антител отражает синтез преимущественно IgG и в меньшей степени – IgM, а через 14 и 20 сут - титр антител характеризует продукцию В-клетками (плазмócитами) только IgG (Петров и др., 1981; Ройт и др., 2000; Хаитов и др., 2002). Известно, что Th1-лимфоциты участвуют в продукции IgM, IgG2a, а Th2-лимфоциты способствуют синтезу IgG1, IgA, IgE (Ройт и др., 2000; Pfeifer et al., 1991; Georgiev, Albright, 1993). Таким образом, использованный метод исследования гуморального звена иммунитета дает представление о функциональной активности как Th1-, так и Th2-лимфоцитов.

Нами показано (табл. 6.1), что под влиянием острого, подострого и хронического действия МАН в индуктивной фазе иммунного ответа (введение яда одновременно с иммунизацией ЭБ) статистически значимо снижался ОДЛТА ($-\log_2$ титра антител) к ЭБ через 5, 8, 14 и 20 сут после иммунизации. Так, острая интоксикация МАН в дозах 0.25, 0.50 и 0.75 LD_{50} приводила к редукции ОДЛТА через 5 сут соответственно в 1.27, 1.42 и 1.57 раза ($p < 0.05$), а через 8 сут - в 1.38, 1.53 и 1.66 раза ($p < 0.05$), через 14 сут - в 1.17, 1.29 и 1.40 раза ($p < 0.05$), через 20 сут - в 1.13 ($p > 0.05$), 1.19 и 1.24 раза ($p < 0.05$) по сравнению с контрольными показателями соответственно.

Полученные данные свидетельствуют о том, что при остром действии МАН иммуносупрессивные эффекты прямо связаны с дозой яда.

Таблица 6.1

Влияние острого действия МАН на ОДЛТА у крыс к ЭБ в индуктивной фазе антителогенеза (МАН вводили одновременно с иммунизацией) (M+m)

Доза, LD_{50}	Время после интоксикации, сут			
	5	8	14	20
Контроль	4.7±0.2 (18)	5.8±0.2 (18)	6.3±0.2 (18)	5.1±0.2 (18)
0.25	3.7±0.3*	4.2±0.3*	5.4±0.3*	4.5±0.3
0.50	3.3±0.3*	3.8±0.2*	4.9±0.2*	4.3±0.2*
0.75	3.0±0.2*	3.5±0.3*	4.5±0.2*	4.1±0.3*

Примечание: в скобках – число животных; в каждой серии использовалось от 7 до 10 крыс; * - различие с контролем достоверно - $p<0.05$

При подостром и хроническом действии МАН в дозах 0.01 LD_{50} отмечалось снижение ОДЛТА (табл. 6.2) соответственно в 1.59 и 1.77 раза ($p<0.05$). Необходимо отметить, что данные воздействия МАН, оцениваемые по редукции иммунного ответа, существенно не отличались.

Таблица 6.2

Влияние подострого и хронического действия МАН на ОДЛТА у крыс к ЭБ (M+m)

Доза; экспозиция, сут	Время после интоксикации, сут	
	7	31
Контроль	5.1±0.3 (10)	5.3±0.3(10)
1/7 $LD_{50} \times 6$	3.2±0.2*	-
0.01 $LD_{50} \times 30$	-	3.0±0.3*

Примечание: в скобках – число животных; в каждой серии использовалось от 7 до 10 крыс; * - различие с контролем достоверно - $p<0.05$

Полученные результаты свидетельствуют о том, что МАН при остром действии дозозависимо снижает синтез IgM и IgG до 20 сут (Ройт и др., 2000; Хаитов и др., 2002; Casale et al., 1983). МАН также вызывает редукцию активности Th1- и Th2-лимфоцитов, так как Th1-лимфоциты участвуют в синтезе IgM (оценка ОДЛТА на 5 сут), а Th2-лимфоциты способствуют синтезу IgG1 и других иммуноглобулинов (Ройт и др., 2000; Pfeifer et al.,

1991; Georgiev, Albright, 1993; Abbas et al., 1996; Fleisher, Oliveira, 2004; Maekawa, Yasutomo, 2005),

Подострое и хроническое действие МАН сопровождалось приблизительно таким же изменением показателей, как и при остром в дозе $0.75 LD_{50}$ через 5 сут (на синтез IgM и функцию Th1-лимфоцитов), 8 и 14 сут (на продукцию IgG и функцию Th2-лимфоцитов).

Таким образом, острая интоксикация МАН через 5-20 сут вызывала дозозависимое снижение антителообразования, оцениваемое по ОДЛТА. При подостром и хроническом действии МАН отмечалось такое же изменение показателей, как и при остром в дозе $0.75 LD_{50}$ через 5 и 14 сут.

Воздействие МАН на число АОК в селезенке, характеризующие синтез IgM. Нами установлено (табл. 6.3), что число АОК в селезенке к ЭБ у белых крыс через 5 сут после острой интоксикации МАН (при введении яда одновременно с ЭБ) дозозависимо снижалось. Так, при дозах МАН, составляющих 0.25, 0.50 и $0.75 LD_{50}$, показатель снижался в 1.78, 2.39 и 3.34 раза ($p < 0.05$) соответственно. Более выраженные изменения числа АОК к ЭБ были обнаружены при введении МАН через 3 сут после иммунизации. Например, в продуктивную фазу антителогенеза число АОК в селезенке при дозах МАН, составляющих 0.25, 0.50 и $0.75 LD_{50}$, снижалось соответственно в 2.50, 3.23 и 4.92 раза ($p < 0.05$) (рис. 6.1).

Редукция показателя в продуктивную фазу гуморальной иммунной реакции (введение МАН через 3 сут после ЭБ), по сравнению с индуктивной (введение МАН одновременно с ЭБ), вполне объяснима. Данный феномен обусловлен более выраженным действием МАН на пролиферацию, дифференцировку и синтез иммуноглобулинов В-клетками (плазмócитами), перераспределением лимфоцитов между органами системы иммунитета в период максимальной антителопродукции – синтеза IgM (3-5 сут после иммунизации) в продуктивной фазе антителообразования по сравнению с воздействием МАН на распознавание антигена макрофагами, их переработку и представление Т- и В-клеткам, кооперацию макрофагов, Т- и В-

лимфоцитов, а также клональную селекцию Т- и В-клеток в индуктивной фазе антителопродукции (Ройт и др., 2000; Хаитов и др., 2002; Забродский, Мандыч, 2007). Не исключено, что при одинаковом по силе редуцирующем эффекте на указанные процессы действие в продуктивный период антителогенеза обуславливает апоптоз (запрограммированную гибель) клеток органов иммунитета, занимающихся антителопродукцией, что приводит к ингибированию синтеза антител (Liao et al., 2004). При этом на восстановительные процессы к моменту оценки действия МАН (через 2 сут после его введения) остается меньше времени, чем при его действии в индуктивной фазе антителогенеза.

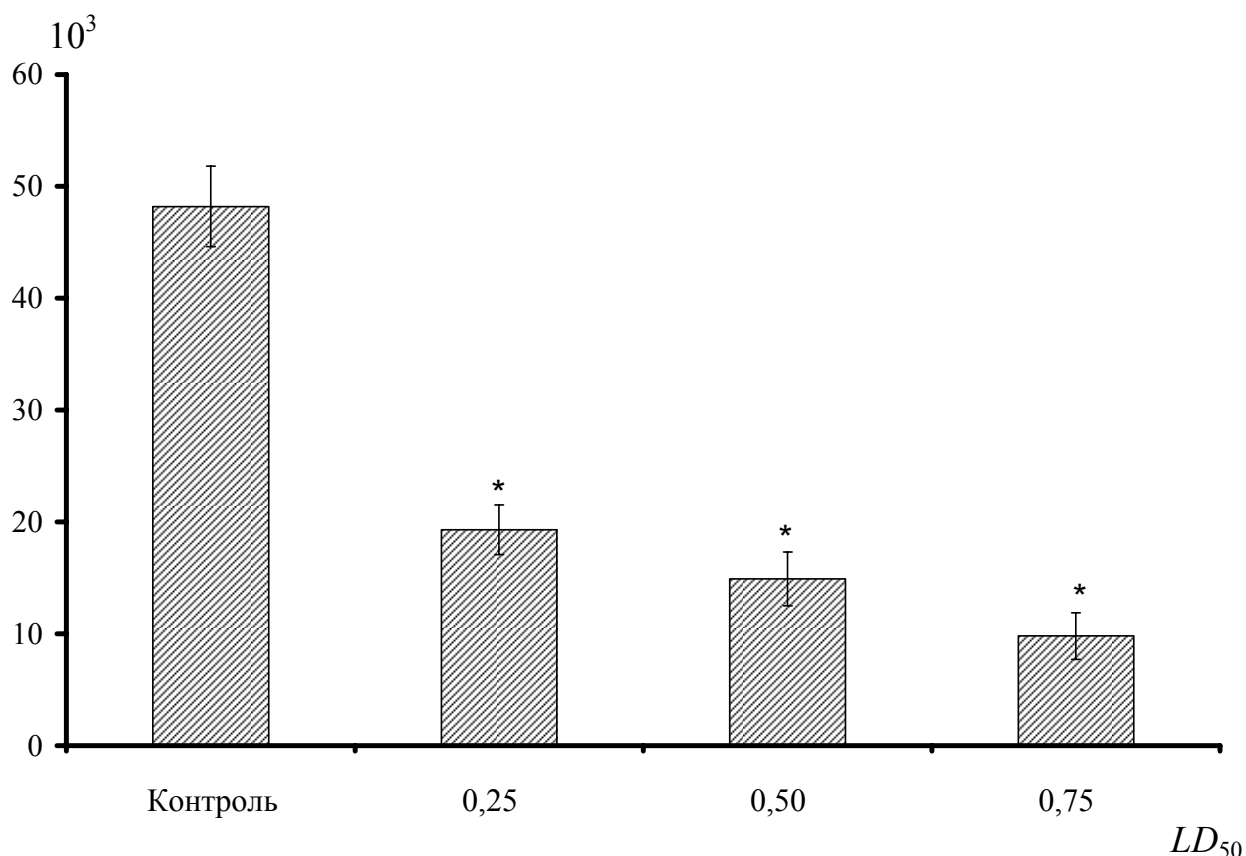


Рис. 6.1. Влияние острого действия МАН на число АОК к ЭБ ($\times 10^3$), синтезирующим IgM, в селезенке крыс через 5 сут после иммунизации в продуктивной фазе иммуногенеза

В каждой серии использовалось от 6 до 8 крыс; * - различие с контролем достоверно - $p < 0.05$. По оси абсцисс - доза; по оси ординат – число АОК к ЭБ ($\times 10^3$)

Таблица 6.3

Влияние острого действия МАН на число АОК к ЭБ ($\times 10^3$), синтезирующим IgM, в селезенке крыс через 5 сут после иммунизации

Доза	Время интоксикации по отношению к иммунизации, сут	
	Индуктивная фаза	Продуктивная фаза
Контроль	48.2 \pm 3.6	
0.25	27.1 \pm 2.5	19.3 \pm 2.2*
0.50	20.2 \pm 2.3*	14.9 \pm 2.4*
0.75	14.4 \pm 2.6*	9.8 \pm 2.1*

Примечание: в каждой серии использовалось от 6 до 8 крыс; * - различие с контролем достоверно – $p < 0.05$

При подостром и хроническом действии МАН отмечалось приблизительно таким же изменением показателей, как и при остром в дозе 0.75 LD_{50} через 5 сут (на синтез IgM и функцию Th1-лимфоцитов) (табл. 6.4). Так, число АОК к ЭБ, синтезирующим IgM, в селезенке крыс при подостром и хроническом действии МАН снижалось в 3.16, и 2.75 раза ($p < 0.05$).

Таблица 6.4

Влияние подострого и хронического действия МАН на число АОК к ЭБ ($\times 10^3$), синтезирующим IgM, в селезенке крыс через 5 сут после иммунизации

Доза; экспозиция, сут	Время после интоксикации, сут	
	7	31
Контроль	50.0 \pm 4.5	53.9 \pm 6.1
1/7 $LD_{50} \times 6$	15.8 \pm 2.7*	-
0.01 $LD_{50} \times 30$	-	19.3 \pm 3.2*-

Примечание: в каждой серии использовалось 7-8 крыс; * - различие с контролем достоверно – $p < 0.05$

Супрессия функции Т-зависимого антителообразования под влиянием МАН может быть связана с реализацией различных механизмов иммунотоксических эффектов на: уровне систем – с активацией ГГНС, уровне взаимодействия клеток – со снижением функции Th1-лимфоцитов, кооперации Т- и В-лимфоцитов, субклеточном уровне – с инициацией ПОЛ, мембранотоксическим действием и другими эффектами (Голиков и др., 1986; Забродский, 2002; Забродский, Мандыч, 2007). Основным механизмом иммунотоксичности МАН обусловлен действием яда на молекулярном уровне и инактивацией системы липоевая-дегидролипоевая кислота

пируватоксидазной системы (Ленинджер, 1974; Диксон, Уэбб, 1982; Страйер, 1985; Куценко, 2004).

Таким образом, под влиянием острой интоксикации МАН происходит дозозависимая супрессия Т-зависимой антителопродукции (функции Th1-лимфоцитов), оцениваемой по числу АОК к ЭБ в селезенке, преимущественно в продуктивную фазу антителогенеза. При подостром и хроническом действии МАН отмечались приблизительно такие же изменения показателей, как и при остром в дозе $0.75 LD_{50}$ через 5 сут (на синтез IgM и функцию Th1-лимфоцитов).

Влияние МАН на синтез IgG. Нами экспериментально показано, (табл. 6.5), что после острого воздействия МАН через 8, 14 и 20 сут происходит дозозависимое снижение синтеза IgG, оцениваемого по числу АОК, синтезирующих иммуноглобулины данного класса. Так, дозы МАН, составляющие 0.25, 0.50 и $0.75 LD_{50}$, вызывали редукцию показателя через 8 сут в 1.46, 1.74 и 2.15 раза ($p < 0.05$), через 14 сут - в 1.51, 1.88 и 2.87 раза ($p < 0.05$), а через 20 сут - в 1.14 ($p > 0.05$), 1.41 и 1.97 раза ($p < 0.05$) соответственно.

Таблица 6.5

Влияние острого, подострого и хронического действия МАН на число АОК к ЭБ, синтезирующим IgG, в селезенке крыс через 8 - 20 сут после иммунизации

Доза, экспозиция, сут	Срок исследования после иммунизации, сут		
	8	14	20
Контроль	26.2±1.7	58.8±4.3	20.1±1.5
0.25	17.9±1.8*	39.0±3.7*	17.7±1.7
0.50	15.1±1.4*	31.2±3.3*	14.3±1.8*
0.75	12.2±1.5*	20.5±2.9*	10.2±1.2*
$1/7 LD_{50} \times 6$	13.4±1.6*	19.2±1.8*	11.6±1.5*
$0.01 LD_{50} \times 30$	15.5±1.8*	21.4±2.2*	14.2±1.4*

Примечание: в каждой серии использовалось от 5 до 8 крыс; при хроническом воздействии МАН иммунизацию проводили через 23, 17 и 11 сут после первого введения токсиканта, т.е. срок исследования после иммунизации составлял 8, 14 и 20 сут, а после первого введения яда – 31 сут, * - различие с контролем достоверно - $p < 0.05$

При подостром и хроническом действии МАН продукция IgG, оцениваемая по числу АОК через 8 сут после иммунизации, уменьшалась в 1.96 и 1.69 раза ($p < 0.05$), через 14 сут - в 3.06 и 2.75 раза ($p < 0.05$), а через 20

сут - в 1.73 и 1.42 раза ($p < 0.05$) соответственно. При этом отмечалось приблизительно такое же изменение показателя, как и при остром действии МАН в дозах 0.50 и 0.75 LD_{50} . (табл. 6.5). В этот период иммуногенеза происходит переключение синтеза с IgM на продукцию IgG В-клетками при помощи Th2-лимфоцитов (Pfeifer et al., 1991; Georgiev, Albright, 1993; Romagnani, 1997).

Снижение синтеза IgG при действии МАН может быть обусловлено инактивацией ферментов системы липоевая-дегидролипоевая кислота пируватоксидазной системы (Ленинджер, 1974; Диксон, Уэбб, 1982; Страйер, 1985; Куценко, 2004). Не исключена инактивация эстераз Т-лимфоцитов (Забродский, 2002; Кадушкин, 2007). Возможна также редукция Th2-лимфоцитами синтеза ИЛ-4, который долгое время назывался «фактором роста В-клеток». Указанные изменения могут приводить к снижению дифференцировки В-клеток и супрессии продукции иммуноглобулинов, в частности, IgG1 (Ройт и др., 2000; Хаитов и др., 2002; Romagnani, 1997). Возможно, что в процессе редукции синтеза антител определенную роль играет инициация ПОЛ (Забродский, 2002; Куценко, 2004), а также КС в результате стресс-реакции при действии МАН.

Таким образом, под влиянием острой интоксикации МАН происходит дозозависимое снижение синтеза IgG В-клетками и функции Th2-лимфоцитов, оцениваемых по числу АОК к ЭБ в селезенке. При подостром и хроническом действии МАН отмечается в целом такое же изменение показателей, как и при остром в дозах 0.50 и 0.75 LD_{50} .

Воздействие острого отравления МАН к Т-независимому антителообразованию. При оценке содержания АОК к Vi-Ag в селезенке у белых крыс после острой интоксикации МАН через 5 сут было установлено (табл. 6.6) дозозависимое снижение показателя. Редукция числа АОК к Vi-Ag свидетельствует о том, что МАН вызывают супрессию синтеза IgM (Ройт и др., 2000; Хаитов и др., 2002). В индуктивном периоде гуморальной иммунной реакции (иммунизацию Vi-Ag проводили одновременно с

введением МАН) острое отравление токсикантом в дозах 0.25, 0.50 и 0.75 LD_{50} приводило к уменьшению содержания АОК в селезенке к Vi-Ag у крыс соответственно в 1.53, 1.93 и 2.33 ($p<0.05$) раза. В продуктивной фазе антителопродукции (введение МАН проводили через 3 сут после иммунизации крыс Vi-Ag) острое отравление токсикантом вызывало снижение числа АОК в селезенке к Vi-Ag соответственно в 1.95, 2.58 и 3.20 раза ($p<0.05$).

Таблица 6.6

Влияние острого отравления МАН на число АОК к Vi-Ag (10^3), синтезирующих IgM, в селезенке крыс через 5 сут после иммунизации ЭБ ($M\pm m$, $n=5-7$)

Токсикант	Доза, LD_{50}	Время интоксикации после иммунизации, сут	
		Индуктивная фаза	Продуктивная фаза
МАН	Контроль	38.4 \pm 2.9	
	0,25	25.1 \pm 2.5*	19,7 \pm 2,1*
	0,50	19.9 \pm 2.2*	14,9 \pm 2,3*
	0,75	16.5 \pm 1.5*	12,0 \pm 1,8*

Примечание: * - $p<0.05$ по сравнению с контролем

Более выраженная супрессия Т-зависимого антителообразования под влиянием МАН, как и большинства токсикантов (Забродский, Мандыч, 2007; 2002; Descotes, 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 et al., 1985; Delves, Roitt, 2000). 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 действием МАН более выражено, чем Т-независимого антителообразования, так как для

него не требуется синтеза ряда лимфокинов, синтезируемых Т-клетками (Ройт, 1991; Ройт и др., 2000; Kimber et al., 1996; Friedman et al., 2003).

При подостром и хроническом действии МАН через 30 сут отмечалось уменьшение числа АОК к Vi-Ag (табл. 6.7) соответственно в 2.06, 1.99 и 1.70 раза ($p < 0.05$). При этом данные воздействия МАН, оцениваемые по редукции иммунного ответа, статистически значимо не отличались и приблизительно соответствовали действию МАН в дозе 0.50-0.75 LD_{50} . Снижение иммунной реакции на тимуснезависимый антиген может быть обусловлено редукцией МАН поликлональной активации значительной части популяции В-лимфоцитов, а также снижением стимуляции пролиферации В-клеток за счет их собственной митогенной активности (Ройт, 1991; Ройт и др., 2000).

Таблица 6.7

Влияние подострого и хронического действия МАН на число АОК к Vi-Ag ($\times 10^3$), синтезирующим IgM, в селезенке крыс через 5 сут после иммунизации

Доза; экспозиция, сут	Время после интоксикации, сут	
	7	31
Контроль	38.5 \pm 3.0	35.0 \pm 3.2
1/7 $LD_{50} \times 6$	18.7 \pm 2.4*	-
0.01 $LD_{50} \times 30$	-	17.6 \pm 2.7*

Примечание: в каждой серии использовалось 8 крыс; * - различие с контролем достоверно – $p < 0.05$

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, МАН оказывают большее действие на цАМФ, чем на цГМФ, поэтому их супрессивный эффект в продуктивный период больше, чем в индуктивный (Петров, 1987; Ройт и др., 2000). Нельзя исключить и ингибирующее синтез антител действие КС (Забродский, 1993, 1998, 2002; Ройт и др., 2000; Claman,

1993), концентрация которых в крови при действии различных токсикантов увеличивается (стресс-реакция) (Селье, 1972).

Таким образом, под влиянием острой интоксикации МАН 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. При подостром и хроническом действии МАН в течение 30 сут в дозе соответственно $0.01 LD_{50}$ отмечалось уменьшение числа АОК к Vi-Ag приблизительно такое же, как и при остром в дозах $0.50-0.75 LD_{50}$.

Нарушение кооперации Т- и В-клеток в формировании антителообразования in vitro. Оценку кооперации Т- и В-лимфоцитов *in vitro* проводили по образованию АОК к Т-зависимому антигену ЭБ. 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 МАН. 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 и др., 2000; Хаитов и др., 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, 1991; Забродский, Мандыч, 2007).

В опытах *in vitro* на спленоцитах мышей установлено (табл. 6.8), что МАН в концентрациях 10^{-5} , 10^{-4} и 10^{-3} М уменьшает функцию В-клеток в кооперации с Т-лимфоцитами в 1.33, 1.68 и 2.75 раза ($p < 0.05$), а функцию Т-клеток - в 2.06, 2.40 и 4.52 раза ($p < 0.05$) соответственно. МАН в большей

степени снижает функцию Т-лимфоцитов ($p < 0.05$) при концентрациях, составляющих 10^{-5} , 10^{-4} и 10^{-3} М.

Таблица 6.8

Нарушение кооперации Т- и В-лимфоцитов под влиянием МАН <i>in vitro</i> (по формированию АОК иммунными мышьяком на 10^6 В-клеток) ($M \pm m$, $n=6-7$)				
Клетки	К	Концентрация МАН, М		
		10^{-5}	10^{-4}	10^{-3}
В	48 ± 5	-		
В+Т	357 ± 3 2	-		
V^0+T		267 ± 29	213 ± 18^a	130 ± 13^a
$V+T^0$		173 ± 18^b	$149 \pm 16^{a\ b}$	$79 \pm 9^{a\ b}$

Примечание: К – контроль; V^0 , T^0 – в течение 1 ч до добавления ЭБ клетки инкубировали с МАН, ^a - $p < 0.05$ по сравнению с контролем (В+Т); ^b - $p < 0,05$ по сравнению с V^0+T

Таким образом, под влиянием МАН *in vitro* существенно нарушается кооперация Т- и В-лимфоцитов. МАН в прямой зависимости от концентрации (10^{-5} , 10^{-4} и 10^{-3} М) снижает кооперацию лимфоцитов, поражая преимущественно Т-клетки.

Оценка способности макрофагов индуцировать гуморальный иммунный ответ. При исследовании способности макрофагов индуцировать гуморальный иммунный ответ на крысах через 1 сут нами установлено (табл. 6.9), что острое действие МАН в дозе $0.75 LD_{50}$ снижает способность макрофагов к индукции антителообразования, оцениваемой по числу АОК к ЭБ в селезенке, в 2.43 раз ($p < 0.05$) по сравнению с контролем. При подостром и хроническом действии МАН в дозе $0.01 LD_{50}$ отмечалась редукция показателя соответственно в 2.10 и 1.81 ($p < 0.05$) раза. Существенных различий между острым, подострым и хроническим воздействием МАН при исследованных дозах и экспозициях не выявлено.

Таким образом, под влиянием острой, подострой и хронической интоксикации МАН происходит снижение способности макрофагов индуцировать гуморальный иммунный ответ. Подострое и хроническое действие токсиканта вызывает редукцию параметра существенно не

отличающуюся от острого действия токсиканта в дозе $0.75 LD_{50}$.

Таблица 6.9

Влияние МАН на способность макрофагов индуцировать гуморальный иммунный ответ у крыс (по числу АОК к ЭБ $\times 10^3$ через 5 сут)

Доза; экспозиция, сут	АОК к ЭБ $\times 10^3$
Контроль	14.1 \pm 2.2
0.75	5.8 \pm 1.7*
$1/7 LD_{50} \times 6$	6.7 \pm 1.5*
$0.01 LD_{50} \times 30$	7.8 \pm 1.9*

Примечание: в каждой серии использовалось 6 крыс; * – различие с контролем достоверно – $p < 0.05$

*

*

*

Острая интоксикация МАН через 5-20 сут вызывала дозозависимое снижение антителообразования, оцениваемое по ОДЛТА. При подостром и хроническом действии МАН отмечалось такое же изменение показателей, как и при остром в дозе $0.75 LD_{50}$ через 5 и 14 сут. Под влиянием острой интоксикации МАН происходит дозозависимая супрессия Т-зависимой антителопродукции (функции Th1-лимфоцитов), оцениваемой по числу АОК к ЭБ в селезенке, преимущественно в продуктивную фазу антителогенеза. При подостром и хроническом действии МАН отмечалось приблизительно такое же изменение показателей, как и при остром в дозе $0.75 LD_{50}$ через 5 сут (на синтез IgM и функцию Th1-лимфоцитов).

При остром действии МАН происходит дозозависимое снижение синтеза IgG В-клетками и функции Th2-лимфоцитов, определяемых по числу АОК к ЭБ в селезенке. При подостром и хроническом действии МАН отмечается в целом такое же изменение показателей, как и при остром в дозах 0.50 и $0.75 LD_{50}$. Острое отравление МАН вызывает 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. При подостром и хроническом действии МАН в течение 30 сут в дозе соответственно 0.01 LD_{50} отмечается уменьшение числа АОК к Vi-Ag приблизительно такое же, как и при остром в дозах 0.50-0.75 LD_{50} . Под влиянием МАН *in vitro* существенно нарушается кооперация Т- и В-лимфоцитов. МАН в прямой зависимости от концентрации (10^{-5} , 10^{-4} и 10^{-3} М) снижает кооперацию лимфоцитов, поражая преимущественно Т-клетки. Острая, подострая и хроническая интоксикация МАН приводит к редукции способности макрофагов индуцировать гуморальный иммунный ответ. Подострое и хроническое действие токсиканта вызывает супрессию параметра существенно не отличающуюся от острого действия токсиканта в дозе 0.75 LD_{50} .

Глава 7. РОЛЬ КОРТИКОСТЕРОНА, ПЕРЕКИСНОГО ОКИСЛЕНИЯ ЛИПИДОВ, ИНГИБИРОВАНИЯ ЭСТЕРАЗ И ОТНОСИТЕЛЬНОЙ ФУНКЦИИ ТН1-, ТН2-ЛИМФОЦИТОВ В НАРУШЕНИИ ИММУННОГО СТАТУСА ПОСЛЕ ВОЗДЕЙСТВИЯ МЕТААРСЕНИТА НАТРИЯ

7.1. Оценка содержания кортикостерона в плазме крови

Роль КС (функции коры надпочечников) в реализации иммунного ответа неоднозначна, физиологические концентрации их необходимы для реализации полноценного гуморального иммунного ответа (Корнева, 1990; Ройт и др., 2000; Хаитов и др., 2002). Высокие концентрации КС, в частности, при интоксикации ФОС, этанола и атразина (Иванова, 1998; Szot, Murphy, 1970) вызывают супрессию ряда показателей системы иммунитета (Хусинов и др., 1991; Забродский, 1993, 2002; Tiefenbach et al., 1980, 1983, 1985; Claman, 1993; Stephen et al., 2003).

Нами установлено (рис. 7.1), что под влиянием МАН содержание КС в плазме крови крыс после интоксикации увеличивается через 1 ч и в дальнейшем к 12 ч снижается до контрольного уровня. Так, под влиянием острой интоксикации МАН через 1 и 3 ч концентрация КС увеличивалась соответственно в 6.23 и 3.60 раза. Увеличение КС в крови под влиянием МАН обусловлено реализацией общего адаптационного синдрома (увеличение продукции АКТГ) (Селье, 1972; Лемус, Давыдов, 1974; Бирбин, 2003; Dhabhar et al., 1996; Stephen et al., 2003). Коэффициенты корреляции между концентрацией КС в крови (через 1 ч) и АОК к ЭБ и реакцией ГЗТ при остром отравлении крыс МАН составляли соответственно -0.715 и -0.709 ($p < 0.05$) ($n=8$).

Таким образом, острая интоксикация МАН повышает концентрацию КС в плазме крови через 1 и 3 ч. Выявлена отрицательная корреляция между концентрацией КС и показателями гуморального и клеточного иммунного ответа при интоксикации МАН.

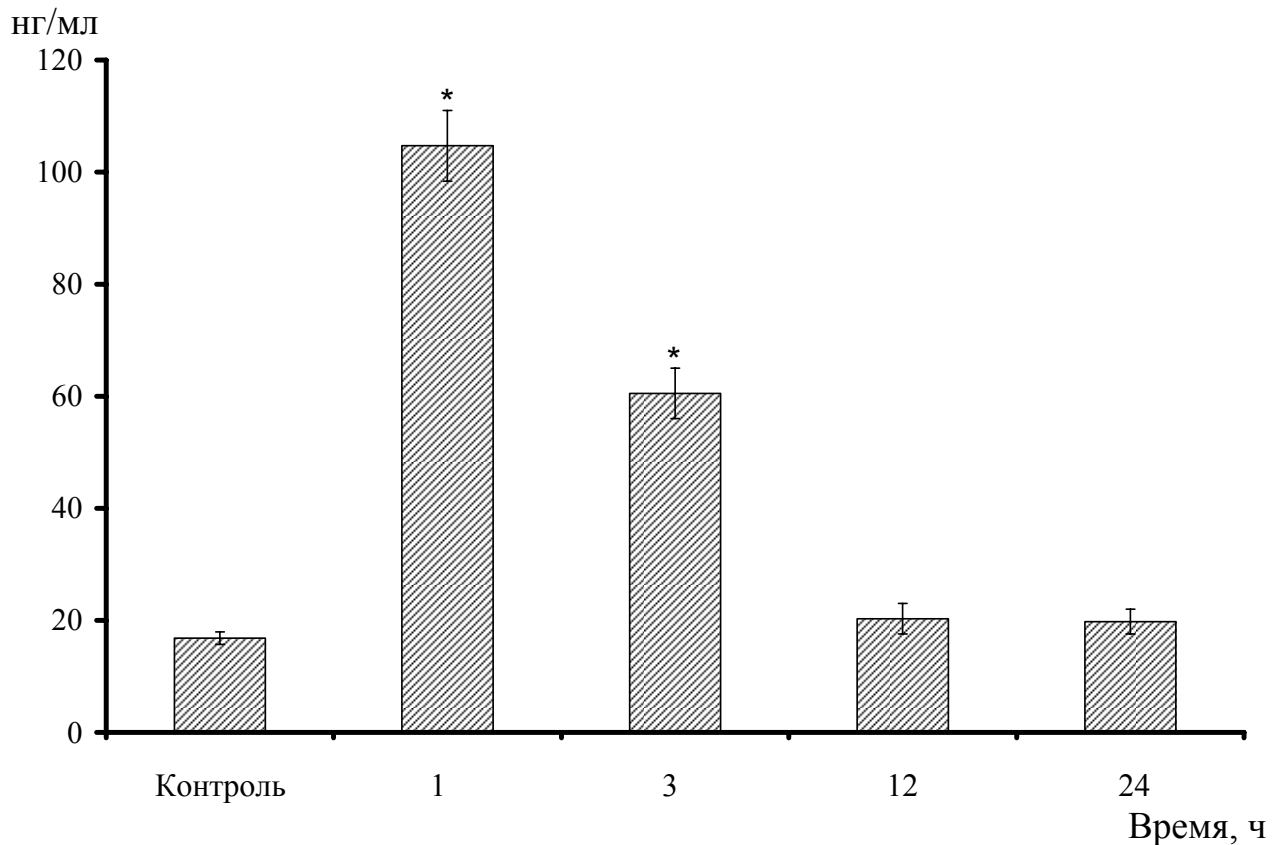


Рис.7.1. Влияние острой интоксикации МАН ($0.75 LD_{50}$) на содержание КС в плазме крови крыс, нг/мл ($M \pm m$)

В каждой серии использовалось от 7 до 11 крыс; * - различие с контролем достоверно - $p < 0.05$. По оси абсцисс - время; по оси ординат – КС, нг/мл

7.2. Исследование влияния кортикостерона на показатели системы иммунитета

Известно, что высокие концентрации КС, в частности, при интоксикациях различными ТХ, вызывают супрессию ряда показателей системы иммунитета (Корнева и др., 1977, 1988; Корнева, 1978, 1985, 1988; Лазарева, Алехин, 1985; Хусинов и др., 1991; Забродский, 1993; Хаитов и др., 2002; Tiefenbach et al., 1980, 1983, 1985; Claman, 1993; Delves, Roitt, 2000; Stephen et al., 2003). В настоящее время не вполне ясно, как будет влиять концентрация КС сопоставимая с содержанием этого гормона в плазме крови при остром отравлении МАН. Выяснение этой задачи позволит определить

удельный вес КС в формировании иммунодефицитного состояния при острой интоксикации МАН.

Наши эксперименты позволили установить (табл. 7.1), что под влиянием двухкратного введения КС в дозах 3.0 и 1.5 мг/кг соответственно с интервалом 2 ч основные показатели системы иммунитета существенно снижаются. Следует отметить, что введение КС в указанных дозах вызывало увеличение данного гормона в крови через 1 ч до 128.4 ± 8.3 нг/мл ($n=7$), а через 3 ч – до 63.4 ± 5.8 нг/мл (контроль составлял – 17.1 ± 1.2 нг/мл). Данные концентрации приблизительно соответствовали содержанию КС в плазме крови после острой интоксикации МАН в дозе $0.75 LD_{50}$.

Таблица 7.1

Влияние КС (в дозах 3.0 и 1.5 мг/кг соответственно с интервалом 2 ч) на показатели системы иммунитета у крыс

Показатели	Контроль	Действие КС
АОК к ЭБ, 10^3	35.3 ± 3.1	$26.1 \pm 2.2^*$
АОК к Vi-Ag, 10^3	27.2 ± 2.5	$19.8 \pm 2.0^*$
Реакция ГЗТ, %	35.4 ± 2.6	$25.0 \pm 2.1^*$
ЕЦ, %	29.3 ± 3.0	$19.2 \pm 1.9^*$
АЗКЦ, %	11.3 ± 1.4	$7.3 \pm 0.8^*$

Примечание: в каждой серии опытов использовалось 5-7 животных; ЕЦ и АЗКЦ определяли соответственно через 1 и 5 сут; * - различия достоверны по сравнению с контролем – $p < 0.05$

Отмечалось снижение Т-зависимого, Т-независимого антителообразования (число АОК к ЭБ и Vi-Ag соответственно), Т-звена иммунитета (реакция ГЗТ), активности ЕКК (ЕЦ) и АЗКЦ под влиянием экзогенного КС в дозах 3.0 и 1.5 мг/кг, которые вводили с интервалом 2 ч, соответственно в 1.35, 1.37, 1.41, 1.53 и 1.55 раза ($p < 0.05$). Проведенные опыты доказывают весьма существенную роль КС в супрессии основных иммунных реакций при остром отравлении МАН.

Данные, приведенные в предыдущих главах, показали, что иммунные реакции под влиянием МАН снижаются в большей степени, чем в опытах при действии КС в концентрациях адекватных (соответствующих) действию токсиканта. (см. главы 5,6) Следовательно, редукция гуморальных и

клеточных показателей системы иммунитета при интоксикации МАН обусловлена не только эффектом КС, но и действием токсиканта на лимфоциты. Причем это действие является весьма значимым. Так, редукция Т-зависимого антителообразования и активности ЕКК при остром действии МАН (с учетом эффекта КС) уменьшалось через 1 сут в 3.34 и 2.77 раза ($p < 0.05$) соответственно.

Проведенные эксперименты позволяют рассчитать эффект КС, концентрация которого сопоставима с действием МАН, в процентах в реализацию супрессии функции любого показателя системы иммунитета при остром отравлении МАН по формуле:

$$\text{Эффект КС} = (1 - \text{ПНО}_{\text{КС}}/\text{ПНО}_{\text{К}}) \cdot 100, \text{ где}$$

$\text{ПНО}_{\text{К}}$, $\text{ПНО}_{\text{КС}}$ - показатель иммунного ответа соответственно в контроле и при действии КС в концентрации, соизмеримой с действием факторов или их сочетания.

Существуют основания считать, что десинхронизация суточных колебаний концентрации КС под влиянием токсикантов, в частности МАН (а не только ее увеличение), также изменяет физиологическую регуляцию иммунного гомеостаза (Dhabhar et al., 1996).

Таким образом, концентрация КС, соизмеримая с содержанием этого гормона в крови при интоксикации МАН, играет весьма существенную роль в супрессии гуморального и клеточного иммунного ответа при действии ТХ.

7.3. Изменение показателей перекисного окисления липидов

ПОЛ мембран, в том числе и при остром отравлении различными токсикантами, действии экстремальных физических факторов и при различных патологических (Меерсон, 1984; Лукьянова и др., 2001; Зарубина, Миронова, 2001; Плужников и др., 2003 *а,б,в*; Hageman et al., 1992; Urban et al., 1995; Knight, 1995; Jaeschke, 1995; Ibuki, Goto, 1997; Iamele et al., 2002) включает следующие стадии: разрыхление гидрофобной области липидного

бислая 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 снижение 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 (Абдрашидова, Романов, 2001; Бурмистров и др., 2002).

Исследование СПР, активности каталазы, пероксидазы и МДА является информативным показателем ПОЛ при интоксикациях (Клинцевич и др., 1994). При этом каталаза и пероксидаза характеризуют антиперекисную защиту, а МДА является показателем активности процессов ПОЛ. Весьма высокотоксичным и относительно стабильным является супероксидный анион. С его прямым или опосредованным через другие активные формы кислорода действием связывают мутагенные и канцерогенные эффекты, а также нарушение многочисленных функций иммунитета (Голиков и др., 1986).

Наши исследования изменения ПОЛ под влиянием МАН показали (табл. 7.2), что токсикант при остром, подостром и хроническом действии инициирует ПОЛ. Так, при острой интоксикации МАН активность каталазы и пероксидазы, характеризующей АОС, уменьшалась соответственно в 1.65 и 1.70 раза ($p < 0.05$). Основным продуктом ПОЛ МДА при остром отравлении МАН повышался на 1.24 раза ($p < 0.05$), а СПР – в 1.74 раза ($p < 0.05$). При подостром и хроническом действии МАН в дозе соответственно 0.01 LD_{50} (табл. 7.3) отмечалось снижение каталазы на 1.51 и 1.57 раза ($p < 0.05$), а

активность пероксидазы - на 2.04 и 1.52 раза ($p<0.05$) соответственно. СПР и содержание МДА изменялись приблизительно так же, как и при остром отравлении МАН.

Таблица 7.2

Влияние МАН на показатели ПОЛ у крыс

Доза; экспозиция, сут	Каталаза, ммоль/мин/л	Пероксидаза, мкмоль/мин/л	СПР, усл. ед.	МДА, нмоль/мл
Контроль	287.2 \pm 24.5	50.4 \pm 3.8	37.5 \pm 3.6	6.15 \pm 0.32
0.75 LD ₅₀	174.2 \pm 22.1*	29.6 \pm 3.6*	54.7 \pm 3.8*	7.61 \pm 0.30*
1/7 LD ₅₀ \times 6	190.0 \pm 17.1*	24.7 \pm 3.3*	58.1 \pm 3.3*	8.08 \pm 0.33*
0.01 LD ₅₀ \times 30	183.3 \pm 18.5*	33.2 \pm 3.4*	55.8 \pm 3.2*	8.15 \pm 0.34*

Примечание: в каждой серии опытов использовалось 7-10 животных; показатели при остром, остром, подостром и хроническом (30 сут) действии МАН определяли соответственно через 3, 7 и 30 сут; * – $p<0.05$ по сравнению с контролем

При вычислении коэффициентов корреляции (r) между числом АОК к ЭБ при остром отравлении МАН и содержанием каталазы и пероксидазы в крови крыс установлено, что они составляли соответственно 0.732 \pm 0.071 ($p<0.05$) и 0.750 \pm 0.082 ($p<0.05$). Коэффициенты корреляции при действии токсиканта между числом АОК к ЭБ и содержанием МДА в крови составляли соответственно -0.760 \pm 0.071 ($p<0.05$) и -0.709 \pm 0.092 ($p<0.05$). Значения r между другими параметрами системы иммунитета при остром действии МАН и показателями АОС находились в пределах от 0.672 до 0.790 ($p<0.05$), а коэффициенты корреляции между содержанием МДА в крови и показателями иммунного статуса при действии МАН составляли от -0.670 до -0.779 ($p<0.05$).

Изменения показателей ПОЛ в плазме крови, несомненно, отражают процесс свободно-радикального окисления липидов, как всех клеток различных органов в целом, так и органов системы иммунитета и, в частности, лимфоцитов.

Таким образом, острая, подострая и хроническая интоксикация МАН приводит к инициации ПОЛ, что проявляется снижением активности

антиоксидантной системы (редукция каталазы и пероксидазы) и увеличением содержания МДА и СПР в плазме крови. Инициация ПОЛ под влиянием МАН является одним из факторов, способствующим формированию постинтоксикационного иммунодефицитного состояния (выявлена обратная корреляции интенсивности инициации ПОЛ с формированием иммунных реакций).

7.4. Инактивация эстераз иммуноцитов под влиянием метаарсенита натрия

Эстеразы играют важную роль в реализации киллерной функции Т-лимфоцитов (Забродский, Мандыч, 2007; Ferluga et al., 1972; Li et al., 1973; Asquith et al. 2007; Frasci et al., 2007; Tomoiu et al., 2007). 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, Кваглино, 1983; Ferluga et al., 1972; Li et al., 1973; Kutty et al., 1976; Kullenkampff et al., 1977; Kullenkampff et al., 1977; Szelenyi et al., 1982; Asquith et al., 2007). АХЭ на поверхности Т-лимфоцитов регулирует влияние ацетилхолина на холинореактивные структуры Т-лимфоцитов (Забродский, 2002; Gordon et al., 1975; Richman, Arnason, 1979; Tomoiu et al., 2007).

Нами экспериментально установлено (табл. 7.4), что МАН в дозе 0.75 LD_{50} через 3 сут снижает активность АХЭ Т-клеток тимоцитов и спленоцитов соответственно в 1.37 и 1.38 раза ($p < 0.05$). При подостром и хроническом действии МАН в дозе соответственно 0.01 LD_{50} (табл. 7.3) отмечалось приблизительно такое же снижение параметра, как и при остром МАН через 3 сут. Однако, следует отметить, что изменения содержания АХЭ в Т-лимфоцитах в селезенке при подостром и хроническом действии МАН были статистически не значимы ($p > 0.05$).

Таблица 7.3

Воздействие МАН ($0.75 LD_{50}$) на активность АХЭ в Т- лимфоцитах тимуса и селезенки у крыс (мЕд/ 10^9)

Доза; экспозиция, сут	Тимус	Селезенка
Контроль	63.5±5.9	58.6±5.7
$0.75 LD_{50}$	46.4±5.1*	42.6± 5.0*
$1/7 LD_{50} \times 6$	45.0±4.5*	44.3± 4.8
$0.01 LD_{50} \times 30$	43.9±4.9*	46.4± 4.4

Примечание: в каждой серии использовалось от 6 до 8 крыс; * - различие с контролем достоверно - $p < 0.05$

При остром действии МАН в дозах 0.25 и $0.50 LD_{50}$ число клеток (в основном Т-лимфоцитов, а также моноцитов и макрофагов), содержащих α -нафтил-AS-ацетатэстеразу в спленоцитах крыс статистически значимо не снижалось. При действии МАН в дозе $0.75 LD_{50}$ число исследованных клеток уменьшалось в 1.28 раза ($p < 0.05$) (табл 7.4).

Таблица 7.4

Влияние острой интоксикации МАН на содержание α -нафтил-AS-ацетатэстеразопозитивных в спленоцитах крыс через 3 сут

Доза, LD_{50}	Содержание α -нафтил-AS-ацетатэстеразопозитивных клеток, %
Контроль	52.4±3.5
0.25	44.8±3.9
0.50	42.6±3.7
0.75	41.8±3.6

Примечание: в каждой серии опытов использовалось 6-7 крыс; * - различия достоверны по сравнению с контролем ($p < 0.05$)

Содержание α -нафтил-бутиратэстеразопозитивных клеток селезенки при действии МАН в дозах 0.25 , 0.50 и $0.75 LD_{50}$ несущественно снижалось (рис.7.2). При объединении всех показателей при этих дозах выявлено достоверное уменьшение эстеразопозитивных клеток после действия МАН ($p < 0.05$). Полученные результаты позволяют утверждать, что преимущественное снижение функции Т-клеток в гуморальных и клеточных

иммунных реакциях под влиянием МАН, наряду с другими факторами, может быть связано с ингибированием эстераз Т-лимфоцитов, моноцитов и макрофагов.

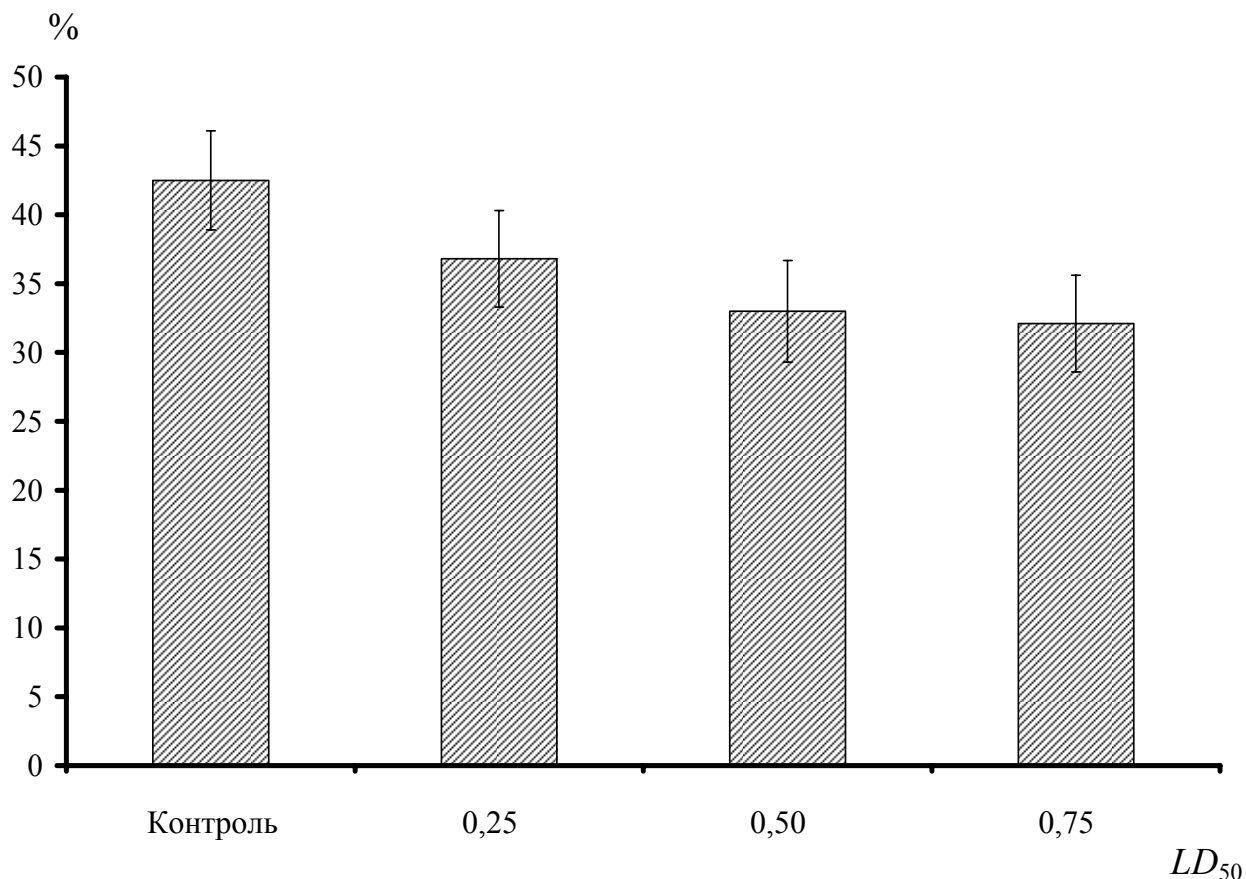


Рис. 7.2. Влияние острой интоксикации МАН на содержание α-нафтилбутиратэстеразопозитивных клеток (%) в спленоцитах крыс

В каждой серии использовалось 6-7 крыс; * - различие с контролем достоверно - $p < 0.05$. По оси абсцисс - доза; по оси ординат – % клеток

Таким образом, под влиянием МАН происходит дозозависимое снижение активности АХЭ Т-лимфоцитов, а также незначительная редукция числа эстеразопозитивных клеток, к которым относятся преимущественно Т-лимфоциты, а также моноциты и макрофаги.

7.5. Роль Th1-, Th2-лимфоцитов в редукции иммунных реакций под влиянием метаарсенита натрия

Относительная роль редукции функции Th1- и Th2-лимфоцитов в супрессии иммунных реакций под влиянием МАН изучали по иммунному ответу в различные сроки иммуногенеза. Гуморальную иммунную реакцию к ЭБ, характеризующую способность Th1-лимфоцитов участвовать в продукции В-лимфоцитами (плазматическими клетками) IgM (Ройт и др. 2000; Хаитов и др., 2002; Georgiev, 1993), определяли по числу АОК в селезенке, функцию Th1-лимфоцитов - по реакции ГЗТ. Реакции оценивали на 5 сут. МАН вводили подкожно в дозе $1/4 LD_{50}$ в течение 4 сут. Функцию Th2-лимфоцитов оценивали по числу АОК, синтезирующие IgG к ЭБ, в селезенке на пике продукции данного иммуноглобулина (14 сут) методом непрямого локального гемолиза в геле (Ройт и др., 2000). При этом МАН вводили в течение 13 сут в дозе $1/13 LD_{50}$. Крыс иммунизировали ЭБ в дозе $2 \cdot 10^8$ клеток одновременно с первым введением токсиканта. Таким образом, при оценке всех иммунных реакций обеспечивалось получение животными эквивалентной дозы токсиканта, составляющей $1.0 LD_{50}$.

Нами показано, что после подострой интоксикации МАН (табл. 7.5) происходило снижение гуморального иммунного ответа через 4 сут к Т-зависимому антигену (по числу АОК в селезенке), характеризующему синтез IgM и функцию Th1-лимфоцитов, по сравнению с контрольным уровнем в 2.56 раза ($p < 0.05$), а через 13 сут после иммунизации (пик иммунного ответа, оцениваемый по IgG) отмечалось уменьшение продукции IgG (по числу АОК в селезенке) в 2.26 раза ($p < 0.05$), свидетельствующее о супрессии функции Th2-лимфоцитов. При действии МАН на 5 сут отмечалась существенная редукция реакции ГЗТ (функция Th1-клеток) соответственно в 2.09 раза ($p < 0.05$).

Таблица 7.5

Действие подострой интоксикации МАН на функцию Th1- и Th2- лимфоцитов у крыс ($M \pm m$, $n = 8-10$)

Токсикант	Функция Th1-лимфоцитов		Функция Th2-лимфоцитов
	АОК к ЭБ (IgM), $\cdot 10^3$	ГЗТ, %	АОК к ЭБ (IgG), $\cdot 10^3$
Контроль	45.5 ± 3.9	39.8 ± 2.8	60.8 ± 4.1
МАН	$17.8 \pm 1.7^*$	$19.0 \pm 2.0^*$	$26.9 \pm 2.5^*$

Примечание: * - $p < 0.05$ по сравнению с контролем

Параметры, характеризующие различные иммунные реакции и связанную с ними функцию Th1- и Th2-лимфоцитов, при действии МАН снижались в 2.32 и 2.26 раза соответственно. Это свидетельствует о том, что под влиянием токсиканта функция Th1- и Th2-лимфоцитов нарушается в равной степени.

Установленные особенности поражения МАН функции Th1- и Th2-лимфоцитов подтверждается исследованием концентрации цитокинов в крови крыс (табл. 7.6). После интоксикации МАН выявлено уменьшение концентрации ИФН- γ на 5 сут и ИЛ-4 на 14 сут соответственно в 2.35 и 2.39 раза ($p < 0.05$).

Таблица 7.6

Действие подострой интоксикации МАН на содержание цитокинов в крови крыс, пг/мл, ($M \pm m$, $n=6$)

Токсикант	ИФН- γ	ИЛ-4	ИФН- γ /ИЛ-4
Контроль	835 ± 78	134 ± 15	6.2
МАН	$355 \pm 41^*$	$56 \pm 11^*$	6.3

Примечание: * - $p < 0.05$ по сравнению с контролем

Увеличение соотношения ИФН- γ /ИЛ-4 характеризует снижение функциональной активности лимфоцитов Th2-типа по сравнению с функцией Th1-клеток, а уменьшение данного соотношения свидетельствует о большей супрессии активности лимфоцитов Th1-лимфоцитов по сравнению с Th2-клетками (Сухих и др., 2005). Проведенные исследования показали, что соотношение ИФН- γ /ИЛ-4 при отравлении МАН составляло 6,3 (контроль –

6,2). Это подтверждает результаты, свидетельствующие об особенностях поражения Th1- и Th2-клеток МАН.

Иммунотоксический эффект МАН обусловлен 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, уменьшением образования АТФ из АДФ – разобщением окисления и фосфорилирования (Трахтенберг, Шафран, 2002) – Th1-, Th2-клеток и других иммунцитов.

Таким образом, подострое действие МАН в суммарной дозе 1,0 LD_{50} вызывает редукцию функции Th1- и Th2-лимфоцитов в равной степени. Под влиянием МАН концентрация в крови ИФН- γ , синтезируемого Th1-клетками, снижается в такой же степени, как и концентрация ИЛ-4, продуцируемого Th2-лимфоцитами.

*

*

*

Острая интоксикация МАН повышает концентрацию КС в плазме крови через 1 и 3 ч. Выявлена отрицательная корреляция между концентрацией КС и показателями гуморального и клеточного иммунного ответа при интоксикации МАН. Концентрация КС, соизмеримая с содержанием этого гормона в крови при интоксикации МАН, играет весьма существенную роль в супрессии гуморального и клеточного иммунного ответа при действии ТХ.

Острая, подострая и хроническая интоксикация МАН приводит к инициации ПОЛ, что проявляется снижением активности АОС (редукция каталазы и пероксидазы) и увеличением содержания МДА и СПР в плазме крови. Инициация ПОЛ под влиянием МАН является одним из факторов, способствующих формированию постинтоксикационного

иммунодефицитного состояния (выявлена обратная корреляция интенсивности инициации ПОЛ с формированием иммунных реакций).

Под влиянием МАН происходит снижение активности АХЭ Т-лимфоцитов, а также незначительная редукция числа эстеразопозитивных клеток, к которым относятся преимущественно Т-лимфоциты, а также моноциты и макрофаги. Подострое действие МАН в суммарной дозе 1,0 LD_{50} вызывает редукцию функции Th1- и Th2-лимфоцитов в равной степени. Под влиянием МАН концентрация в крови ИФН- γ , синтезируемого Th1-клетками, снижается в такой же степени, как и концентрация ИЛ-4, продуцируемого Th2-лимфоцитами.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Острые и хронические интоксикации МАН могут происходить при его применении в различных областях промышленности, получении и использовании лекарственных препаратов, пестицидов, употреблении пищи и воды, содержащих данный элемент, контакт с его соединениями в производственных условиях, действии ТХ и т.п. 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, Плетенева, 1989; Забродский, 1998; Забродский, Мандыч, 2007). В настоящее время развитые страны, имеющие на вооружении БОВ, в частности, ОВ типа - люизит, активно ведут уничтожение их запасов, в соответствии с Конвенцией о запрещении разработки, производства, накопления и применения химического оружия и его уничтожения. МАН, как продукт деструкции люизита являются высоко токсичным химическим соединением и способен в случае аварий на химических предприятиях оказывать поражение организма животных и человека вследствие загрязнения окружающей среды. МАН, 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.

Нами показано, что после острой, подострой и хронической интоксикации МАН происходит увеличение летальности животных от экспериментального перитонита, вызванного *E. coli*, а также уменьшение LD_{50} *E. coli* и среднеэффективного времени жизни животных, что свидетельствует о снижении НРО под влиянием МАН.

Острое отравление МАН вызывает дозозависимое увеличение летальности животных от экспериментальной пневмонии после предварительной иммунизации, дозозависимое уменьшение LD_{50} *P. vulgaris* и среднеэффективного времени жизни животных, что свидетельствует о снижении под влиянием МАН НРО.

Редукция НРО и НИРО под влиянием МАН могут быть обусловлены взаимодействием МАН с дегидролипоевой кислотой пируватоксидазной системы клеток - макрофагов, моноцитов и ЕКК и других клеток крови (Ленинджер, 1974; Страйер, 1985; Забродский, 2002), как самим ядом, так и его метаболитами, ингибированием МАН некоторых энзимов, в частности эстераз клеточных элементов клеток крови (Хейхоу, Кваглино, 1983; Забродский, 1987).

Действие острого отравления МАН в дозах 0.25, 0.50 и 0.75 LD_{50} обуславливает дозозависимое снижение БАСК, активности лизоцима и ФМАН в течение 9 сут. После подострого и хронического действия МАН в дозе 0.01 LD_{50} показатели ФМАН существенно уменьшались по сравнению с контролем ($p < 0.05$), причем степень их снижения приблизительно соответствовала редукции параметров после острого действия МАН дозе 0.75 LD_{50} через 1 сут.

Уменьшение параметров доиммунных факторов защиты организма (НРО) при острой интоксикации МАН 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, Плетенева, 1989; Забродский, 1998; 2002).

Поражение ФМАН МАН может быть связано и с ингибированием токсикантом $ФАД^+$, $ФАД \cdot H$, восстановленного и окисленного убихинона и цитохрома b_{245} лейкоцитов. Возможны и иные механизмы нарушения

функционирования НАДФ·Н-оксидазного комплекса нейтрофилов. Возможно, МАН, кроме кислородзависимых антиинфекционных систем фагоцитоза, поражают и кислороднезависимые микробицидные системы фагоцитов (Забродский, 1998, 2002; Кадушкин, 2007).

Острая, подострая и хроническая интоксикация МАН вызывает уменьшение числа лимфоцитов в лимфоидных органах. При остром отравлении МАН редукция носит дозозависимый характер. Под влиянием острой интоксикации МАН в дозах 0.25, 0.50 и 0.75 LD_{50} через 8 сут происходит дозозависимое уменьшение миграции Т-лимфоцитов из тимуса и В-клеток из костного мозга. Подострое и хроническое действие МАН приводит к снижению миграции Т-лимфоцитов из тимуса и В-клеток из костного мозга.

Редукцию лимфоцитов в крови и органах системы иммунитета можно объяснить поражением лимфоидной стволовой кроветворной клетки, а также зрелых лимфоцитов реализацией следующих механизмов: подавление пролиферации иммуноцитов в результате ингибирования ферментов тканевого дыхания митохондрий ИКК (Ротенберг, 1980, 1982; Забродский и др., 1998), а также инактивацией МАН многочисленных ферментных систем лимфоцитов (Куценко, 2004), повреждением мембран клеток, замещением фосфора мышьяком в ДНК полипотентной стволовой кроветворной клетки (Давыдова, 1989) (и прежде всего, лимфоидной стволовой кроветворной клетки), инактивацией тиоловых ферментов лимфоцитов и эстерах Т-клеток (Страйер, 1985; Забродский, 1998, 2002).

Острая интоксикация МАН через 5-20 сут вызывала дозозависимое снижение антителообразования, оцениваемое по ОДЛТА. При подостром и хроническом действии МАН отмечалось такое же изменение показателей, как и при остром эффекте в дозе 0.75 LD_{50} через 5 и 14 сут.

Под влиянием острой интоксикации МАН происходит дозозависимая супрессия Т-зависимой антителопродукции (функции Th1-лимфоцитов), оцениваемой по числу АОК к ЭБ в селезенке, преимущественно в

продуктивную фазу антителогенеза. При подостром и хроническом действии МАН отмечалось приблизительно такое же изменение показателей, как и при остром в дозе $0.75 LD_{50}$ через 5 сут (на синтез IgM и функцию Th1-лимфоцитов).

При остром действии МАН происходит дозозависимое снижение синтеза IgG В-клетками и функции Th2-лимфоцитов, оцениваемых по числу АОК к ЭБ в селезенке. При подостром и хроническом действии МАН отмечается в целом такое же изменение показателей, как и при остром в дозах 0.50 и $0.75 LD_{50}$.

Снижение тимусзависимого антителообразования под влиянием МАН может быть связана с реализацией различных механизмов иммуотоксических эффектов на уровнях: систем – с активацией ГГНС, взаимодействия клеток – со снижением функции Th1-лимфоцитов, кооперации Т- и В-лимфоцитов, субклеточном – с инициацией ПОЛ, мембранотоксическим действием и другими эффектами (Голиков и др., 1986; Забродский, 2002; Забродский, Мандыч, 2007). Основной механизм иммуотоксичности МАН обусловлен действием яда на молекулярном уровне и инактивацией системы липоевая-дегидролипоевая кислота пируватоксидазной системы (Ленинджер, 1974; Диксон, Уэбб, 1982; Страйер, 1985; Куценко, 2004).

Острое отравление МАН вызывает 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. При подостром и хроническом действии МАН в течение 30 сут в дозе соответственно $0.01 LD_{50}$ отмечается уменьшение числа АОК к Vi-Ag приблизительно такое же, как и при остром в дозах $0.50-0.75 LD_{50}$.

Под влиянием МАН *in vitro* существенно нарушается кооперация Т- и В-лимфоцитов. МАН в прямой зависимости от концентрации (10^{-5} , 10^{-4} и 10^{-3} М) снижает кооперацию лимфоцитов, поражая преимущественно Т-клетки.

Острая, подострая и хроническая интоксикация МАН приводит к редукции способности макрофагов индуцировать гуморальный иммунный ответ. Подострое (в течение 6 сут) и хроническое действие токсиканта в течение 30 сут вызывает супрессию параметра существенно не отличающегося от острого действия токсиканта в дозе $0.75 LD_{50}$.

Под влиянием острой интоксикации МАН (0.25 , 0.50 и $0.75 LD_{50}$) происходит дозозависимое снижение функции Т-клеток, оцениваемой по ингибированию миграции лейкоцитов, в течение 1-12 сут. Подострое и хроническое действие МАН в течение 30 сут существенно снижает функцию Т-клеток. Эта редукция показателя приблизительно соответствует острому воздействию МАН в дозе $0.75 LD_{50}$ через 1-6 сут.

Под влиянием острого отравления МАН дозозависимо уменьшается функция Th1-лимфоцитов. Подострое (в течение 6 сут) и хроническое действие МАН в течение 30 сут вызывает супрессию функции Th1-клеток, приблизительно соответствующую острому действию МАН в дозе $0.75 LD_{50}$.

После острой интоксикации МАН (0.25 , 0.50 и $0.75 LD_{50}$) происходит дозозависимое снижение активности ЕКК до 9 сут. При подостром (в течение 6 сут) и хроническом действии МАН через 30 сут в дозе $0.01 LD_{50}$ отмечается редукция ЕКК соответственно в 2.42 и 2.04 раза (что соответствовало редукции функции ЕКК через 1-6 сут при остром воздействии в дозе $0.75 LD_{50}$). МАН *in vitro* в прямой зависимости от концентрации (10^{-6} , 10^{-5} и 10^{-4} М) снижает активность ЕКК.

Вероятно, снижение клеточных иммунных реакций обусловлено ингибирующим действием КС (Забродский, Германчук, 2000; Tiefenbach et al., 1983, 1985), секреция которых в течение 6-12 ч существенно увеличивается в результате стресс-реакции, незначительным ингибированием эстераз Т-лимфоцитов, возможным повреждением м- и н-холинорецепторов,

содержащих SH-группы, лимфоцитов и нарушением функции их пируватоксидазной системы вследствие взаимодействия МАН с моно- и дитиоловыми ферментами (Трахтенберг, Шафран, 2002).

Редукция активности ЕКК при отравлении МАН 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 (French, Yokoyama, 2003; Garrity et al., 2005; Li, Kawada, 2006), а также индукцией апоптоза (Garrity et al., 2005; MacFarlane, Campbell, 2006).

Острая интоксикация МАН повышает концентрацию КС в плазме крови через 1 и 3 ч. Выявлена отрицательная корреляция между концентрацией КС и показателями гуморального и клеточного иммунного ответа при интоксикации МАН. Концентрация КС, соизмеримая с содержанием этого гормона в крови при интоксикации МАН, играет весьма существенную роль в супрессии гуморального и клеточного иммунного ответа при действии токсичных химикатов.

Острая, подострая и хроническая интоксикация МАН приводит к инициации ПОЛ, что проявляется снижением активности АОС (редукция каталазы и пероксидазы) и увеличением содержания МДА и СПР в плазме крови. Инициация ПОЛ под влиянием МАН является одним из факторов, способствующим формированию постинтоксикационного иммунодефицитного состояния (выявлена обратная корреляция интенсивности инициации ПОЛ с формированием иммунных реакций).

Под влиянием МАН происходит дозозависимое снижение активности АХЭ Т-лимфоцитов, а также незначительная редукция числа эстеразопозитивных клеток, к которым относятся преимущественно Т-лимфоциты, а также моноциты и макрофаги. Подострое действие МАН в суммарной дозе 1.0 LD_{50} вызывает редукцию функции Th1- и Th2-лимфоцитов в равной степени. Под влиянием МАН концентрация в крови

ИФН- γ , синтезируемого Th1-клетками, снижается в такой же степени, как и концентрация ИЛ-4, продуцируемого Th2-лимфоцитами.

Таким образом, основными механизмами редукции доиммунных факторов защиты организма (НРО) и показателей системы иммунитета МАН в дозах 0.25-0.75 LD_{50} , приводящими к постинтоксикационному иммунодефицитному состоянию, являются: супрессия гуморального и клеточного иммунного ответа (с преимущественным поражением Т-лимфоцитов) вследствие снижения содержания иммуноцитов в органах системы иммунитета, уменьшением миграции Т-клеток из тимуса и В-клеток из костного мозга; нарушения кооперации Т- и В-лимфоцитов, редукции способности макрофагов индуцировать гуморальный иммунный ответ, повышения концентрации КС в плазме крови, незначительного ингибирование АХЭ Т-клеток тимуса и селезенки, а также α -нафтил-АС-ацетатэстеразы и α -нафтил-бутиратэстеразы тимоцитов и спленоцитов (Т-клеток, моноцитов, макрофагов); инициации ПОЛ, редукцию функции Th1- и Th2-лимфоцитов (в равной степени) и продукции ими соответственно ИФН- γ и ИЛ-4.

ВЫВОДЫ

1. Острая, интоксикация метаарсенитом натрия (экологотоксикологическое воздействие) вызывает снижение интегральной неспецифической резистентности организма и комплексной неспецифической и иммунологической резистентности, бактерицидной активности сыворотки крови, активности лизоцима и фагоцитарно-метаболической активности нейтрофилов.

2. Острая, подострая и хроническая интоксикация метаарсенита натрия приводит к снижению числа лимфоцитов в лимфоидных органах и миграции Т-клеток из тимуса и В-клеток из костного мозга.

3. Действие метаарсенита натрия вызывает дозозависимое снижение Т-зависимого и Т-независимого антителообразования преимущественно в продуктивный период иммуногенеза по сравнению с индуктивным периодом, что свидетельствует о снижении функции Th1-лимфоцитов и В-клеток. Под влиянием метаарсенита натрия *in vitro* существенно нарушается кооперация Т- и В-лимфоцитов. Метаарсенит натрия в прямой зависимости от концентрации снижают кооперацию лимфоцитов, поражая преимущественно Т-клетки. Интоксикация метаарсенитом натрия приводит к редукции способности макрофагов индуцировать гуморальный иммунный ответ.

4. Под влиянием интоксикации метаарсенита натрия происходит снижение функции Т-клеток, Th1-лимфоцитов, оцениваемой в реакции гиперчувствительности замедленного типа, антителозависимой клеточной цитотоксичности и активности естественных клеток-киллеров. Метаарсенит натрия *in vitro* в прямой зависимости от концентрации (10^{-6} , 10^{-5} и 10^{-4} М) снижает активность естественных клеток-киллеров.

5. Под влиянием МАН происходит повышение концентрации кортикостерона в плазме крови, ингибирование эстераз Т-лимфоцитов, моноцитов и макрофагов, инициация пероксидации липидов, редукция в равной степени функции Th1- и Th2-лимфоцитов и супрессия продукции ими

соответственно ИФН- γ и ИЛ-4.

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, МКИ⁵ 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 иммунофана // International J. on Immunorehabilitation. Физиология и патология иммунной системы. – 2003.- Т. 5, №2.- с. 205.
15. Базарный В.В., Ястребов А.П. К механизму иммуностропного 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. Иммунофармакологический 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. – ТоМАНк, 1974. – 209 с.
 28. Бухарин О. В., Васильев Н. В. Система β -лизина и его роль в клинической и экспериментальной медицине. – ТоМАНк, 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 иМАНтивации бактерицидного действия тромбоцитарного катионного белка (β -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. ЖаМАНаранова 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. ЗеМАНков 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 системы // Вест. АМН СССР.- 1990.- №11.- С. 36-42.
 86. Коробейникова Э.Н. Фотометрический метод определения моновалентного 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. Могущ 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., МоLДокулов О.А., Власенко Р.Я. Миелопид; иммунокорректирующая 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. ТоМАНк. 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

- иммуотропных средств // Фармак. и токсикол.- 1984.-№3.- с. 5-13.
161. Утешев Б.С., Сергеев А.С., Коростелев С.А. Анализ современных направлений в создании иммуотропных средств // Эксперим. и клин. фармакол.-1995.-Т.58, №3.- С.3-7.
 162. Феерман И.С., Бонгард Э.М., Лащенко 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. Arkusz J., Stańczyk M., Lewińska D. et al. Modulation of murine peritoneal macrophage function by chronic exposure to arsenate in drinking water // Immunopharmacol. Immunotoxicol.–2005. – Vol. 27, N 2. - P. 315-30.
192. Bagiuski B. Einfluss von Blei und Cadmium auf die Vitalität und

- Phagozytosefähigkeit humaner polymorphkerniger Zenkoryten //Zbl. Bakteriolog.-1985.-Bd. 181, N 6.-S. 461-468.
193. 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.
 194. 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.
 195. 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.
 196. Boman H.G. Peptid antibiotics and their role in innate immunity // Ann. Rev. Immunol.-1995.- Vol. 13.-P. 61-92.
 197. 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.
 198. 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.
 199. Charbonneau S.M., Spenser K., Bryce F., Santi E. Arsenik excretion by monkeys dosed with Arsenic – containing fish or with inorganic arsenik // Bull. Environ. Contam. Toxicol. – 1978. – Vol. 20. – P 470-477.
 200. Claman H.N. Corticosteroids as immunomodulators //Immunomodulation drugs / Ann. of the N.-Y. Acad. Sci. – 1993.-Vol. 685. –P. 288-292.
 201. Chavan H.D., Singh G., Dey C.S. Confocal microscopic investigation of tubulin distribution and effect of paclitaxel on posttranslationally modified tubulins in sodium arsenite resistant Leishmania donovani // Exp. Parasitol.– 2007. – Vol. 116, N 3. - P. 320-326.
 202. De B.K., Majumadar D., Sen S. et al. Pulmonary involvement in chronic arsenic poisoning from drinking contaminated ground-water // J. Assoc.

- Physicians. India.-2004. – N 52. P 395-400.
203. 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.
 204. Descotes J. Immunotoxicology of drugs and chemicals. – Amsterdam- -N. Y.- Oxford: Elsvier, 1986.- 400 p.
 205. Descotes J., Mazue G. Immunotoxicology // Adv. Vet. Sci. a Comp. Med. – 1987.- Vol. 31.-.p. 95-119.
 206. 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.
 207. Di Giampaolo L., Di Gioacchino M., Qiao N. et al. "In vitro" effects of different arsenic compounds on PBMC (preliminary study) // G. Ital. Med. Lav. Ergon.–2004. – Vol. 26, N 3.- P. 183-6.
 208. 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.
 209. 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.
 210. 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.
 211. Elsbach P., Weise J. Oxygendependent and oxygenindependent mechanisms of microbiological activity of neutrophils // Immunol.- Lett. - 1985.- Vol. 11.- No 3-4. - P. 159-163.
 212. Fergula J., Ashercon 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.

213. 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.
214. Finkelstein M.E., Grasman K.A., Croll D.A. et al. Contaminant-associated alteration of immune function in black-footed albatross (*Phoebastria nigripes*), a North Pacific predator// Environ. Toxicol. Chem.–2007. – Vol. 26, N 9. - P. 1896-1903.
215. Gabon P.A. et al. Organic acids in ethylen glycol intoxication// Annals of Internal Medicine.-1986.-.-Vol.105, № 1.- P. 16-20.
216. 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.
217. Gennari M., Bouthillier Y., Ibanes 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.
218. Georgiev V.St., Yamaguuchi H. Immunomodulation drugs / Ann. of the N.-Y. Acad. Sci. – 1993.-Vol. 685. – 816 p.
219. Georgiev V.St., Albright J.E. Cytokines // Immunomodulation drugs / Ann. of the N.-Y. Acad. Sci. – 1993.-Vol. 685. –P.284-602.
220. Ghosh D., Datta S., Bhattacharya S. et al. Long-term exposure to arsenic affects head kidney and impairs humoral immune responses of *Clarias batrachus* // Aquat. Toxicol.–2007. – Vol. 15, N 1. - P. 79-89.
221. Gilbert R.V., Hoffmann M.K. cAMP 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.
222. Goytia-Acevedo R.C., Cebrian M.E., Calderon-Aranda E.S. Differential effects of arsenic on intracellular free calcium levels and the proliferative response of murine mitogen-stimulated lymphocytes // Toxicology.–2003. – Vol. 189, N 3. - P. 235-244.
223. Hermann A.C., Kim C.H. Effects of arsenic on zebrafish innate immune system // Mar. Biotechnol. (NY)–2005. – Vol. 7, N 5. -P. 494-505.

224. Hewett J. A., Roth R. A. Dieldrin activates rat neutrophils in vitro //Toxicol. and Appl. Pharmacol.-1988.- Vol. 96, N 2.-P. 269-278.
225. Hinck J.E., Blazer V.S., Denslow N.D. et al. Biomarkers of contaminant exposure in Northern Pike (*Esox lucius*) from the Yukon River Basin, Alaska // Arch. Environ. Contam. Toxicol.–2007. – Vol. 52, N 4.- P. 549-62.
226. Iokobsen D. et al. Glikolat caused the acidosis in the ethylen glycol poisoning // Acta Med. Skand.- 1984.-Vol.216, № 3.- P. 409-416.
227. Janik G. Kopp W.C. Levamisol-induced neopterin synthesis //Immunomodulation drugs / Ann. of the N.-Y. Acad. Sci. – 1993.-Vol. 685. – P.252-258.
228. Jerne N. K., Nordin A. A. Plaque formation in agar by sirgte antibody producing cells //Seince.- 1963.- Vol. 140, N 4. - P. 405.
229. Kalmadi S.R., Hussein M.A. The emerging role of arsenic trioxide as an immunomodulatory agent in the management of multiple myeloma // Acta. Haematol.–2006. – Vol. 116, N 1.- P. 1-7.
230. 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.
231. 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.
232. Kimber I. Chemical – Induced Hypersensitivity //In.: Exper. Immun.- Boca Raton, New York, London, Tokyo.- 1996.- P. 391-417.
233. 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.
234. 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.
235. 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.
236. Li C. G., Lam R. W., Gam L. T. Esterases in human leucocytes //J. Histochem. Cytochem.- 1973.- Vol. 21.- No 1. - P. 1-12.
 237. Liao W.T., Chang K.L., Yu C.L. et al. Arsenic induces human keratinocyte apoptosis by the FAS/FAS ligand pathway, which correlates with alterations in nuclear factor-kappa B and activator protein-1 activity // Toxicol. Appl. Pharmacol.-2004. – Vol. 198, N 3.-P. 283-90.
 238. Lilienfeld D.E. Arsenic, geographical isolates, environmental epidemiology, and arteriosclerosis //Arteriosclerosis.-1988.-Vol. 8, N 5.-P. 449-451.
 239. Loose L.D. Immunotoxicology-1985 //Year Immunol.- 1985-1986.-Vol. 2.- Basel e.a., 1986.-P. 365-370.
 240. 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.
 241. Madden K. S., Livnat S. Catecholamine action and immunologic reactivity // In: Psychoneuroimmunology, Second Edition.- academic Press, Inc.-1991.- 283-310.
 242. Marshak-Rothstein A., Fink P., GriLDey 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.
 243. Marx J.L. How killer cells kill their targets. //Science.-1986.-Vol. 231, N 4744.-P. 1367-1369.
 244. 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.
 245. 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.
 246. McManus J., Huebner K. M. Vesicants // Crit. Care Clin.- 2005. Vol. 21, N 4. –P. 707-718.

247. Miller K. Immunotoxicology //Clin. and Exp. Immunol.-1985.-Vol 61, N 2.- P. 219-223.
248. Minich E., Fefer A. Biologocal, response modifiers: subcombite report //Nat. Cancer Inst. Monograf. – 1983.-Vol. 63. – P. 1-252.
249. Mikhailova A.A. Fonina L.A. Myelopeptides – immunoregulatopy cytokines produces by the bone marrow cells // Eur. Jed. Immunol. Soc.10th Meet., Edinburg, 10-12 Sept., 1990: Abstr.- Edinburg, 1990.- P.125.
250. Munro N.B., Watson A.P., Ambrose K.R., Griffin G.D. Treating exposure to chemical warfare agents: implications for health care providens and community emergency planning // Environmental Health Perspectives. - 1990. - Vol. 89. – P. 205-215.
251. Nayak A.S., Lage C.R., Kim C.H. Effects of low concentrations of arsenic on the innate immune system of the zebrafish (*Danio rerio*) // Toxicol. Sci.–2007. – Vol. 98, N 1.- P. 118-24.
252. Nogueira N. Intracellular mechanisms of killing /Immunobiol. Parasit. and Parasitic. Infec. - New York-London, 1984.-P. 53-69.
253. Nouragargh S., Holt J.R.S. Ingibition of human neutrophil degranulation by forskolin in the presence phosfodiesterases ingibitors// Eur. J. Pharmacol.- 1986.- Vol. 222, N2.-P. 205-212.
254. 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.
255. Patterson R., Vega L., Trouba K. et al. Arsenic-induced alterations in the contact hypersensitivity response in Balb/c mice // Toxicol. Appl. Pharmacol.– 2004. – Vol. 198, N 3. -P. 434-43.
256. 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.
257. Pineda-Zavaleta A.P., García-Vargas G., Borja-Aburto V.N. et al. Nitric oxide and superoxide anion production in monocytes from children exposed to arsenic and lead in region Lagunera, Mexico // Toxicol. Appl. Pharmacol.–

2004. – Vol. 198, N 3. -P. 283-90.
258. Romagnani S. The Th1/Th2 paradigm // Immunol. Today. –1997.- Vol. 18, №6.- P. 263-266.
259. 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.
260. Sakurai T., Ohta T., Tomita N. et al. Evaluation of immunotoxic and immunodisruptive effects of inorganic arsenite on human monocytes/macrophages // Int. Immunopharmacol.–2004. – Vol. 4, N 13. P. 1661-1673.
261. Sakurai T., Ohta T., Fujiwara K. Inorganic arsenite alters macrophage generation from human peripheral blood monocytes // Toxicol. Appl. Pharmacol.–2005. – Vol. 203, N 2. P. 145-153.
262. Sakurai T., Ohta T., Tomita N. et al. Evaluation of immunotoxic and immunodisruptive effects of inorganic arsenite on human monocytes/macrophages // Int. Immunopharmacol.–2006. – Vol. 6, N 2. P. 304-15.
263. Sayed H.A., El Ayyat A., El Dusoki H. et al. A cross sectional study of hepatitis B, C, some trace elements, heavy metals, aflatoxin B1 and schistosomiasis in a rural population, Egypt // J. Egypt. Public. Health. Assoc.–2005. – Vol. 80, N 3-4. P. 355-88.
264. 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.
265. Schmitt C.J., Hinck J.E., Blazer V.S. et al. Environmental contaminants and biomarker responses in fish from the Rio Grande and its U.S. tributaries: spatial and temporal trends // Sci. Total. Environ.–2005. – Vol. 1, N 1-3. - P. 161-93.
266. Segal A. W. Nitroblue – tetrasolium test //Lancet. - 1974.- Vol. 2. - No 7891. - P. 1248-1252.
267. 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.
268. 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.
269. Smialowicz R. J., Rogers R. R., RidLDe 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.
270. Smialowicz R. J., Rogers R. R., RidLDe 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.
271. 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.
272. 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.
273. Solberg C. O. Phagocytic cell in host defence //Acta oto-laryngol.- 1984.-Vol. 98. - No 407. - P. 5-13.
274. Sosa M., Sana A. Immunopharmacologic properties of inosine 5'- methylmonophosphate (MIMP) //Immunomodulation drugs / Ann. of the N.-Y. Acad. Sci. – 1993.-Vol. 685. –P. 458-463.
275. Soto-Peña G.A., Luna A.L., Acosta-Saavedra L. et al. Assessment of lymphocyte subpopulations and cytokine secretion in children exposed to arsenic // FASEB. J. .-2006. – Vol. 20, N 6. -P. 779-81.
276. Stevens G. Immunomodulation drugs: where and whither//Immunomodulation drugs / Ann. of the N.-Y. Acad. Sci. – 1993.-Vol. 685. –P. 430-431.
277. 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.
278. Sullivan J. B. Immunological alterations and chemical exposure // *J. Toxicol. Clin. Toxicol.*-1989.-Vol. 27, N 6.-P. 311-343.
279. 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.
280. 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.
281. Tenorio E.P., Saavedra R. Differential effect of sodium arsenite during the activation of human CD4⁺ and CD8⁺ T lymphocytes // *Int. Immunopharmacol.*-2005. – Vol. 5, N 13-14. -P. 1853-1869.
282. Tephly T.R. The biochemical toxicology of metanol // *Toxicol. Lett.* - 1983.-Vol. 18, No 7. - P. 34-36.
283. Tersago K., De Coen W., Scheirs J. et al. Immunotoxicology in wood mice along a heavy metal pollution gradient // *Environ. Pollut.*-2004. – Vol. 132, N 3. -P. 385-394.
284. 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.
285. 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.
286. Tiefenbach B., Hennighausen G., Lange P. Zum Mechanismus der akuten Wirkungen phosphororganischer Pestizide auf das Immunsystem // *Zbl. Pharm.*-1983.-Bd. 122, H. 2.-S. 156.

287. 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.
288. 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.
289. 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.
290. 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.
291. 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.
292. 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.
293. Whisler R. L., Stobo J.D. Heterogeneity of murine regulatory T cells // J. Exp. Med.-1976.-Vol. 144, N 2.-P. 398-413.
294. Yu H.S., Liao W.T., Chai C.Y. Arsenic carcinogenesis in the skin // J. Biomed. Sci.–2006. – Vol. 13, N 5. -P. 657-866.