

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ В МЕДИЦИНЕ И БИОЛОГИИ

УДК 615:616-056.22:001.18

Б.Т. Величковский

ОБ ЭКСПРЕСС-МЕТОДЕ ПРОГНОЗИРОВАНИЯ ВОЗМОЖНОГО ПАТОЛОГИЧЕСКОГО ВЛИЯНИЯ НАНОЧАСТИЦ НА ОРГАНИЗМ

Российский государственный медицинский университет (Москва)

В связи с активным развитием производства и применения наноматериалов появилась новая актуальная задача — определение потенциального вреда наночастиц для здоровья человека. Подобный вред, по-видимому, возможен. В эксперименте на животных установлен высокий уровень задержки наночастиц в легких, а также способность проникать через аэрогематический барьер в ткани организма. При введении в кровь они преодолевают гематоэнцефалический барьер и откладываются в мозгу. В модельных клеточных опытах наночастицы особой формы — фуллероны — могут повреждать молекулу ДНК — «расплетсти», разрезать.

Ключевые слова: наночастицы, оценка безопасности, хемилюминисценция

ABOUT EXPRESS-METHOD OF PROGNOSING THE POSSIBLE PATHOLOGICAL INFLUENCE OF NANO-PARTICLES ON ORGANISM

B.T. Velichkovsky

State medical university, Moscow

A new actual problem — determining the potential harm of nano-particles to human health was occurred in the association with an active development of the production and using the nano-materials. A similar harm appears to be possible. A high level of the nano-particle accumulation in the lungs as well as the ability to penetrate the arohematic barrier in the organism tissues has been revealed in the experiments using the animals. In administration into the blood they may overcome the hematoencephalic barrier and deposit in the brain. In the model cellular experiments the nano-particles of a special form — fullerones — may injure the DNA molecule, i.e. «unplait», cut it.

Key words: nano-particles, estimation of safety, chemiluminescence

К наноматериалам и наноструктурам относят разнообразные объекты, величина которых хотя бы в одной из трех размерностей меньше 100 нм (1 нанометр — миллиардная доля метра или 10 ангстрем). Они могут быть трехмерными (фуллероны, нанокристаллы), двумерными (нанотрубки) и одномерными (нанопленки).

По происхождению различают два вида наноструктур: природные и искусственные. К природным наноструктурам относятся вирусы малых размеров, молекулы ДНК. Искусственные наноструктуры создаются на основе современных наукоемких технологических процессов.

Крупномасштабное производство наночастиц основано на трех механизмах их образования: конденсации из газовой фазы, осаждения из коллоидного раствора и дезинтеграции твердого вещества.

Кроме полезных нанопродуктов, в ряде производств возникают побочные техногенные наночастицы. Они содержатся в дымах металлургических и химических предприятий, в выхлопных газах бензиновых и дизельных двигателей, в аэрозолях

конденсации, образующихся при газо- и электро-сварочных работах. К слову сказать, первичные размеры частиц табачного дыма обычных сигарет целиком располагаются в области нановеличин.

Ведущими в характеристике наночастиц являются свойства поверхности. От них зависит их стабильность и реакционная способность, полупроводниковые, магнитные, оптические и механические свойства, а также особенности биологического действия. Трудные проблемы для медицины создают как уникальные свойства, так и значительное разнообразие наночастиц.

В настоящее время наиболее широкое практическое применение имеют три их группы. В количественном отношении пальма первенства принадлежит, по-видимому, углеродным наночастицам.

Самая известная из них — фуллерон. Это молекула углерода, состоящая из 60 атомов. По виду она похожа на футбольный мяч, сшитый из правильных многоугольников (рис. 1).

Другая многочисленная разновидность — нанотрубки из правильных углеродных шестиуголь-

ников с соотношением длины к диаметру больше 3:1. Ту и другую разновидность углеродных наноструктур отличает механическая прочность, превышающая прочность стали, химическая инертность, электропроводность, каркасное (полое) строение с толщиной стенки в одну молекулу.

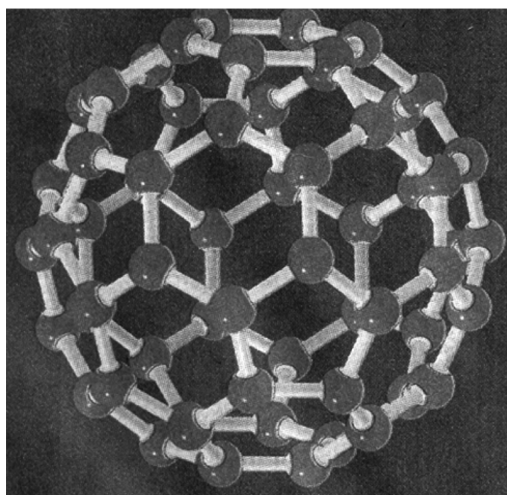


Рис. 1. Фуллерен.

Вторую группу, имеющую широкое коммерческое применение, составляют наночастицы оксидов металлов, преимущественно TiO_2 , ZnO , Al_2O_3 . Они обладают каталитическими, полупроводниковыми и другими уникальными свойствами и используются в микроэлектронике, энергетике, химической промышленности.

Третью группу составляют композиционные наноматериалы, не содержащие ни углерод, ни металлы. Типичным представителем этой группы является многотоннажный технический продукт — аэросил, представляющий собой аэрозоль конденсации диоксида кремния, получаемый при сжигании $SiCl_4$, либо кремнийорганических мономеров в контролируемой среде. Наночастицы аэросила имеют удельную поверхность 175–380 м²/г, средний эквивалентный диаметр 0,02–0,01 мкм (20–10 ангстрем) и отличаются значительной монодисперсностью: диаметр всех его частиц укладывается в диапазон 0,005–0,05 мкм (5–50 ангстрем). Аэросил используется как наполнитель в производстве особо прочных резиновых шин, как загуститель при получении машинного масла, а также в пищевой, фармацевтической и парфюмерно-косметической промышленности.

Чрезвычайно высокая поверхностная энергия наночастиц обуславливает их почти мгновенную коагуляцию в воздухе рабочей зоны и образование крупных оседающих хлопьев. Наглядно воздушную коагуляцию наночастиц демонстрирует процесс возникновения табачного дыма, благодаря которому он и становится виден.

Для наночастиц весовой метод определения их содержания в воздухе непригоден. Любые варианты счетного метода также недостаточно информативны. Для характеристики экспозиции наночастиц в воздухе рабочей зоны наиболее приемлемой и доступной в настоящее время, по-видимому, можно

признать двухэтапную комбинацию определения весовой концентрации респираторной фракции пыли с последующим определением суммарной поверхности отобранной пылевой навески методом адсорбции азота или другого инертного газа по БЭТ. В результате рассчитываются величины удельной поверхности витающих наночастиц на конкретном рабочем месте. Именно по этому показателю — величине удельной поверхности витающей пыли — и следует нормировать предельно допустимую концентрацию наночастиц в воздухе рабочей зоны.

В дальнейшем перспективными, вероятно, могут стать устройства прямого определения суммарной поверхности наночастиц, основанные на высокой адсорбционной способности их поверхности. Например, может быть использовано изменение стандартной концентрации светящегося газообразного эталонного вещества при прохождении через измерительную кювету прибора воздушного потока с наночастицами.

Президиум РАМН среди 5 наиболее актуальных направлений изучения нанотехнологий выделил исследования:

1) фундаментальных аспектов взаимодействия наночастиц с клеточными и субклеточными структурами организма;

2) проблемы безопасности при разработке и использовании нанотехнологий и наноматериалов.

С 1 декабря 2007 года введены в действие методические рекомендации по «Оценке безопасности наноматериалов», утвержденные руководителем Роспотребнадзора, главным санитарным врачом РФ, академиком РАМН Г.Г. Онищенко. Методические рекомендации разработаны с целью обеспечения единого научно-обоснованного подхода к оценке безопасности наноматериалов на этапах разработки, экспертизы и государственной регистрации подобной продукции.

В них для изучения взаимодействия наночастиц с биологическими макромолекулами и клеточными мембранами и для выяснения возможности проникновения через биологические барьеры рекомендованы следующие 13 методов:

- атомно-силовая микроскопия;
- сканирующая и просвечивающая электронная микроскопия;
- светооптическая флуоресцентная микроскопия;
- светооптическая конфокальная микроскопия;
- спектрометрия деполяризации флуоресценции;
- спектрометрия кругового дихроизма;
- спектрофлуориметрия;
- ЯМР-спектроскопия;
- ЭПР-спектрометрия;
- масс-спектрометрия;
- метод радиоактивных индикаторов;
- аналитическое ультрацентрифугирование;
- жидкостная хроматография высокого разрешения.

У большинства медицинских организаций профилактической направленности нет подобного оснащения, отсутствуют специалисты, умеющие эксплуатировать перечисленные приборы. Поэтому пока необходимо опираться на накопленные ранее данные и те методы исследования, которыми они в свое время были получены. Такие сведения в методических рекомендациях, к сожалению, отсутствуют. К тому же по своей структуре они ориентированы в основном на оценку наноматериалов, попадающих в организм *per os*.

Для предварительной характеристики особенностей биологического влияния наночастиц на организм следует получить представление о том, каков механизм взаимодействия их поверхности с окружающей средой. Химия поверхности твердых тел вообще представляет собой одну из важнейших проблем естествознания и техники.

В ходе эволюции легкие приспособились к борьбе с возбудителями инфекции дыхательных путей и в меньшей степени оказались подготовленными к воздействию неорганических микрочастиц. При контакте возбудителя инфекции, иммунного комплекса или пылевой частицы с мембраной фагоцита так интенсивно повышается уровень потребления кислорода, что это явление получило название «дыхательного взрыва». Например, при активации макрофагов частицами кварца потре-

бление кислорода увеличивается в 4 раза, частицами угольной пыли или диоксида титана — в 1,5 раза. Практически весь дополнительно поглощенный кислород не используется ни на энергетические, ни на пластические нужды клетки.

Особая ферментная система фагоцитов, встроенная во внешнюю клеточную мембрану, НАДФН-оксидаза изменяет электронную структуру молекулы кислорода, превращая его в главное оружие бактерицидной защиты клетки — активные формы кислорода (АФК), а состояние длительного избыточного образования АФК — «окислительным стрессом».

В бактерицидной защите органов дыхания принимает участие и оксид азота. NO — газ, обладающий свойствами свободного радикала, благодаря непарному электрону на внешней орбитали молекулы. Оксид азота синтезируется фагоцитами из аминокислоты аргинина ферментом NO-синтазой.

Таким образом, первичный ответ организма на действие нерастворимых частиц стереотипен и заключается в мобилизации неспецифических бактерицидных систем фагоцитов.

Об интенсивности этого процесса можно судить по уровню люминолзависимой хемилюминесценции (ХЛ) фагоцитов. Принципиальная схема метода показана на рис. 3. Суспензия одних макрофагов дает лишь слабое спонтанное свечение, а взвесь корпускулярных частиц обычно не вызывает его со-

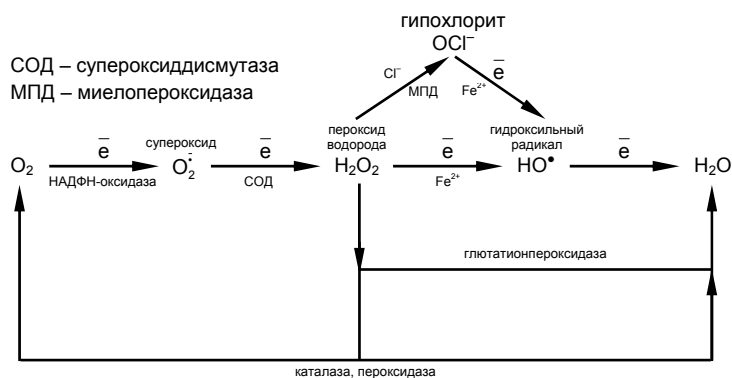


Рис. 2. Одноэлектронный путь восстановления кислорода в организме.

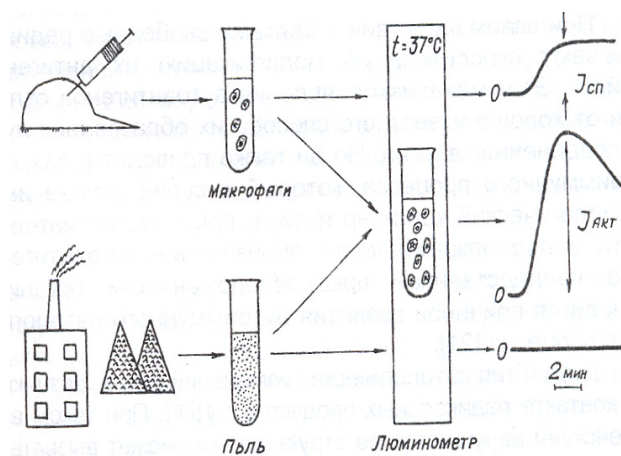


Рис. 3. Хемилюминесцентное определение способности наночастиц активировать макрофаги.

всем. При контакте же таких частиц с макрофагами наблюдается развитие ХЛ, отражающее динамику образования свободных радикалов кислорода.

Основываясь на опыте изучения биологического действия различных субмикроскопических аэрозолей конденсации можно выделить пять типов биологически значимых межмолекулярных взаимодействий поверхности наночастицы с мембраной фагоцита.

К первой группе относятся наночастицы симметричного внутреннего строения, для которых контакт поверхности с окружающей средой обусловлен самым слабым универсальным неспецифическим межмолекулярным взаимодействием, вызываемым флуктуациями электронов в пограничном слое частицы. К этой группе относятся углеродные наночастицы с абсолютно однородной чистой поверхностью. Электростатическое взаимодействие наночастиц с клеточной мембраной обуславливает физиологичный тип активации фагоцитов. Он характеризуется постепенным нарастанием, низким уровнем и медленным затуханием хемилюминесцентного свечения клеток. Фагоцитоз подобных частиц обуславливает «гипертрофический» механизм гибели кониофага. Клетка, поглощающая большое количество таких частиц, длительное время остается жизнеспособной, подвижной и увеличивается в объеме. Происходит типичная «рабочая» гипертрофия кониофага на внутриклеточном уровне. Гипертрофированные кониофаги, естественно, нуждаются в потреблении повышенного количества кислорода. Однако с увеличением размеров клетки отношение площади её поверхности к объему прогрессивно снижается, поскольку масса клетки возрастает пропорционально кубу, а поверхность — пропорционально квадрату линейных размеров. Поэтому в расчете на единицу массы потребление кислорода уменьшается, нарушается режим работы митохондрий, и в конце концов клетка погибает. В медицине труда указанный сценарий наблюдается при воздействии низкоцитотоксичной пыли алмаза, кристаллического кремния, эльбора и др.

На примере углеродных наночастиц наиболее наглядно прослеживается биологическое значение наноразмерности. Материал, характеризующийся электростатическим типом взаимодействия своей поверхности с мембраной фагоцитов, обладает высокой совместимостью с тканями организма, не вызывает ни воспаления, ни отторжения. Поэтому из углеродистых наноматериалов прессуются в наиболее легкие, прочные и долговечные протезы искусственных суставов, костей, зубов. Пока они дороги, но со временем станут более доступными и, по-видимому, наиболее востребованными. Однако в связи с наноразмерами эти углеродистые материалы проникают и накапливаются не только в протоплазме клетки, но и в её ядре, вызывая патологические изменения ДНК и, значит, становясь потенциальными канцерогенами.

Все современные технологии получения углеродных нанотрубок требуют применения металлических катализаторов, следы которых загрязняют

их поверхность. В состав катализаторов чаще всего входят Co, Ni, Fe и их сочетания. Наночастицы, содержащие в пограничном слое катионы таких металлов-аллергенов, как никель и кобальт, составляют вторую группу биологически значимых взаимодействий. Ионы металлов-аллергенов способны покидать поверхность частиц и переходить в тканевую жидкость. Там они связываются с белковыми молекулами и, в конечном итоге, могут вызвать аллергическую реакцию. В обыденной жизни типичным примером подобного действия являются аэрозоли полиметаллических руд, обуславливающие возникновение особой формы пневмокониоза с гиперреактивными проявлениями.

Наночастицы, содержащие в пограничном слое ионы железа или других переходных металлов, составляют третью биологически значимую группу. Когда наночастицы содержат в пограничном слое ионы переходных металлов, то на таких каталитических центрах поверхности происходит вторичная трансформация бактерицидных продуктов, образованных активированными фагоцитами. При этом возникает наиболее агрессивный из всех свободных радикалов — гидроксильный радикал $\text{OH}\cdot$, который запускает цепную реакцию перекисного окисления липидов клеточных мембран и может вызвать окислительное повреждение молекул РНК и ДНК. В традиционных производствах подобным механизмом биологического действия обладают волокнистые пылевые частицы асбеста, содержащие в пограничном слое катионы железа. Все разновидности асбестовых волокон в той или иной степени являются канцерогенами.

Четвертую группу составляют наночастицы с гидратированной поверхностью, обладающей способностью к специфическим электростатическим взаимодействиям, ориентированным в пространстве за счет образования водородных связей ($\text{A}-\text{OH}\cdots\text{B}$). Классическим образцом вещества с подобной поверхностью служит кремнезем. Кварцевая пыль даже в вакууме в считанные минуты адсорбирует остаточные молекулы воды, образуя состоящую из силанольных групп ($\text{Si}-\text{OH}$) гидроксильную поверхность. Такая поверхность, покрытая силанольными группами, обуславливает химическую инертность и устойчивость кремнезема в обычных условиях земной атмосферы, но она же обуславливает его высокую фиброгенность и невысокую, но уже доказанную канцерогенность.

Последнюю группу составляют наночастицы, поверхность которых способна к межмолекулярным взаимодействиям за счет электростатического связывания, обусловленного неравномерным распределением электронной плотности на поверхности излома, создающим неориентированный в пространстве суммарный эффективный заряд частицы. Чем выше дзета-потенциал такой частицы, тем больше ее способность активировать фагоциты. Подобным действием обладает фиброгенная пыль, не содержащая свободного диоксида кремния.

Таким образом, потенциально опасным воздействием на организм обладают все пять групп. Главная

особенность заключается в том, что наноразмерность повышает цитотоксичность частиц. В основе подобной реакции лежит механизм активации фагоцитов, главным образом, макрофагов и дендритных клеток. Для активации указанных клеточных элементов необходим одновременный многоточечный контакт частиц с поверхностью клетки. Это условие и обеспечивают наноразмеры частиц. Если дело идет об аэрозолях, то химический состав, по-видимому, отступают на второй план. Литейную лихорадку, как известно, вызывает дым не только оксида цинка, но и других металлов и даже полимерных частиц.

Все наночастицы должны рассматриваться как потенциальные канцерогены. Менее вероятно их фиброгенное влияние, так как раньше, чем в ткани, накопится необходимое «пылевое депо», проявится их повышенная цитотоксичность. Об этом свидетельствуют экспериментальные исследования с аэросилом. Интратрахеальное введение стандартной 50-миллиграммовой дозы этого наиболее высокодисперсного конденсата диоксида кремния вызывает быструю гибель всех подопытных крыс. Введение в четыре раза меньшей дозы приводит к развитию только клеточно-пылевых узелков, которые исчезают через две недели по мере растворения и выведения из легких остатков наночастиц, оставляя после себя расширенные деформированные ацинусы с разрушенными альвеолярными стенками.

Поэтому более ожидаемо развитие в органах дыхания патологического процесса, подобного эмфиземе. В основе подобных изменений лежит деструкция легочной ткани, обусловленная действием свободных радикалов, генерируемых активированными фагоцитами. Такой процесс подобен профессиональному экзогенному фиброзирующему альвеолиту, впервые описанному Н.К. Вознесенским у плавильщиков бронзовых сплавов, подвергавшихся воздействию дыма оксида цинка на протяжении 10 – 15 лет. Он опасен развитием гипоксии и легочно-сердечной недостаточности.

В настоящее время доказано, что саркоидоз, характеризующийся формированием макрофагальных гранул в лимфатических узлах, легких, сердце и других тканях, могут вызывать зернистые формы микобактерий туберкулеза. Они, как и другие L-формы микробов, по размерам относятся к наноматериалам. Но неизвестна хемилуминесцентная характеристика свойств поверхности подобных форм микробов, поэтому нельзя сопоставить их со свойствами поверхности неорганических наночастиц и высказать мнение о вероятности провоцирования подобных изменений.

Несмотря на высокую биологическую активность наноматериалов, ни в коем случае не следует преувеличивать их потенциальную опасность.

Сведения об авторах

Величковский Борис Тихонович, д.м.н., профессор, академик РАМН, Российский государственный медицинский университет, г. Москва; e-mail: borisvel@comtv.ru

В связи с тем, что огромная удельная поверхность наночастиц обуславливает их практически мгновенную коагуляцию в воздухе рабочей зоны и достаточно быстрое оседание в виде хлопьев, возникновение опасных концентраций наноматериалов представляется маловероятным. Об этом свидетельствует, в частности, опыт нашей лаборатории, исследовавшей опасность развития профессиональной патологии у рабочих французской корпорации SNECMA MOTEURS. Рабочие, занятые на армировании сопел ракет и вентиляционных лопаток турбореактивных двигателей, жаловались на воспаление слизистой глаз и раздражение кожных покровов. В связи с высокой кратностью воздухообмена в производственных помещениях запыленность воздуха весовым методом практически не определялась. У дирекции возникло подозрение о наличии в углеродистых нановолокнах каких-то неизвестных аллергенов. Исследования показали, что всё дело в высоком модуле упругости указанных волокон, превышающем прочность стали. Попадая на слизистую глаз, такая мельчайшая острая частица, не видимая не только глазом, но и аппаратурой окулиста, чисто механически ранит её и вызывает травматическое воспаление. Снабжение рабочих соответствующей спецодеждой полностью ликвидировало все жалобы и объективные изменения.

Для предприятий, производящих и использующих наночастицы любого состава и происхождения как и для производств, характеризующихся поступлением в воздух рабочей зоны высокодисперсных аэрозолей конденсации оксидов металлов, общеобменная вентиляция малоэффективна. Более рациональна местная вытяжная вентиляция в виде индивидуального бортового отсоса со скоростью всасывания 3,0 – 3,5 м/сек и сдува, отклоняющего от лица рабочего поток образующихся аэрозолей и увлекающего его в сторону воздухоприемника.

Наиболее быстрым, информативным и относительно дешевым способом выявления характера биологического воздействия наночастиц является хемилуминесцентный метод исследования. Хемилуминометры выпускаются отечественными приборостроительными фирмами и стоят несравненно дешевле приборов, рекомендуемых Роспотребнадзором. Информация об отечественных хемилуминесцентных методах имеется в Интернете. Все варианты хемилуминесцентного исследования нерастворимых микрочастиц тщательно разработаны и опубликованы, в частности, в методическом пособии «Методы определения влияния фиброгенной пыли на организм в эксперименте и клинике» (2003). Поэтому хемилуминесцентный метод следует дополнительно внести в перечень приборов, указанных в методических рекомендациях Роспотребнадзора «Оценка безопасности наноматериалов».

С.А. Витязева, Т.П. Старовойтова, В.И. Дубровина, С.А. Татарников, Т.Т. Шкаруба

МОРФОЛОГИЧЕСКАЯ ОЦЕНКА ИЗМЕНЕНИЙ В ИММУНОКОМПЕТЕНТНЫХ ОРГАНАХ МОРСКИХ СВИНОК, ЗАРАЖЕННЫХ *FRANCISELLA TULARENSIS* РАЗНЫХ ПОДВИДОВ*Иркутский научно-исследовательский противочумный институт Сибири и Дальнего Востока (Иркутск)*

Проведены исследования по изучению влияния туляремийного микроба разных подвидов на морфологические изменения в иммунокомпетентных органах экспериментальных животных с помощью компьютерной программы «Морфометрия». На основе морфометрического анализа функционально значимых структур макроорганизма идентифицированы иммунные маркеры, обладающие прогностическим значением для характеристики течения инфекционного процесса, вызванного *F. tularensis* разных подвидов.

Ключевые слова: туляремийный микроб, лимфатический узел, селезенка, морфометрия

MORPHOLOGICAL EVALUATION OF CHANGES IN IMMUNOCOMPETENT ORGANS OF GUINEA PIGS INFECTED WITH DIFFERENT *FRANCISELLA TULARENSIS* SUBSPECIES

S.A. Vityazeva, T.P. Starovoitova, V.I. Dubrovina, S.A. Tatarnikov, T.T. Shkaruba

Irkutsk Antiplague Research Institute of Siberia and Far East (Irkutsk)

Immune response in spleen and lymph nodes of guinea pigs followed to inoculation of various *Francisella tularensis* subspecies was evaluated at light-optical level with the computer programs «Motic Images Plus» (Version 2) and «Morphometry». The findings can be prognostic for characterization of the infectious process.

Key words: *Francisella tularensis*, lymph node, spleen, morphometry

Туляремия, как нозологическая форма известна уже давно, причина высокой патогенности ее возбудителя остается загадкой [7]. Число зарегистрированных случаев заболевания во всем мире относительно низкое, но риск использования *Francisella tularensis* в качестве биологического оружия заставляет глубже изучать ее патогенез, а также разрабатывать эффективные вакцины и терапевтические методы против туляремии.

Несмотря на большое количество работ, посвященных этой проблеме, недостаточно уделяется внимания изучению патоморфологических изменений иммунокомпетентных органов экспериментальных животных [3, 7, 8]. Между тем, изучение морфофункционального состояния иммунокомпетентных органов с применением морфометрического метода для изучения морфологических изменений, происходящих в иммунной системе организма, позволяет количественно характеризовать состояние клеточных популяций и взаимоотношения отдельных органных структур и может служить прогностическим критерием исхода инфекционного процесса [1, 6].

Целью данного исследования явилось изучение влияния туляремийного микроба разных подвидов на морфологические изменения в иммунокомпетентных органах экспериментальных животных.

МЕТОДИКА

Экспериментальной моделью в опытах служили 95 беспородных, но стандартных по условиям содержания и массе (250 – 300 г) морских свинок обоих полов.

В качестве объектов исследования использовали 6 штаммов возбудителя туляремии – вакцинный *Francisella tularensis* 15 НИИЭГ (*F. tularensis* subsp. *holarctica*); *F. tularensis* subsp. *tularensis* И-163 (Schu 11), *F. tularensis* subsp. *holarctica* И-94 (401), И-250 (306); *F. tularensis* subsp. *mediaasiatica* И-357 (А-120); *F. tularensis* subsp. *novicida-like* И-383 (F 6168). Инфекционный процесс вызывали введением морским свинкам подкожно туляремийного микроба всех выбранных для исследования штаммов в дозе 100 м.к./мл.

Забор материала для исследования (регионарный лимфатический узел и селезенка) проводили на 3-и, 6-е, 10-е сутки с момента заражения. В экспериментах морских свинок умерщвляли гуманным способом в соответствии с «Правилами проведения работ с использованием экспериментальных животных» (2003). Животных усыпляли хлороформом и немедленно проводили вскрытие, что обеспечивало близкое к прижизненному состоянию, забираемых на гистологическое исследование, органов. Материал фиксировали в 10% нейтральном формалине, заливали в парафин. В работе использовали методы обзорной микроскопии с применением окрасок гематоксилином-эозином, метиловым зеленым-пиронином [4]. Количественную оценку пиронинофильных клеток (плазматических) лимфатического узла и селезенки проводили с использованием морфометрии [1], измерение площади лимфатического фолликула и его реактивного центра, – с помощью компьютерной программы «Motic Images Plus» (версия 2). Автоматический анализ изображения производили с помощью светового микро-

скопа «Zeiss» (Германия) с видеокамерой «Moticam 2000», разрешение 1392 × 1040 пикселей, об. 100. Статистическую обработку проводили с помощью программы Microsoft Excel (2003) корпорации Microsoft. Достоверными считали различия при уровне значимости $p < 0,05$, $p < 0,01$.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Установлено, что на начальной стадии инфекционного процесса (3 сут.) у морских свинок, зараженных *F. tularensis* subsp. *tularensis* И-163, имеет место редукция фолликулов иммунокомпетентных органов (табл. 1, 2), которая проявляется уменьшением общей площади фолликула в 1,2–1,5 раза по сравнению с показателями у интактных животных.

К 6-м сут. происходит увеличение как площади самих фолликулов (в 1,6 раза при $p < 0,05$), так и реактивных центров, показатели которых снижаются к 10-м сут. К 3-м сут. в селезенке и лимфатических узлах отмечается увеличение количества плазматических клеток (табл. 3) по сравнению с интактными животными (в 1,6–6,2 раза), достигая пика к 6-м сут. (в 11,2–14,7 раза при $p < 0,01$), и резко снижается к 10-м сут. (в 3,5–4,0 раза при $p < 0,01$). Менее выраженные изменения отмечаются у животных, зараженных штаммами *F. tularensis* subsp. *holarctica* И-250 и И-94, которые проявляются отсутствием признаков разрушения структуры фолликулов иммунокомпетентных органов, незначительного увеличения их общей площади и реактивных центров во все сроки наблюдения. Число плазматических клеток у животных, зараженных этими штаммами, начиная с 3-х сут. постепенно увеличивается (в 1,5–4,7 раза, по сравнению с интактными животными), достигая максимальных значений к 10 сут. (в 3,8–9,0 раза при $p < 0,01$ по сравнению с контролем), однако у животных, зараженных штаммом И-94, непатогенным для морских свинок, эти показатели значительно выше (в 8,6–23,5 раза при $p < 0,01$).

У животных, зараженных штаммом *F. tularensis* subsp. *mediaasiatica* И-357 изменения в регионарном лимфатическом узле отмечается уже на 3 сут., выражающиеся в увеличении как площади самого фолликула (в 3,6 раза), так и реактивного центра (в 14,0 раз), а к 6-м сут. эти показатели снижаются, но тем не менее, превышают значения у интактных

животных в 1,6 и 3,0 раза соответственно. Площадь лимфатических фолликулов к 10-м сут. наблюдения соответствует контрольным значениям, а реактивного центра – в 2,0 раза выше. В селезенке подобные изменения отмечались на 6–10-е сут. Увеличение количества плазмодитов в иммунокомпетентных органах происходит в эти же сроки, превышая в 6,2–9,7 раза показатели в контроле.

В селезенке и регионарном лимфатическом узле животных, зараженных штаммами *F. tularensis* 15 НИИЭГ и *F. tularensis* subsp. *novicida* И-383 отмечается увеличение в 2,2–7,8 раза числа плазматических клеток на 3-и сут., достигая максимальных значений к 10-м сут. (в 14,8–25,0 раз выше, чем у интактных). Площадь фолликулов селезенки и регионарного лимфатического узла (табл. 2, 3) значительно увеличиваются к 3-м сут., достигая максимальных значений к 6–10-м сут. (в 2,8–3,1 и 3,0–3,5 раза больше, чем у интактных). Также отмечено значительное увеличение и реактивного центра в селезенке – в 13,0–19,0 раз, в лимфоузле – в 8,0–17,0 раз.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, изменения микроанатомической организации (увеличение площади фолликула и реактивного центра) и повышение числа плазматических клеток в селезенке и лимфатических узлах свидетельствует об активизации В-зависимых зон иммунокомпетентных органов и, следовательно, о развитии иммунологических реакций гуморального типа [2, 5]. Этот процесс наиболее выражен у животных, инфицированных *F. tularensis* subsp. *novicida* И-383, *F. tularensis* subsp. *holarctica* И-94 и *F. tularensis* 15 НИИЭГ в отличие от морских свинок, зараженных штаммом *F. tularensis* subsp. *mediaasiatica* И-357, у которых данные показатели были значительно ниже. Выявленное в ходе исследования отсутствие реакции со стороны иммунокомпетентных органов животных, зараженных штаммом *F. tularensis* subsp. *tularensis* И-163 и слабовыраженная у морских свинок, инфицированных *F. tularensis* subsp. *holarctica* И-250, указывает на слабую сопротивляемость организма на внедрение патогена, вследствие чего, инфекционный процесс в этих случаях приводит к гибели животных в ранние сроки наблюдения (6–10-е сут.).

Таблица 1
Площадь фолликула и реактивного центра в селезенке морских свинок, зараженных *F. Tularensis*

Штамм	Сроки наблюдения (сут.)					
	3		6		10	
	S фол.	S р.ц.	S фол.	S р.ц.	S фол.	S р.ц.
15-В	1,2	1,5	1,2	1,5	1,2	1,5
И-383	1,2	1,5	1,2	1,5	1,2	1,5
И-357	1,2	1,5	1,2	1,5	1,2	1,5
И-94	1,2	1,5	1,2	1,5	1,2	1,5
И-250	1,2	1,5	1,2	1,5	1,2	1,5
И-163	1,2	1,5	1,2	1,5	1,2	1,5
Контроль	1,2	1,5	1,2	1,5	1,2	1,5

Примечание: * – $p < 0,05$; ** – $p < 0,01$ статистическая значимость различий по отношению к контролю; S фол. – общая площадь фолликула в мкм; S р.ц. – площадь реактивного центра в мкм.

Таблица 2

Площадь фолликула и реактивного центра в регионарном лимфатическом узле морских свинок, зараженных *F. Tularensis*

А	" " "					
	"		*"		%\$"	
	G' "	G' " "	G' "	G' " "	G' "	G' " "
%)! "	ÍÈJÀ†ÀÈÈÈÈÀ	FÈFÀ†ÀÈÈÈÈÀ	ÍÈFÀ†ÀÈÈÈÈÀ	FÈHÀ†ÀÈÈÈÈÀ	ÍÈTÀ†ÀÈÈÈÈÀ	ÈÈTÀ†ÀÈÈÈÈÀ
!', "	HÈGÀ†ÀÈÈÈÈÀ	ÈÈTÀ†ÀÈÈÈÈÀ	ÍÈHÀ†ÀÈÈÈÈÀ	FÈTÀ†ÀÈÈÈÈÀ	ÍÈTÀ†ÀÈÈÈÈÀ	FÈFÀ†ÀÈÈÈÈÀ
!) +'	ÍÈTÀ†ÀÈÈÈÈÀ	FÈTÀ†ÀÈÈÈÈÀ	GÈIÀ†ÀÈÈÈÈÀ	ÈÈHÀ†ÀÈÈÈÈÀ	FÈTÀ†ÀÈÈÈÈÀ	ÈÈGÀ†ÀÈÈÈÈÀ
!-('	FÈTÀ†ÀÈÈÈÈÀ	ÈÈGÀ†ÀÈÈÈÈÀ	FÈFÀ†ÀÈÈÈÈÀ	ÈÈHÀ†ÀÈÈÈÈÀ	FÈTÀ†ÀÈÈÈÈÀ	ÈÈGÀ†ÀÈÈÈÈÀ
!&)\$'	HÈFÀ†ÀÈÈÈÈÀ	ÈÈGÀ†ÀÈÈÈÈÀ	FÈTÀ†ÀÈÈÈÈÀ	ÈÈIÀ†ÀÈÈÈÈÀ	FÈTÀ†ÀÈÈÈÈÀ	ÈÈGÀ†ÀÈÈÈÈÀ
!%*''	FÈGÀ†ÀÈÈÈÈÀ	ÈÈFÀ†ÀÈÈÈÈÀ	GÈIÀ†ÀÈÈÈÈÀ	ÈÈFÀ†ÀÈÈÈÈÀ	GÈGÀ†ÀÈÈÈÈÀ	ÈÈFÀ†ÀÈÈÈÈÀ
	FÈTÀ†ÀÈÈÈÈÀ	ÈÈFÀ†ÀÈÈÈÈÀ	À			

Примечание: * – $p < 0,05$; ** – $p < 0,01$ статистическая значимость различий по отношению к контролю; S фол. – общая площадь фолликула в мкм; S р.ц. – площадь реактивного центра в мкм.

Таблица 3

Количество плазматических клеток в иммунокомпетентных органах морских свинок, зараженных *F. Tularensis*

А	#					
	" " "					
	"	*"	%\$"	"	*"	%\$"
%)! "	HÈJÀ†ÀÈÈÈÈÀ	ÍÈJÀ†ÀÈÈÈÈÀ	FÈÈÀ†ÀÈÈÈÈÀ	GÈIÀ†ÀÈÈÈÈÀ	ÍÈJÀ†ÀÈÈÈÈÀ	FÈÈÀ†ÀÈÈÈÈÀ
!-('	GÈGÀ†ÀÈÈÈÈÀ	HÈGÀ†ÀÈÈÈÈÀ	JÈGÀ†ÀÈÈÈÈÀ	FÈTÀ†ÀÈÈÈÈÀ	GÈJÀ†ÀÈÈÈÈÀ	JÈIÀ†ÀÈÈÈÈÀ
!&)\$'	FÈÈÀ†ÀÈÈÈÈÀ	HÈGÀ†ÀÈÈÈÈÀ	FÈJÀ†ÀÈÈÈÈÀ	FÈJÀ†ÀÈÈÈÈÀ	FÈFÀ†ÀÈÈÈÈÀ	HÈTÀ†ÀÈÈÈÈÀ
!%*''	ÈÈTÀ†ÀÈÈÈÈÀ	ÍÈTÀ†ÀÈÈÈÈÀ	GÈÈÀ†ÀÈÈÈÈÀ	GÈIÀ†ÀÈÈÈÈÀ	ÍÈJÀ†ÀÈÈÈÈÀ	FÈIÀ†ÀÈÈÈÈÀ
!) +'	ÈÈJÀ†ÀÈÈÈÈÀ	HÈTÀ†ÀÈÈÈÈÀ	ÍÈHÀ†ÀÈÈÈÈÀ	ÈÈTÀ†ÀÈÈÈÈÀ	GÈIÀ†ÀÈÈÈÈÀ	HÈJÀ†ÀÈÈÈÈÀ
!', "	GÈIÀ†ÀÈÈÈÈÀ	ÍÈTÀ†ÀÈÈÈÈÀ	ÍÈIÀ†ÀÈÈÈÈÀ	ÈÈJÀ†ÀÈÈÈÈÀ	ÍÈTÀ†ÀÈÈÈÈÀ	ÍÈÈÀ†ÀÈÈÈÈÀ
	ÈÈTÀ†ÀÈÈÈÈÀ			ÈÈIÀ†ÀÈÈÈÈÀ		

Примечание: * – $p < 0,05$; ** – $p < 0,01$ статистическая значимость различий по отношению к контролю.

Полученные результаты способствуют более глубокому пониманию патологического процесса, вызванного *F. tularensis* разных подвидов и потенциальной идентификации иммунных маркеров, связанных с выздоровлением, что может иметь прогностическое значение для характеристики течения инфекционного процесса.

ЛИТЕРАТУРА

1. Автандилов Г.Г. Медицинская морфометрия / Г.Г. Автандилов. – М.: Медицина, 1990. – 384 с.
 2. Галактионов В.Г. Иммунология: Учебник. – М.: «РИЦ МДК», 2000. – 487 с.
 3. Исупов И.В. Морфологическая характеристика чумы, холеры, сибирской язвы, туляремии и бруцеллеза у животных / И.В. Исупов. – Саратов. – 1998. – 93 с.

4. Меркулов Г.А. Курс патогистологической техники / Г.А. Меркулов. – Л.: Медицина, 1969. – 423 с.
 5. Сапин М.Р. Иммунная система, стресс и иммунодефицит / М.Р. Сапин, Д.Б. Никитюк. – М.: АПП «Джангар», 2000. – 184 с.
 6. Селятицкая В.Г. Эндокринно-лимфоидные отношения в динамике адаптивных процессов / В.Г. Селятицкая, Л.А. Обухова. – Новосибирск: Со РАМН. – 2001. – 168 с.
 7. Histologic and molecular diagnosis of tularemia: a potential bioterrorism agent endemic to North America / L.W. Lamps [et al.] // Modern Pathology. – 2004. – Vol. 17. – P. 489–495.
 8. Identification of Immunologic and Pathologic Parameters of Death versus Survival in Respiratory Tularemia / D. Chiavolini [et al.] // Infect. Immun. – 2008. – Vol. 76, N. 2. – P. 486–496.

Сведения об авторах

Витязева Светлана Александровна, к.м.н., младший научный сотрудник лаборатории патофизиологии Иркутского научно-исследовательского противочумного института Сибири и Дальнего Востока; 664047, г. Иркутск, ул. Трилиссера 78; тел.: 8 (3952) 22-01-35, факс: 8 (3952) 22-01-40, e-mail: adm@chumin.irkutsk.ru
Старовойтова Татьяна Пантелеевна, научный сотрудник Иркутского научно-исследовательского противочумного института Сибири и Дальнего Востока, тел. 8 (3952) 22-01-35, факс: 8 (3952) 22-01-40
Дубровина Валентина Ивановна, д.б.н., старший научный сотрудник, зав. лабораторией патофизиологии Иркутского научно-исследовательского противочумного института Сибири и Дальнего Востока; тел.: 8 (3952) 22-01-35, факс: 8 (3952) 22-01-40
Татарников Станислав Александрович, научный сотрудник Иркутского научно-исследовательского противочумного института Сибири и Дальнего Востока; тел.: 8 (3952) 22-01-35, факс: 8 (3952) 22-01-40
Шкаруба Татьяна Тимофеевна, научный сотрудник Иркутского научно-исследовательского противочумного института Сибири и Дальнего Востока; тел. 8 (3952) 22-01-35, факс: 8 (3952) 22-01-40

ПРАВИЛА ОФОРМЛЕНИЯ СТАТЕЙ В «БЮЛЛЕТЕНЬ ВСНЦ СО РАМН»

Редакционная коллегия «Бюллетеня ВСНЦ СО РАМН» обращает внимание авторов на необходимость соблюдать следующие правила.

1. Статья должна иметь визу руководителя учреждения, сопроводительное письмо из учреждения, где выполнена работа, на фирменном бланке, экспертное заключение о возможности опубликования.

2. Статья должна быть напечатана на одной стороне листа формата А4. В редакцию направляется магнитный диск с записью статьи в текстовом редакторе Word 6 или выше и один распечатанный экземпляр.

3. Рекомендуемый шрифт — Times New Roman, 12 кегль, интервал — одинарный; поля: верх — 2,5, низ — 2, слева — 3, справа — 1. Все рисунки должны быть представлены каждый отдельным файлом в формате TIFF с разрешением не менее 300 ppi. Диаграммы, графики и таблицы должны быть выполнены в программах MS Word, MS Excel или Statistica и представлены отдельными файлами.

4. Объем статей с иллюстрациями, подписями к ним, таблицами, списком литературы и рефератом не должен превышать 8 страниц.

5. В начале первой страницы пишут: индекс УДК, инициалы и фамилию автора (-ов), название статьи, учреждение, в котором выполнена работа, город, реферат на русском языке, ключевые слова на русском языке (не более 4), реферат на английском языке, ключевые слова на английском языке.

Затем идет текст статьи, список литературы. На отдельных листах печатаются таблицы, рисунки, подрисуночные подписи.

6. При представлении в печать научных экспериментальных работ авторы должны указывать сведения о количестве, видах использованных лабораторных сертифицированных животных, источниках их получения, применявшиеся методы обезболивания и умерщвления животных (строго в соответствии с «Правилами проведения работ с использованием экспериментальных животных», утвержденными приказом МЗ СССР).

7. Статьи экспериментального и клинического характера после короткого введения необходимо снабжать подзаголовками «Методика», «Результаты», «Заключение» или «Выводы».

8. Изложение статьи должно быть ясным, сжатым, без повторений и дублирования в тексте данных таблиц и рисунков. Статья должна быть тщательно выверена авторами. Все буквенные обозначения и аббревиатуры должны быть расшифрованы в тексте.

9. Все цитаты, приводимые в статьях, необходимо тщательно проверить. Должна быть ссылка на пристатейный список литературы.

10. Все термины должны быть унифицированы с учетом Международной классификации болезней 10-го пересмотра.

11. Сокращение слов, имен, названий (кроме общепринятых сокращений мер, физических и математических величин и терминов) не допускается. Необходимо строго придерживаться международных номенклатур. Единицы измерений даются по системе СИ.

12. В тексте обозначаются места расположения рисунков и таблиц, с указанием номера рисунка или таблицы и их названия.

13. В конце статьи ставятся подписи всех авторов. Необходимо указать фамилии авторов, полностью имя и отчество, должность, ученые степени и звания, полный почтовый адрес (с шестизначным индексом) и номер телефона того автора, с которым редакция будет вести переписку.

14. Количество иллюстраций (фотографии, рисунки, диаграммы, графики) должно быть минимальным (не более 3-х монтажей фотографий или рисунков).

Фотографии должны быть прямоугольными, контрастными в формате TIFF (с разрешением не менее 300 dpi), рисунки — четкими, диаграммы и графики выполнены в редакторе MS Word или MS Excel с выводом через лазерный принтер.

Все иллюстрации необходимо присылать в одном экземпляре. На обороте фотографии и рисунка карандашом ставится номер, фамилия первого автора, название статьи, обозначается верх и низ.

Микрофотографии необходимо давать в виде компактных монтажей. В подписях к микрофотографиям указывают увеличение, метод окраски. Если рисунок дан в виде монтажа, детали которого обозначены буквами, обязательно должна быть общая подпись к нему и пояснения всех имеющихся на нем цифровых и буквенных обозначений.

Рисунки вкладываются в конверт, на котором пишут фамилию автора (-ов) и название статьи.

15. Таблицы должны быть наглядными и компактными. Все таблицы нумеруют арабскими цифрами и снабжают заголовками. Предельное число знаков в таблице — 65, включая ее голову и считая за один знак каждый символ, пробел, линейку. Название таблицы и заголовки граф должны точно соответствовать ее содержанию.

16. Библиографические ссылки в тексте статьи даются номерами в квадратных скобках в соответствии с пристатейным списком литературы. В оригинальных статьях цитируется не более 15 источников, в передовых статьях и обзорах — не более 30. В список литературы не включаются неопубликованные работы и учебники.

17. Пристатейный список литературы должен оформляться в соответствии с ГОСТ 7.1-8.4 с изменениями от 1 июля 2000 г.

Сокращение русских и иностранных слов или словосочетаний в библиографическом описании допускается только в соответствии с ГОСТ 7.12-77 и 7.11-78.

18. К статье прилагается реферат, отражающий основное содержание работы, размером не более 15 строк машинописи в 1 экземпляре на русском и английском языке. В реферате на английском языке необходимо указать: название статьи, фамилии всех авторов, полное название учреждения, а также ключевые слова.

19. Редакция оставляет за собой право сокращать и исправлять принятые работы. Статьи, направленные авторам на исправление, должны быть возвращены в редакцию не позднее чем через месяц после получения с внесенными изменениями (плюс носитель с исправленной статьей). Если статья возвращена в более поздний срок, соответственно, меняется и дата ее поступления в редакцию.

20. Не допускается направление в редакцию статей, уже публиковавшихся или посланных на публикацию в другие журналы.

21. Статьи рецензируются редакционным советом.

22. Рукописи, принятые для опубликования, авторами, которых являются аспиранты, публикуются бесплатно.

23. Рукописи, оформленные не в соответствии с указанными правилами, не рассматриваются.

24. Не принятые к опубликованию рукописи авторам не возвращаются, по запросу автора направляется аргументированный отказ в письменной (электронной) форме.

25. Корректурa авторам не высылается, и вся дальнейшая сверка проводится редакцией по авторскому оригиналу.

26. Автор полностью несет ответственность за стиль работы и за перевод реферата.

Формат 60×84 1/8. Бумага офсетная. Сдано в набор 02.12.2009. Подписано в печать 15.12.2009.
Печ. л. 5,2. Усл. печ. л. 4,75. Уч. изд. л. 3,9. Зак. 301-09. Тир. 500.

РИО НЦРВХ СО РАМН
(664003, Иркутск, ул. Борцов Революции, 1. Тел. 29-03-37. E-mail: arleon58@gmail.com)