

На правах рукописи

Рожкова Ирина Семеновна

**ХРОНОБИОЛОГИЧЕСКИЕ АСПЕКТЫ ОНТОГЕНЕЗА В
ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ МОДЕЛИ ХРОНИЧЕСКОГО СТРЕССА И
ЕГО КОРРЕКЦИИ КОМПЛЕКСОМ АНТИОКСИДАНТОВ**

1.5.5 – Физиология человека и животных

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени

доктора биологических наук

Майкоп - 2022

Работа выполнена в Федеральном государственном бюджетном образовательном учреждении высшего образования «Астраханский государственный университет» им. В.Н. Татищева и Федеральном государственном бюджетном образовательном учреждении высшего образования «Астраханский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения России при поддержке Гос. задания по теме № АААА-А18-118012290371-3.

Научный консультант: **Теплый Давид Львович**
доктор биологических наук, профессор,
заслуженный работник Высшей школы РФ

Официальные оппоненты: **Джандарова Тамара Исмаиловна**
доктор биологических наук, доцент,
ФГАОУ ВО «Северо-Кавказский федеральный университет», кафедра анатомии и физиологии медико-биологического факультета, заведующий кафедрой

Чернышева Марина Павловна
доктор биологических наук, доцент,
ЧОУ ВО «Санкт-Петербургский медико-социальный институт», кафедра медико-биологических дисциплин,
профессор

Вербицкий Евгений Васильевич
доктор биологических наук, профессор,
ФГБУН Федеральный исследовательский центр «Южный научный центр Российской академии наук», лаборатория наземных экосистем, главный научный сотрудник

Ведущая организация: Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Ставропольский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения России

Защита диссертации состоится 14 декабря 2022г. в 13 часов, на заседании Диссертационного совета 24.2.267.02 при ФГБОУ ВО «Адыгейский государственный университет» по адресу: 385000, Республика Адыгея, г. Майкоп, ул. Пионерская, 260, конференц-зал научной библиотеки АГУ.

С диссертацией можно ознакомиться в научной библиотеке им. Д.А. Ашхамафа ФГБОУ ВО «Адыгейский государственный университет» по адресу: 385000, Республика Адыгея, г. Майкоп, ул. Пионерская, 260, и на сайте университета www.adygnet.ru/nauka/aspirantura-doktorantura-dissertatsionnye-sovety/dissertation/4512/

Автореферат разослан «___» _____ 2022 г.

Ученый секретарь
диссертационного совета
кандидат биологических наук, доцент



Т.В. Челышкова

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность исследования. В настоящее время, биологические ритмы признаны важнейшим механизмом регуляции функций организма, обеспечивающим гомеостаз, динамическое равновесие и процессы адаптации биологических систем (Комаров Ф.И., Рапопорт С.И. и др., 2017; Бродский В.Я., 2021). В связи с этим хронобиологический подход в онтогенетических исследованиях приобретает все большее значение, так как для любых живых систем свойственна пространственно-временная организация (Бродский В.Я., 2014; Чернышева М.П., 2016; Загускин С.Л., 2016). Среди всех прочих биологических ритмов особое место занимают окологосовые клеточные ритмы. Не имея явных экзогенных инициаторов, такие колебательные процессы ведут себя как выраженные осцилляторы (Brodsky V. Y., Lloyd D., 2008; Загускин С.Л., 2016) и их следует рассматривать как важный компонент временной организации тканей.

Ультранианые ритмы могут служить не только надежным маркером морфологической зрелости, но и функциональной активности ткани (Бродский В.Я., 2021). Регистрируя особенности таких колебаний при воздействии стрессогенных антропогенных факторов, можно выявить токсический эффект, так как они связаны со спецификой клеточного метаболизма и отражают его нестабильность (Фельдман Б.В. и др., 2011; Агаджанян Н.А. и др., 2013; Аношкина Е.В., 2016; Комаров Ф.И., Рапопорт С.И. и др., 2017).

В этом плане, особый интерес исследуемой проблемы обусловлен ухудшением экологической обстановки, связанной с загрязнением атмосферы серосодержащими продуктами. Одним из факторов экологической опасности для жизнедеятельности организма является сероводород. Являясь составным компонентом природного газа Астраханского газоконденсатного месторождения (АГКМ), сероводород обладает высокой токсичностью для всего живого (Доценко Ю.И., 2007; Фельдман Б.В., 2011; Боев В.М., 2013; Abzhalilova A.R., 2013; Guidotti T.L., 2015; Логинов П.В., 2016). Ежегодно в воздушный бассейн Астраханской области поступает до 230 тысяч тонн химических веществ, из которых до 90% составляют выбросы от работы промышленных предприятий и автотранспорта. При этом величина комплексной антропогенной нагрузки среды обитания на население, проживающее на урбанизированной территории в 4,9 раза выше, чем в сельской местности, вследствие накопления поллютантов в почве и воздухе (Куценко С.А., 2004; Сетко Н.П., Боев В.М., 2009; Боев М.В., 2013). По данным обследований, проведенным А.Т. Абдрашитовой с соавторами (2011«в») среди 1600 сотрудников предприятия ООО «Газпром добыча Астрахань», преобладающее большинство из них имеют признаки преждевременного старения, снижение иммунитета и рост онкозаболеваемости (Боев В.М. и др., 2017).

Проблема приобретает особую актуальность в связи с недостаточной изученностью иммунного ответа организма человека на территориях с повышенной антропогенной нагрузкой. При этом одним из эффективных путей сохранения и поддержания здоровья населения представляется поиск доступных адаптогенов для снижения интенсивности свободно-радикальных процессов, повышения активности ферментных систем и устойчивости тканей органов иммунной системы к экзогенным повреждающим воздействиям, а так же поиск средств необходимых для своевременной коррекции патологии иммунной системы на фоне хронического стресса.

Степень разработанности темы. В процессе эволюционного развития происходит не только непрерывное усложнение структуры живых систем, но и совершенствование их временной организации (Бродский В.Я., 2014; Чернышева М.П., 2016). К настоящему времени установлено, что биологические ритмы, с одной стороны, имеют эндогенную природу и генетическую регуляцию, с другой, их осуществление тесно связано с влиянием модифицирующих факторов внешней среды, так называемых датчиков времени (Бродский В.Я., 2021). Эта связь лежит в основе единства организма со средой, когда физиологические и экологические ритмы способны подстраиваться к изменениям

цикличности внешних условий, регулировать в определенных пределах интенсивность и характер биологических процессов, сдвигать фазы ритмов и менять их амплитуду.

В исследованиях ряда авторов показано, что сероводород, благодаря способности проникать через гистогематические барьеры и действовать в объеме циркулирующей крови, нарушает обменные процессы между микроциркуляторным руслом и клетками (Ярошинская А.П. и др., 2016), ингибирует электронный транспорт в митохондриях, путем формирования прочной связи с железом в молекулах цитохромоксидаз, изменяет активность митохондриальных ферментов, в том числе и в митохондриях иммунокомпетентных клеток (McGuire P. J., 2019). В результате нарушается биоритм митохондриальной функции, что приводит к биоэнергетическому распаду и образованию АФК (Scialo F. et al., 2017; Calamita P. et al., 2018; Caputi S. et al., 2019). Это существенно отражается на качестве энергообразования и вызывает острую тканевую гипоксию (Wallace J.L., Wang R., 2015; Fukami K., Sekiguchi F., Kawabata A., 2017; Шишкина Т.А. и др., 2018; Наумов А.В. и др., 2020). Согласно исследованию А.М. Косыревой с соавторами (2019) известно, что гипоксия и иммунные реакции тесно взаимосвязаны между собой на молекулярном, клеточном и организменном уровнях организации. Избыточное накопление свободных радикалов в тканях, приводит к снижению уровня утилизации кислорода, а в конечном итоге к дефициту энергии и развитию оксидативного стресса (Зенков Н.К., 2020). Угнетаются ферменты, нарушается кислотно-щелочное равновесие (Мажитова М.В., 2012; Голубкина Е.В., Дюкарева О.С., Тризно Н.Н. и др. 2019). В результате разрушающего действия продуктов перекисного окисления липидов на мембраны клеток происходит нарушение процессов передачи информации от внеклеточных регуляторов к внутриклеточным эффекторным системам (Теплый Д.Л., 2019 «б»).

Выраженность защитных реакций организма на внешние воздействия во многом зависит от морфофункционального состояния тканей органов иммунной системы (Родзаевская Е.Б. и др., 2017; Ваш И.Ю., 2019). Тимус как первичный орган иммунной системы чрезвычайно чувствителен к различным внешним и внутренним воздействиям (Донецкова А.Д., 2013; Москвичев Е.В., 2013; Старская И.С. и др., 2013; Комелькова М.В., 2015; Косырева А.М. и др., 2019; Alexandropoulos K., 2012; Roberts N. et al., 2014; Csaba G., 2016). Это дает основания считать, что возрастные изменения в вилочковой железе играют ключевую роль в ослаблении системы клеточного и гуморального иммунитета, особенно у лиц пожилого и старческого возраста (Кветной И.М. и др., 2005; Полякова В.О., 2007; Федорова Е.С., 2009). Как результат инволюции тимуса, ряд авторов отмечают снижение эффективности антиоксидантной защиты (Мустафин А.Г. и др., 2015; Умбетов Т.Ж., 2018; Теплый Д.Л., 2019«б»; Czesnikiewicz-Guzik M., 2007; Ong A.L.C. et al., 2018; Kolchina N., 2019), нарушение регуляции апоптоза, что может служить причиной преждевременного старения (Абдрашитова А.Т. и др., 2011«в»; Теплый Д.Л., 2019«а»; Хужахметова Л.К. и др., 2019; Бажанова Е.Д., Анисимов В.Н., 2020; Donehower L.A., 2002; Gentry A. et al., 2005; Beyfuss K. et al., 2018; Vineetha R.C. et al., 2018) и способствует формированию различных возрастных патологий (Теплый Д.Л., 2016; Стручко Г.Ю. и др., 2018; Giorgi C. et al., 2018).

Анализ литературных источников показывает, что малоизученным остается вопрос о биоритмальных возрастных и тканеспецифических особенностях реакции органов иммунной системы в норме и в условиях гипоксии, индуцированной хроническим воздействием серосодержащего газа, а так же о динамике в них процессов свободно-радикального окисления и уровня апоптоза, обусловленных стрессом и при коррекции комплексом антиоксидантов. Учитывая вышесказанное, исследование хронобиологии и морфологии тканей органов иммунной системы в онтогенетическом аспекте с учетом влияния экстремальных условий внешней среды является весьма актуальным и перспективным, а также будет иметь несомненный интерес для понимания механизмов поддержания гомеостаза и адаптации к работе в условиях гипоксии.

Цель исследования: Выявить особенности хронобиологических процессов на разных этапах онтогенеза в экспериментальной модели стресса и коррекции его антиоксидантным комплексом.

Для реализации поставленной цели были определены следующие **задачи:**

1. Изучить окологасовые ритмы биохимических показателей в плазме крови (уровня содержания общего белка, альбумина и глобулинов) и в тимусе, в паховых лимфатических узлах и селезенке (уровня общего белка и альбумина) у крыс разного возраста в норме и подвергшихся хроническому воздействию природным газом Астраханского газоконденсатного месторождения.
2. Провести анализ динамики свободно-радикальных процессов в плазме крови и в органах иммунной системы у крыс разного возраста в норме и в ответ на действие природного газа Астраханского газоконденсатного месторождения.
3. Определить возрастные особенности морфофункционального состояния тканей иммунной системы крыс и морфогенеза, в том числе, по уровню апоптоза в этих тканях, в экспериментальной модели хронического стресса.
4. Выявить влияние антиоксидантного комплекса на окологасовые ритмы исследуемых показателей в плазме крови и тканях органов иммунной системы в экспериментальной модели действия природного газа Астраханского газоконденсатного месторождения.
5. Изучить действие комплекса антиоксидантов на свободно-радикальные процессы в плазме крови и тканях иммунной системы крыс в экспериментальной модели хронического стресса.
6. Установить влияние антиоксидантного комплекса на морфогенез и морфофункциональное состояние тканей иммунной системы крыс в экспериментальной модели действия природного газа Астраханского газоконденсатного месторождения.

Научная новизна. Экспериментальное исследование вносит важный вклад в изучение механизмов и закономерностей формирования хронофизиологических процессов в организме под влиянием экологических факторов среды, в изменение характера и интенсивности биоритмальных процессов при воздействии природного сероводородсодержащего газа, а так же в условиях введения комплекса антиоксидантов на фоне гипоксического стресса. В работе впервые:

- установлено, что маркером функциональной активности плазмы крови и тканей органов иммунной системы в онтогенезе животных является окологасовой ритм содержания белков в норме и в условиях стресса, проявляющийся в изменении кинетических кривых: в снижении амплитуды колебаний, изменении периодов ритма.

- с применением хронобиологического, биохимического, общегистологического и цитофотометрического исследований изучены структурно-функциональные и биохимические показатели развития тканей органов иммунной системы крыс на разных этапах постнатального онтогенеза в норме, при воздействии природного сероводородсодержащего газа и в условиях применения комплекса антиоксидантов на фоне стресса.

- сопоставлена интенсивность биоритмической организации и показаны неизвестные ранее отличия в динамике окологасовых ритмов содержания изучаемых белков в плазме крови, тимусе, в паховых лимфатических узлах и селезенке крыс разного возраста при нормальном развитии, при воздействии природного газа АГКМ и в условиях применения комплекса антиоксидантов на фоне стресса. Установлен период наибольшей чувствительности к таким воздействиям.

- выявлены особенности возрастной динамики свободно-радикальных процессов в плазме крови и в органах иммунной системы крыс в норме. Проведена оценка влияния природного сероводородсодержащего газа на уровень свободно-радикальных процессов на изучаемых этапах постнатального онтогенеза и в условиях применения антиоксидантов на фоне стресса.

- прослежена взаимосвязь структурных изменений в органах иммунной системы крыс с возрастом экспериментальных животных. При этом установлены эффекты влияния на разных этапах онтогенеза используемого комплекса антиоксидантов.

- доказано корригирующее влияние комплекса антиоксидантов в условиях гипоксического стресса на состояние апоптоза клеточных элементов иммунной системы экспериментальных животных на разных этапах постнатального онтогенеза.

- изучены особенности структурно-функционального состояния клеток органов иммунной системы крыс в условиях хронической гипоксии, вызванной воздействием сероводородсодержащим газом, модифицирующим околочасовой ритм в онтогенетическом аспекте.

- показана возможность комплексного применения тималина и альфа-токоферола ацетата в качестве адаптогенов, способных повышать устойчивость белков плазмы крови, и одновременно синхронизировать деятельность иммунокомпетентных клеток тимуса, паховых лимфатических узлов и селезенки, для поддержания гомеостаза и адаптационных возможностей иммунной системы при стрессе.

Теоретическая значимость работы.

Направленность экспериментального исследования и полученные данные вносят весомый вклад в развитие теории стресса, существенно дополняя и расширяя современные представления о роли экологических факторов в формировании циклических процессов и изменении уровня их организации в организме.

Результаты выполненных исследований доказывают наличие возрастных особенностей динамики околочасовых ритмов уровня содержания общего белка, альбумина и глобулинов в плазме крови, а так же количества общего белка и альбумина в тканях органов иммунной системы, которые обеспечивают поддержание гомеостаза и адаптацию к работе в условиях гипоксии.

В процессе исследования доказано, что популяция иммунокомпетентных клеток модифицирует околочасовой ритм содержания общего белка и альбумина в пределах адаптивных возможностей ткани тимуса, паховых лимфоузлов и селезенки, выбирая оптимальный для этого набор периодов и амплитуды колебаний, что вносит существенный вклад в изучение фундаментальных проблем биоритмологии, дает возможность концептуально шире посмотреть на вопросы формирования механизмов и закономерностей морфофункциональных адаптивных возможностей тканей органов иммунной системы и плазмы крови на разных этапах онтогенеза.

Полученные данные, несомненно, важны для прогнозирования эффектов адаптивного иммунитета.

Экспериментальное исследование вносит весомый вклад в развитие новых современных научных направлений в биоритмологии: хронофизиологии и хроноэкологии.

Практическая значимость работы.

Полученные данные о состоянии плазмы крови, возрастных и тканеспецифических особенностях реакции органов иммунной системы на действие стрессогенного фактора промышленного происхождения, а так же данные об особенностях динамики процессов свободно-радикального окисления обусловленных стрессом, могут служить обоснованием возможности комплексного использования антиоксидантов для замедления темпов апоптоза и своевременной коррекции реактивности иммунной системы на фоне хронического стресса.

Установленные периоды наибольшей чувствительности к негативному экзогенному влиянию сероводородсодержащего газа могут использоваться для разработки комплексных охранных и профилактических мероприятий в экологически неблагоприятных зонах, где возможно внезапное появление или длительное присутствие токсикантов.

Результаты исследования могут служить основой для выбора наиболее эффективных методов профилактики и тактики коррекции хронической гипоксии,

вызванной воздействием сероводородсодержащего газа. Результаты исследований могут быть использованы в лекционных курсах и на практических занятиях в преподавании медико-биологических дисциплин (биологии, анатомии, гистологии, общей, возрастной и экологической физиологии).

Теоретико – методологическая основа исследования. Теоретическую основу диссертации составили научные представления:

– о биоритмологии и временной структуре организма, роли гормонов в генезе временных процессов (Чернышева М.П., Ноздрачев А.Д., 2006; Бродский В.Я., 2014; Загускин С.Л., 2016; Комаров Ф.И., 2017; Бродский В.Я., 2021);

– о стрессе, старении и их биохимической коррекции (Selye. H, 1985; Анисимов В.Н, 2000; Хавинсон В.Х., 2003; Тодоров И.Н., 2003; V.N. Anisimov, V.Kh. Khavinson 2010; Теплый Д.Л., 2019);

– о молекулярно-клеточных механизмах развития окислительного стресса (Ланкин В.З., 2001; Дубинина Е.Е., 2006; Меньшикова Е.Б., 2008; Кольтовер В.К., 2010; Зенков Н.К., 2020);

– о роли апоптоза при старении организма (Новиков В.С., 1996; Теплый Д.Л., 2019; Бажанова Е.Д., Анисимов В.Н., 2020);

– о регуляторных параметрах в адаптационном процессе на воздействие экстремальных природных факторов (Полунин И.Н., Асфандияров Р.И., 1999; Бучин В.Н., 2007; Фельдман Б.В., 2011; Агаджанян Н.А., 2013; Комаров Ф.И., Рапопорт С.И., 2017).

Методологическая основа работы представлена комплексным подходом к изучению хронобиологических аспектов онтогенеза иммунной системы с использованием биохимических, общегистологических и цитофотометрических методов исследования.

Для реализации поставленных целей и задач был проведен подробный анализ публикаций как отечественных, так и зарубежных авторов по теме диссертации. Разработан дизайн исследования, включавший три этапа: изучение динамики хронобиологических и структурно-функциональных процессов в тканях органов иммунной системы на разных этапах онтогенеза в естественных условиях жизнедеятельности лабораторных животных (крыс), а так же при экспериментальном моделировании гипоксического стресса и его коррекции комплексом антиоксидантов.

Организация и методы исследования. Опыты поставлены на 675 беспородных белых крысах - самцах, которых содержали в условиях вивария при обычном световом режиме и свободном доступе к пище и воде. Содержание и кормление животных проводилось в соответствии с «Санитарными правилами по устройству, оборудованию и «Содержанию экспериментально-биологических вивариев» (ГОСТ Р.50258-92). Все животные были подразделены на интактных (обозначенная в дальнейшем группа - К) – контрольные крысы, и на экспериментальных (стрессированные крысы). В соответствии с возрастом (Западнюк И.П. и др., 1983) все лабораторные животные были разделены на три группы: первая: молодые (неполовозрелые) – от 15 дней до 1 месяца; вторая: половозрелые – 6 – ти месячного возраста; третья: старые – 2-х лет жизни.

Экспериментальные животные подразделялись на две подгруппы: 1) животные, подвергавшиеся ингаляционному воздействию серосодержащим природным газом, в концентрации $90 \pm 4 \text{ мг/м}^3$ по сероводороду (обозначенная как подгруппа - ССГ); 2) животные, подвергавшиеся ингаляционному воздействию серосодержащим природным газом, в концентрации $90 \pm 4 \text{ мг/м}^3$ по сероводороду на фоне комплексного введения антиоксидантов (тималина и альфа-токоферола ацетата), обозначенная далее как подгруппа (ССГ+АО).

Животные второй подгруппы в течение 6 недель опыта через день получали внутримышечно тималин (производство Самсон – Мед ООО, г. Санкт – Петербург, Россия) из расчета 0,01мг на 100г массы тела. Введение альфа-токоферола ацетата (10% масляный раствор, производство Фармацевтическая фабрика Санкт – Петербурга ОАО, Россия) осуществлялось per os при помощи инсулинового шприца без иглы в дозе 0,5мг на

100г массы тела каждого животного в течение 14 дней до опыта и во время всего периода воздействия природным газом АГКМ.

Моделирование хронического эксперимента при ингаляции воздушно-газовой смеси проводилось согласно гигиеническим нормам к требованию выполнения и воспроизведения эксперимента (Токсикометрия химических веществ, 1986). Статическое воздействие серосодержащим природным газом, в концентрации 90 ± 4 мг/м³ по сероводороду проводилась 4 часа в день в течение 6 недель за исключением воскресных дней, строго с 10 до 14 часов. Экспериментальные исследования на животных проводились в осенне-зимний период для исключения влияния сезонных ритмов. Контрольных крыс помещали в ту же камеру, на тот же срок с обычным составом дыхательной смеси без примеси газа. По окончании эксперимента, т.е. с 14.00 (это условие строго соблюдалось для всех групп животных для чистоты эксперимента) осуществлялась наркотизация животных этаминалом натрия (внутрибрюшинно в дозе 5 мг на 100г массы тела), после чего производили декапитацию и осуществляли забор крови, ткани тимуса, паховых лимфатических узлов и селезенки через каждые 20 минут в течении 3-х часов. Гомогенизацию тканей тимуса, паховых лимфатических узлов и селезенки готовили в гомогенизаторе Даунса непосредственно перед измерением на фосфатном буфере 0,07М рН 7,45 (1:1).

Для решения поставленных задач применялись следующие методы:

1. Общегистологические:

а) для изучения цитоархитектоники органов и выявления хроматофильного вещества в иммунокомпетентных клетках срезы окрашивали 0,1% водным раствором крезилвиолета по Нисслию (Буреш Ян и др., 1991) и гематоксилином – эозином. Диаметр ядер клеток измеряли в плоскости оптического среза, проходящего через ядрышко. Площадь ядер в мкм² определяли по формуле $S=\pi/4 \times d_1 d_2$, где d_1 и d_2 - взаимно перпендикулярные диаметры ядер. В каждом случае изучалось не менее 100 клеток. Микроскопический анализ, морфометрию и фотографирование препаратов проводили с помощью микроскопа системы «Биолам» и окуляр – микрометра МОВ-1 15× при общем увеличении ×400. Микрофотографии получены с помощью цифровой фотокамеры Mercury Cyber Pix E-560 М и монокулярного оптического адаптера.

б) Определение апоптотических клеток проводили с помощью окраски этидием бромидом (Kumari S R. et al., 2000; Lim H H. et al., 2001; Vijayan A. et al., 2001; Vogt C J. et al., 2001). С помощью универсального люминесцентного микроскопа при увеличении ×40 и длине волны – 546 нм, подсчитывали количество апоптотических клеток с конденсированным хроматином в тимусе, паховых лимфатических узлах и селезенке. Уровень апоптоза находили процентным соотношением от числа нормальных клеток на 4-5 срезах каждого изучаемого органа, и далее определяли среднее количество на группу животных.

в) Определение относительного коэффициента массы органа ($M \pm m$, мг/100г веса животного) рассчитывали по формуле:

$m=A \times k$, где A – это разница между максимальным и минимальным значением массы органа; k – коэффициент для расчета стандартной ошибки.

$M=\sum p/n$, где $\sum p$ – сумма показателей массы, n – число наблюдений.

2. Биохимические:

а) Определение общего белка в плазме крови и в гомогенатах органов регистрировали с помощью биуретового метода, используя спектрофотометр Ваекман (США) производили измерения при длине волны 500—560 нм.

б) Определение содержания альбумина в плазме крови и в гомогенатах органов осуществлялось унифицированным методом, основанном на взаимодействии альбумина с бромкрезоловым зеленым. Измерения проводили на спектрофотометре Ваекман (США) при длине волны 630—690 нм. Уровень содержания глобулинов в плазме крови вычисляли определением разницы между уровнями содержания общего белка и альбумина плазмы крови.

в) Для оценки стресс - реакции проводилась эозинопеническая проба Торна, регистрирующая изменение числа эозинофилов в 1 мм^3 крови. Подсчет клеток производили в камере Горяева после окрашивания жидкостью Дунглера.

г) Определялись показатели свободнорадикальных процессов: ПОЛ в плазме крови и гомогенатах органов иммунной системы определяли по методу И.Д. Стальной и Т.Г. Гаришвили (1977) в модификации Е.А. Строева и В.Г. Макаровой (1986), основанном на взаимодействии МДА – с тиобарбитуровой кислотой, используя спектрофотометр UV mini 1240 UV-VIS SPECTROFOTOMETR SHIMADZU производили измерения при $\lambda = 530$ нм. В гомогенатах органов определяли: исх. ПОЛ по уровню содержания МДА в 0,05 г сырой массы ткани, а Сп. ПОЛ и Аск. ПОЛ по уровню МДА в пробе за 1 час инкубации.

ОМБ в плазме крови и гомогенатах тимуса, паховых лимфатических узлов и селезенки определяли на основе реакции взаимодействия окисленных аминокислотных остатков белков с 2,4-ДФГ с образованием окрашенных производных динитрофенилгидразона по методике Е.Е. Дубининой с соавторами (1995), используя спектрофотометр UV mini 1240 UV-VIS SPECTROFOTOMETR SHIMADZU при $\lambda = 530$ нм.

д) Математическая обработка данных производилась с использованием компьютерных программ «Statistica for Windows 6.0», «Microsoft Excel 2007» и «Cosinor Ellipse 2006». Достоверность различий полученных результатов определяли с помощью параметрического метода с определением t-критерия Стьюдента с поправкой Бонферрони и Ньюмена-Кейлса (С. Гланц, 1998) для множественных сравнений.

В связи со значительными различиями в содержании исследуемых показателей между плазмой крови и иммунокомпетентными органами при изложении результатов исследования для плазмы крови выражали изучаемые показатели в - г/л, а для органов (тимуса, лимфатических узлов и селезенки) в - условных единицах (у.е.).

Основные положения, выносимые на защиту:

1. Онтогенетические изменения окологосударственных осцилляций содержания белков плазмы крови и тканевых белков характеризуются снижением амплитуды и удлинением периодов колебаний у старых крыс по сравнению с неполовозрелыми и половозрелыми животными.

2. Адаптационный механизм при действии хронического стресса проявляется в снижении амплитуды колебаний, сглаживании кинетической кривой, изменении периодов окологосударственных осцилляций, уровня содержания белков, интенсификации свободно-радикальных процессов в плазме крови и тканях иммунной системы, а так же эозинопенией. Степень данных изменений зависит от возрастных особенностей уровня метаболических процессов.

3. В условиях хронического стресса наиболее выраженные морфологические изменения в тканях тимуса, паховых лимфатических узлов, селезенки (полнокровие сосудов, очаги диапедеза эритроцитов, измельчение и распад глыбок хроматофильного вещества, снижение плотности расположения иммунокомпетентных клеток), а так же повышение уровня апоптоза в тканях иммунной системы характерны для неполовозрелых и старых животных.

4. Воздействие комплексом антиоксидантов (тималина и α -токоферола ацетата) способствует снижению влияния хронического стресса на изменение амплитуды колебаний биохимических показателей в плазме крови и тканях иммунной системы у животных разных возрастных групп. За счет антиоксидантного и антиапоптотического действия комплекс препаратов наиболее выражено защищает ткани старых животных как в норме, так и в условиях хронического стресса.

Внедрение результатов исследования

Количественные и качественные данные, полученные при изучении онтогенеза иммунной системы внедрены в учебный процесс ФГБОУ ВО «Астраханский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения России и ФГБОУ ВО «Астраханский государственный университет» им. В.Н. Татищева при

преподавании ряда разделов медико-биологических дисциплин: биологии, нормальной физиологии, патологической анатомии, гистологии, патологической физиологии.

Степень достоверности результатов.

Высокий уровень достоверности результатов диссертационной работы, а также обоснованность выводов определяются достаточным числом наблюдений, продуманным методическим и методологическим дизайном исследования, использованием современных общегистологических, цитофотометрических и биохимических методов, позволяющих решить поставленные задачи, а также адекватных методов статистического анализа при помощи прикладных компьютерных программ «Statistica for Windows 6.0», «Microsoft Excel 2007» и «Cosinor Ellipse 2006». Достоверность различий полученных результатов определяли с помощью параметрического метода с определением t-критерия Стьюдента с поправкой Бонферрони и Ньюмена-Кейлса (С. Гланц, 1998) для множественных сравнений.

Апробация результатов исследования. Основные положения диссертации доложены и обсуждены на: Международной конференции «Актуальные вопросы морфологии» посвященной 100-летию со дня рождения проф. Б.З. Перлина, Молдова 2012г.; IX Международной научно-практической конференции «Достижения фундаментальных наук и возможности трансляционной медицины в решении актуальных проблем практического здравоохранения», Астрахань 2013г.; Международной конференции «Теоретические и практические аспекты науки и образования», Волгоград 2014г., 2015г.; XIV Международной научно-практической конференции «Современные концепции научных исследований», Москва 2015г.; III Всероссийской научной конференции с международным участием «Свободные радикалы, антиоксиданты и старение», Астрахань 2016г.; в Российско-китайском журнале «Содружество», 2016г.; Международной конференции Прикаспийских государств «Актуальные вопросы современной медицины», Астрахань 2016г.; Всероссийской научно-практической конференции с международным участием «Инновации в здоровье нации», Санкт-Петербург 2016г.; Международной научно-практической конференции «Фармацевтические науки: от теории к практике», Астрахань 2016г.; Международной научно-практической конференции "Общество, технология и окружающая среда», Москва 2017г.; I Международной научно-практической конференции "Исследования, разработки и методы в области медицины и фармацевтики», Саратов 2017г.; Международной научно-практической конференции «Структурные преобразования органов и тканей в норме и при воздействии антропогенных факторов», Астрахань 2017г.; 44-ой Международной научно-практической конференции «Актуальные проблемы в современной науке и пути их решения» Евразийского Союза Ученых, Москва 2017г.; VI International Scientific Conference Global science «Development and novelty», Geneva 2017г.; Международной научно-практической конференции «Единство науки, образования и практики медицине будущего», Москва 2018; International Scientific Conference Open science 2.0, North Carolina, USA 2018г.; XIV Конгрессе Международной ассоциации морфологов, Астрахань 2018г.; Международной научно-практической конференции «Актуальные исследования висцеральных систем», Астрахань 2018г.; VIII Съезде НМОАГЭ, Москва 2019г.; VII International scientific practical conference, Brussel, 2019г.; International scientific practical conference, Washington, 2019г.; Международной конференции Прикаспийских государств «Актуальные вопросы современной медицины», Астрахань, 2019г.; Научно - практической конференции «Молодые ученые в решении актуальных проблем современной физиологии», Астрахань, 2020г.; X International scientific practical conference, New York, 2019г.; International Conference «Scientific Research of the SCO countries: Synergy and Integration» Beijing, China, 2020.

Публикации: По материалам исследования опубликовано: 51 научная работа, в том числе статьи в научных изданиях, рекомендованных ВАК для докторских диссертаций - 16, статьи в международных научных изданиях – 14 (в том числе статьи в

журналах Scopus, WoS, UIRichs Web – 10), 1 – монография «Околочасовые клеточные ритмы при различных функциональных состояниях организма и токсическом воздействии», 4 – учебных пособия.

Личный вклад автора. Личный вклад соискателя составляет более 80% и состоит в разработке рабочей гипотезы работы и непосредственном участии ее выполнения на всех этапах диссертационного исследования. Формулировка цели и задач исследования, определяющих общие концепции, разработка дизайна и методологии исследования, анализ и систематизация данных литературы проведены лично автором. Обсуждение полученных результатов, их интерпретация, подготовка публикаций по теме диссертации осуществлялась лично автором при согласовании с научным консультантом.

Структура и объем диссертации. Диссертационная работа состоит из введения, обзора литературы, описания материала и методов исследования, изложения результатов собственного исследования, заключения, выводов и списка литературы. Диссертация изложена на 388 страницах, содержащих 48 таблиц, 170 рисунков и микрофотографий, две схемы. Список литературы включает 658 источников, в том числе 408 – отечественных и 250 – зарубежных.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

В исследовании впервые околочасовой ритм содержания белка служил маркером функциональной активности плазмы крови и органов иммунной системы в онтогенезе у животных и на фоне стресса. Механизм межклеточной кооперации был зарегистрирован с помощью околочасового ритма, при этом выявленные колебания содержания общего белка, альбумина и глобулинов могут быть охарактеризованы как ультрадианные с периодами в 20-40 и до 60-80 минут (Бродский В.Я., 2021).

Изучение возрастных особенностей ритмогенеза белков плазмы крови, позволило констатировать, что более выраженные изменения метаболической активности в контроле наблюдались в модификации ритмических кривых общего белка и глобулинов у неполовозрелых и старых животных (Рис. 1, 2, 3).

Анализ кинетической кривой содержания альбумина в плазме крови молодых интактных животных показал, что колебания уровня содержания этого белка находятся в противофазе по сравнению с ритмическими колебаниями глобулинов, с амплитудой 42% от среднего.

Серосодержащие соединения при хронической ингаляции природным газом АГКМ во всех группах животных по сравнению с контролем вызывают модификацию околочасовых осцилляций белков плазмы крови, проявляющейся в снижении амплитуды колебательного процесса и в изменении набора периодов колебаний (Таблица 1). Так, в плазме крови неполовозрелых животных в условиях интоксикации было зарегистрировано выраженное снижение содержания общего белка на 23,7% и глобулинов на 47,4% в сравнении с контролем. Выявленное сглаживание кинетической кривой глобулинов на протяжении 60 минут наблюдения у неполовозрелых крыс, вероятно связано с низким уровнем резистентности этой группы белков к экзогенным токсическим воздействиям. У стрессированных половозрелых и старых животных также зарегистрировано снижение содержания общего белка, но отмечается увеличение уровня альбумина на 19% у половозрелых крыс, что связано, возможно, с его функцией основного транспортного белка и его свойством антиоксидантной защиты жидких сред организма (Рис. 4). Тем самым наши данные подтверждают исследования Л.Д. Лукьяновой (1989), И.В. Сорокиной с соавторами (1997) и J. Gutteridge (1995) об антиоксидантной роли белков плазмы крови, таких как альбумин, трансферрин, церулоплазмин, лактоферин.

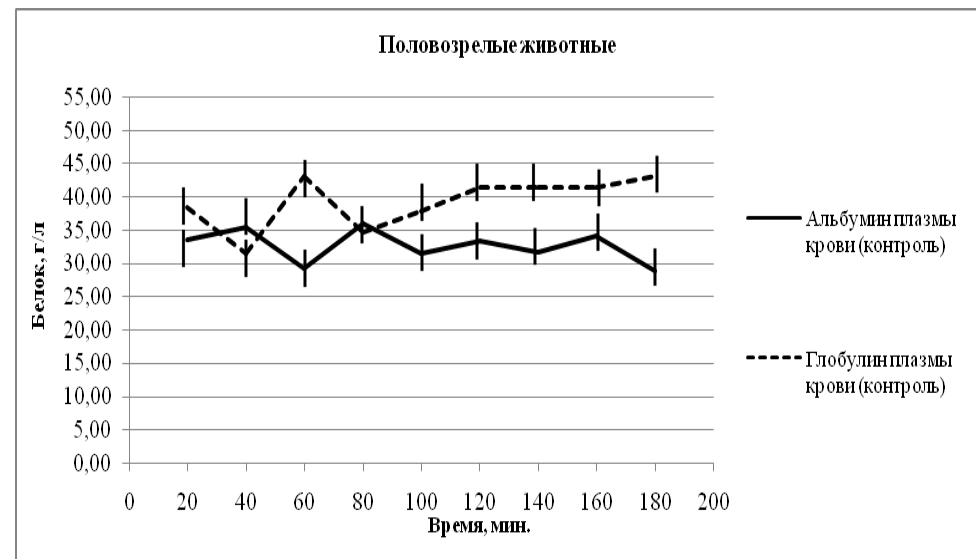
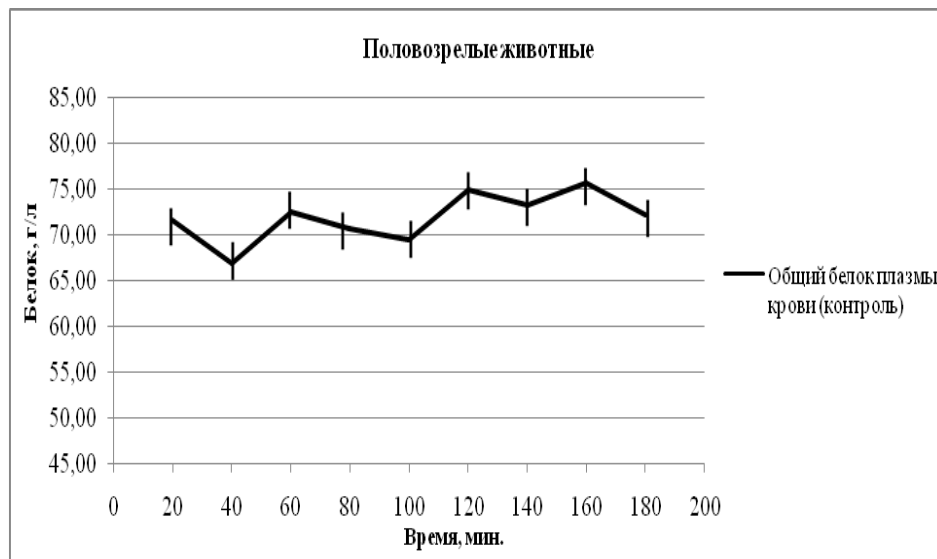
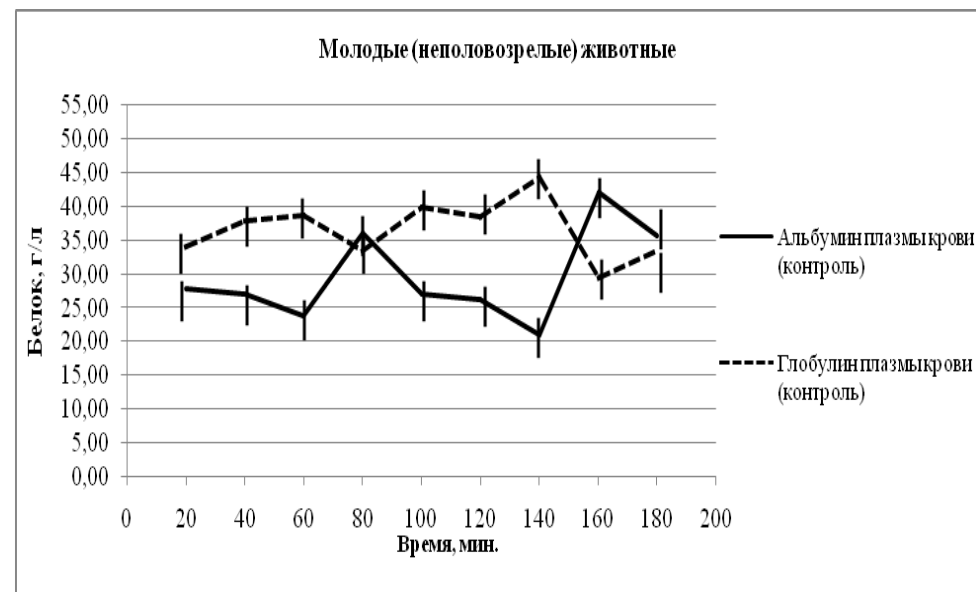
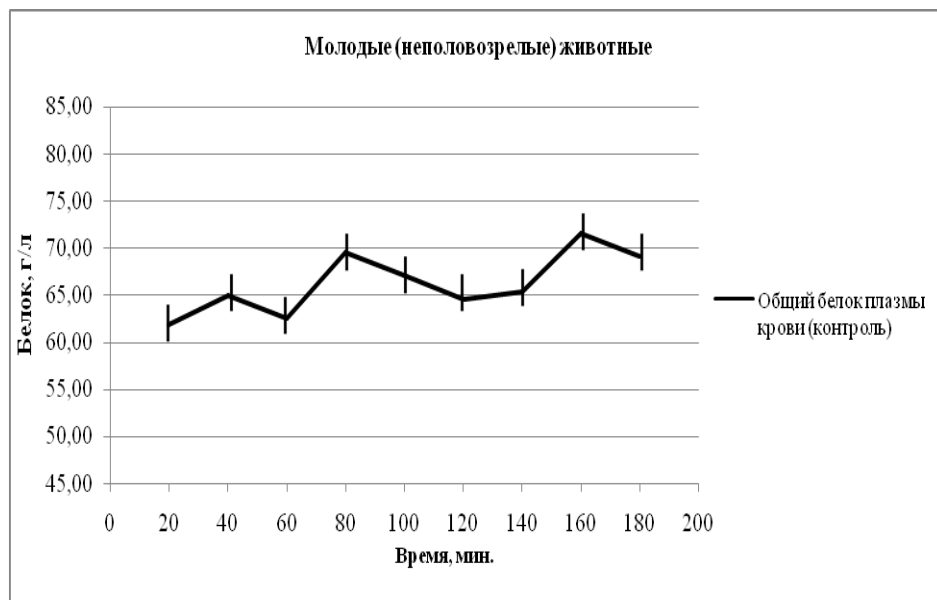


Рисунок 1 - Ритмогенез белков плазмы крови интактных неполовозрелых и половозрелых крыс

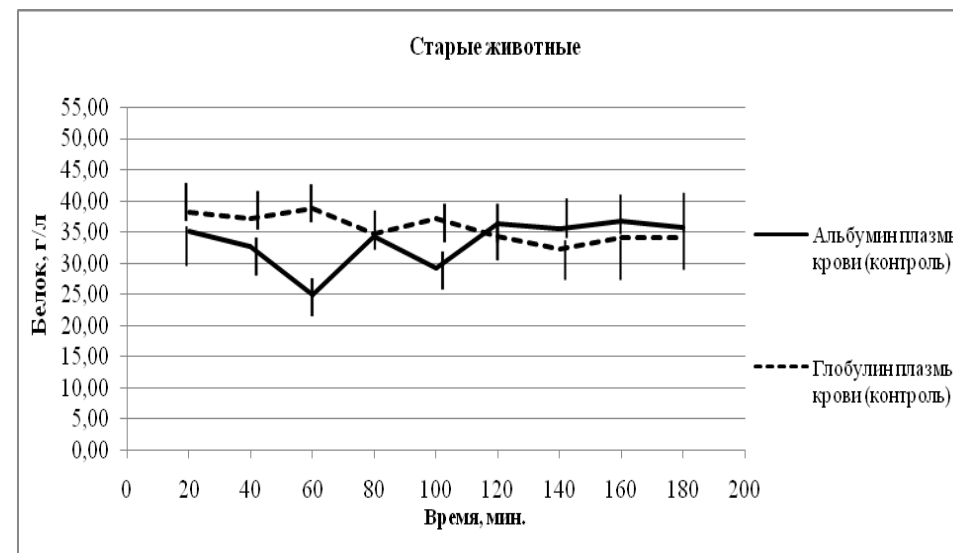
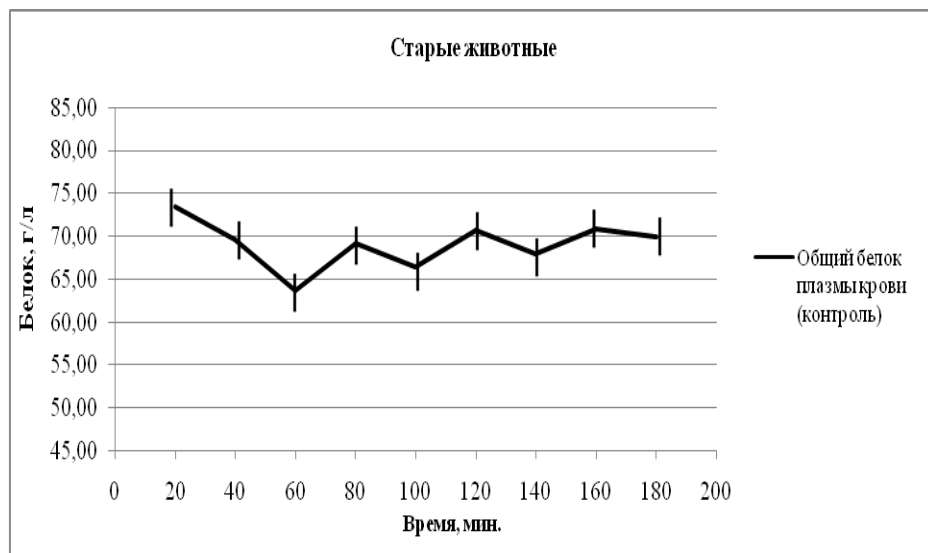


Рисунок 2 - Ритмогенез белков плазмы крови интактных старых крыс

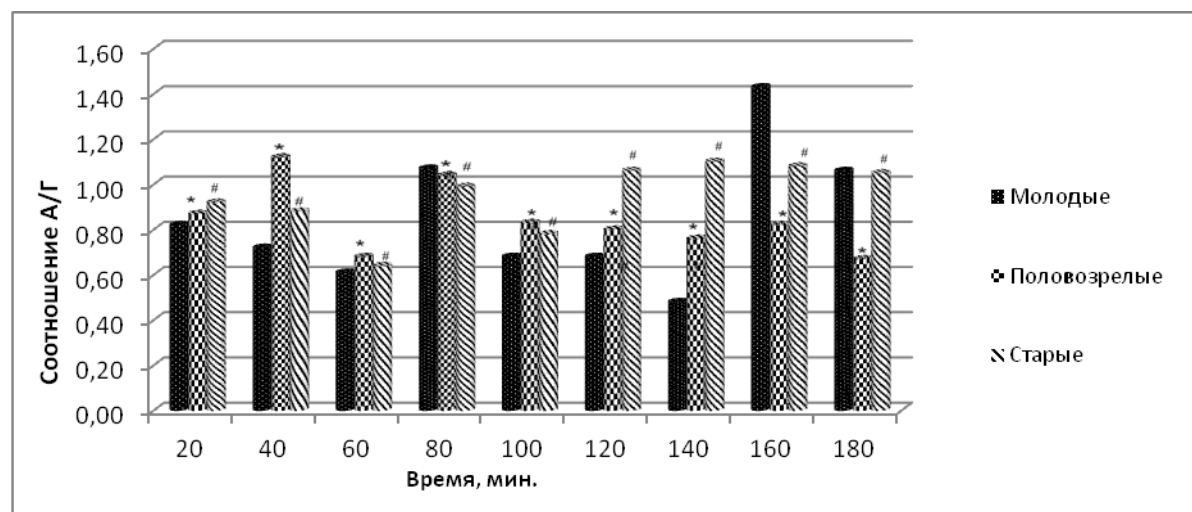


Рисунок 3 - Возрастные особенности соотношения содержания А/Г плазмы крови интактных крыс

Примечание: *# - значимые различия ($p < 0,05$) между группами (здесь и далее: t-критерий Стьюдента с поправкой Бонферрони и Ньюмена-Кейлса для множественных сравнений)

Таблица 1 - Уровень содержания общего белка, альбумина и глобулинов в плазме крови крыс в норме, подвергшихся хроническому стрессу и введению комплекса антиоксидантов

| Тимус | Группы (n=60) | Мезор (у.ед.) | Амплитуда (%) | Р (период, мин.) |
|-----------------------------------|---------------|--------------------------|---------------|------------------|
| Молодые (неполовозрелые) животные | | | | |
| Общий белок | К | 66,29±5,9 | 8% | 40 мин |
| | ССГ | 50,59±5,1* | 8,5% | 20-40 мин |
| | ССГ+АО | 71,77±9,3 [◊] # | 84,78% | 20-40 мин |
| Альбумин | К | 29,64±0,6 | 42,04% | 20-40 мин |
| | ССГ | 31,33±1,2* | 13% | 20-40 мин |
| | ССГ+АО | 40,1±5,2 [◊] # | 15% | 40-60 мин |
| Глобулины | К | 36,64±0,8 | 21% | 20-40 мин |
| | ССГ | 19,26±10,5* | 5,4% | 60-80 мин |
| | ССГ+АО | 41,2±2,2 [◊] # | 8,5% | 60 мин |
| Половозрелые животные | | | | |
| Общий белок | К | 71,86±1,7 | 5,2% | 40 мин |
| | ССГ | 64,42±6,0* | 4,3% | 40-60 мин |
| | ССГ+АО | 78,57±3,7 [◊] # | 5,1% | 40-60 мин |
| Альбумин | К | 32,63±0,1 | 10,33% | 40-60 мин |
| | ССГ | 38,82±3,4* | 9,74% | 20-40 мин |
| | ССГ+АО | 32,01±0,4 [◊] # | 5,9% | 40 мин |
| Глобулины | К | 39,25±4,9 | 10% | 20-40 мин |
| | ССГ | 25,6±4,8* | 3% | 80 мин |
| | ССГ+АО | 46,56±9,3 [◊] # | 9,1% | 40-60 мин |
| Старые животные | | | | |
| Общий белок | К | 69,07±0,6 | 6,3% | 40 мин |
| | ССГ | 68,23±0,5* | 5,8% | 40 мин |
| | ССГ+АО | 71,32±1,5 [◊] # | 5% | 40 мин |
| Альбумин | К | 33,42±1,4 | 10% | 40 мин |
| | ССГ | 30,57±0,3* | 8% | 40-60 мин |
| | ССГ+АО | 31,16±0,3 [◊] # | 11,68% | 40-60 мин |
| Глобулины | К | 35,66±1,4 | 9% | 40-60 мин |
| | ССГ | 37,67±0,9* | 8% | 40-60 мин |
| | ССГ+АО | 40,17±1,8 [◊] # | 3,6% | 60-80 мин |

Примечание: *p<0,05 в сравнении с контролем; [◊]p<0,05 в сравнении подгруппы, получавшей ССГ с подгруппой ССГ + АО; #p<0,05 в сравнении контрольной группы с подгруппой получавшей ССГ + АО; значимые различия (p<0,05) между подгруппами

Комплексное введение препаратов тималина и витамина Е на фоне интоксикации организма формирует положительную ответную динамику со стороны функциональной активности плазмы крови крыс (Таблица 1) всех возрастных групп, повышая резистентность изучаемых белков к воздействию природного газа (Рис. 5).

Зарегистрированные в нашем исследовании перестройки временной организации белков плазмы крови (снижение амплитуды колебаний, удлинение периодов, сглаживание кинетической кривой) являются важнейшими компонентами адаптационного механизма в целом на действие экзотоксиканта, и свидетельствуют о функциональных резервах организма на клеточном уровне (Курзанов А.Н. и др., 2016). Поскольку такие изменения осцилляций связаны со спецификой клеточного метаболизма и отражают его нестабильность.

Результаты изучения хронобиологических особенностей иммунной системы крыс на этапах онтогенеза, приводят к заключению об адаптивном значении модификаций окологоризонтальных колебаний содержания белков в тканях тимуса, паховых лимфатических узлов и селезенки у всех экспериментальных животных (Таблица 2).

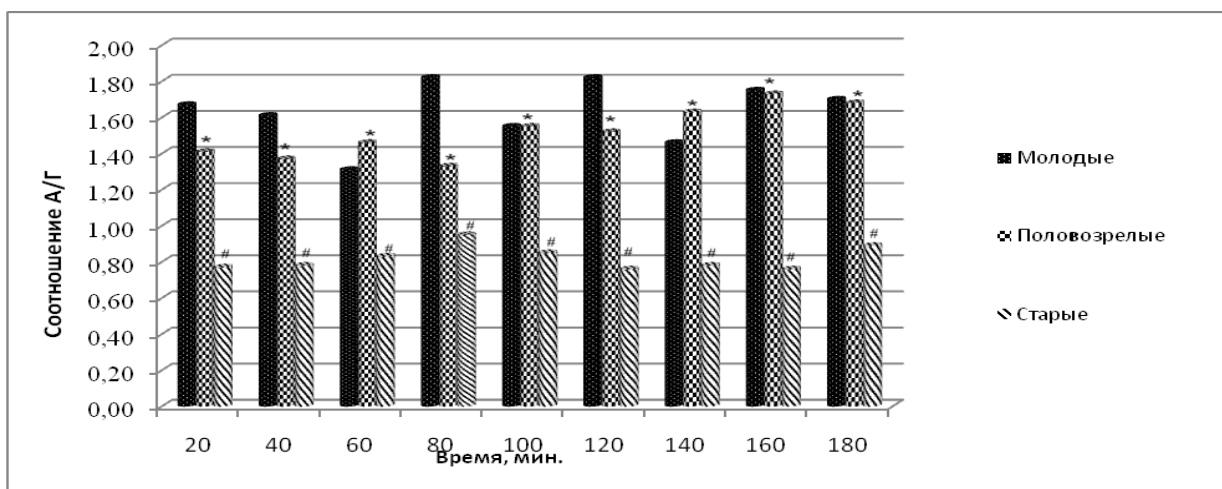


Рисунок 4 - Возрастные особенности соотношение содержания А/Г плазмы крови крыс в онтогенезе в условиях воздействия ССГ

Примечание: * и # - значимые различия ($p < 0,05$) между группами

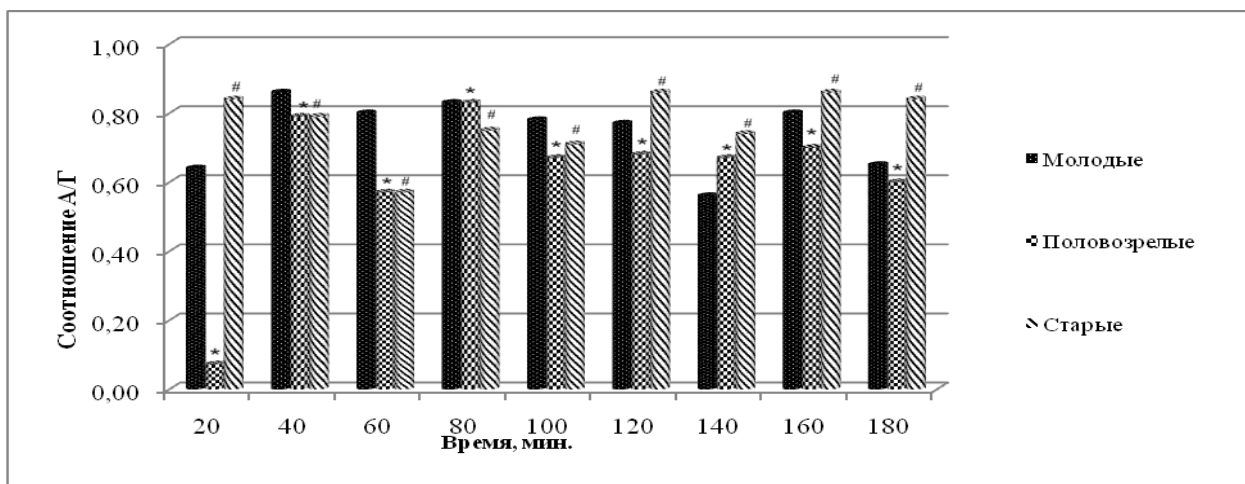


Рисунок 5 - Соотношение содержания А/Г плазмы крови крыс в онтогенезе в условиях воздействия ССГ+АО

Примечание: * и # - значимые различия ($p < 0,05$) между группами

При сравнении возрастных особенностей модификаций ритмических кривых, зарегистрировано, что у половозрелых животных амплитуда колебаний белков тимуса ниже, чем у неполовозрелых крыс. На всех стадиях эксперимента наибольшее снижение амплитуды колебаний белков в тимусе было у старых крыс, что вероятно связано с происходящими в нем инволюционными процессами.

На фоне комплексного введения препаратов тималина и альфа-токоферола ацетата стрессированным животным ответная реакция на экзогенные токсические воздействия проявляется в мобилизации компенсаторных возможностей ткани тимуса, и особенно в группе старых крыс (Таблица 2). На кинетической кривой регистрируется увеличение среднего содержания общего белка и альбумина в 2,3 раза.

Таблица 2 - Уровень содержания общего белка и альбумина в ткани тимуса крыс в норме, подвергшихся хроническому стрессу и введению комплекса антиоксидантов

| Тимус | Группы (n=60) | Мезор (у.ед.) | Амплитуда (%) | Р (период, мин.) |
|--|---------------|-------------------------|---------------|------------------|
| Молодые (неполовозрелые) животные | | | | |
| Общий белок | К | 29,0±4,7 | 47% | 20-40 мин |
| | ССГ | 27,0±4,1* | 32% | 20-40 мин |
| | ССГ+АО | 41,0±5,7 ^{o#} | 32% | 20-40 мин |
| Альбумин | К | 7,8±1,8 | 53% | 20-40 мин |
| | ССГ | 4,2±1,6* | 31% | 20-40 мин |
| | ССГ+АО | 17,0±6,2 ^{o#} | 38% | 20-40 мин |
| Половозрелые животные | | | | |
| Общий белок | К | 29,0±2,1 | 36,5% | 20-40 мин |
| | ССГ | 16,4±6,0* | 24% | 20-40 мин |
| | ССГ+АО | 40,5±10,5 ^{o#} | 26% | 20-40 мин |
| Альбумин | К | 10,4±2,0 | 37% | 20-40 мин |
| | ССГ | 5,7±1,4* | 53% | 40-60 мин |
| | ССГ+АО | 12,0±2,9 ^{o#} | 69% | 20-40 мин |
| Старые животные | | | | |
| Общий белок | К | 39,4±1,7 | 11% | 40-60 мин |
| | ССГ | 35,0±1,6* | 9% | 20-40 мин |
| | ССГ+АО | 38,4±0,6 ^{o#} | 23% | 20-40 мин |
| Альбумин | К | 12,0±2,4 | 27% | 40 мин |
| | ССГ | 6,0±1,9* | 22% | 60 мин |
| | ССГ+АО | 14,0±3,6 ^{o#} | 31% | 20-40 мин |

Примечание: * $p < 0,05$ в сравнении с контролем; ^o $p < 0,05$ в сравнении подгруппы, получавшей ССГ с подгруппой ССГ + АО; [#] $p < 0,05$ в сравнении контрольной группы с подгруппой получавшей ССГ + АО; значимые различия ($p < 0,05$) между подгруппами

Впервые нами зарегистрированные ритмические колебания уровня общего белка и альбумина в тканях паховых лимфатических узлов являются околочасовыми, и период их составляет с 20-40 до 60 минут.

В условиях стресса у животных всех возрастных групп отмечено сохранение околочасовой периодичности содержания общего белка и альбумина в тканях паховых лимфатических узлов. Тем не менее, токсическое воздействие приводит к снижению амплитуды колебаний и угнетению синтеза изучаемых белков, что модифицирует ритмическую кривую особенно у молодых и старых крыс.

Так, у неполовозрелых животных уровень общего белка снижается на 21% и альбумина на 53% от среднего в сравнении с контролем, а у стрессированных старых крыс наблюдается снижение содержания общего белка на 55% и альбумина на 76,5% от среднего в сравнении с контролем (Таблица 3).

Зарегистрированные изменения околочасовой ритмики белкового обмена могут быть следствием как торможения синтеза белков в органе, так и поступления белков в ткань из плазмы.

Известно, что в условиях гипоксии, индуцированной хроническим воздействием серосодержащего газа наблюдается подавление ферментных систем, происходит торможение транспорта клеточных белков (Ярошинская А.П. и др., 2016; Шишкина Т.А. и др., 2018; McGuire P. J., 2019). В связи с этим, отмечается зарегистрированное нами угнетение синтетической активности на клеточном и тканевом уровнях организации.

Таблица 3 - Уровень содержания общего белка и альбумина в ткани паховых лимфатических узлов крыс в норме, подвергшихся хроническому стрессу и введению комплекса антиоксидантов

| Лимфатические узлы | Группы (n=60) | Мезор (у.ед.) | Амплитуда (%) | P (период, мин.) |
|-----------------------------------|---------------|-------------------------|---------------|------------------|
| Молодые (неполовозрелые) животные | | | | |
| Общий белок | К | 8,6±1,9 | 56% | 40 мин |
| | ССГ | 6,3±1,1* | 55,6% | 20-40 мин |
| | ССГ+АО | 8,4±1,7 [◇] # | 54% | 20-40 мин |
| Альбумин | К | 1,4±0,6 | 76% | 20-40 мин |
| | ССГ | 0,3±0,1* | 93% | 20-40 мин |
| | ССГ+АО | 1,5±0,7 [◇] # | 67% | 40-60 мин |
| Половозрелые животные | | | | |
| Общий белок | К | 8,7±1,8 | 56% | 20-40 мин |
| | ССГ | 6,9±1,2* | 53% | 40-60 мин |
| | ССГ+АО | 16,0±4,4 [◇] # | 59% | 20 мин |
| Альбумин | К | 1,27±0,4 | 65% | 20-40 мин |
| | ССГ | 0,6±0,1* | 50% | 40-60 мин |
| | ССГ+АО | 5,0±2,2 [◇] # | 78% | 20-40 мин |
| Старые животные | | | | |
| Общий белок | К | 20,5±5,4 | 48% | 20-40 мин |
| | ССГ | 9,2±1,8* | 42% | 40-60 мин |
| | ССГ+АО | 13,9±1,6 [◇] # | 76% | 40 мин |
| Альбумин | К | 1,4±0,5 | 77% | 40-60 мин |
| | ССГ | 0,4±0,1* | 57,5% | 20-40 мин |
| | ССГ+АО | 6,0±2,8 [◇] # | 22% | 40-60 мин |

Примечание: *p<0,05 в сравнении с контролем; [◇]p<0,05 в сравнении подгруппы, получавшей ССГ с подгруппой ССГ + АО; #p<0,05 в сравнении контрольной группы с подгруппой получавшей ССГ + АО; значимые различия (p<0,05) между подгруппами

На фоне введения антиоксидантов в условиях стресса повышается активность процессов обмена белков в лимфатических узлах у животных всех возрастных групп. Вместе с тем, у старых крыс отмечается сглаживание кинетической кривой содержания альбумина. Это связано, возможно, с истощением функциональных возможностей ткани паховых лимфатических узлов у этой группы животных, происходящих на фоне инволюционных изменений.

В ткани селезенки (Таблица 4), у интактных половозрелых животных среднее содержание общего белка выше в 2 раза, чем у неполовозрелых, и в 1,3 раза больше чем у старых крыс. Уровень содержания альбумина также выше у половозрелых животных - на 59%, чем у неполовозрелых, и на 10% - чем у старых животных.

При токсическом воздействии кинетические кривые сохраняют околичасовую периодичность вне зависимости от возраста. Зарегистрированные нами изменения уровня содержания изучаемых белков на фоне стресса, носят обратимый характер, так как комплексное введение тималина и альфа-токоферола ацетата модифицирует кинетические кривые, повышая во всех возрастных группах амплитуду колебаний, а также среднее значение общего белка и альбумина (Таблица 4).

Изучение содержания эозинофилов в плазме крови крыс показало, что ответная стресс - реакция на действие экзотоксиканта проявилась эозинопенией, с более выраженным эффектом в плазме крови старых крыс, а так же снижением относительного коэффициента массы органа по отношению к контролю: в группе неполовозрелых

животных в тимусе - на 29%, в паховых лимфатических узлах - на 56%, и максимально в селезенке, где падение коэффициента составило на 61% (Таблица 5). Аналогичные изменения зафиксированы нами в группах половозрелых и старых крыс. Данная ответная реакция органов иммунной системы на токсический стресс согласуется с результатами исследований А.К. Ажиковой (2020), А.Л. Ясенявской (2016) и М.А. Самотруевой (2010).

Таблица 4 - Уровень содержания общего белка и альбумина в ткани селезенки крыс в норме, подвергшихся хроническому стрессу и введению комплекса антиоксидантов

| Селезенка | Группы (n=60) | Мезор (у.ед.) | Амплитуда (%) | Р (период, мин.) |
|-----------------------------------|---------------|-------------------------|---------------|------------------|
| Молодые (неполовозрелые) животные | | | | |
| Общий белок | К | 21,0±7,9 | 47% | 40 мин |
| | ССГ | 9,8±6,1* | 38% | 40-60 мин |
| | ССГ+АО | 40,0±14,0 ^{◊#} | 31% | 20-40 мин |
| Альбумин | К | 8,8±3,1 | 34% | 20-40 мин |
| | ССГ | 2,3±1,0* | 52% | 40-60 мин |
| | ССГ+АО | 15,0±6,3 ^{◊#} | 54% | 20-40 мин |
| Половозрелые животные | | | | |
| Общий белок | К | 43,0±3,1 | 31% | 20-40 мин |
| | ССГ | 38,0±1,5* | 11% | 20-60 мин |
| | ССГ+АО | 42,0±2,5 ^{◊#} | 21% | 40 мин |
| Альбумин | К | 14,0±0,9 | 36% | 20-40 мин |
| | ССГ | 11,0±1,2* | 16,4% | 40 мин |
| | ССГ+АО | 15,0±1,6 ^{◊#} | 29,3% | 20-40 мин |
| Старые животные | | | | |
| Общий белок | К | 34,4±0,2 | 30,5% | 40-60 мин |
| | ССГ | 33,0±0,7* | 27,5% | 40 мин |
| | ССГ+АО | 43,0±5,0 ^{◊#} | 32% | 40 мин |
| Альбумин | К | 12,7±0,6 | 53,5% | 20-40 мин |
| | ССГ | 8,6±2,0* | 52% | 40 мин |
| | ССГ+АО | 14,0±1,9 ^{◊#} | 56% | 40 мин |

Примечание: *p<0,05 в сравнении с контролем; ◊p<0,05 в сравнении подгруппы, получавшей ССГ с подгруппой ССГ + АО; #p<0,05 в сравнении контрольной группы с подгруппой получавшей ССГ + АО; значимые различия (p<0,05) между подгруппами

Таблица 5 – Относительный коэффициент массы органа

| Группа (n=10) | Относительный коэффициент массы органа, М±m, мг/100г веса животного | | |
|-----------------------------------|---|--------------------------|----------------------------|
| | Тимус | Лимфатические узлы | Селезенка |
| Молодые (неполовозрелые) животные | | | |
| К | 0,24±0,017 | 0,09±0,017 | 0,59±0,046 |
| ССГ | 0,17±0,016** | 0,04±0,021* | 0,23±0,022*** |
| ССГ+АО | 0,27±0,015 ^{◊◊◊###} | 0,07±0,019 ^{◊#} | 0,49±0,020 ^{◊◊◊#} |

Примечание: *p<0,05, **p<0,01 и ***p<0,001 в сравнении с контролем; ◊p<0,05, ◊◊p<0,01 и ◊◊◊p<0,001 в сравнении группы, получавшей ССГ с подгруппой ССГ + АО; #p<0,05, ##p<0,01 и ###p<0,001 в сравнении контрольной группы с подгруппой получавшей ССГ + АО

Полученные нами результаты исследований (Рис. 6, 7), вне сомнений, указывают на функциональную взаимосвязь околочасовых колебаний общего белка, альбумина и глобулинов плазмы крови с уровнем оксидативного стресса, вызванного сероводородсодержащим газом, и характером морфологических изменений в органах иммунной системы в онтогенезе крыс.

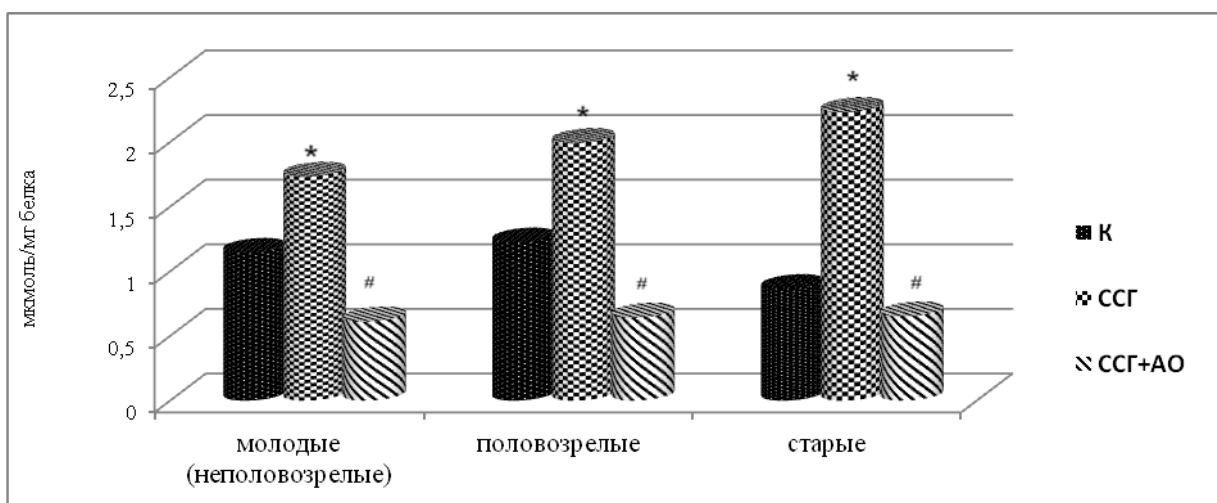


Рисунок 6 - Возрастные особенности изменения показателей ОМБ в плазме крови крыс

Примечание: * и # - $p < 0,05$ – достоверность различий между группами

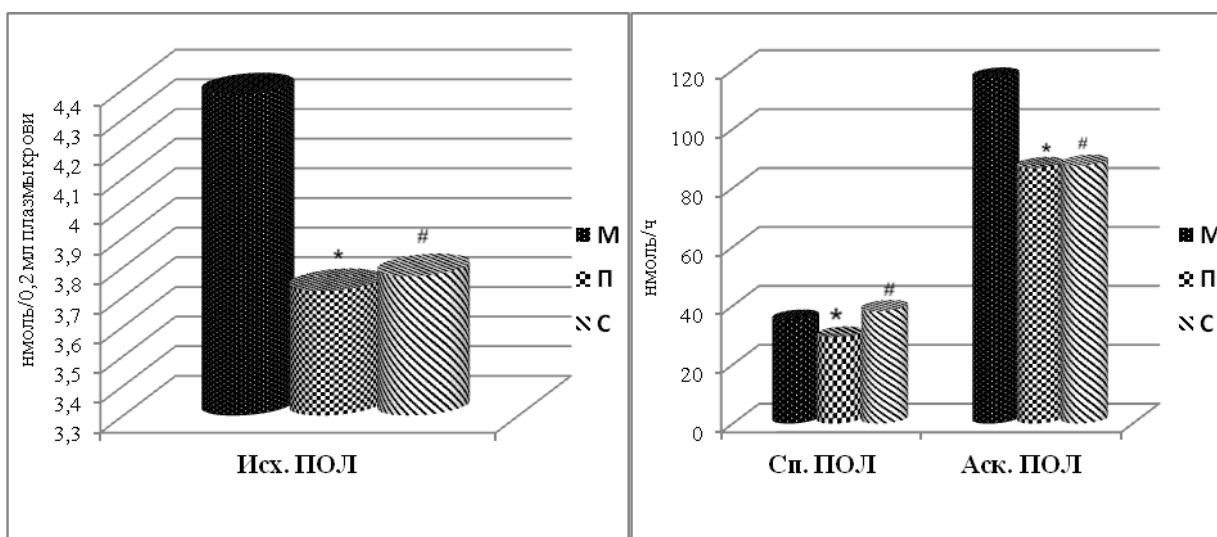


Рисунок 7 - Возрастные особенности изменения показателей пероксидации липидов в плазме крови крыс

Примечание: М – молодые (неполовозрелые) животные, П – половозрелые животные; С – старые животные; * и # - $p < 0,05$ – достоверность различий между группами

При анализе показателей пероксидации липидов в ткани тимуса (Рис. 8) установлено, что содержание пероксидов, с возрастом увеличивается и способствует развитию окислительного стресса, зарегистрирован рост всех показателей ПОЛ особенно у старых животных. Это свидетельствует об усилении токсического действия сероводорода на тимус старых крыс на фоне происходящих в нем инволюционных изменений. Полученные результаты согласуются с утверждениями авторов Е.Б. Родзаевской с соавторами (2017), Б.А. Муруева с соавторами (2018), Г.Ю. Стручко с соавторами (2018), И.Ю. Ваш (2019), Наумова А.В. с соавторами (2020) о том, что стресс

ускоряет развитие акцидентальной инволюции вилочковой железы, снижая иммунологическую реактивность организма и его устойчивость к патогенным факторам.

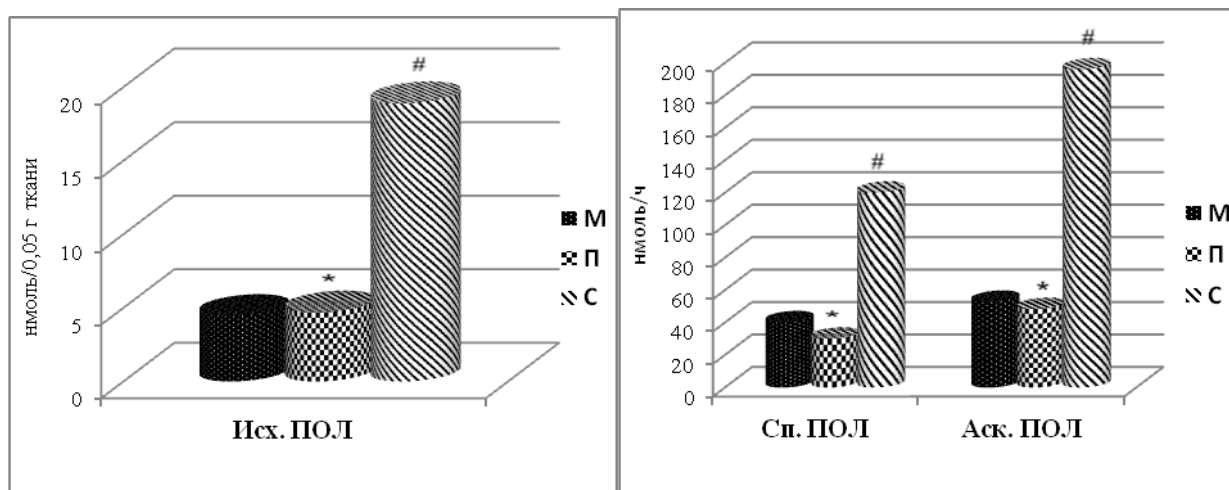


Рисунок 8 - Возрастные особенности изменения показателей пероксидации липидов в ткани тимуса крыс подгруппы ССГ

Примечание: М – молодые животные (неполовозрелые), П – половозрелые животные; С – старые животные; * и # - $p < 0,05$ – достоверность различий между группами

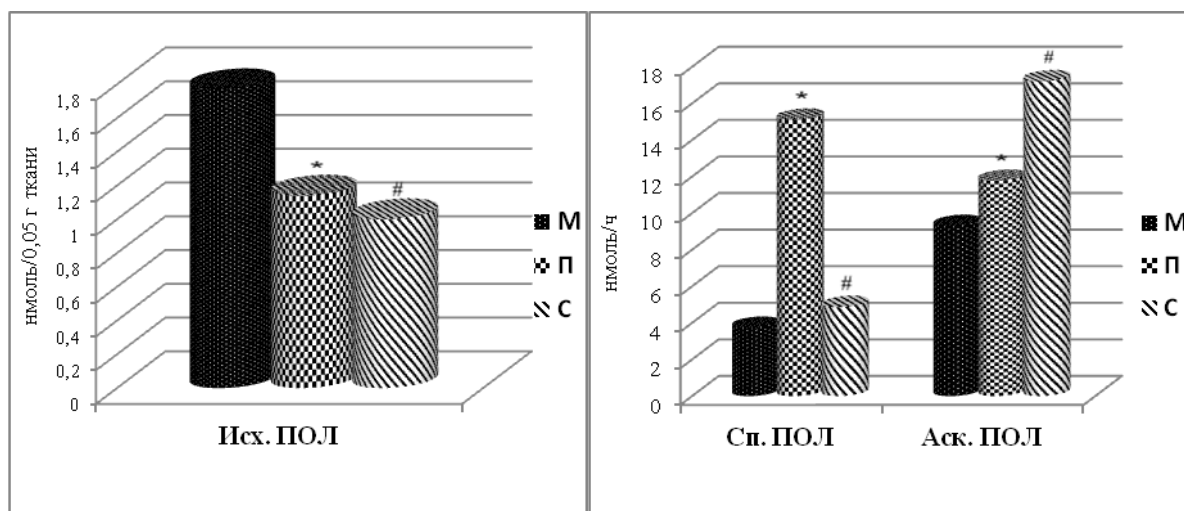


Рисунок 9 - Возрастные особенности изменения показателей пероксидации липидов в ткани тимуса крыс подгруппы ССГ+АО

Примечание: М – молодые животные (неполовозрелые), П – половозрелые животные; С – старые животные; * и # - $p < 0,05$ – достоверность различий между группами

Введение препаратов α -токоферола ацетата и тималина на фоне действия токсиканта (Рис. 9) указывает на высокие адаптивные возможности тимуса, способствует снижению уровня свободно-радикальных процессов во всех возрастных группах, с более выраженным корригирующим эффектом у старых крыс в сравнении с контрольными значениями ($P < 0,001$) молодых и половозрелых животных.

Анализ экспериментальных данных свидетельствует также о существенной интенсификации ПОЛ в ткани лимфатических узлов старых животных в сравнении с контрольными значениями: исходного ПОЛ в 10 раз, скорости спонтанного ПОЛ в 13 раз и аскорбатзависимого ПОЛ в 5 раз. Вместе с тем, произошло снижение уровня окислительной модификации белков на 73% в сравнении с контролем. Вероятно, что активизация всех показателей ПОЛ у старых крыс под действием стрессора

способствовала вовлечению в адаптивный процесс других составляющих звеньев антиоксидантной защиты, что отразилось снижением ОМБ (Рис. 10) в ответной реакции на токсический эффект.

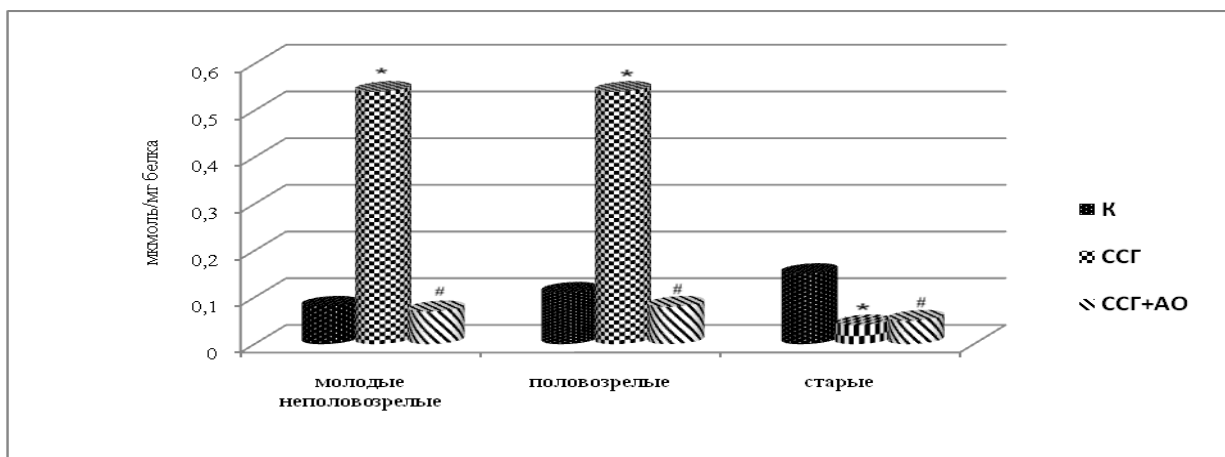


Рисунок 10 - Возрастные особенности изменения уровня ОМБ в ткани лимфатических узлов крыс при различных функциональных состояниях организма
Примечание: * и # - значимые различия ($p < 0,05$) между подгруппами

Обращает внимание тот факт, что сочетанное введение α -токоферола ацетата и тималина в условиях гипоксии способствовало значительному снижению интенсивности свободно-радикальных процессов в паховых лимфатических узлах, вместе с тем у старых крыс уровни всех показателей ПОЛ не достигли контрольных значений. По всей вероятности, это определяется истощением антиоксидантной системы ткани лимфатических узлов на стадии инволюции.

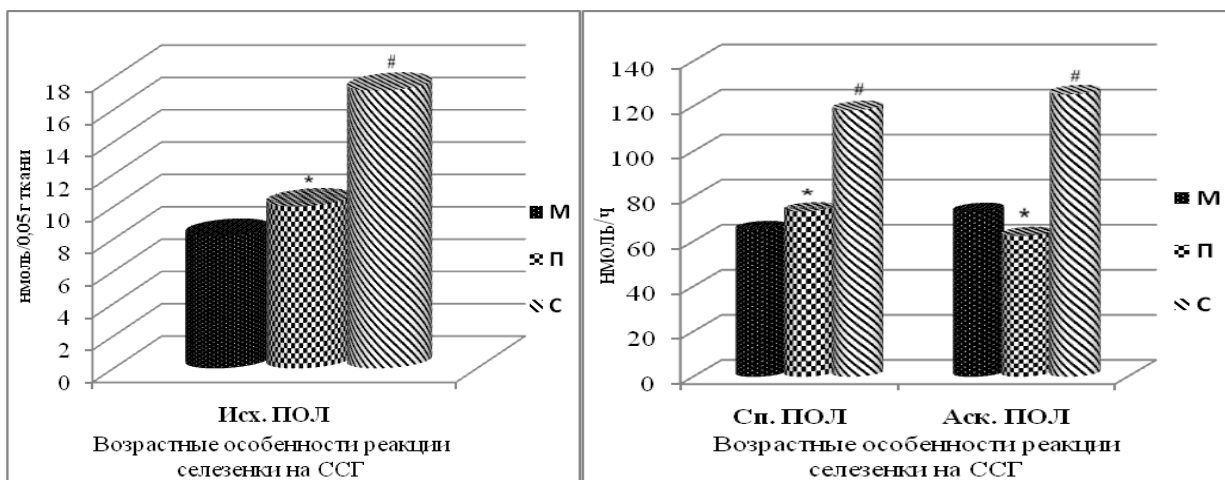


Рисунок 11 - Возрастные особенности изменения показателей пероксидации липидов в ткани селезенки крыс подгруппы ССГ

Примечание: М – молодые (неполовозрелые) животные, П – половозрелые животные; С – старые животные; * и # - значимые различия ($p < 0,05$) между группами

Полученные результаты подтверждают данные (G. Rao, E. Xia, A. Richardson, 1990) о том, что старение сопровождается разнонаправленными изменениями в активности ферментных систем и это позволяет сохранять определенный уровень физиологических процессов. С учетом морфологической картины органа можно говорить об инволюционном истощении антиоксидантной системы ткани пахового лимфатического узла.

Содержание продуктов, реагирующих с тиобарбитуровой кислотой в ткани селезенки с возрастом увеличивается (Рис. 11). Повышение уровня окислительной модификации белков у экспериментальных животных в онтогенезе свидетельствует о развитии оксидативного стресса в этом органе независимо от возраста крыс. Наибольший корригирующий эффект комплекса антиоксидантных препаратов был зарегистрирован у половозрелых животных. При этом снижение скорости аскорбатзависимого ПОЛ у неполовозрелых и старых крыс не достигло контрольных значений, что связано, возможно, с недостаточным уровнем антиоксидантных возможностей ткани селезенки животных этих групп.

На этапах онтогенеза в ткани тимуса степень изменения функциональных параметров и его клеточного состава соответствует возрасту животных. Процесс развития и дифференцировки клеточных элементов тимуса направлен от наружных слоев к внутренним. Инволюция вилочковой железы затрагивает в основном ее паренхиму. В связи с этим в тимусе старых крыс отмечается расширение междольковых пространств, а многочисленные липидные включения, группируются в округлые образования (полости).

На фоне развивающейся гипоксии в тимоцитах мозгового вещества происходит измельчение и распад глыбок хроматофильного вещества. С возрастом, тимоциты теряют компактность своего расположения, во всех возрастных группах определяется полнокровие сосудов. Одним из показателей ответной реакции ткани тимуса на стрессовое воздействие является изменение уровня апоптоза лимфоцитов (Рис. 12). Наибольший прирост апоптозных клеток наблюдался в ткани тимуса стрессированных крыс неполовозрелого и старого возраста.

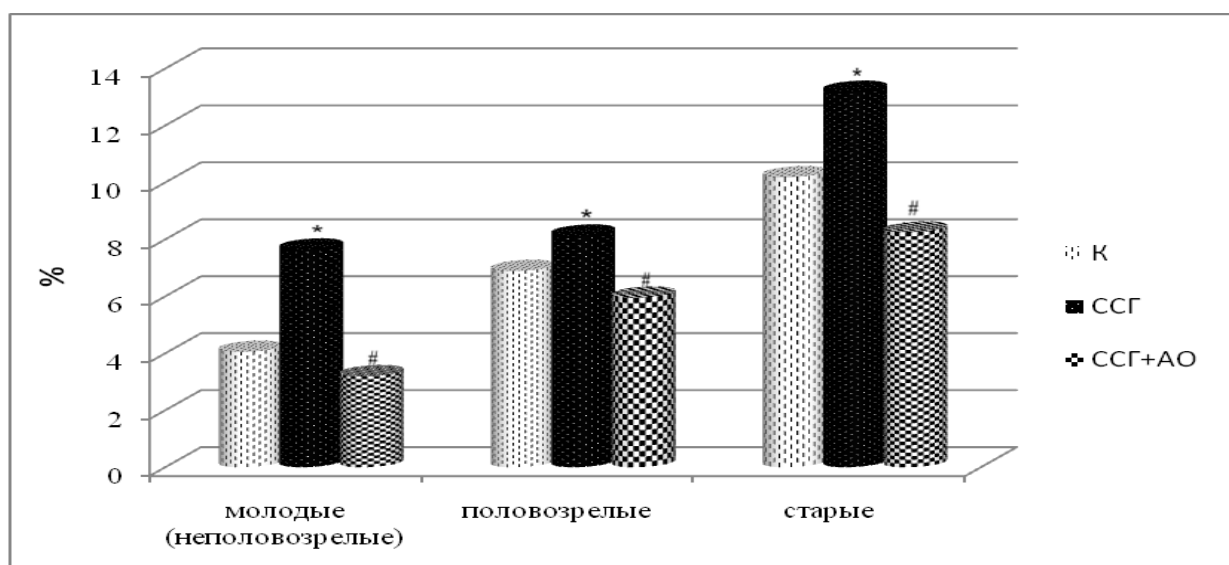


Рисунок 12 - Количество апоптозных клеток в ткани тимуса крыс при различных функциональных состояниях организма изучаемых групп животных
Примечание: * и # - значимые различия ($p < 0,05$) между подгруппами

На фоне гипоксии нами зарегистрировано снижение синтетической активности тимоцитов животных всех возрастных групп, с наибольшим проявлением ее у неполовозрелых и старых крыс.

Комплекс «тималин + α -токоферол ацетат» способствовал увеличению относительного коэффициента массы тимуса экспериментальных животных: на 23% у старых крыс, на 10,5% у половозрелых животных, а у неполовозрелых крыс изучаемый показатель вырос даже на 59%, что, вероятно, привело к сохранению гормонообразующей функции вилочковой железы. Также нами зарегистрировано повышение функциональной активности тимоцитов животных всех возрастных групп, с наибольшим проявлением ее у неполовозрелых и старых крыс (Рис. 13), о чем свидетельствует увеличение площади ядер

лимфоцитов в мозговом веществе тимуса, где у старых животных наблюдалось максимальное увеличение этого показателя на 91,5% в сравнении с подгруппой ССГ. Комплексное введение препаратов тималина и α -токоферола ацетата способствовало снижению уровня апоптоза у животных всех возрастных групп с наибольшим эффектом в ткани тимуса старых и половозрелых животных. Полученные нами данные согласуются с исследованиями последних лет о том, что введение иммуномодуляторов способствует появлению апоптозоустойчивых лимфоцитов (Жумашева А.А. и др., 2016; Бажанова Е.Д., Анисимов В.Н., 2020; Manley N.R., 2000; Maroder M. et al., 2000; Arockia-Rani P.J. et al., 2001; Hazenberg M. D. et al., 2001; Gameiro J. et al., 2010).

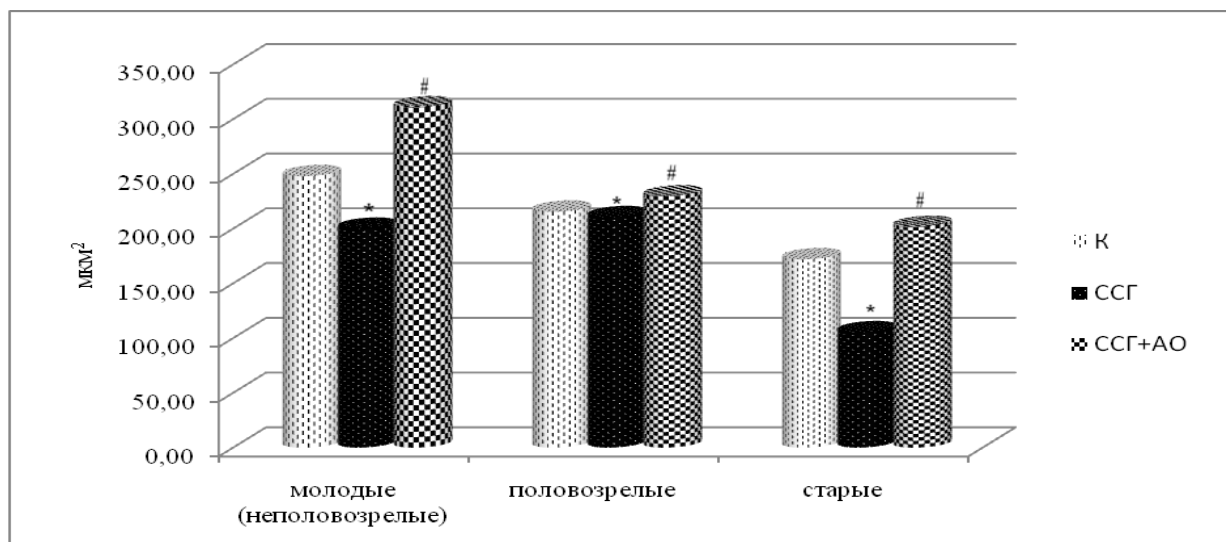


Рисунок 13 - Динамика площади ядер тимоцитов в постнатальном онтогенезе в норме, при воздействии природного газа и в условиях применения комплекса антиоксидантов на фоне стресса

Примечание: * и # - значимые различия ($p < 0,05$) между подгруппами

В постнатальном онтогенезе ткани пахового лимфатического узла на фоне снижения размеров коркового вещества с возрастом животных увеличивается доля мозгового вещества, в связи с этим промежуточные синусы становятся особенно широкими у старых крыс. Возрастные изменения затрагивают в основном строму лимфоузла, плотность ее увеличивается, происходит разрастание соединительной ткани. В условиях стресса, наблюдалось достоверное снижение относительного коэффициента массы лимфоузлов по отношению к контролю: у половозрелых животных на 56%, у старых крыс зарегистрировано максимальное снижение на 81%. При гипоксии с возрастом, лимфоциты теряют компактность своего расположения. Во всех изучаемых группах животных в цитоплазме лимфоцитов происходит измельчение и распад глыбок хроматофильного вещества. В условиях интоксикации особенно у старых крыс количество апоптозных клеток выше, чем у половозрелых и неполовозрелых особей (Рис. 14).

Это свидетельствует, по-видимому, о большей стрессоустойчивости ткани лимфоузла половозрелых животных. Этот факт согласуется с результатами ранее проведенных исследований (Cox G., 1995; Melcangi R.C. et al., 2000) о том, что высокий уровень половых гормонов при стрессе способствует защите клеток от усиления апоптоза.

Введение комплекса антиоксидантов на фоне стресса оказало антиапоптотическое действие (Рис. 14) на клетки иммунной системы животных всех возрастных групп, с наибольшим корригирующим эффектом у старых особей, что мы связываем с увеличением уровня цитохрома «с» в цитоплазме стареющих клеток, который, согласно литературным данным (Ибатуллина, Р.Б., 2001; Phaneuf S. et al., 2002; Mohan M. et al.,

2003), ингибирует α -токоферол, воздействуя на митохондриальный и каспазный уровень апоптоза.

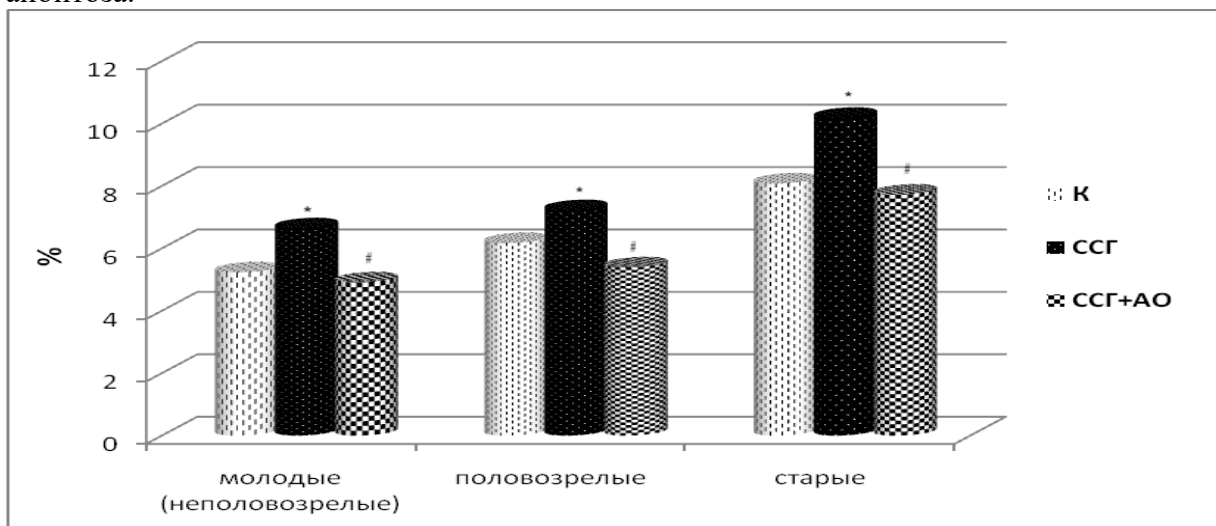


Рисунок 14 - Количество апоптотических клеток в ткани паховых лимфоузлов при различных функциональных состояниях организма изучаемых групп животных

Примечание: * и # - значимые различия ($p < 0,05$) между подгруппами

При стрессовом воздействии в ткани паховых лимфоузлов неполовозрелых и старых животных отмечены значимые снижения площади ядер лимфоцитов (Рис. 15). Анализируя, возрастные особенности изменения этого показателя у стрессированных крыс обращает внимание тот факт, что площадь ядер у неполовозрелых животных на 35,6% больше площади ядер старых крыс и на 25% выше, чем у половозрелых крыс. В то же время, площадь ядер половозрелых животных при гипоксии существенно превышает этот же показатель у старых животных ($P < 0,05$).

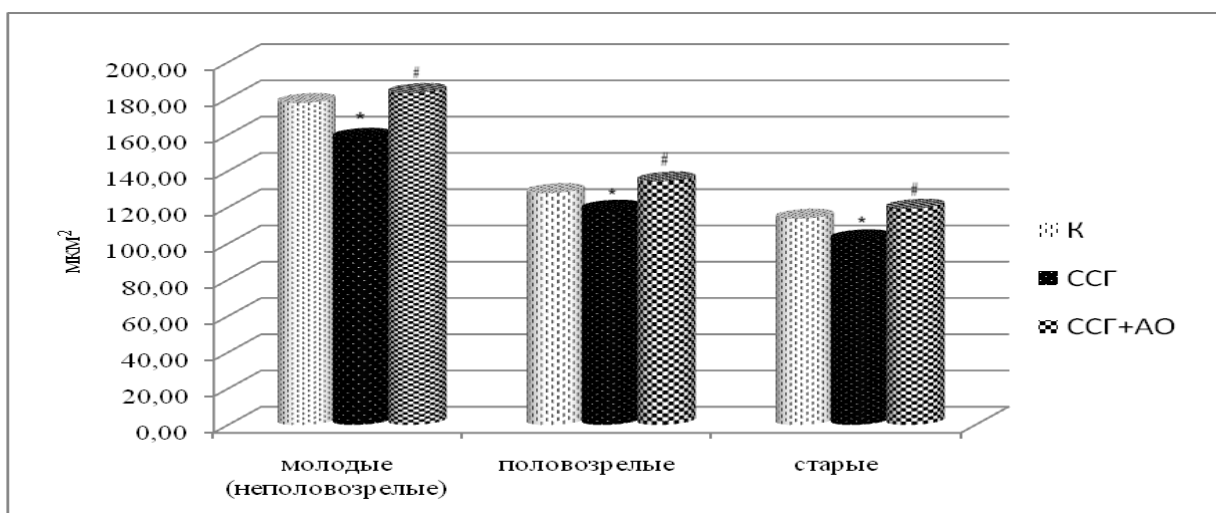


Рисунок 15 - Динамика площади ядер лимфоцитов при различных функциональных состояниях организма изучаемых групп животных

Примечание: * и # - значимые различия ($p < 0,05$) между подгруппами

Полученные данные согласуются с утверждениями авторов (В.Т. Морозова и др, 2003; В.М. Петренко, 2004; И.Н. Путаловой, 2008; И.И. Кошелевой, 2010; Q.Q. Ни et al., 2014; Бородин Ю.И. и др., 2016; Умбетова Т.Ж., 2018) о том, что к действию повреждающих факторов наиболее подвержены структуры лимфатических узлов с максимальными функциональными нагрузками, при этом ответная реакция может

сопровождаться изменением плотности расположения иммунокомпетентных клеток (Гилязова Л.Б., Коплик Е.В. и др., 2010; Конторщиков П.К. и др., 2010).

При воздействии комплексом антиоксидантов на стрессированных животных зарегистрирована положительная динамика функциональной активности ткани, при этом максимальный рост площади ядер лимфоцитов наблюдался у неполовозрелых и старых крыс (Рис. 15).

Структурные перестройки в ткани пахового лимфоузла стрессированных животных на фоне введения тималина с α -токоферолом ацетатом характеризуются расширением мозговых синусов, в то же время у старых крыс отмечается явление коллагенизации. Наличие таких морфологических изменений в строме изучаемого органа, согласно литературным данным М.Р. Сапина (2012), следует, вероятно, рассматривать как следствие «усиления лимфотока и моторной функции узла».

В постнатальном онтогенезе селезенки на фоне увеличения ее размеров, возрастные изменения затрагивают в большей степени строму белой пульпы, уменьшая ее плотность, особенно широкими становятся селезеночные тяжи и синусоиды. С возрастом снижается количество герминативных центров (Сапин М.Р., 2012; Петренко В.М., 2012). В ответ на стрессогенное воздействие зарегистрировано достоверное уменьшение относительного коэффициента массы селезенки по отношению к контролю у всех возрастных групп.

Эти результаты наших исследований согласуются с данными Л.Д. Чесноковой с соавторами (2015), В.Б. Зайцева с соавторами (2010), в частности, о различиях в относительной массе селезенки, связанной с преобладающими функциями этого органа на определенном этапе жизнедеятельности. Под действием стресса в цитоплазме лимфоцитов тимусзависимой зоны (Т-зоны) селезенки всех изучаемых групп животных происходит измельчение и распад глыбок хроматофильного вещества по сравнению с контролем. С возрастом снижается компактность расположения лимфоцитов в герминативных центрах, определяется полнокровие сосудов, отмечается разрастание соединительной ткани в паренхиме селезенки старых крыс (Тухтаев Н.К., 2010; Меркулова Л.М., 2017).

Одним из показателей ответной реакции на стрессовое воздействие является изменение уровня апоптоза лимфоцитов (Рис. 16), при этом наибольшее количество апоптозных клеток зарегистрировано у неполовозрелых и старых крыс.

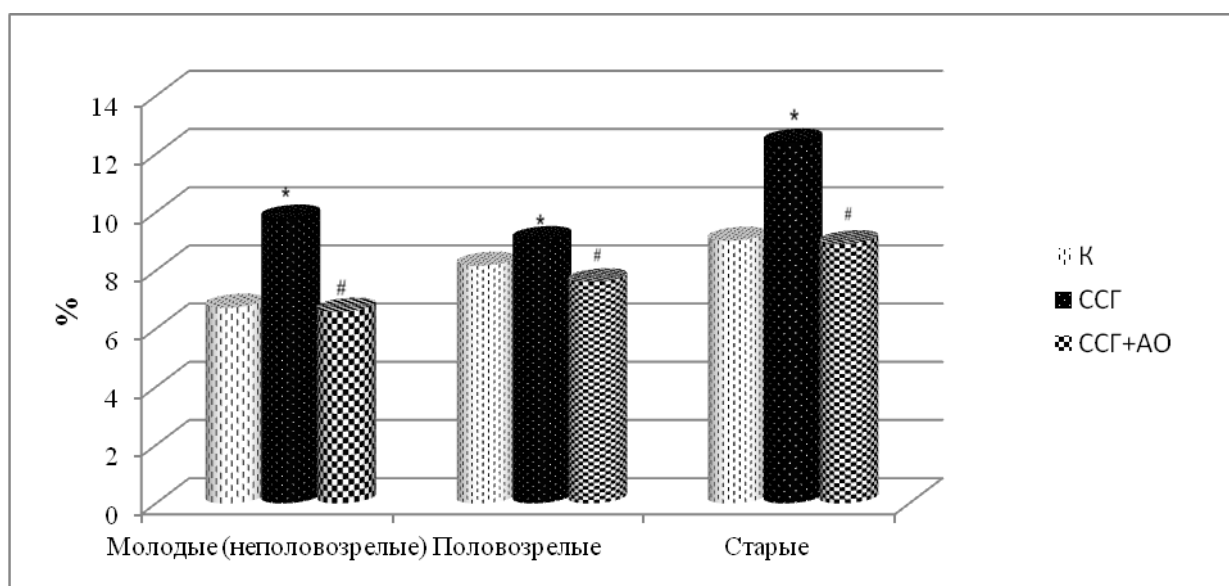


Рисунок 16 - Количество апоптозных клеток в ткани селезенки при различных функциональных состояниях организма изучаемых групп животных
Примечание: * и # - значимые различия ($p < 0,05$) между подгруппами

При сравнении возрастных особенностей изменения этого показателя у стрессированных крыс обращает на себя внимание тот факт, что в условиях гипоксии, вызванной воздействием природного газа, у старых крыс количество апоптозных клеток на 3,4% выше, чем у половозрелых особей ($P < 0,01$) и на 2,6% больше по сравнению этого показателя с молодыми животными ($P < 0,01$). У стрессированных половозрелых крыс зарегистрировано наименьшее количество апоптозных клеток, чем у молодых и старых животных (Рис. 18), что свидетельствует о большей стрессоустойчивости гистологической структуры ткани селезенки данной возрастной группы.

Полученные нами результаты исследований согласуются с утверждениями М.В. Кондашевской с соавторами (2010), А.М. Косыревой с соавторами (2010) о том, что уровень гормонов, в частности андрогенов и эстрогенов, оказывает модулирующее воздействие на морфофункциональное состояние органов иммунной системы.

В условиях гипоксии наблюдалось значительное снижение показателя площади ядер лимфоцитов (Рис. 17), особенно выраженное у неполовозрелых животных.

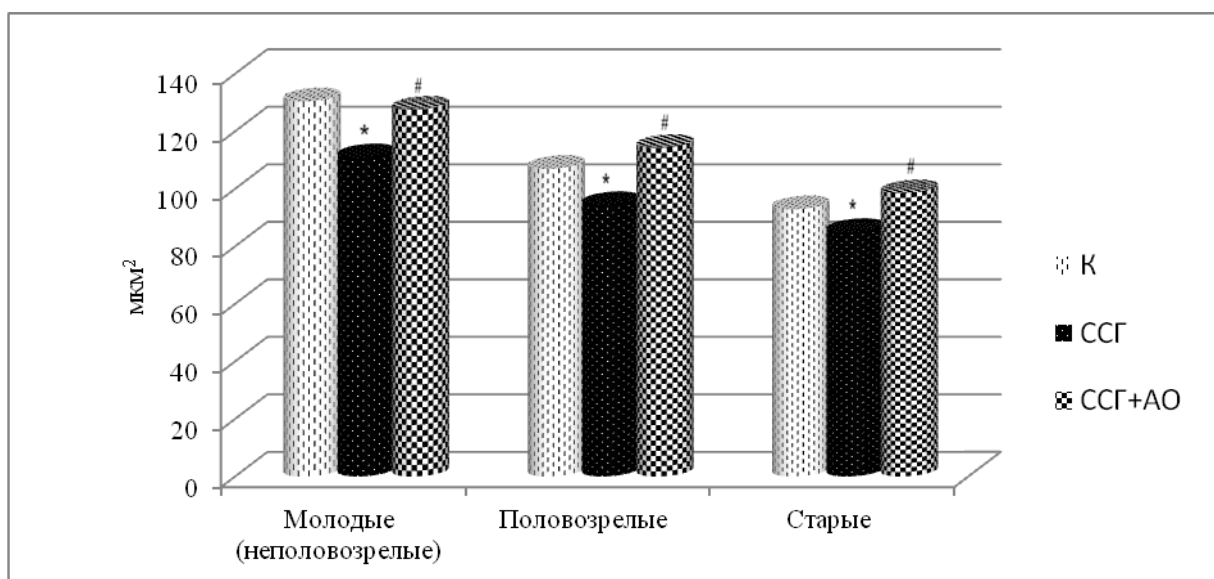


Рисунок 17 - Динамика площади ядер лимфоцитов селезенки при различных функциональных состояниях организма изучаемых групп животных
Примечание: * и # - значимые различия ($p < 0,05$) между подгруппами

При сравнительном анализе возрастных особенностей изменения этого показателя обращает на себя внимание тот факт, что площадь ядер у стрессированных неполовозрелых животных значимо больше площади ядер старых крыс и половозрелых животных. В то же время, площадь ядер половозрелых крыс в условиях гипоксии достоверно ($P < 0,05$) превышает данный показатель у старых животных. Как и при исследовании тканей тимуса и лимфоузлов под действием тималина и витамина Е на фоне стресса, в ткани селезенки всех возрастных групп также был выявлен антиапоптотический эффект (Рис. 16).

На фоне введения комплекса тималина и α -токоферола ацетата относительный коэффициент массы селезенки по отношению к подгруппе, подвергшихся хронической интоксикации, максимально увеличивается в группе молодых крыс - на 113% ($P < 0,001$), в то время как у половозрелых животных рост показателя составил всего на 5,5% ($P < 0,05$), а у старых крыс увеличение этого же показателя произошло на 14% ($P < 0,001$).

В условиях токсического стресса введенный комплекс препаратов усиливает функциональную активность лимфоцитов всех возрастных групп, с наибольшим проявлением ее у половозрелых животных (Рис. 17). Подтверждением этого процесса является зарегистрированное нами увеличение показателя площади ядер лимфоцитов в

тимусзависимой зоне белой пульпы селезенки. У неполовозрелых особей этот показатель вырос в среднем на 15% ($P<0,05$) в сравнении с группой того же возраста, получавшей ССГ, у старых крыс отмечено повышение размера ядер лимфоцитов на 16% ($P<0,05$), а максимальное увеличение данного показателя зарегистрировано у половозрелых животных на 21% ($P<0,05$), в сравнении с группой получавшей ССГ (Рис. 17).

При анализе возрастных особенностей активности ткани селезенки при сочетании токсического стресса с введением препаратов «тималин + витамин Е» обращает на себя внимание тот факт, что площадь ядер лимфоцитов молодых животных существенно выше этого же показателя в группе старых крыс на 23% ($P<0,001$) и больше площади ядер лимфоцитов половозрелых животных на 10,5% ($P<0,01$). Необходимо отметить, что этот же показатель у половозрелых крыс выше, чем у старых животных на 13,8% ($P<0,001$). Наблюдаемые преобразования в морфологической картине ткани селезенки происходят на фоне увеличения размера ядер и объемной плотности элементов белой пульпы, что свидетельствует о тенденции к нормализации функциональной активности органа в условиях воздействия ССГ+АО.



Схема 1 - Эффекты воздействия ССГ на организм крыс

Примечание: ↑ - повышение; ↓ - снижение изучаемого показателя

Таким образом, экспериментальные исследования показали, что выявление околочасового ритма связано с замыканием связей между клетками иммунокомпетентных органов. В онтогенетическом аспекте необходимо отметить, что в уже синхронизированной клеточной популяции тимуса, паховых лимфатических узлов и селезенки изменяется набор периодов колебаний с 20-40 минут до 60-80 минут, что имеет адаптивный характер.

При старении в тканях органов иммунной системы резко изменяется амплитуда колебаний, параметр рассматриваемый как основной показатель синхронизации иммунокомпетентных клеток и их согласованной синтетической активности. В эксперименте при гипоксии, вызванной воздействием сероводородсодержащего газа АГКМ, изменяются адаптивные возможности межклеточной кооперации (Схема 1).

Выявленные морфофункциональные изменения со стороны клеточных структур органов иммунной системы в условиях гипоксии происходят на фоне модификаций околочасовых ритмов в изучаемых тканях. При этом сероводородсодержащий газ

изменяет околочасовой ритм, вызывая снижение амплитуды колебаний, сглаживание кинетической кривой, изменение набора периодов колебаний.

В свою очередь, популяция иммунокомпетентных клеток модифицирует околочасовой ритм в пределах адаптивных возможностей ткани тимуса, лимфатических узлов и селезенки, используя оптимальный для этого набор периодов и амплитуды колебаний (Схема 2).

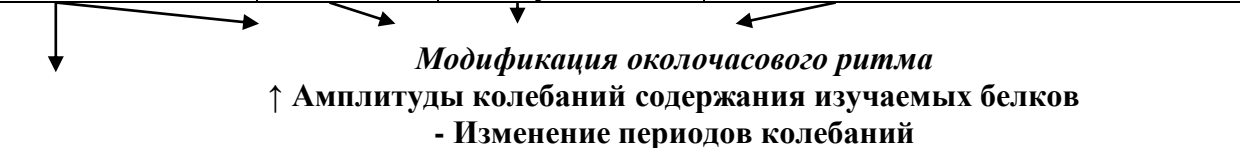
| ССГ+АО | | | |
|---|--|-----------------------------------|------------------|
| Время наблюдения 180 мин. | | | |
| <i>Плазма крови</i> | <i>Тимус</i> | <i>Паховые лимфатические узлы</i> | <i>Селезенка</i> |
|  <p style="text-align: center;">Модификация околочасового ритма ↑ Амплитуды колебаний содержания изучаемых белков - Изменение периодов колебаний</p> | | | |
| ↑ Количества эозинофильных гранулоцитов в 1 мм ³ ↓ Показателей пероксидации липидов ↓ ОМБ | В изучаемых органах ↑ Относительного коэффициента массы органа ↑ Синтетической активности иммунокомпетентных клеток ↑ Пролиферации в тканях ↓ Показателей пероксидации липидов ↓ ОМБ ↓ Уровня апоптоза в тканях | | |

Схема 2 - Эффекты воздействия ССГ+АО на организм крыс

Примечание: ↑ - повышение; ↓ - снижение изучаемого показателя

Результаты исследований показали, что околочасовые ритмы используются в клеточной кооперации для поддержания гомеостаза и адаптации к работе в условиях гипоксии, вызванной воздействием сероводородсодержащим газом.

Выводы

1. В постнатальном онтогенезе регистрируется снижение амплитуды околочасовых колебаний общего белка в плазме крови (с 8% до 6,3% от среднего) и удлинение периодов колебаний изучаемых белков с 20-40 минут и до 60-80 минут. У неполовозрелых и половозрелых животных ритмические осцилляции содержания альбумина и глобулинов в плазме крови находятся в противофазе. Сглаживание кинетической кривой содержания глобулинов у старых животных (с 21% до 9% от среднего) связано с инволюционными процессами в тимусе.

2. В динамике околочасовых ритмов содержания изучаемых белков тимуса, лимфатических узлов и селезенки на этапах онтогенеза выявлено снижение амплитуды общего белка у старых крыс (в тимусе: с 47% до 11%, в паховых лимфатических узлах с 56% до 48%, в селезенке с 47% до 30,5% от среднего), что объясняется угнетением белкового обмена.

3. Адаптивный характер околочасовых осцилляций изучаемых белков плазмы крови и тканей иммунокомпетентных органов при токсическом воздействии связан с выбором частот колебаний в 20-40 минут и до 60-80 минут и проявляется в снижении амплитуды колебаний, сглаживании кинетической кривой.

4. В онтогенезе наибольшие изменения ритмогенеза в плазме крови отмечены у неполовозрелых стрессированных животных, где зарегистрировано снижение содержания общего белка на 23,7% и глобулинов на 47,4% в сравнении с контролем. Выявленное на протяжении 60 минут наблюдения сглаживание кинетической кривой глобулинов,

вероятно связано с низким уровнем резистентности этой группы белков к гипоксическому стрессу. У стрессированных половозрелых и старых животных также зарегистрировано снижение содержания общего белка, но отмечается увеличение уровня альбумина на 19% у половозрелых крыс, что связано, возможно, с его функцией основного транспортного белка и его свойством антиоксидантной защиты жидких сред организма.

5. Угнетение синтеза изучаемых белков в тканях тимуса, паховых лимфатических узлов и селезенки при хроническом воздействии сероводородсодержащего газа, проявляется в изменении параметров ритма особенно у группы молодых и старых крыс. (В тимусе: у неполовозрелых животных подгруппы ССГ уровень общего белка снижается на 6,9% и альбумина на 46% от среднего, у стрессированных старых крыс снижение содержания общего белка составило на 11% и альбумина на 50% от среднего в сравнении с контролем. В паховых лимфатических узлах: у неполовозрелых животных подгруппы ССГ уровень общего белка снижается на 21% и альбумина на 53% от среднего, у стрессированных старых крыс отмечено снижение содержания общего белка на 55% и альбумина на 76,5% от среднего в сравнении с контролем. В селезенке: у неполовозрелых животных подгруппы ССГ уровень общего белка ниже на 53% и альбумина на 73,9% от среднего, у стрессированных старых крыс отмечено снижение содержания общего белка на 4,1% и альбумина на 32,3% от среднего в сравнении с контролем). Зарегистрированные изменения окологорачовой ритмики белкового обмена могут быть следствием как торможения синтеза белков в органах, так и поступлением белков в ткани из плазмы.

6. Хроническое воздействие сероводородсодержащего газа вызывает выраженные морфологические изменения в тканях тимуса, паховых лимфатических узлов, селезенки (полнокровие сосудов, очаги диапедеза эритроцитов, измельчение и распад глыбок хроматофильного вещества, снижение плотности расположения иммунокомпетентных клеток). На разных этапах онтогенеза в норме и при токсическом воздействии наиболее выраженные апоптотические изменения регистрируются в тканях тимуса, паховых лимфатических узлов и селезенки у неполовозрелых и старых животных.

7. Стресс-реакция, вызванная хроническим воздействием сероводородсодержащего газа, проявляется эозинопенией (с более выраженным эффектом в плазме крови старых крыс), снижением относительного коэффициента массы органов по отношению к контролю с наибольшим падением в группе неполовозрелых и старых животных (в тимусе - на 29%, в паховых лимфатических узлах - на 55,6%, и селезенке на 61% у молодых крыс; а так же у старых животных: в тимусе - на 45,8%, паховых лимфатических узлах - на 81%, и селезенке на 32%), усилением интенсивности процессов свободнорадикального окисления в плазме крови и тканях тимуса, паховых лимфатических узлов, селезенки, что определяется возрастными адаптационными особенностями функционирования организма в целом.

8. После введения антиоксидантов на фоне стресса наблюдается увеличение амплитуды колебаний общего белка и альбумина плазмы крови у животных всех возрастных групп (наибольшее увеличение в 2,3 раза отмечено у старых крыс), что вероятно способствует повышению активности процессов обмена белков плазмы крови и тканей органов иммунной системы.

9. Совместное применение препаратов тималина и α -токоферола ацетата на фоне хронического стресса оказывает антиапоптотическое действие на органы иммунной системы крыс всех возрастных групп с наиболее выраженным эффектом в тимусе и селезенке у неполовозрелых и старых животных (в тимусе: отмечается снижение изучаемого показателя на 5% ($P < 0,001$) у старых крыс и на 4,5% ($P < 0,001$) у молодых животных; в селезенке: на 3,5% ($P < 0,01$) у старых и на 3,2% ($P < 0,05$) у молодых животных соответственно ниже количество апоптотических клеток в сравнении с подгруппами ССГ животных того же возраста).

10. Введение тималина и α -токоферола ацетата при хроническом воздействии сероводородсодержащим природным газом приводит к снижению уровня свободно-

радикальных процессов в тимусе, в паховых лимфатических узлах и селезенки у животных всех возрастных групп, но с более выраженным эффектом у старых животных, что свидетельствует о необходимости использования комплекса антиоксидантов в качестве корректоров гипоксических нарушений.

Научно-практические рекомендации

1. Полученные в ходе диссертационного исследования данные позволяют рекомендовать использовать выявленные окологорловые колебания в качестве маркера функционального состояния и морфологической зрелости тканей тимуса, паховых лимфатических узлов и селезенки в онтогенезе и при экзогенных воздействиях.

2. Выявленные в работе закономерности совместного действия препаратов тималина и альфа-токоферола ацетата, указывают на возможность их комплексного применения в качестве адаптогенов, способных повышать устойчивость белков плазмы крови, и одновременно корректировать структурно-функциональные и адаптационные возможности органов иммунной системы при стрессогенном воздействии токсической природы.

3. Разработанный в ходе экспериментального исследования комплекс совместного применения терапевтических доз тималина и альфа-токоферола ацетата на фоне оксидативного стресса эффективно снижает интенсивность свободно-радикальных процессов и увеличивает активность ферментных систем, что позволяет рекомендовать этот комплекс препаратов для синхронизации деятельности иммунокомпетентных клеток, а так же для повышения устойчивости тканей и органов иммунной системы к экзогенным повреждающим воздействиям.

4. Предложенный и апробированный в работе комплекс препаратов рекомендуется использовать для проведения доклинических исследований зарегистрированных средств с целью расширения спектра показаний их применения.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Список работ, опубликованных в научных изданиях, рекомендованных ВАК:

1. Рожкова, И.С. Окологорловые клеточные ритмы как фактор адаптации к изменяющимся условиям внешней среды /И.С. Рожкова, Б.В. Фельдман // Астраханский медицинский журнал. - 2008г. - №3. - т. 3. - с. 273 - 276.
2. Рожкова, И.С. Показатели свободнорадикальных процессов в иммунной системе крыс на различных этапах онтогенеза /И.С. Рожкова, Д.Л. Теплый, Б.В. Фельдман // Астраханский медицинский журнал. - 2012г. - №4. - т.7. - с. 223 - 225.
3. Рожкова, И.С. Онтогенетические особенности показателей свободнорадикальных процессов плазмы крови крыс /И.С. Рожкова, Д.Л. Теплый, Б.В. Фельдман // Астраханский медицинский журнал. - 2013г. - №1. - т. 8. - с. 209 - 211.
4. Рожкова, И.С. Вилочковая железа в постнатальном онтогенезе белых крыс /И.С. Рожкова, Д.Л. Теплый, Б.В. Фельдман, М.Н. Тризно // Астраханский медицинский журнал. - 2013г. - №1. - т. 8. - с. 211 - 214.
5. Рожкова, И.С. Морфология тимуса в постнатальном онтогенезе в условиях хронической интоксикации /И.С. Рожкова, Д.Л. Теплый, Б.В. Фельдман // Морфология. - 2014г. - №3. - т. 145. - с. 163 - 164.
6. Рожкова, И.С. Морфология тимуса в постнатальном онтогенезе белых крыс /И.С. Рожкова, Д.Л. Теплый // Естественные науки. - 2014г. - №1. - т. 46. - с. 67 - 71.
7. Рожкова, И.С. Адаптационная способность органов иммунной системы крыс в условиях стресса /И.С. Рожкова, Д.Л. Теплый // Естественные науки. - 2014г. - №4. - т. 49. - с. 67 - 71.

8. Рожкова, И.С. Динамика свободнорадикальных процессов при хронической интоксикации /И.С. Рожкова, Д.Л. Теплый // Естественные науки. - 2015г. - №3. - т. 52. - с. 61 – 65.
9. Рожкова, И.С. Процесс апоптоза клеток ткани тимуса в условиях хронической интоксикации на разных этапах онтогенеза /И.С. Рожкова, Д.Л. Теплый, Б.В. Фельдман //Морфология. - 2016г. - №3. - т. 149. - с. 172-173.
10. Рожкова, И.С. Анализ патоморфологических изменений тимуса при хронической интоксикации и введении антиоксидантов /И.С. Рожкова, Д.Л. Теплый, Б.В. Фельдман // Астраханский медицинский журнал. - 2015г. - №4. - т.10. - с. 73-78.
11. Рожкова, И.С. Фармакологическая коррекция динамики свободно-радикальных процессов в органах иммунной системы на фоне хронической интоксикации /И.С. Рожкова, Д.Л. Теплый // Естественные науки. - 2016г. - №1. - т. 54. - с. 72 - 77.
12. Рожкова, И.С. Ультрадианные ритмы синтеза белка в плазме крови у молодых животных в условиях интоксикации /И.С. Рожкова, Д.Л. Теплый // Естественные науки. - 2017г. - №1. - т. 58. - с. 53 - 59.
13. Рожкова, И.С. Особенности ритмической активности белков плазмы крови у экспериментальных животных /И.С. Рожкова, Д.Л. Теплый // Естественные науки. - 2017г. - №4. - т. 61. - с. 73 - 76.
14. Рожкова, И.С. Околочасовые ритмы белков ткани тимуса в условиях хронической интоксикации на разных этапах онтогенеза /И.С. Рожкова, Б.В. Фельдман // Морфология. - 2018г. - №3. - т. 153. - с. 232.
15. Рожкова, И.С. Реакция лимфатических узлов крыс в условиях хронической интоксикации /И.С. Рожкова, Д.Л. Теплый // Морфология. - 2019г. - с. 241 - 242.
16. Рожкова, И.С. Антиоксиданты в регуляции функциональной активности ткани селезенки в условиях интоксикации /И.С. Рожкова, Д.Л. Теплый // Современные проблемы науки и образования. - 2020. - №3. - с. 124. DOI: 10.17513/spno.29874.

Список работ, опубликованных в международных изданиях:

17. Рожкова, И.С. Оксидативный стресс и апоптоз в тимусе крыс при хронической интоксикации и введении антиоксидантов /И.С. Рожкова, Б.В. Фельдман // Sciences of Europe Journal. - 2016г. - №1. - vol. 2. - с. 82 - 86.
18. Рожкова, И.С. Антиоксиданты и свободно-радикальные процессы плазмы крови крыс в условиях хронической интоксикации /И.С. Рожкова, Б.В. Фельдман //Российско-китайский журнал «Содружество». – 2016г. – с. 102 – 104.
19. Рожкова, И.С. Оксидативный стресс при хронической интоксикации и введение антиоксидантов /И.С. Рожкова // East European Scientific Journal.– 2017г. - №4. – vol. 20. - part 1. – с. 93 – 98.
20. Рожкова, И.С. Адаптация органов периферической иммунной системы к оксидативному стрессу /И.С. Рожкова // 44-ая Международная научно-практическая конференция «Актуальные проблемы в современной науке и пути их решения». - Eurasian Union of Scientists Journal. - 2017г. - с. 25 - 27.
21. Рожкова, И.С. Ритмическая активность ткани тимуса в постнатальном онтогенезе /И.С. Рожкова // Global science. Development and novelty. Collection of scientific papers on materials VI International Scientific Conference. – Geneva. - 2017г. – Part 1. - с. 40 – 42. DOI: 10.18411/gdsn-25-12-2017-11
22. Рожкова, И.С. Формирование околочасовых ритмов и оксидативного стресса в ткани тимуса /И.С. Рожкова, Д.Л. Теплый // Open science 2.0: Collection of scientific articles. Raleigh, North Carolina, USA: Open Science Publishing, USA. - 2018г. - vol. 4. - с. 151 – 155.
23. Рожкова, И.С. Особенности ритмической активности белков плазмы крови в эксперименте /И.С. Рожкова, Д.Л. Теплый // Sciences of Europe Journal. - 2018г. - №27. - vol. 2. - с. 12 - 14.

24. Рожкова, И.С. Экологическая адаптация ритмической активности белков плазмы крови в эксперименте /И.С. Рожкова // Scientific achievements of the third millennium. Collection of scientific papers on materials VII International scientific - practical conference. - San Francisco. - 2018г. - Part 1. - с. 64 - 67. DOI: 10.18411/scc-05-2018-16.
25. Рожкова, И.С. Хронобиологическая структура тимуса /И.С. Рожкова, Д.Л. Теплый // General question of world science. Collection of scientific papers, on materials VII International scientific - practical conference. - Brussel. - 2019г. - Part 1. - с. 104 - 107. DOI: 10.18411/gq-30-03-2019-24.
26. Рожкова, И.С. Особенности реакции лимфатических узлов и селезенки крыс на хроническую интоксикацию /И.С. Рожкова, Д.Л. Теплый // Scientific achievements of the third millennium. Collection of scientific papers on materials International scientific-practical conference. - Washington. - 2019г. - Part 1. - с. 56 - 58. DOI: 10.18411/scienceconf-05-2019-2.
27. Рожкова, И.С. Адаптация ткани вилочковой железы к интоксикации серосодержащими поллютантами /И.С. Рожкова, Д.Л. Теплый // Scientific achievements of the third millennium. Collection of scientific papers on materials X International scientific-practical conference. - New York. - 2019г. - с. 49 - 51. DOI: 10.18411/scienceconf-09-2019-26.
28. Рожкова, И.С. Ритмическая активность ткани лимфатических узлов в онтогенезе при токсическом стрессе /И.С. Рожкова // Eurasian Union of Scientists Journal. - 2020г. - №3-3 (72). - с. 4 - 7. DOI: 10.31618/ESU.2413-9335.2020.3.72.
29. Рожкова, И.С. Воздействие природного газа на активность ткани селезенки в онтогенезе /И.С. Рожкова, Д.Л. Теплый // Eurasian Union of Scientists Journal. - 2020г. - №4-2 (73). - с. 53 - 58. DOI: 10.31618/ESU.2413-9335.2020.2.73.663.
30. Рожкова, И.С. Functioning of blood plasma proteins under experimental stress /И.С. Рожкова // Proceedings of the Internarional Conference «Scientific Research of the SCO countries: Synergy and Integration. - China. - 2020. - Part 1. - с. 207 - 210. DOI: 10.34660/INF.2020.61.79.028.
31. Rozhkova, I.S. Ultradian rhythms and oxidative stress in lymph-node tissue during ontogenesis /I.S. Rozhkova, D.L. Teply, E.D. Bazhanova // Advances in Gerontology. - 2021. - т. 11. - № 3. - с. 268 - 273.

Монографии:

32. Рожкова, И.С. Околочасовые клеточные ритмы при различных функциональных состояниях организма и токсическом воздействии /Б.В. Фельдман, Р.И. Асфандияров, И.С. Рожкова. - Астрахань: изд-во АГМА. - Монография. - 2008г. - 139с.

Список работ, опубликованных в рецензируемых изданиях:

33. Рожкова, И.С. Интенсивность процессов перекисного окисления липидов в иммунной системе крыс при токсическом воздействии /И.С. Рожкова, Д.Л. Теплый, Б.В. Фельдман // Материалы IX международной научно-практической конференции «Достижения фундаментальных наук и возможности трансляционной медицины в решении актуальных проблем практического здравоохранения». - Астрахань. - 2013г. - с. 91 - 93.
34. Рожкова, И.С. Окислительный стресс в органах иммунной системы крыс при токсическом воздействии /И.С. Рожкова, Д.Л. Теплый, Б.В. Фельдман // Международная научно-практическая конференция «Теоретические и практические аспекты науки и образования». - Волгоград. - №2. - т. 3. - 2014г. - с. 5 - 11.
35. Рожкова, И.С. Сравнительное изучение структурно-функциональной организации тимуса в норме и при токсическом воздействии /И.С. Рожкова, Д.Л. Теплый, Б.В. Фельдман // Международная научно-практическая конференция «Теоретические и практические аспекты науки и образования». - Волгоград. - №3. - т. 4. - 2014г. - с. 93 - 102.
36. Рожкова, И.С. Возрастные особенности антиоксидантной системы крыс при хронической интоксикации /И.С. Рожкова, Д.Л. Теплый, Б.В. Фельдман // Теоретические и практические аспекты науки и образования. - Волгоград. - №5. - т. 6. - 2014г. - с. 128 - 136.

37. Рожкова, И.С. Влияние хронической интоксикации на свободнорадикальные процессы плазмы крови крыс /И.С. Рожкова, Д.Л. Теплый, Б.В. Фельдман // Международная научно-практическая конференция «Теоретические и практические аспекты науки и образования». - Волгоград. - №3. - т. 10. - 2015г. - с. 62 - 68.
38. Рожкова, И.С. Возрастные особенности показателей свободнорадикальных процессов плазмы крови крыс в условиях хронической интоксикации /И.С. Рожкова // Материалы XIV Международной научно-практической конференции «Современные концепции научных исследований». - Москва. - №5. - 2015г. - с. 34 - 36.
39. Рожкова, И.С. Оценка эффективности введения комплекса антиоксидантов в условиях хронической интоксикации /И.С. Рожкова, Д.Л. Теплый, Б.В. Фельдман // Материалы III Всероссийской научной конференции с международным участием «Свободные радикалы, антиоксиданты и старение». - Астрахань. - 2016г. - с. 91 - 94.
40. Рожкова, И.С. Антиоксиданты и хроническая интоксикация организма /И.С. Рожкова, Д.Л. Теплый, Б.В. Фельдман // Материалы Международной конференции Прикаспийских государств «Актуальные вопросы современной медицины». - Астрахань. - 2016г. - с. 182 - 183.
41. Рожкова, И.С. Введение антиоксидантов при оксидативном стрессе в плазме крови крыс /И.С. Рожкова, Д.Л. Теплый, Б.В. Фельдман // Материалы Всероссийская научно-практическая конф. С международным участием «Инновации в здоровье нации». - Санкт-Петербург. - 2016г. - с. 160 - 163.
42. Рожкова, И.С. Ритмическая активность белков плазмы крови у молодых животных при введении комплекса антиоксидантов /И.С. Рожкова, Д.Л. Теплый // Материалы Международной научно-практической конф. «Фармацевтические науки: от теории к практике». - Астрахань. - 2016г. - с. 68 - 69.
43. Рожкова, И.С. Воздействие комплекса антиоксидантов на ритмическую активность белков плазмы крови у старых животных [Электронный ресурс] /И.С. Рожкова, Д.Л. Теплый // Дневник науки. - 2017. - №3 (3) URL: http://www.dnevniknauki.ru/images/publications/2017/3/biology/Roskova_Teply.pdf (Дата обращения 24.03.2017).
44. Рожкова, И.С. Роль антиоксидантов в регуляции оксидативного стресса /И.С. Рожкова // Материалы Международной научно-практической конференции «Общество, технология и окружающая среда». - Москва. - 2017г. - с. 379 - 383.
45. Рожкова, И.С. Ритмы белков плазмы крови старых крыс /И.С. Рожкова // Материалы I Международной научно-практической конференции «Исследования, разработки и методы в области медицины и фармацевтики». – Саратов. - 2017г. – с. 36 – 41.
46. Рожкова, И.С. Околочасовые ритмы белков плазмы крови при стрессе и введении комплекса антиоксидантов /И.С. Рожкова, Д.Л. Теплый, Б.В. Фельдман // Материалы международной научно-практической конф. «Структурные преобразования органов и тканей в норме и при воздействии антропогенных факторов». - Астрахань. - 2017г. - с. 147 - 148.
47. Рожкова, И.С. Кинетика содержания белков плазмы крови у молодых животных /И.С. Рожкова // Материалы Международной научно-практической конф. «Единство науки, образования и практики в медицине будущего» посв. 110-летию со дня рожд. ак-ка Жданова Д.А. и 260-летию ПМГМУ им. И.М. Сеченова. - Москва. - 2018г. - с. 242 - 244.
48. Рожкова, И.С. Реакция лимфатических узлов и селезенки крыс на оксидативный стресс /И.С. Рожкова, Д.Л. Теплый // Материалы Всероссийской Научно-практической конф. с международным участием «Актуальные исследования висцеральных систем в биологии и медицине». - Астрахань. - 2018г. - с. 63 - 65.
49. Рожкова, И.С. Антиоксидантное действие витамина Е и тималина в условиях хронической интоксикации серосодержащими поллютантами /И.С. Рожкова, Б.В. Фельдман // Материалы IV Международной конф. Прикаспийских государств «Актуальные вопросы современной медицины». - Астрахань. - 2019г. - с. 284 - 286.

50. Рожкова, И.С. Тималин и витамин Е в регуляции оксидативного стресса /И.С. Рожкова // Материалы Всероссийской научно-практической конф. «Молодые ученые в решении актуальных проблем современной физиологии». - Астрахань. - 2020г. - с. 56 - 58.

51. Рожкова, И.С. Окислительный стресс в ткани лимфатических узлов в условиях интоксикации / И.С. Рожкова // М.: Изд-во «Современные проблемы науки и образования». - 2021г. - т. 21. - с. 77 - 80.

Список обозначений и условных сокращений

α -ТФ - α – токоферол; **АГКМ** - Астраханское газоконденсатное месторождение; **А/Г** - соотношения содержания альбуминов к глобулинам; **Аск. ПОЛ** - скорость аскорбатзависимого ПОЛ; **АКМ** - активированные кислородные метаболиты; **АО** – антиоксиданты; **Ед. оп. пл.** - единицы оптической плотности; **Исх. ПОЛ** - уровень содержания МДА; **М** – молодые (неполовозрелые) животные; **МДА** - малоновый диальдегид; **ОМБ** - окислительная модификация белков; **П** – половозрелые животные; **ПОЛ** - перекисное окисление липидов; **Сп. ПОЛ** - скорость спонтанного ПОЛ; **С** – старые животные; **СРО** - свободно-радикальное окисление; **ССГ** - сероводородсодержащий газ; **ССГ+АО** – воздействие природного сероводородсодержащего газа на фоне введения антиоксидантов; **ТБК** - продукты, реагирующие с тиобарбитуровой кислотой; **У. ед.** - условные единицы.