

С.А. Витязева, Т.П. Старовойтова, В.И. Дубровина, Ж.А. Коновалова

## ОЦЕНКА ДЕЙСТВИЯ АРГЕНТОГАЛАКТОМАННА И АРГЕНТО-ПОЛИ-1-ВИНИЛ-1,2,4-ТРИАЗОЛА НА ПОПУЛЯЦИОННЫЙ СОСТАВ КЛЕТОК КОСТНОГО МОЗГА ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫХ ЖИВОТНЫХ

ФКУЗ «Иркутский научно-исследовательский противочумный институт» Роспотребнадзора (Иркутск)

*Проведены исследования по изучению влияния серебросодержащих наноконкомпозитов – галактоманна и поли-1-винил-1,2,4-триазола – на клеточный состав периферической крови и красного костного мозга белых мышей. Полученные в ходе экспериментов результаты свидетельствуют о том, что данные наноконкомпозиты не являются токсичными, изменения, вызываемые их введением, носят продуктивный характер, и часть из них указывает на активизацию иммунной системы макроорганизма.*

**Ключевые слова:** наноконкомпозит, аргентогалактоманн, поли-1-винил-1,2,4-триазол, иммуногенность

## ESTIMATION OF INFLUENCE OF ARGENTOGALACTOMANNAN AND ARGENTO-POLY-1-VINYL-1,2,4-TRIAZOLE ON POPULATION STRUCTURE OF RED MARROW CELLS OF EXPERIMENTAL ANIMALS

S.A. Vityazeva, T.P. Starovoitova, V.I. Dubrovina, Zh.A. Konovalova

Irkutsk Antiplague Research Institute of Siberia and Far East, Irkutsk

*We studied influence of silver-containing nanocomposites – galactomannan and poly-1-vinyl-1,2,4-triazole – on cell structure of peripheral blood and red marrow of white mice. The results obtained after the experiments testify that these nanocomposites aren't toxic, the changes caused by their introduction are productive and part of them points at the activization of immune system of macroorganism.*

**Key words:** nanocomposite, argentogalactomannan, poly-1-vinyl-1,2,4-triazole, immunogenicity

Актуальным направлением исследований в области иммунопрофилактики инфекционных болезней на протяжении многих лет является поиск безопасных средств, повышающих эффективность специфической иммунотерапии, экстренной индукции неспецифической резистентности в эпидемически опасной ситуации при встрече с неизвестным возбудителем и в других случаях повышенного риска возникновения инфекции [4]. Важным свойством иммуномодулирующих препаратов является селективность их влияния на организм, что проявляется направленным воздействием на Т- или В- звено иммунной системы, фагоцитоз, неспецифические защитные реакции и т.д. [2, 3].

Среди множества неспецифических стимуляторов иммунитета, различающихся по происхождению, структуре и механизму действия, лишь немногие получили применение в медицине и смежных областях. Это обусловлено, прежде всего, их токсичностью и отсутствием мембранотропных свойств. В настоящее время ведутся разработки препаратов лишенных этих недостатков. В связи с тем, что производные 1-винил-1,2,4-триазола (ПВТ) и галактоманна (ГМ) проявляют антибактериальную, фунгицидную и иммуномодулирующую активность, а также обладают низкой токсичностью, серебросодержащие композиты на их основе представляют особый интерес [6, 8].

**Цель работы:** изучить влияние аргентогалактоманна и аргенто-1-винил-1,2,4-триазола на клеточный состав периферической крови и красного костного мозга экспериментальных животных.

## МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

В качестве объектов исследования использовали два полимерных наноконкомпозита: аргентогалактоманн (ГМ-Аг) и аргенто-1-винил-1,2,4-триазол (2-Н-ПВТ-Аг).

Экспериментальной моделью в опытах служили 132 беспородные, но стандартные по условиям содержания и весу (18 – 20 г) белые мыши обоих полов. Животные были разделены на шесть опытных (по 20 особей в каждой) и контрольную (12 особей) группы. Белым мышам I, II и III опытных групп вводили ГМ-Аг однократно подкожно в правую заднюю лапу в объеме 0,5 мл в дозах 1 мг/кг, 10 мг/кг и 100 мг/кг соответственно. Животным IV, V и VI групп в тех же дозах и объеме вводили 2-Н-ПВТ-Аг. Контролем служили белые мыши, получившие забуференный физиологический раствор (ЗФР, рН = 7,2) в объеме 0,5 мл.

Забор крови для исследования проводили из вены хвоста на 1-е, 3-е, 5-е и 7-е сутки с момента введения препарата. Оценку гематологических показателей осуществляли по общепринятым методам [7, 9].

Животных выводили из эксперимента под наркозом на 3-е, 7-е, 14-е и 21-е сутки с момента введения препарата в соответствии с «Правилами проведения работ с использованием экспериментальных животных» (Приказ МЗ СССР № 775 от 12.08.1977 г. и Приложение к приказу Минздрава РФ № 267 от 2003 «Об утверждении правил лабораторной практики») и немедленно проводили вскрытие, что обеспечивало близкое к прижизненному

состояние органов и тканей. Макроскопически оценивали состояние паренхиматозных органов. Обнаруженные при вскрытии животных изменения регистрировали в протоколе.

Фиксированные мазки костного мозга окрашивали по стандартным методикам [7]. Количественную оценку клеточного состава проводили с использованием морфометрии (100 измерений клеточных элементов в различных участках на 5 мазках при помощи 25-узловой сетки на условной единице площади препарата, равной 2500 мкм<sup>2</sup>, с использованием масляной иммерсии при увеличении окуляра – 10, объектива – 100) [1].

Все полученные материалы обработаны с применением стандартного пакета программ Statistica 6.0 (Copyright©Stat Soft, Inc 19842001, ИПЧИ 31415926535897) и пакета программ Microsoft Office Excel (2003). Для каждой выборки вычисляли  $M$  – среднее арифметическое,  $m$  – ошибка среднего. Для сравнения средних из выборок использовали критерий Стьюдента. Результаты считали достоверными при  $P < 0,05$  по отношению к контролю.

### РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В течение 7 дней осуществляли контроль массы тела животных путем ежедневного взвешивания. Динамика изменения веса опытных животных за весь период наблюдения не отличается от показателей у контрольных животных.

За 30 минут до введения препарата у животных ректальным способом измеряли исходную температуру, которая составила  $36,8 \pm 0,5$  °С. После введения иммуномодуляторов в дозе 100 мг/кг измерение температуры проводили 3-кратно с промежутком 60 мин. Температура тела белых мышей, получивших подкожно максимальную дозу наноконпозитов, не увеличивалась, среднее значение оставалось в тех же пределах, что и до введения –  $36,9 \pm 0,3$  °С, не превышая допустимых пределов.

При вскрытии у животных, получавших ГМ-Аг и 2-Н-ПВТ-Аг в дозе 1 мг/кг, во все сроки наблюдения видимые изменения отсутствуют. У 60 % белых мышей при инокуляции препаратов в дозе 10 мг/кг только на 3-и сутки паренхиматозные органы (селезенка и печень) увеличены в размере, дряблые, на разрезе – ткань лишена обычного блеска, тусклая. У особей, иммунизированных большой дозой наноконпозитов (100 мг/кг), вышеперечисленные изменения носят более выраженный характер и регистрируются в 80 % случаев, сохранялись до 14-х суток. В других органах и в месте введения препарата видимых изменений не установлено.

Существенных различий в патоморфологической картине у белых мышей, получавших 2-Н-ПВТ-Аг и ГМ-Аг, не выявлено. Все изменения носят доброкачественный характер (отсутствие экссудативных и некротических процессов) и нивелируются к 21-м суткам.

При исследовании периферической крови экспериментальных животных, иммунизированных экспериментальными препаратами в дозе 1 мг/

кг и 10 мг/кг абсолютные и относительные показатели гемограммы, общее число эритроцитов и лимфоцитов во все сроки наблюдения остаются без изменений и соответствуют значениям контрольных животных.

У белых мышей, получивших большую дозу препаратов (100 мг/кг), только на ранних сроках отмечено незначительное увеличение общего числа эритроцитов (табл. 1). Так, у особей, которым вводили 2-Н-ПВТ-Аг, эти показатели, по сравнению с интактными животными, выше в 1,2 раза ( $t = 5,0$ ;  $df = 6$ ;  $P < 0,01$ ), а у мышей, иммунизированных ГМ-Аг, – в 1,3 раза ( $t = 4,5$ ;  $df = 6$ ;  $P < 0,01$ ). Максимальное повышение общего числа лейкоцитов установлено на 1-е сутки с момента введения препаратов. У животных, получивших 2-Н-ПВТ-Аг, и у белых мышей, иммунизированных ГМ-Аг, данный показатель превосходит контрольные значения в 1,5 раза ( $t = 5,1$ ;  $df = 6$ ;  $P < 0,01$ ) и 1,6 раза ( $t = 7,1$ ;  $df = 6$ ;  $P < 0,001$ ) соответственно. На 3–7-е сутки наблюдения в этих опытных группах данные показатели не отличаются от контрольных.

Таблица 1

Общее число эритроцитов и лимфоцитов в крови белых мышей, иммунизированных наноконпозитами 2-Н-ПВТ-Аг и ГМ-Аг в дозе 100 мг/кг ( $M \pm m$ )

Сроки наблюдения, сутки	Препараты	Количество эритроцитов (млн/мм <sup>3</sup> )	Количество лейкоцитов (тыс./мм <sup>3</sup> )
1-е	2-Н-ПВТ-Аг	11,2 ± 0,4*	14,8 ± 0,8*
	ГМ-Аг	11,9 ± 0,6*	15,9 ± 0,7**
3-и	2-Н-ПВТ-Аг	9,8 ± 0,3	12,1 ± 0,5
	ГМ-Аг	9,9 ± 0,7	12,8 ± 0,9
5-е	2-Н-ПВТ-Аг	9,5 ± 0,6	10,7 ± 0,7
	ГМ-Аг	9,3 ± 0,3	10,9 ± 0,4
7-е	2-Н-ПВТ-Аг	9,4 ± 0,1	10,2 ± 0,3
	ГМ-Аг	9,3 ± 0,5	10,1 ± 0,7
Контроль		9,2 ± 0,2	10,2 ± 0,4

Примечание: \* –  $P < 0,01$ ; \*\* –  $P < 0,001$  – статистическая значимость различий по отношению к контролю.

В лейкограмме периферической крови животных, которым вводили препараты в дозе 1 мг/кг, изменения отсутствуют. У белых мышей, получивших 2-Н-ПВТ-Аг в дозе 10 мг/кг на 1 сутки, имеет место тенденция к увеличению числа моноцитов и эозинофилов за счет снижения сегментоядерных гранулоцитов и лимфоцитов. Данные изменения в группе животных, иммунизированных ГМ-Аг в этой дозе, отмечаются и на 3-и сутки исследования. Показатели лейкограммы опытных животных на 5–7-е сутки не отличаются от показателей у интактных белых мышей. Наиболее выраженные изменения в лейкограмме периферической крови регистрируются у особей, получивших наноконпозиты в дозе 100 мг/кг. На 1-е сутки исследования в крови животных, иммунизированных 2-Н-ПВТ-Аг, отмечается увеличение числа моноцитов в 1,9 раза ( $t = 12,6$ ;  $df = 6$ ;  $P < 0,001$ ) и в 1,7 раза ( $t = 7,5$ ;

df = 6;  $P < 0,001$ ) при введении ГМ-Аг, относительно показателя в контроле, эозинофилов – в 2,6 раза ( $t = 6,5$ ;  $df = 6$ ;  $P < 0,001$ ) и 3,1 раза ( $t = 10,6$ ;  $df = 6$ ;  $P < 0,001$ ) соответственно. Данные изменения усиливаются к 3-м суткам, превышая значения в контроле по содержанию моноцитов в 2,4 раза ( $t = 27,5$ ;  $df = 6$ ;  $P < 0,001$ ) у животных, получивших 2-Н-ПВТ-Аг, и 2,2 раза ( $t = 12,2$ ;  $df = 6$ ;  $P < 0,001$ ) – ГМ-Аг. Количество эозинофилов снижается как в первой, так и во второй опытных группах, но остается выше показателей контрольных животных. В эти же сроки у мышей опытных групп в периферической крови регистрируются широкоплазменные лимфоциты и овальнаядерные моноциты, что может свидетельствовать о повышении их фагоцитирующей способности и указывать на активизацию клеточного иммунитета [5]. Начиная с 5-х суток, показатели лейкограммы соответствуют значениям в контроле, тем не менее, отмечена тенденция к увеличению числа малых лимфоцитов по сравнению с интактными.

В миелограмме белых мышей, которым вводили препараты в дозе 1 мг/кг, достоверных изменений на всех сроках исследования не выявлено. На 3-и сутки эксперимента у животных опытных групп (препараты в дозе 10 мг/кг) отмечается уменьшение числа зрелых клеток лейкопоза, в связи с чем соотношение между молодыми и более зрелыми формами нейтрофилов – индекс созревания нейтрофилов (ИСН) – превышает в 1,6 раза ( $t = 10$ ;  $df = 6$ ;  $P < 0,001$ ) у белых мышей, иммунизированных 2-Н-ПВТ-Аг, и в 1,5 раза ( $t = 4,2$ ;  $df = 6$ ;  $P < 0,01$ ) – ГМ-Аг по сравнению с показателями у интактных животных (табл. 2). Это прежде всего связано с оттоком зрелых гранулоцитов в периферическую кровь и органы. В последующие сроки ИСН снижается до значений в контроле.

Таблица 2

Костномозговой индекс созревания нейтрофилов ( $M \pm m$ )

Сроки наблюдения, сутки	Нанокompозит	
	2-Н-ПВТ-Аг	ГМ-Аг
3-и	0,80 ± 0,03**	0,75 ± 0,06*
7-е	0,60 ± 0,05	0,62 ± 0,08
14-е	0,51 ± 0,08	0,49 ± 0,04
21-е	0,48 ± 0,02	0,50 ± 0,02
Контроль	0,50 ± 0,01	

Примечание: \* –  $P < 0,01$ ; \*\* –  $P < 0,001$  – статистическая значимость различий по отношению к контролю.

На 7-е сутки регистрируется интенсивная пролиферация клеток гранулоцитарного, лимфоцитарного, моноцитарного и эритроидного ростка костномозгового гемопоэза. Так, у опытных животных обеих групп количество палочкоядерных нейтрофилов в среднем в 1,5 раза ( $t = 15,2$ ;  $df = 6$ ;  $P < 0,001$ ) превышает контрольные значения, а увеличение числа зрелых сегментоядерных нейтрофилов в 1,4

раза ( $t = 13,5$ ;  $df = 6$ ;  $P < 0,001$ ) регистрируется только в случае 2-Н-ПВТ-Аг. Установлено повышение процента зрелых лимфоцитов у животных, иммунизированных 2-Н-ПВТ-Аг в 1,8 ( $t = 31,6$ ;  $df = 6$ ;  $P < 0,001$ ) и 2,0 раза ( $t = 30,7$ ;  $df = 6$ ;  $P < 0,001$ ) – ГМ-Аг. Число моноцитов как в первом, так и во втором случаях превышает в 1,5 раза ( $t = 2,6$ ;  $df = 6$ ;  $P < 0,05$ ) контрольные значения. У белых мышей опытных групп отмечается наличие плазмобластов и плазматических клеток, а также увеличение процентного содержания пролимфоцитов с азурофильной зернистостью, характерной для Т-лимфоцитов [5]. Начиная с 14-х суток наблюдения, данные показатели не отличались от таковых в контроле.

У животных, иммунизированных препаратами в дозе 100 мг/кг, вышеперечисленные изменения носят более выраженный характер. На 3 – 7-е сутки наблюдения отмечается увеличение количества эозинофилов у животных, иммунизированных ГМ-Аг, в 4 раза ( $t = 7,5$ ;  $df = 6$ ;  $P < 0,001$ ), а у белых мышей, получавших 2-Н-ПВТ-Аг, – в 2 раза ( $t = 3,3$ ;  $df = 6$ ;  $P < 0,05$ ), по сравнению с контролем, что может свидетельствовать об аллергической реакции, вызванной большой дозой препаратов.

Таким образом, экспериментальные нанокompозиты ГМ-Аг и 2-Н-ПВТ-Аг в дозах 1 – 100 мг/кг не вызывают необратимых патологических изменений в паренхиматозных органах лабораторных животных. Результаты исследования периферической крови опытных белых мышей (отсутствие изменений в лейкограмме и количественного содержания эритроцитов и лейкоцитов) указывают на безвредность испытуемых препаратов.

При сравнительном анализе полученных данных установлено, что иммунный ответ в красном костном мозге экспериментальных животных при введении нанокompозитов ГМ-Аг и 2-Н-ПВТ-Аг регистрируется на ранних сроках наблюдения (3 – 7-е сутки), с последующим снижением показателей к 21-м суткам. Выявленное в ходе экспериментов стимулирующее действие ГМ-Аг и 2-Н-ПВТ-Аг характеризуется клеточной пролиферацией (компенсаторной клеточной гипертрофией) и более ускоренным созреванием гранулоцитов и лимфоцитов, при этом соотношение между костномозговыми клетками различных возрастов сохраняет свою закономерность. Повышение дозы препаратов до 100 приводит к эозинофилии.

### Выводы

1. ГМ-Аг и 2-Н-ПВТ-Аг в дозах 1 – 100 мг/кг при парентеральном введении не токсичны для беспородных белых мышей, вызываемые ими патоморфологические изменения однотипны и носят доброкачественных характер.

2. Нанокompозиты активируют гранулоцитарный и моноцитарный ростки костномозгового гемопоэза, что может свидетельствовать о перспективности их применения в качестве иммуностимулирующих средств, в частности, для повышения естественной резистентности организма к возбудителям инфекционных болезней.

ЛИТЕРАТУРА

1. Автандилов Г.Г. Медицинская морфометрия. — М.: Медицина, 1990. — 384 с.
2. Вакцины и вакцинация: национальное руководство / Под ред. В.В. Зверева, Б.Ф. Семенова, Р.М. Хаитова. — М.: ГЭОТАР-Медиа, 2011. — 880 с.
3. Витязева С.А. Закономерности формирования иммунного ответа макроорганизма на введение *Yersinia pestis* EV с иммуномодуляторами: автореф. дис. ... канд. мед. наук. — Иркутск, 2009. — 22 с.
4. Клинико-иммунологическая эффективность иммунобиологических препаратов: (справочник) / Под ред. М.П. Костинова, Н.В. Медуница. — М.: Миклош, 2005. — 256 с.
5. Кузьмина Л. А. Гематология детского возраста. — М.: МЕДпресс-информ, 2001. — 399 с.
6. Лесничая М.В., Александрова Г.П., Феоктистова Л.П. и др. Серебросодержащие нанокomпозиты на основе галактоманнана и каррагинана: синтез, строение, антимикробные свойства // Известия Академии наук. Серия химическая. — 2010. — № 12. — С. 1–6.
7. Меньшиков В.В. и др. Лабораторные методы исследования в клинике: справочник. — М.: Медицина, 1987. — 364 с.
8. Поздняков А. С. Полифункциональные (со) полимеры 1-винил-1,2,4-триазола и нанокomпозиты на их основе: автореф. дис. ... канд. хим. наук. — Иркутск, 2011. — 22 с.
9. Токсиколого-гигиеническая оценка безопасности наноматериалов: методические указания, МУ 1.2.2520–09. — М.: Федеральный центр гигиены и эпидемиологии Роспотребнадзора, 2009. — 43 с.

Сведения об авторах

**Витязева Светлана Александровна** – кандидат медицинских наук, научный сотрудник отдела микробиологии чумы ФКУЗ «Иркутский научно-исследовательский противочумный институт Сибири и Дальнего Востока» Роспотребнадзора (664047, г. Иркутск, ул. Трилиссера, 78; тел.: 8 (3952) 22-01-35, факс: 8 (3952) 22-01-40; e-mail: adm@chumin.irkutsk.ru)

**Старовойтова Татьяна Пантелеевна** – научный сотрудник лаборатории патофизиологии ФКУЗ «Иркутский научно-исследовательский противочумный институт Сибири и Дальнего Востока» Роспотребнадзора (664047, г. Иркутск, ул. Трилиссера, 78; тел.: 8 (3952) 22-01-35, факс: 8 (3952) 22-01-40)

**Дубровина Валентина Ивановна** – доктор биологических наук, старший научный сотрудник, заведующая лабораторией патофизиологии ФКУЗ «Иркутский научно-исследовательский противочумный институт Сибири и Дальнего Востока» Роспотребнадзора (тел.: 8 (3952) 22-01-35, факс: 8 (3952) 22-01-40)

**Коновалова Жанна Анатольевна** – кандидат биологических наук, старший научный сотрудник лаборатории патофизиологии ФКУЗ «Иркутский научно-исследовательский противочумный институт Сибири и Дальнего Востока» Роспотребнадзора (664047, г. Иркутск, ул. Трилиссера, 78; тел.: 8 (3952) 22-01-35, факс: 8 (3952) 22-01-40)