

ФГБУ «НАУЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ИНСТИТУТ
МОРФОЛОГИИ ЧЕЛОВЕКА» РОССИЙСКОЙ АКАДЕМИИ
МЕДИЦИНСКИХ НАУК

На правах рукописи

Тимохина Екатерина Петровна

**МОРФОФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ ИЗМЕНЕНИЯ ОРГАНОВ
ИММУННОЙ СИСТЕМЫ КРЫС ПРИ ДЛИТЕЛЬНОМ
ВОЗДЕЙСТВИИ НИЗКИХ ДОЗ ДДТ**

03.03.04 – клеточная биология, цитология, гистология

ДИССЕРТАЦИЯ
на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Научный руководитель:
д.м.н. Яглова Н.В.

Москва – 2014

ОГЛАВЛЕНИЕ

Принятые сокращения	4
Введение	5
ГЛАВА 1. Обзор литературы	
Введение	9
История создания, применения и запрета	11
Эндокринные дизрапторы	17
ДДТ как эндокринный дизраптор	18
Влияние ДДТ на иммунную систему	20
ДДТ и его метаболиты в организме человека	25
Заключение	26
ГЛАВА 2. Материалы и методы	27
ГЛАВА 3. Результаты собственных исследований	
3.1. Морфофункциональные изменения тимуса при воздействии низких доз ДДТ	
3.1.1. Морфологическая характеристика тимуса крыс контрольной группы	
– через 6 недель после начала эксперимента	35
– через 10 недель после начала эксперимента	37
3.1.2. Морфологическая характеристика тимуса крыс, потреблявших ДДТ в течение 6 недель	
– в дозе $1,89 \pm 0,086$ мкг/кг/сут	41
– в дозе $7,77 \pm 0,17$ мкг/кг/сут	44
3.1.3. Морфологическая характеристика тимуса крыс, потреблявших ДДТ в течение 10 недель	
– в дозе $1,89 \pm 0,086$ мкг/кг/сут	47
– в дозе $7,77 \pm 0,17$ мкг/кг/сут	49
3.1.4. Исследование экспрессии белка p53 клетками тимуса крыс	52
3.1.5. Исследование пролиферативной активности клеток тимуса	57

3.2. Морфофункциональные изменения селезенки при воздействии низких доз ДДТ	
3.2.1. Морфологическая характеристика селезенки крыс контрольной группы	
– через 6 недель после начала эксперимента	60
– через 10 недель после начала эксперимента	62
3.2.2. Морфологическая характеристика селезенки крыс, потреблявших ДДТ в течение через 6 недель	
– в дозе $1,89 \pm 0,086$ мг/кг/сут	65
– в дозе $7,77 \pm 0,17$ мг/кг/сут	68
3.2.3. Морфологическая характеристика селезенки крыс, потреблявших ДДТ в течение 10 недель	
– в дозе $1,89 \pm 0,086$ мг/кг/сут	72
– дозе $7,77 \pm 0,17$ мг/кг/сут	76
3.2.4. Исследование пролиферативной активности клеток селезенки крыс	80
3.3. Исследование концентрации цитокинов и гормонов в сыворотке крови крыс	84
3.4. Изучение зависимости показателей цитокинового профиля и морфофункциональных показателей тимуса и селезенки	88
ГЛАВА 4. Обсуждение результатов собственных исследований	92
Заключение	105
Выводы	107
Библиографический список	108-121

ПРИНЯТЫЕ СОКРАЩЕНИЯ

ВОЗ – Всемирная Организация Здравоохранения

ДДД – дихлордифенилдихлорэтан

ДДТ – дихлордифенилтрихлорэтан

ДДЭ – дихлордифенилдихлорэтилен

ИЛ – интерлейкин

ИФА - иммуноферментный анализ

ИЮПАК (IUPAC) - International Union of Pure and Applied Chemistry

МДУ – максимальные допустимые уровни

ПАЛМ - периартериальные лимфоидные муфты

ПДК – предельно допустимая концентрация

СОЗ – стойкие органические загрязнители

ТФР-β (TGFβ) - трансформирующий фактор роста-β

Ig – иммуноглобулин

NFκB - nuclear factor kappa B (ядерный фактор каппи-б)

Th - Т-хелпер лимфоциты

Treg (Трег) - регуляторные Т-лимфоциты

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность темы

В последние десятилетия в мире отмечается рост заболеваемости, связанный с нарушениями функционирования иммунной системы. Многие исследователи из разных стран сходятся во мнении, что основной причиной повышения числа заболеваний можно по праву считать загрязнение окружающей среды, приводящее к срыву защитных функций и адаптационных резервов организма человека [6, 67, 76, 103, 133].

Стойкие органические загрязняющие вещества или загрязнители (СОЗ), поступающие в окружающую среду в результате деятельности человека, в силу высокой токсичности, стабильности, способности к дальнему переносу и биоаккумуляции считаются одними из наиболее опасных загрязнителей. Наиболее распространенным стойким органическим загрязнителем, широко применявшимся в огромных количествах в 50-70 г.г. (более 4,5 млн. тонн) в сельском, домашнем хозяйстве, на производстве и в воинских частях, и представляющим наибольшую опасность с точки зрения биогенеза, считается пестицид 1,1,1-трихлор-2,2-бис(4-хлорфенил)этан (ДДТ). Несмотря на то, что в США и России использование ДДТ запрещено с 1970 года из-за высокой токсичности и способности накапливаться в живом организме (биоаккумуляции), почве, продуктах питания (в почве, например, ДДТ может сохраняться более 20 лет), в ряде стран Азии, Африки и Южной Америки применение ДДТ еще достаточно распространено. На сегодняшний день, во всем мире ежегодно используется 4.000 – 5.000 тонн ДДТ для борьбы с малярией и висцеральным лейшманиозом [115].

Благодаря высокой устойчивости к разложению фоновые дозы ДДТ регистрируются на всех материках и во всех океанах [15, 55, 65, 113, 136].

Высокая растворимость в жирах и низкая растворимость в воде обуславливают задержку ДДТ в жировой ткани. В целом организмы высоких пищевых уровней имеют тенденцию к накоплению больших количеств ДДТ по сравнению с организмами низших пищевых уровней.

По данным различных исследований, ДДТ и его метаболиты обладают канцерогенным действием [100, 130], а также являются эндокринными disruptорами, способными приводить к развитию эндокринных заболеваний, а также нарушать физиологическое течение беременности и приводить к преждевременным родам и выкидышам [74, 77, 99, 118, 132, 137]. В токсичных и субтоксичных дозах ДДТ и его метаболиты оказывают иммуносупрессивное действие, подавляя гуморальный и клеточный ответ [56, 57, 126, 127] и др.

Однако крайне мало работ, посвященных изучению влияния низких фоновых доз ДДТ, предусмотренных максимальными допустимыми уровнями (МДУ) содержания в пищевых продуктах, водопроводной воде и т.д. Данные о влиянии ДДТ на функционирование иммунной системы характеризуются фрагментарностью и противоречивостью. По данным одних авторов, при фоновом воздействии ДДТ отмечается снижение секреции Th1 цитокинов (ИЛ-2, интерферона- γ), увеличение Th2 цитокинов, в основном ИЛ-4, уменьшение активности натуральных киллеров, а также повышение синтеза IgE, G, A [79, 109]. По другим данным, наблюдается усиление факторов клеточного иммунитета – секреции Th1 цитокинов интерлейкинов (ИЛ)-1,-2, фактора некроза опухоли- α , а также повышение активности индуцибельной NO-синтазы, активности макрофагов [84, 100]. Практически полностью отсутствуют сведения об изменениях иммунного статуса под влиянием низких доз ДДТ.

Цель исследования

Изучение морфофункциональных изменений органов иммунной системы крыс при длительном воздействии низких доз ДДТ.

Задачи исследования

1. Изучить морфофункциональные изменения тимуса крыс при длительном воздействии низких доз ДДТ;
2. Исследовать механизмы гибели тимоцитов под действием низких доз ДДТ;

3. Изучить морфофункциональные изменения селезенки крыс при длительном воздействии низких доз ДДТ;
4. Изучить изменения пролиферативной активности *ex tempore* и пролиферативного ответа на введение митогена при длительном воздействии низких доз ДДТ;
5. Оценить изменения цитокинового профиля сыворотки крови крыс при длительном воздействии низких доз ДДТ.

Научная новизна

Впервые установлено, что воздействие низких доз ДДТ, предусмотренных максимальными допустимыми уровнями его содержания в продуктах питания, приводит к развитию морфофункциональных изменений органов иммунной системы.

Впервые охарактеризованы морфологические и функциональные изменения тимуса, селезенки при различном по длительности воздействии низких доз ДДТ, заключающиеся в гибели клеток лимфоидного происхождения, в том числе Т-лимфоцитов, В-лимфоцитов, что вначале вызывает усиление их пролиферации, а затем приводит к значительному снижению пролиферативной активности. Установлено, что в механизмах гибели тимоцитов под действием низких доз ДДТ задействован р53-зависимый путь апоптоза.

Впервые выявлено, что воздействие низких доз ДДТ приводит к изменениям цитокинового профиля, коррелирующим с морфофункциональными изменениями тимуса и селезенки, но не вызывает стойкого сдвига в балансе Th1-Th2 цитокинов.

Практическая значимость

Выявленные морфофункциональные изменения органов иммунной системы крыс при длительном воздействии низких доз ДДТ показывают, что максимальные допустимые уровни его содержания в продуктах питания не являются безопасными для организма. Эти данные могут стать основой для дальнейших исследований по установлению безопасных уровней содержания ДДТ и его метаболитов в продуктах питания.

Положения, выносимые на защиту:

1. Длительное воздействие низких доз ДДТ, предусмотренных МДУ его содержания в продуктах питания, приводит к развитию морфофункциональных изменений центральных и периферических органов иммунной системы крыс, обусловленных гибелью клеток лимфоидного происхождения, реактивным усилением, а затем снижением их пролиферативной активности.
2. Воздействие низких доз ДДТ приводит к изменениям цитокинового профиля, коррелирующим с морфофункциональными изменениями тимуса и селезенки, но не вызывает стойкого сдвига в балансе Th1-Th2 цитокинов.

3. ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

Введение

ДДТ (1,1,1-Трихлор-2,2-ди(п-хлорфенил)этан по номенклатуре ИЮПАК (IUPAC), по рациональной номенклатуре — дихлордифенилтрихлорэтан) — инсектицид, применяемый против малярийных комаров, вредителей хлопка, соевых бобов, арахиса. Одно из немногих действительно эффективных средств против саранчи.

Химическая структура ДДТ представлена на рисунке 1. Структура некоторых аналогов ДДТ представлена в табл. 1.

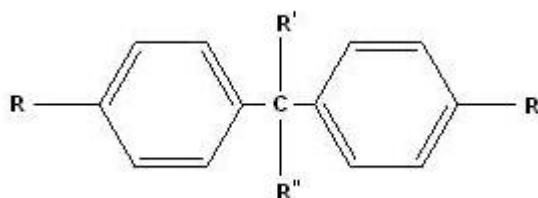


Рис.1 Структура *p,p'*-ДДТ.

Таблица.1

Химическая структура некоторых аналогов ДДТ (многие из этих соединений существуют также в форме *o,p'*- и других изомеров)

Название ДДТ и его основные метаболиты	Химическое наименование	R	R'	R''
ДДТ	1,1'-(2,2,2-трихлорэтилиден-бис[4-хлорбензол])	–Cl	–H	–CCl ₃
ДДЭ ^a	1,1'-(2,2-дихлорэтилиден-бис[4-хлорбензол])	–Cl	Нет	–CCl ₂
ТДЭ (ДДД) ^{a,б}	1,1'-(2,2-дихлорэтилиден-бис[4-хлорбензол])	–Cl	–H	–CHCl ₂

Некоторые родственные инсектициды				
Булан [®]	2-нитро-1,1-бис-(4-хлорфенил)бутан	–Cl	–H	NO ₂ –CHC ₂ H ₅
Пролан [®]	2-нитро-1,1-бис-(4-хлорфенилпропан)	–Cl	–H	NO ₂ –CHCH ₂
Дикокол (Кельтан [®])	4-хлор-альфа-(4-хлорфенил)- -альфа-(трихлорметил) бензолметанол	–Cl	– OH	–CCl ₃
Хлорбензилат ^б	этил-4-хлор-альфа-(4-хлорфенил)-альфа- оксибензолацетат	–Cl	– OH	–C(O)OC ₂ H ₅
Хлорпропилат ^б	1-метилэтил-4-хлор-альфа-(4-хлорфенил)-альфа- оксибензолацетат	–Cl	– OH	– C(O)OCH(CH ₃)
Метоксихлор ^б	1,1'-(2,2,2-трихлорэтилиден)- бис[4-метоксибензол]	– OCH ₃	–H	–CCl ₃
Пертан [®]	1,1'-(2,2-дихлорэтилиден)- бис[4-этилбензол]	–C ₂ H ₅	–H	–CHCl ₂
ДФДТ	1,1'-(2,2,2-трихлорэтилиден)- бис[4-фторбензол]	–F	–H	–CCl ₃

^а Установленный метаболит у крыс.

^б Для этого соединения, используемого в качестве инсектицида, Международная организация по стандартизации утвердила название ТДЭ, и оно поступает в продажу под названием Ротан[®]; в исследованиях метаболизма это же вещество фигурирует под названием ДДД; в качестве лекарственного средства оно называется митотан.

^в Общепринятое название, утвержденное Международной организацией стандартизации (МОС).

История создания, применения и запрета

Впервые синтезированный в 1874 году австрийским химиком Отмаром Цейдлером (Othmar Zeidler), ДДТ долгое время не находил себе применения, пока швейцарский химик Пауль Мюллер (Paul Müller) в 1939 году не открыл его инсектицидные свойства. В 1948 году Пауль Мюллер получил Нобелевскую премию по медицине «За открытие высокой эффективности ДДТ как контактного яда».

ДДТ является инсектицидом наружного действия, то есть вызывающим смерть при внешнем контакте, поражая нервную систему насекомого. О степени его токсичности можно судить по тому, что личинки мух гибнут при попадании на поверхность их тела дозы менее 1 нг (1×10^{-9} г). В годы второй мировой войны применение ДДТ против возбудителей малярии спасло миллионы людей от этого заболевания, что в 1973 г. было отмечено в отчете Всемирной Организации Здравоохранения (ВОЗ) [11].

В 40-50-х гг. значительная часть очагов малярии в Европе и США была уничтожена благодаря применению инсектицидов, в частности ДДТ. После чего очаги эпидемий малярии стали отмечать в основном в экваториальных, тропических и субтропических широтах (рис.2)

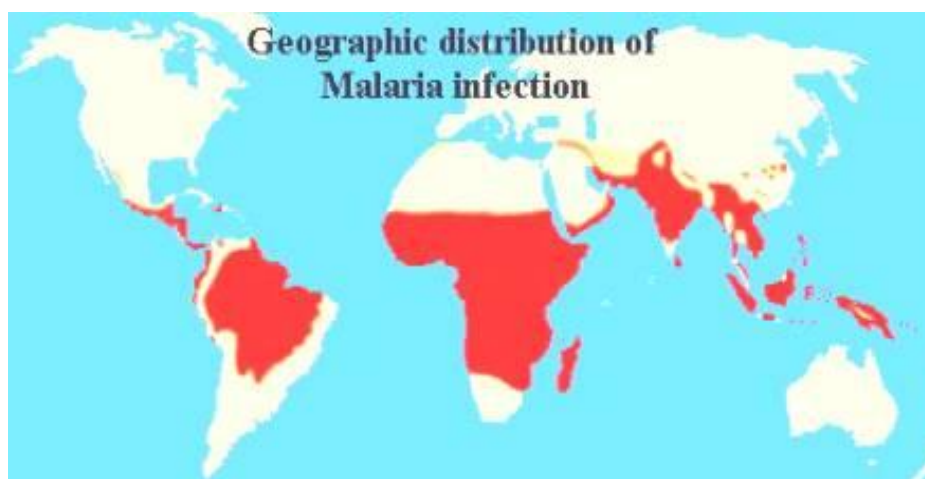


Рис. 2. Распространение малярии после 40-50х гг. [13].

Начиная с 60-х годов, ежегодно в мире использовалось примерно 400 тыс. тонн ДДТ, из них 70-80% в сельском хозяйстве, чему способствовала

низкая цена препарата (0,6\$/кг) [18]. Бесконтрольному применению ДДТ способствовала и его сравнительно низкая острая токсичность для людей и животных.

Однако скоро выявились и его отрицательные эффекты. Так, например, было доказано, что ДДТ оказывает токсическое действие на микрофлору морской и речной воды, рыбу, амфибий и птиц. Первой страной, которая по экологическим соображениям в 1970 г. запретила использование ДДТ, была Швеция [21]. В том же году ДДТ и связанные с ним соединения были запрещены как инсектициды Министерством здравоохранения СССР. Причиной этого были персистенция, биоаккумуляция и канцерогенность ДДТ [54]. В 1981 г. было запрещено использование ДДТ в сельском хозяйстве, но все еще разрешалось его использование для дезинфекции, против малярийных комаров. В 1989 г. были запрещены и эти формы использования ДДТ [18]. Однако в ограниченных количествах применение ДДТ сохранилось, но только по разрешению органов санитарной инспекции. В настоящее время использование ДДТ в Российской Федерации полностью запрещено.

После запрещения в 1973 г. использования ДДТ как инсектицида в США, его производство и применение резко сократилось в большинстве развитых стран. Но в ряде стран продолжалось его экспортное производство. Так, в 1985 г. примерно 300 тонн ДДТ было экспортировано из США. В 1990 г. он продолжал производиться отдельными фирмами в Италии, Индии и Индонезии (суммарная продукция примерно 7 млн. тонн) [81].

Вопрос о том, следует ли полностью запретить ДДТ вместе с 11 другими хлорорганическими пестицидами, обсуждался в рамках Программы ООН по окружающей среде. Полное запрещение ДДТ вызвало возражения, поскольку, например, в ЮАР полное временное запрещение использования ДДТ привело к вспышке малярии. Указывалось на возможность трагических последствий, которое могло бы иметь полное запрещение ДДТ в развивающихся странах [88].

В 2006 году Всемирная организация здравоохранения (ВОЗ) приняла решение о продолжении применения ДДТ для контроля малярии в 12-ти странах мира. В их числе Индия, Северная Корея и некоторые южноафриканские государства [83].

На сегодняшний день, во всем мире ежегодно используется 4000 – 5000 тонн ДДТ для борьбы с малярией и висцеральным лейшманиозом. Крупнейшим потребителем является Индия. В последние годы в таких странах как Индия, Северная Корея и Китай, производство этого инсектицида возросло [115].

ВОЗ подтвердила свое намерение «сократить применение ДДТ в борьбе с малярией на 30% во всем мире к 2014 году и полностью отказаться от него к началу 2020-х годов, если не раньше». Для достижения этой цели планируется внедрение альтернативных химических соединений [141].

ДДТ, как и другие стойкие органические соединения, отличается не только высокой стойкостью к разложению, но и способностью к биоаккумуляции в живых организмах [2]. Расчёт Дамена и Хейса (1973 год) показал, что на каждом звене пищевой цепи происходит увеличение содержания ДДТ в 10 раз (рис.3).

Это быстрое накопление ДДТ наглядно видно из следующего примера. Так, при исследовании одной экосистемы в озере Мичиган было обнаружено следующее накопление ДДТ в пищевых цепях:

- 0,014 мг/кг (в расчете на сырой вес) в донном иле озера;
- 0,41 мг/кг в ракообразных, питающихся на дне;
- 3-6 мг/кг в различных рыбах (бельдюговые, язь, елец);
- свыше 2400 мг/кг в жировой ткани чаек, питающихся рыбой.

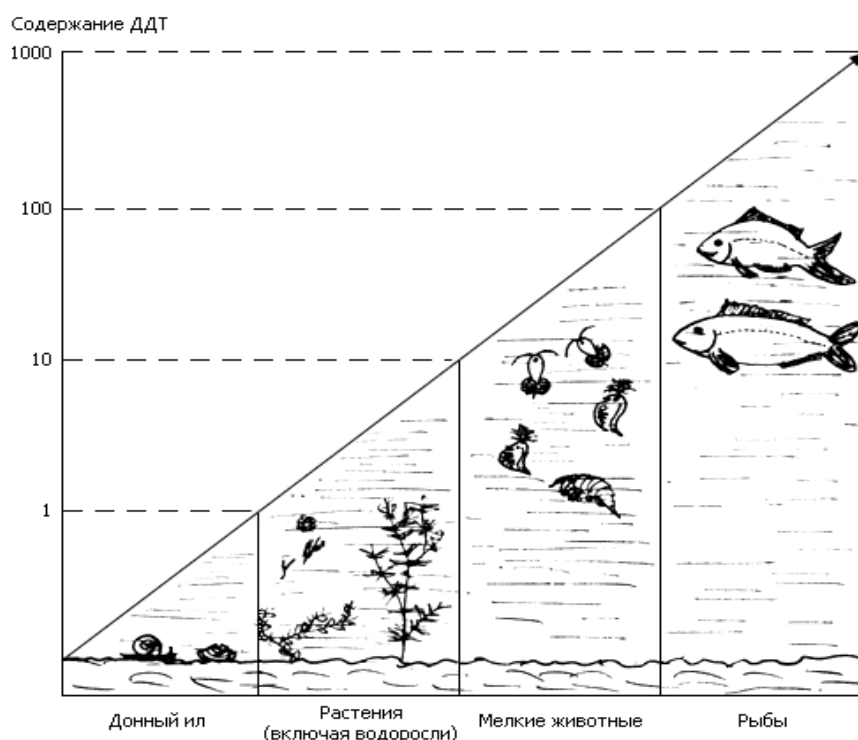


Рис. 3. Тысячекратное повышение концентрации ДДТ в пищевой цепи [128].

Высокая растворимость в жирах и низкая растворимость в воде обуславливают задержку ДДТ в жировой ткани. Этот факт наглядно продемонстрирован в исследовании распределения ДДТ и его основных метаболитов ДДД и ДДЭ у молодых крыс. Было отмечено, что ДДТ и его метаболиты накапливаются в печени, тимусе, головном мозге, но в наибольшей концентрации эти соединения аккумулируются в жировой ткани [128].

С момента запрета ДДТ проведено немало исследований его остаточного содержания в почвах, водах и продуктах питания.

Так, на территории Иркутской области обследованы с/х угодья 7 районов: Иркутского, Эхирит-Булагатского, Ангарского, Баяндаевского, Тулунского, Киренского, Балаганского и почвы Прибайкальского национального парка. По данным обследования 1996 года наибольшие средние уровни содержания ДДТ наблюдались в Иркутском и Балаганском районах (1,17-4,77 ПДК). Средние содержания ДДТ на уровне 2,5-5,5 ПДК обнаружено в Иркутском и Усольском районах области осенью 1998 г. Повышенное содержание ДДТ (1,08-11,57 ПДК) в Иркутском районе обнаружено весной 2002 г. [24].

За последнее десятилетие средние и максимальные значения ДДТ в донных отложениях Северного Каспия составили 4,47-23,40 нг/г, ДДЭ - 0,31-3,20 нг/г, ДДД - 1,18-11,00 нг/г соответственно [113].

В 2002 г. повысился уровень загрязненности вод Японского моря. Среднегодовое содержание ДДТ увеличилось от 1,9 до 2,2 нг/л (максимум 7,8 нг/л), ДДД - от 0,4 нг/л до 0,6 (4,0 нг/л), ДДЭ - от 0,3 до 0,5 нг/л (1,4 нг/л) [15].

В 2005 году была проведена работа по оценке загрязнения стойкими органическими загрязнителями куриных яиц в различных регионах России. Содержание ДДТ и ДДЭ в пробах куриных яиц из г. Новомосковск Тульской области, находящегося в непосредственной близости от предприятия «Оргсинтез», закрывшегося в 1995 году, составило 1 647 и 2 610 нг/г липидов соответственно. Содержание в куриных яйцах г. Чапаевска Самарской области 121 и 372 нг/г липидов соответственно. В различных районах Саратовской области – 25 и 135 нг/г липидов [31].

Сравнительный анализ результатов мониторинга хлорорганических пестицидов в пищевых продуктах животного происхождения в Республике Армения, проведенных в 1970 и 2002-2003 гг. показывает, что содержание пестицидов ДДТ в мясе, молоке, сыре и яйцах снизилось на 2-3 порядка, что является значимым результатом. Однако, учитывая более чем 30-летний срок после исследований в 1970 г, эти пестициды не должны регистрироваться, так как должна была происходить полная деградация этих пестицидов. Этот факт указывает на вероятность применения хлорорганических пестицидов и в настоящее время [1].

В 2005 году в ММА им. И.М.Сеченова методами газожидкостной капиллярной хроматографии и хромато-масс-спектрометрии определено содержание ДДТ и его метаболита ДДЕ в 49 официальных фитопрепаратах (жидких экстрактах и настойках) из травы тысячелистника, травы чабреца, листьев крапивы, плодов калины и плодов боярышника. Установлено, что

абсолютные концентрации ДДТ в жидких экстрактах и настойках достигали 0,45 нг/г, ДДЭ -3,07 нг/г [8].

В 2006 году сотрудники международной сети по ликвидации пестицидов (IPEN) собирали куриные яйца в малых хозяйствах, расположенных неподалеку от отобранных горячих точек в 18 странах и провели определение содержания ДДТ в них. Полученные результаты сравнивали с фоновыми уровнями и с предельно допустимыми уровнями, установленными Европейским Союзом (ЕС) и США. Уровни ДДТ в яйцах находились в диапазоне от фоновых значений до более чем 7000 нг/г жира (т.е. в 14 раз выше максимально допустимого остаточного уровня ЕС). В двух местах (Сенегал и Кения) анализ композитных образцов яиц показал свежее поступление ДДТ. Самые высокие уровни ДДТ были установлены в семи странах: Болгарии, Чехии, Индии, Кении, Мексике, Пакистане и в Танзании. Эти места включают жилые районы неподалеку от хранилищ непригодных пестицидов, складов пестицидов и предприятий по производству ДДТ. В России в объединенных пробах яиц концентрации ДДТ составляли 138,7 - 214,6 нг/г жира. Эти уровни в 4,5 - 7 раз превышали фоновый уровень в 30 нг/г жира [80].

Федеральной службой по надзору в сфере защиты прав потребителей было проведено изучение содержания ДДТ и его метаболитов в плодах гранатов, поступивших в продажу в России из Республики Азербайджан в 2007 году. По данным этого исследования было обнаружено содержание ДДТ и его метаболитов в количествах в 6-7 раз превышающих предельно допустимые концентрации.

Таджикистане сотрудниками Фонда поддержки гражданских (ФПГИ) инициатив был выявлен факт торговли ДДТ и его использования. Были проведены рейды по рынкам города Душанбе и его окрестностей с целью взятия проб имеющихся в свободной продаже пестицидов. По инициативе членов ФПГИ была найдена возможность проведения анализа взятых проб пестицидов в лаборатории Института химии Академии Наук. Практически во всех пробах обнаружен ДДТ и его изомеры [28].

Таким образом, изучение влияния фоновых доз ДДТ, регистрируемых повсеместно, на организм человека и животных, и в частности на иммунную систему, очень актуально в настоящее время.

Эндокринные дизрапторы

Интерес к проблеме влияния низких доз ДДТ на организм возник в связи с выявлением у ДДТ свойств эндокринного дизраптора. Эндокринные дизрапторы – это экзогенные вещества, содержащиеся в почве, воде, воздухе, пищевых продуктах и некоторых промышленных изделиях, которые, поступая в организм, оказывают гормоноподобные эффекты, нарушающие гомеостатические механизмы регуляции эндогенными гормонами процессов жизнедеятельности живых организмов [75, 144]. В связи с этим исследования воздействия ДДТ на функционирование интегрирующих систем организма (эндокринной и иммунной) приобрели особую актуальность. Известно, что в последние два десятилетия в промышленно развитых и развивающихся странах отмечается рост числа заболеваний, как эндокринных желез, так и заболеваний, обусловленных нарушениями в функционировании иммунной системы, таких как аутоиммунные заболевания, аллергические реакции, иммунодефицитные состояния.

Проведенные исследования показывают, что эндокринные дизрапторы могут способствовать возникновению злокачественных опухолей, нейропсихических нарушений и других заболеваний [58].

В настоящее время есть все основания полагать, что действие эндокринных дизрапторов не ограничивается только нарушениями гормональной регуляции функций организма. Известно, что многие нейроны центральной и периферической нервной системы, наряду с медиаторами, выделяют и пептидные гормоны [143].

Эндокринные клетки имеются и в тимусе. Кроме того, известна взаимная связь между нейроэндокринной системой и иммунной системой организма. Так, гормоны влияют на иммунную систему, а цитокины – биологически активные вещества, выделяемые клетками иммунной системы, действуют на

нейроэндокринные функции. Более того, иммунocyты сами выделяют некоторые гормоны – адренокортикотропный гормон, β -эндорфин, пролактин, релизинг-фактор для лютеинизирующего гормона, которые ранее считались продуктами секреции только пептидергических нейронов и клеток гипофиза [9]. Все сказанное свидетельствует о том, что эндокринные дизрапторы могут выступать как системные нейроэндокринные и иммунные дизрапторы, существенно нарушающие течение регуляторных процессов в организме животных и человека [45, 46].

ДДТ как эндокринный дизраптор

Влияние на человека содержащихся в окружающей среде соединений с эстрогенной активностью (эндокринных дизрапторов), и потенциальное воздействие их на здоровье человека является предметом продолжающихся научных дискуссий. Их потенциальные последствия вызывают беспокойство в отношении неврологического развития после воздействия в перинатальном периоде. Центральное место в этой дискуссии занимает пестицид ДДТ. Ряд лабораторных исследований показывает, что он действует на центральную нервную систему, влияя на Na^+/K^+ насосы нейронных мембран, и приводит к нарушению баланса Ca^{2+} в организме. Потенциально это может привести как к апоптозу, так и к некрозу. Исследование, посвященное изучению эффектов ДДТ и двух его метаболитов, ДДД и ДДЭ, на ультраморфологию нервных клеток, показывает повышение проницаемости мембран для всех трех химических веществ, в сопровождении с кариолизисом в группе ДДЭ, что является типичной чертой онкогенеза. Эти результаты подтверждаются другими исследователями, а также вызывают озабоченность ВОЗ, что ДДТ и его метаболиты могут приводить к развитию нейротоксических эффектов после перинатального воздействия [64].

Изучение воздействия ДДТ как эстрогеноподобного дизраптора также показало, что в перинатальном периоде он способен изменить развитие репродуктивных органов, нейроэндокринной системы, и, как следствие, оказать влияние на дальнейшее половое поведение животных. У самцов домашних

мышей, потреблявших ДДТ в дозе 18 нг/г, было обнаружено, в частности, что семенники были значительно меньше по массе и диаметру, чем в контрольной группе. Возможные последствия воздействия этого вещества, влияющего на развитие социального поведения, и такие его проявления, как агрессия, у особей репродуктивного возраста обсуждаются [110].

Исследования показывают, что потребление самцами и самками японских перепелов ДДТ в малых дозах в течение длительного периода (100 дней) вызывает значительную задержку полового развития. У самцов отмечено значительное уменьшение диаметра семенных канальцев [85, 86]. В ранее проводимых исследованиях было показано, что введение ДДТ японским перепелам вызывало увеличение массы надпочечных желез, а также расширение их коркового вещества. При этом размеры ядер клеток коркового и мозгового вещества не изменялись. Неизменным оставалось и содержание липидов в клетках коркового вещества надпочечников. Наблюдаемые изменения рассматривались как следствие гиперплазии адренокортикоцитов [62].

Изучение воздействия низких доз ДДТ на транскрипцию генов и ДНК-метилирование в гипоталамусе молодых самцов крыс показало нарушение экспрессии 40 генов в гипоталамусе. Этот результат показывает, что гипоталамус восприимчив к низким дозам ДДТ, особенно в молодом возрасте [125].

Существуют данные и о влиянии ДДТ на функциональную деятельность щитовидной железы, гормональные рецепторы которой также как и для стероидных гормонов имеют ядерную локализацию. Показано, что скармливание сублетальных количеств ДДТ голубям вызывало увеличение массы щитовидной железы и снижало содержание коллоида в ее фолликулах. Это может проявляться как гиперфункцией, так и гипофункцией щитовидной железы и снижением массы откладываемых яиц [98]. Полагают, что в основе повреждающего действия ДДТ на секрецию тиреоидных гормонов лежит блокада кальциевых каналов фолликулярных тироцитов [68].

Таким образом, можно отметить, что влияние ДДТ как эндокринного дизраптора на эндокринную и, в частности, репродуктивную систему изуче-

но довольно полно. При этом известно, что иммунная система также имеет в своем составе эндокринные клетки. Так ретикулярные эпителиоциты тимуса секретируют растворимые тимические (или тимусные) гормоны - тимопоэтин, тимозин и другие, регулирующие процессы роста, созревания и дифференцировки Т-клеток и функциональную активность зрелых клеток иммунной системы. Однако, молекулярные механизмы влияния ДДТ на эндокринные клетки иммунной системы неизвестны. Также вопрос о влиянии фоновых доз на иммунную систему в целом является малоизученным, а имеющиеся данные в литературе – противоречивы.

Влияние ДДТ на иммунную систему

Опасность воздействия ДДТ, в первую очередь, связана с его способностью нарушать механизмы регуляции эндогенными гормонами процессов жизнедеятельности организмов, что может служить причиной повышения заболеваемости инфекционными, аллергическими, аутоиммунными и др. заболеваниями. Большинство исследований влияния ДДТ на иммунную систему связаны с токсическими и субтоксическими дозами.

Данные по изучению морфологических изменений центральных органов иммунной системы под действием ДДТ

Исследование влияния ДДТ на органы иммунной системы (100 ppm перорально в течение 40 дней), показало его способность снижать абсолютную массу тимуса кур на 35% по сравнению со значениями контрольной группы [90].

Результаты различных исследований влияния ДДТ на клетки тимуса показывают усиление гибели тимоцитов под воздействием инсектицида. По данным работ Tebourbi и др. ДДТ инициирует апоптоз клеток тимуса [129].

Однако механизмы гибели тимоцитов при воздействии низких доз ДДТ остаются невыясненными.

Апоптоз — программируемая клеточная смерть, регулируемый процесс самоликвидации на клеточном уровне, в результате которого клетка фрагментируется на отдельные апоптотические тельца, ограниченные плазматиче-

ческой мембраной. Фрагменты погибшей клетки обычно очень быстро (в среднем за 90 минут) фагоцитируются макрофагами либо соседними клетками, минуя развитие воспалительной реакции. Морфологически регистрируемый процесс апоптоза продолжается 1-3 часа. Одной из основных функций апоптоза является уничтожение дефектных (повреждённых, мутантных, инфицированных) клеток. В многоклеточных организмах апоптоз к тому же задействован в процессах дифференциации и морфогенеза, в поддержании клеточного гомеостаза, в обеспечении важных аспектов развития и функционирования иммунной системы [35]. Установлено, что более 95% тимоцитов удаляются путем апоптоза в ходе их селекции и обучения. В 90-х годах был открыт ряд генов, участвующих в регуляции апоптоза. Продукты некоторых из этих генов являются активаторами, в то время как другие - ингибиторами апоптоза. Повышение уровня белка p53, одного из регуляторов клеточного цикла, вызывает апоптоз в клетках кожи, в тимоцитах и в клетках кишечного эпителия. Активация p53 происходит в ответ на повреждения ДНК. Апоптоз в тимусе совершается по p53-зависимому и p53-независимому путям. p53-независимый тип апоптоза контролируется гормонами надпочечников – глюкокортикоидами [47].

Данные по изучению морфологических изменений периферических органов иммунной системы под действием ДДТ

В национальном научно-исследовательском центре Каира было проведено исследование по изучению способности ДДТ индуцировать хромосомные aberrации в селезенке мышей. В дозе 5,5 мг/кг массы тела он вызвал максимальные хромосомные aberrации в клетках селезенки через 24 ч после инъекции. Результаты показывают, что ДДТ оказывает генотоксическое действие на клетки селезенки мышей [51].

Исследование влияния ДДТ на периферические органы иммунной системы в дозе 100 ppm перорально в течение 40 дней также показало его способность снижать абсолютную массу селезенки у кур на 45% по сравнению со значениями контрольной группы [31].

*Данные по изучению физиологических изменений иммунной системы
под действием ДДТ*

Исследование хронического отравления малыми дозами инсектицидов в Восточно-Сибирском технологическом институте показало, что в организме животных образуются конъюгаты ДДТ-белок. Они были обнаружены с помощью специальных сывороток крови кроликов, специфичных к ДДТ. Было отмечено, что процесс образования конъюгатов инсектицид-белок вызывает его специфическое антителообразование к ним, к 90 и 120-му дню накапливаются антитела, реагирующие с конъюгатами инсектицид-белок или свободным инсектицидом. В сыворотке крови и органах животных длительное время получающих малые дозы ДДТ наблюдается повышение содержания некоторых классов белков, что сопровождается появлением ауто-антител, т.е. развитием аутоиммунных реакций [36].

Данные о влиянии ДДТ на гуморальный и клеточный иммунный ответ в литературе противоречивы. Так, в работах Banerjee, при изучении влияния субхронического действия ДДТ на гуморальный и клеточный иммунный ответ белых крыс было выявлено, что у крыс, находившихся под действием субтоксических доз ДДТ, обнаруживается гибель В-лимфоцитов, подавление гуморального и клеточного иммунного ответа [56]. Однако в работах других авторов отмечается обратный эффект. У крыс Вистар при введении дозы 40 мг/кг ежедневно в течение 60 дней было констатировано усиление гуморального иммунного ответа. Изучение же клеточного иммунного ответа при той же дозе ДДТ показало как повышение реакции гиперчувствительности замедленного типа (ГЗТ) у крыс Вистар на бычий сывороточный альбумин, так и снижение выраженности этой реакции на туберкулин у кроликов при дозе ДДТ 150мг/кг, вводимой перорально в течение 4 недель [10]. Также имеются данные о совместном влиянии ДДТ и стресса на гуморальный ответ. Было изучено влияние различных доз ДДТ (20, 50, или 100ppm в течение 4 недель) у мышей. При этом данные этого исследования показали, что ДДТ сам по себе не влияет на первичный гуморальный ответ. Однако когда мыши, потреб-

лявшие ДДТ подвергались воздействию одной и нескольких сессий холодового стресса, которые сами по себе не влияют на показатели гуморального иммунного ответа, было отмечено снижение количества антител по сравнению с контрольными значениями [56].

Исследование индийских ученых, проведенное в 2008 году, показало, что ДДТ активирует систему комплемента через альтернативный путь в отсутствие каких-либо патогенов и приводит к повышению восприимчивости организма к гнойным инфекциям. Кроме того, ДДТ вызвал увеличение образования макрофагами фактора некроза опухоли-альфа и оксида азота (NO), приводя к воспалительным реакциям и цитокиновому дисбалансу. В макрофагах наблюдалась также потеря псевдоподий, цитоплазматическая вакуолизация и фрагментации ДНК, что свидетельствует об апоптозе [84].

Учеными из США была исследована способность ДДТ подавлять функцию естественных клеток-киллеров (NK-клеток) в крови человека *in vitro*. Исследование показало, что ДДТ, концентрацией 2,5 мкМ уменьшает активность NK-клеток на 55% через 24 часа после введения. Данное исследование доказывает, что ДДТ может увеличивать вероятность развития у человека раковых опухолей или вирусной инфекции, поскольку естественные клетки-киллеры являются первой линией иммунной защиты организма против опухолевых клеток и вирусно-инфицированных клеток [133].

Исследование связи между накоплением ДДТ в жировой ткани и риском развития неходжкинской лимфомы, проведенное датскими исследователями в 1993-1997 гг., выявило увеличение риска развития данного заболевания с увеличением концентрации ДДТ в жировой ткани у взрослого населения, а также половые различия, заключающиеся в более выраженной предрасположенности у мужчин [67].

По литературным данным воздействие ДДТ приводит к изменениям продукции отдельных цитокинов, однако они противоречивы. При изучении продукции цитокинов под воздействием низких доз ДДТ получены данные об увеличении синтеза Th2 и снижении синтеза Th1 цитокинов [79]. По дру-

гим данным ДДТ вызывает снижение секреции ИЛ-2 Т-лимфоцитами *in vitro* [109]. При исследовании группы лиц, занятых в сельскохозяйственных работах и подвергавшихся воздействию ДДТ более 20 лет назад, имеющих низкие концентрации метаболитов ДДТ в сыворотке крови, авторами отмечалось снижение продукции ИЛ-2 и повышение содержания в сыворотке крови ИЛ-4 [79]. При изучении функциональных показателей иммунной системы у детей 7-10 лет, имеющих в крови низкие концентрации ДДТ и его метаболитов, обусловленные фоновым содержанием ДДТ в продуктах питания, обнаруживались умеренный лейкоцитоз и повышение концентрации IgG, IgA, но более всего IgE. Эти данные расценивались как поляризация иммунного ответа по Th2 типу [103]. Однако, согласно результатам исследователи из США, которые провели работу по сравнению концентрации ДДЭ в плазме крови у 137 афро-американских мужчин-фермеров 30-88 лет (средний возраст 64 года) и уровней иммуноглобулинов А и G, уровни IgG уменьшались с увеличением концентрации ДДЭ, со статистически значимым снижением примерно на 50% при максимальных концентрациях $\geq 6,0$ мкг/л. При этом, связи между уровнем IgA и концентрацией ДДЭ отмечено не было [76].

Изучение влияния ДДТ и его основного метаболита ДДЭ на детей, проживающих в трех населенных пунктах, расположенных в Южной Мексике, показало статистически значимую связь между потреблением метаболита ДДЭ и выраженным апоптозом мононуклеарных лимфоцитов периферической крови. Эффект от прямого воздействия ДДТ был ниже, но отмечено усиление апоптотической гибели этих клеток [111].

Изучение уровня ДДЭ (основного метаболита ДДТ) у младенцев в возрасте до 14 месяцев, показало четкую взаимосвязь между высоким уровнем ДДЭ в молоке матерей (в среднем 112 нг/г липидов) и рецидивами инфекционных заболеваний нижних дыхательных путей. Данные результаты подтверждают, что ДДТ и его метаболитов повышают вероятность развития инфекционных заболеваний верхних дыхательных путей [127].

ДДТ и его метаболиты в организме человека

Несмотря на запрет применения ДДТ во многих странах, он и его главный метаболит ДДЭ до сих пор обнаруживаются в тканях человека. Так, в США суммарный уровень ДДТ и его метаболитов в жировой ткани возрос с 5 мг/кг в 1950 г. до 15,6 мг/кг в 1956 г. и затем снизился до 3 мг/кг в 1980 г. [14]. В настоящее время на нашей планете не существует организма, который не содержал бы в своих тканях ДДТ и его метаболитов. Концентрация ДДТ в тканях человека имеет тенденцию к снижению во многих странах, но уровень ДДЭ снижается значительно медленнее – этот метаболит поступает с пищей, особенно с рыбой [70]. В развивающихся странах поступление в организм человека ДДТ и его метаболитов, присутствующих в пище, в 100 раз выше, чем в более развитых странах. У населения, постоянно проживающего в Гренландии и поглощающего большое количество мяса морских животных, отмечено подавление иммунитета у детей с повышением их чувствительности к инфекциям [39].

В двух украинских городах у 100% исследованных беременных женщин обнаружен ДДТ в периферической крови в концентрациях 0,28-4,5 мкг/л в Полтаве и 0,86-6 мкг/л в Киеве. У 100% кормящих женщин хлорорганические пестициды (ДДТ и его метаболиты, реже гексахлорциклогексан и гексахлорбензол) найдены в женском молоке. В более чем 90% случаев концентрация ДДТ составляла 5,8 мкг/л [14]. Важным индексом для оценки поступления в организм ребенка липофильных веществ считается их содержание в жире грудного молока. Содержание ДДТ составляло 190-1400 нг/г жира грудного молока, 38-95% этого количества приходилось на ДДЭ. Потребление грудного молока составляет примерно 130 мл/кг массы тела ребенка в сутки, а для ДДТ приходится 0,75-5,6 мкг/кг массы тела, что значительно превосходит установленную допустимую дозу (0,0025 мкг/кг массы тела в сутки). В другом исследовании грудного молока 197 женщин из Киева и Днепропетровска средняя концентрация ДДЭ составляла 2500 нг/г жира грудного молока, что выше почти всех опубликованных цифр из Европы.

Содержание ДДТ и его метаболитов в женском молоке в течение последних 20 лет снижалось во всем мире. Если в 1951 г. средние уровни составляли 5000-10000 мкг/кг жира молока (молочного жира), то к концу 90-х годов они были в 5-10 раз меньше (1000 мкг/кг). Но, например, в Таиланде суточное потребление ДДТ детьми в 20 раз превышало допустимый уровень, рекомендованный ВОЗ [39].

Заключение

Обобщение результатов исследования влияния ДДТ на функционирование различных органов и систем млекопитающих животных и человека показывает, что этот инсектицид обладает способностью накапливаться в различных тканях, в первую очередь в жировой, характеризуется высокой устойчивостью к разложению и низкой скоростью метаболизма.

В основном, изучение влияния ДДТ на организм было связано с его широким применением и сводилось к исследованиям действия его высоких доз. Крайне мало работ, посвященных изучению влияния фоновых доз ДДТ, регистрируемых в настоящее время на всех материках, и особенно в регионах, где его применение возобновлено.

Данные о влиянии ДДТ на функционирование иммунной системы отличаются фрагментарностью и противоречивостью. Практически полностью отсутствуют сведения об изменениях иммунного статуса под влиянием низких доз.

Практически не изучены морфологические изменения органов иммунной системы млекопитающих и человека, подвергающихся ежедневной фоновой нагрузке ДДТ.

Все вышеизложенное обусловило цель настоящего исследования.

ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Схема эксперимента

Эксперимент выполнен на самцах крыс Вистар (n=64) массой тела 80-100гг (питомник «Столбовая»). Животные содержались в виварии, уход за ними осуществлялся по нормам и правилам обращения с лабораторными животными, в соответствии с «Международными рекомендациями по проведению медико-биологических исследований с использованием животных» (1985), правилами лабораторной практики в Российской Федерации (приказ МЗ РФ от 19.06.2003 №267) и законом «О защите животных от жестокого обращения» гл. V, ст. 10, 4679-ГД от 01.12.1999г. Проведение исследования единогласно одобрено на заседании этического комитета ФГБУ «НИИ морфологии человека» РАМН.

Эксперимент проведен в соответствии с правилами работы с использованием экспериментальных животных, утвержденными приказом Минздрава СССР № 577 от 12.08.1977г. На проведение эксперимента получено разрешение этического комитета НИИ морфологии человека РАМН (протокол №8а от 06.10.2011г.).

Животных рандомизировали на 6 групп: 2 контрольные и 4 опытные (табл. 2).

Таблица 2.

Количество животных в каждой экспериментальной группе

	Контроль	Опыт 1	Опыт 2
6 недель	10	11	11
10 недель	10	11	11

Животные опытных групп (n=44) вместо воды получали растворы о,р-ДДТ (“Sigma”, США) с концентрацией 20 и 80мкг/л.

Расчет потребляемой дозы ДДТ производили с учетом требований National Toxicology Program (США) [108] к определению низких доз, с учетом

пороговых значений низких доз для ДДТ (50 мкг/кг/сут) [135] и нормативам содержания ДДТ в продуктах питания в Российской Федерации [5].

Выбор данных доз обусловлен рознящимся фоновым содержанием ДДТ на различных географических территориях и МДУ в продуктах питания (мясная продукция – 0,1мг/кг; молочная продукция – 0,05мг/кг; зерновые культуры – 0,02 мг/кг) [4]. Животные контрольных групп (n=20) получали водопроводную воду ad libitum. Методом газожидкостной хроматографии [7] (исследование проведено в ФГУЗ «Центр гигиены и эпидемиологии в городе Москве») было подтверждено отсутствие в водопроводной воде и корме для лабораторных животных ДДТ, его метаболитов и родственных хлорорганических соединений (рис.4).

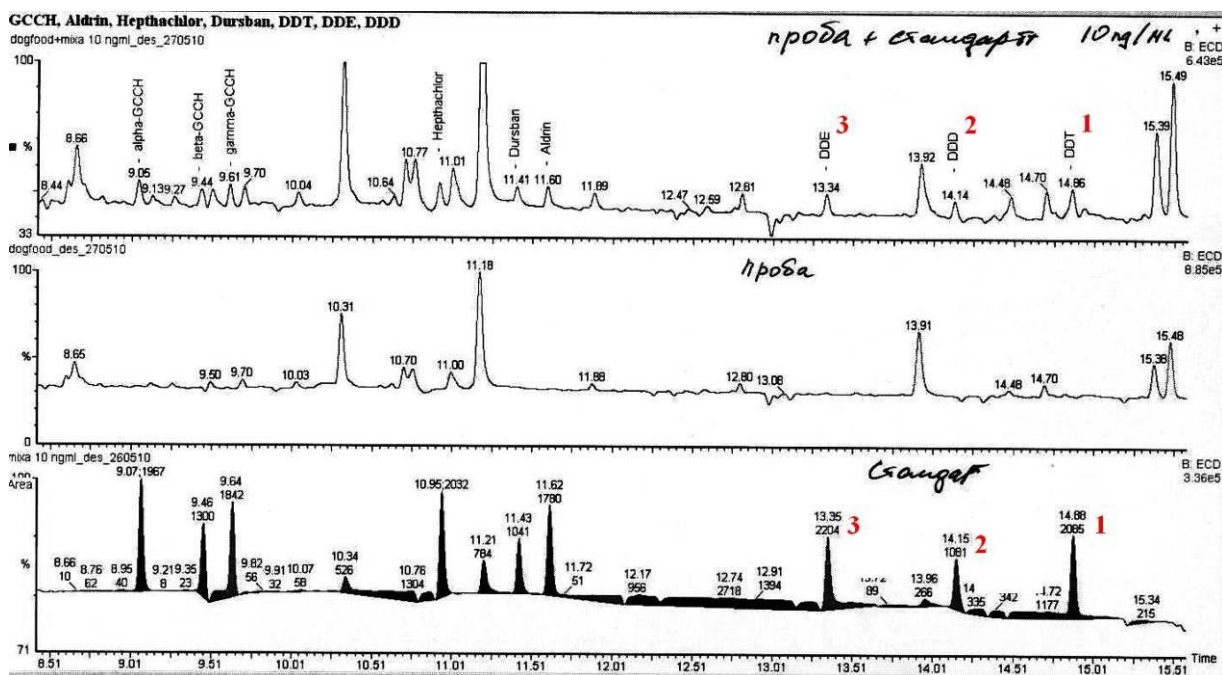


Рис. 4. Данные газожидкостной хроматографии. В пробе водопроводной воды и корма крыс подтверждено отсутствие ДДТ, его метаболитов (отмечены пиками 1, 2 и 3) и родственных хлорорганических соединений.

Доступ к воде и пище у крыс был свободным. Учет потребляемой жидкости производили ежедневно. Массу тела крыс определяли еженедельно.

Животных выводили из эксперимента через 6 и 10 недель. Умерщвление крыс осуществляли с помощью передозировки золетила ("Virbac Sante Animale", Франция), вводимого внутримышечно в дозе 50мг/кг.

Расчет полученной дозы ДДТ

В течение всего времени эксперимента каждую неделю измерялась масса тела крыс, и рассчитывалось среднее значение массы на каждую группу (рис.5).

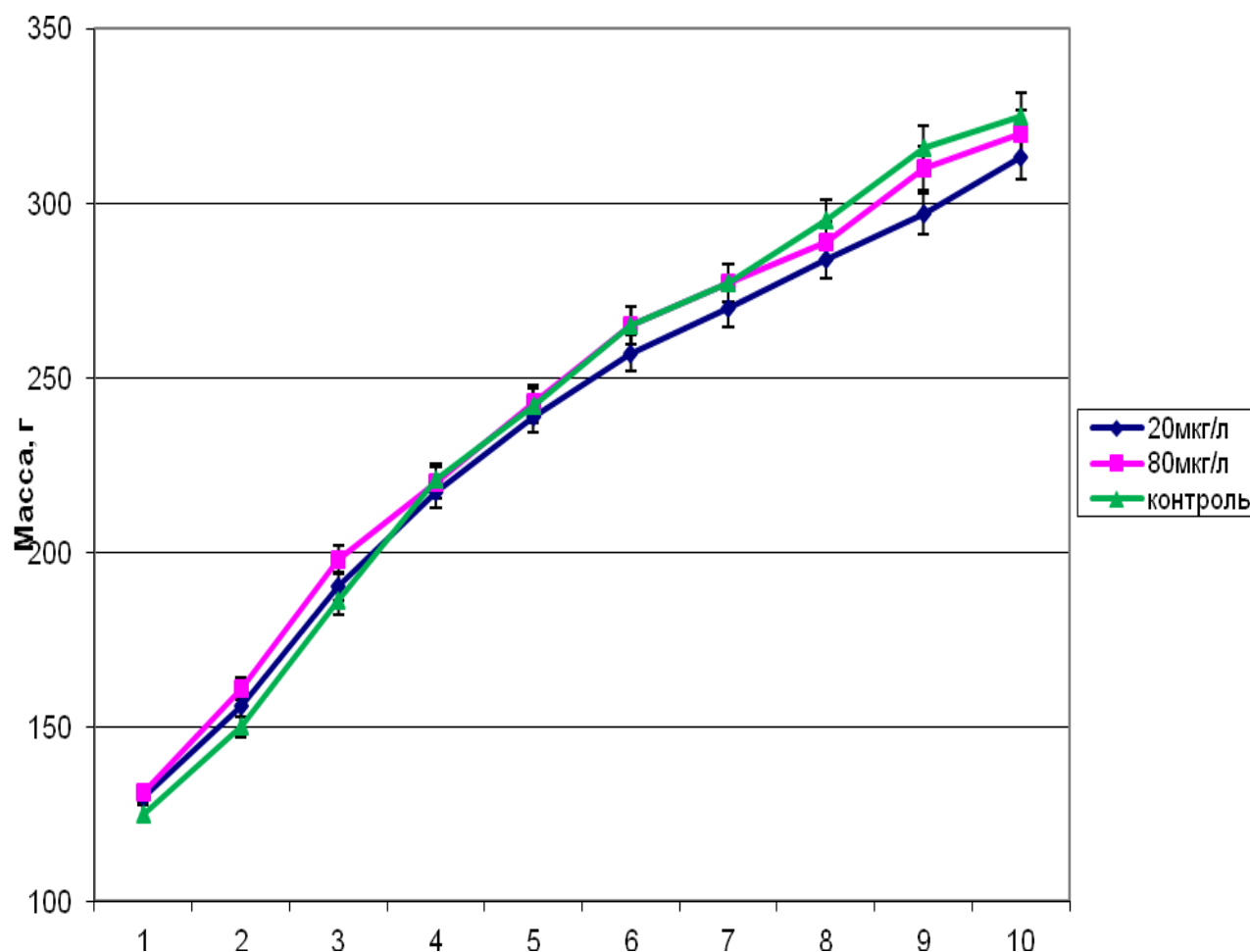


Рис. 5. Средний прирост массы тела крыс в группах за 10 недель.

Из графика видно, что отличия в приросте массы тела в двух опытных и контрольной группах статистических отличий не имели.

Была рассчитана средняя доза ДДТ на одну особь и на килограмм массы тела крысы за весь срок исследования (6 и 10 недель) для каждой опытной группы (табл.3).

Таблица 3

Расчет средней дозы ДДТ на одну крысу и на кг массы тела крысы

Неделя	20мкг/л			80мкг/л		
	Средний вес крысы, кг	Кол-во ДДТ на крысу, мкг	ДДТ мкг/кг массы	Средний вес крысы, кг	Кол-во ДДТ на крысу, мкг	ДДТ мкг/кг массы
1	0,130	1,40	10,77	0,131	6,40	48,85
2	0,169	2,70	15,98	0,176	11,20	64,37
3	0,207	2,84	13,72	0,216	12,00	55,56
4	0,230	3,14	13,65	0,231	13,12	56,80
5	0,250	3,24	12,96	0,254	14,56	57,32
6	0,266	4,90	18,42	0,276	20,88	75,65
7	0,276	1,64	5,94	0,283	6,00	21,20
8	0,291	4,00	13,75	0,295	15,60	52,88
9	0,303	3,66	12,08	0,315	15,20	48,25
10	0,321	6,54	20,37	0,325	23,60	72,62

В группе, получавшей раствор 20мкг/л, за 6 недель в среднем одна крыса получила дозу 18,22мкг (85,5мкг/кг) ДДТ. За 10 недель потребления раствора 20мкг/л - 34,06мкг (137,64мкг/кг) ДДТ.

В группе, получавшей раствор 80мкг/л, за 6 недель в среднем одна крыса получила дозу 78,16мкг (358,55мкг/кг) ДДТ. За 10 недель - 138,56мкг (553,5мкг/кг) ДДТ.

По расчетам, потребленная среднесуточная доза ДДТ составила $1,89 \pm 0,086$ мкг/кг/сут в группе, получавшей раствор 20мкг/л, и $7,77 \pm 0,17$ мкг/кг/сут в группе, получавшей раствор 80мкг/л.

Получение сыворотки крови. Процедура забора органов и крови

Животных фиксировали на доске на спине. Производили срединный разрез. Ножницами рассекали диафрагму, затем перерезали аорту и сердце. Кровь собирали с помощью стерильного одноразового шприца без иглы из грудной полости в чистые конические стеклянные пробирки. Проводили забор тимуса и селезенки.

Собранную кровь инкубировали при комнатной температуре в течение 30 мин, после чего отделяли образовавшийся сгусток от стенок пробирок и центрифугировали в течение 10 мин при 1500 об/мин на лабораторной центрифуге. Сыворотку крови замораживали при температуре -20°C .

Изготовление и изучение гистологических препаратов

Кусочки тимуса и селезенки фиксировали в растворе Буэна. После стандартной гистологической проводки с помощью гистопроцессора «Tissue-Tek VIP 5 Jr» («Hygesc», Франция) кусочки органов заливали в парафин. Срезы изготавливали с помощью микротомы «Microm HM 340E» («Microm GmbH», Германия) и окрашивали гематоксилином и эозином.

Изучение гистологических препаратов проводили методом световой микроскопии с использованием микроскопа “Leica DM2500” и компьютерной морфометрии с помощью программы “ImageScope” (“Leica Microsystems, GMBH, Австрия”).

В гистологических препаратах тимуса, определяли соотношение коркового и мозгового веществ, ширину субкапсулярного слоя, количество тимических телец в мм^2 площади среза мозгового вещества, оценивали количество ретикулярных эпителиоцитов, входящих в их состав, и стадии развития телец.

1-я стадия – сближение нескольких ретикулярных эпителиоцитов с повышенной оксифилией цитоплазмы;

2-я стадия – concentрическое наложение ретикулярных эпителиоцитов и накопление в них кератина;

3-я стадия – формирование полости в центре тельца;

4-я стадия – распад тимического тельца.

В гистологических препаратах селезенки определяли соотношение белой и красной пульпы, соотношение площади лимфатических узелков и периартериальных лимфоидных муфт (ПАЛМ) в белой пульпе, диаметр лимфатических узелков и их герминативных центров, ширину маргинальной и мантийной зон. Также подсчитывали количество узелков на мм^2 площади

среза селезенки, долю узелков с большим количеством гибнущих клеток и с большим числом митотически делящихся клеток в герминативных центрах.

Иммуногистохимическое исследование экспрессии белка p53

Исследование экспрессии белка p53 выполняли с использованием первичных кроличьих поликлональных антител (“Santa Cruz Biotechnology”, США). Визуализацию реакции осуществляли с помощью набора реактивов “UltraVision Detection System” (“Termo Scientific”, США). Препараты докрасивали гематоксилином Майера.

Радиоизотопный метод определения пролиферации *ex tempore* клеток тимуса и селезенки

Селезенку и тимус помещали в стеклянные гомогенизаторы с охлажденной средой для отмывки. Полученную клеточную суспензию освобождали от тканевых фрагментов отстаиванием в центрифужных пробирках в течение 5 минут и дважды отмывали в среде путём центрифугирования при 1000 об/мин в течение 7 минут. Осадок ресуспендировали в произвольном объёме среды для отмывки и определяли количество жизнеспособных клеток в камере Горяева по модифицированному методу Шрека. Для этого клеточную суспензию разводили в смеси равных объёмов 0,1% раствора эозина в растворе Рингера двойной концентрации и 0,1% водного раствора трипанового синего. Число нежизнеспособных клеток не превышало 10%. Клетки в количестве 2×10^6 /мл отмывали в новой среде и осадок суспендировали в нужном объёме культуральной среды. Среда для культивирования содержала среду RPMI 1640, 10%-ую инактивированную эмбриональную телячью сыворотку, 10 мМ буфера HEPES, 2 мМ L-глутамин, 5×10^{-5} М 2-меркаптоэтанола.

Определяли пролиферативную активность клеток тимуса и селезенки *ex tempore* [30, 44]. Клетки в количестве 2×10^5 вносили в 96-луночные планшеты для определения 4-х часовой пролиферации, добавляли ^3H -тимидин (1мкКи/лунку) с удельной активностью 24 Ки/ммоль. После инкубации клет-

ки снимали на харвестре, метку просчитывали на β -счетчике (“LKB” Швеция).

Радиоизотопный метод определения пролиферативной активности лимфоцитов селезенки и тимуса в реакции бласттрансформации

В лунки 96-луночного круглодонного планшета вносили смесь 100 мкл клеток селезенки или тимуса в концентрации $2 \cdot 10^6$ клеток/мл и 50 мкл Конканавалина А (“Sigma”, США) с таким расчётом, чтобы конечная концентрация Конканавалина А составляла 5 мкг/мл. Контрольные лунки содержали смесь 100 мкл клеток ($2 \cdot 10^6$ клеток/мл) и 100 мкл среды для культивирования. Планшет инкубировали 72 ч при 37°C в атмосфере воздуха с 5% содержанием CO₂. За 4 часа до окончания инкубирования в лунки вносили по 1 мкКи ³H-тимидина. Пробы собирали при помощи харвестра на стекловолокнистые фильтры, высушивали и просчитывали на β -спектрометре (фирма “LKB”, Финляндия). Индекс стимуляции пролиферации в реакции бласттрансформации (ИБ) определяли по формуле:

$$\text{ИБ} = A/B,$$

где А – Конканавалин А –стимулированная пролиферация клеток, В – пролиферация клеток в среде.

Определение концентрации цитокинов и гормонов в сыворотке крови

В сыворотке крови методом твердофазного иммуноферментного анализа с помощью коммерческих наборов определяли концентрации ИЛ-2, ИЛ-10, ИЛ-12, ТФР- β (“Bender Medsystems”, Австрия), неоптерина и кортикостерона (“IBL”, Германия).

Статистическая обработка полученных данных

Статистическую обработку проводили с помощью пакета прикладных программ STATISTICA (“Statsoft Inc.”, США).

Для описания количественных признаков проводили анализ соответствия вида распределения признака закону нормального распределения с ис-

пользованием критериев Колмогорова-Смирнова, Лиллиефорса, Шапиро-Уилка.

Центральные тенденции и рассеяния количественных признаков, имеющих приближенно нормальное распределение, описывали средним значением M и стандартной ошибкой среднего значения m . Центральные тенденции и рассеяния количественных признаков, не имеющих приближенно нормального распределения, описывали с помощью медианы Me и интерквартильного размаха.

Сравнение независимых групп по количественному признаку проводили с помощью t -критерия Стьюдента с учетом значений критерия Левена о равенстве дисперсий, критерия Манна-Уитни, χ^2 . Различия считали статистически значимыми при $p=0,05$.

ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ СОБСТВЕННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ

3.1. Морфофункциональные изменения тимуса при воздействии низких доз ДДТ

3.1.1. Морфологическая характеристика тимуса крыс контрольной группы – через 6 недель после начала эксперимента

Тимус крыс контрольной группы через 6 недель после начала эксперимента на гистологических срезах представлял собой паренхиматозный орган дольчатого строения (рис.6).

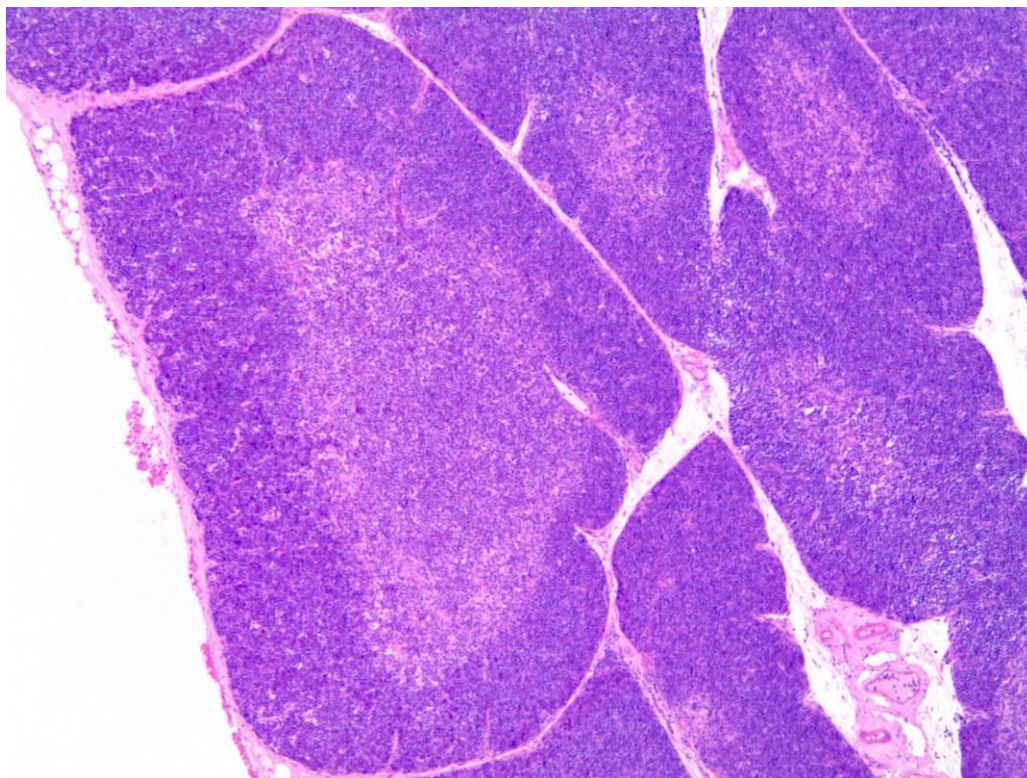


Рис. 6. Структура тимуса крысы контрольной группы через 6 недель после начала эксперимента.

Корковое вещество хорошо выражено. Граница между корковым и мозговым веществом чёткая.

Окраска гематоксилином и эозином. Ув.50.

Снаружи тимус был покрыт тонкой соединительнотканной капсулой, от которой внутрь отходили тонкие соединительнотканные прослойки, по которым проходили сосуды. Паренхима каждой дольки была образована лимфоидной тканью, строма сформирована ретикулярными эпителиоцитами. В дольке четко различались две зоны: корковое вещество, занимающее

периферическую часть долики, и мозговое вещество, находящееся в центре долики. В корковом веществе лимфоциты плотно прилежали друг к другу. Доля коркового вещества составляла $73,37 \pm 1,4\%$, мозгового – $26,63 \pm 1,4\%$ паренхимы (рис.6).

В корковом веществе хорошо визуализировался субкапсулярный слой, образованный плотно лежащими лимфобластами (рис.7).

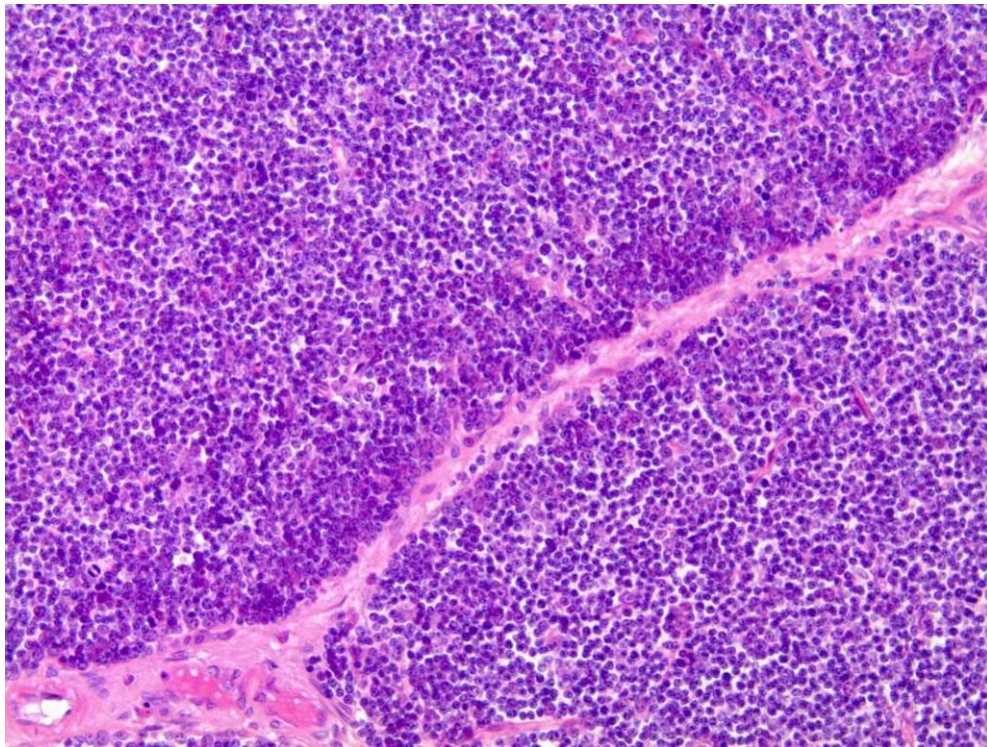


Рис. 7. Строение коркового слоя тимуса крысы контрольной группы через 6 недель после начала эксперимента.

Корковое вещество представлено плотно лежащими клетками. Субкапсулярный слой хорошо выражен и образован компактно лежащими лимфобластами.

Окраска гематоксилином и эозином. Ув.200.

Толщина субкапсулярного слоя варьировала в пределах $43,56 \pm 1,67$ мкм. В мозговом веществе находилось небольшое количество лимфоцитов, между ними были видны ретикулярные эпителиоциты. В мозговом веществе встречались единичные тимические тельца. Количество их в 1 мм^2 среза мозгового вещества составляло в среднем $0,8 \pm 0,15$ телец. Тимические тельца состояли в среднем из $3,07 \pm 0,12$ клеток и в подавляющем большинстве случаев ($90,01 \pm 5,09\%$) представляли собой концентрическое наложение

светлых и темных ретикулярных эпителиоцитов (II стадия развития тимических телец) (рис.8).

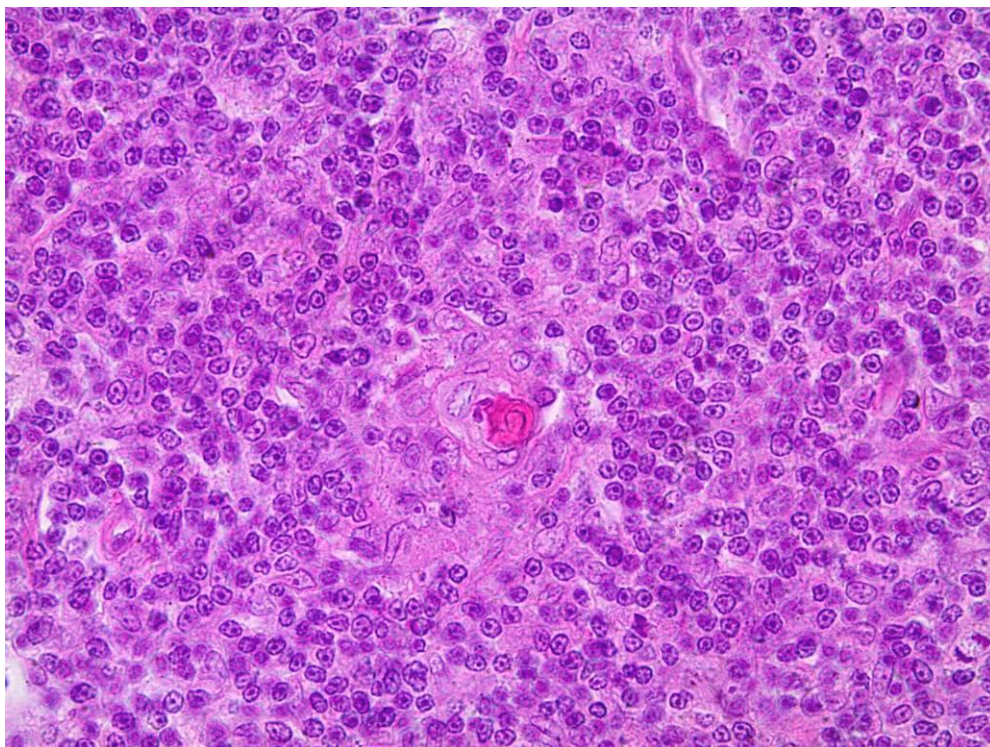


Рис. 8. Строение мозгового слоя тимуса крысы контрольной группы через 6 недель после начала эксперимента.

Лимфоциты преобладают над ретикулярными эпителиоцитами. Тимическое тельце находится во II фазе состоит из 4-5 concentrically layered reticular epithelial cells with keratin deposits in the center of the body. Stained with hematoxylin and eosin. Magnification 400x.

В корковом и мозговом веществе встречались митотически делящиеся клетки. Просветы сосудов как артериального, так и венозного русла были свободны, либо в просвете имелось небольшое количество плазмы.

– через 10 недель после начала эксперимента

Тимус контрольной группы крыс через 10 недель после начала эксперимента также имел дольчатое строение. Дольки тимуса были покрыты капсулой. Заметных изменений толщины соединительнотканых междольковых перегородок замечено не было. В тимусе крыс контрольной группы в сравнении с предыдущим сроком исследования соотношение долей коркового и мозгового веществ статистически значимо не изменялось. Доля коркового вещества составляла $76,4 \pm 1\%$, мозгового - $23,6 \pm 1\%$ (рис.9).

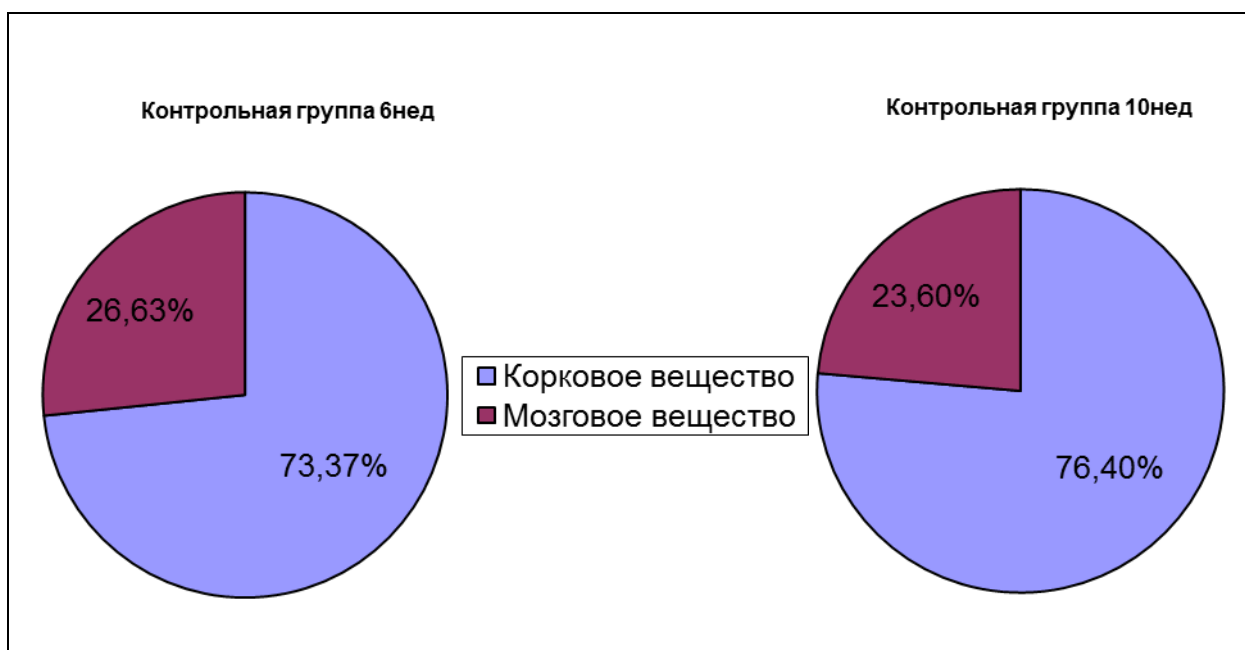


Рис. 9. Соотношение коркового и мозгового вещества тимуса крыс контрольных групп через 6 и 10 недель после начала эксперимента.

В корковом слое хорошо визуализировался субкапсулярный слой, образованный плотно лежащими лимфобластами. Ширина субкапсулярного слоя не изменялась по сравнению с предыдущим сроком исследования и составляла $44,22 \pm 1,19$ мкм (рис 10).

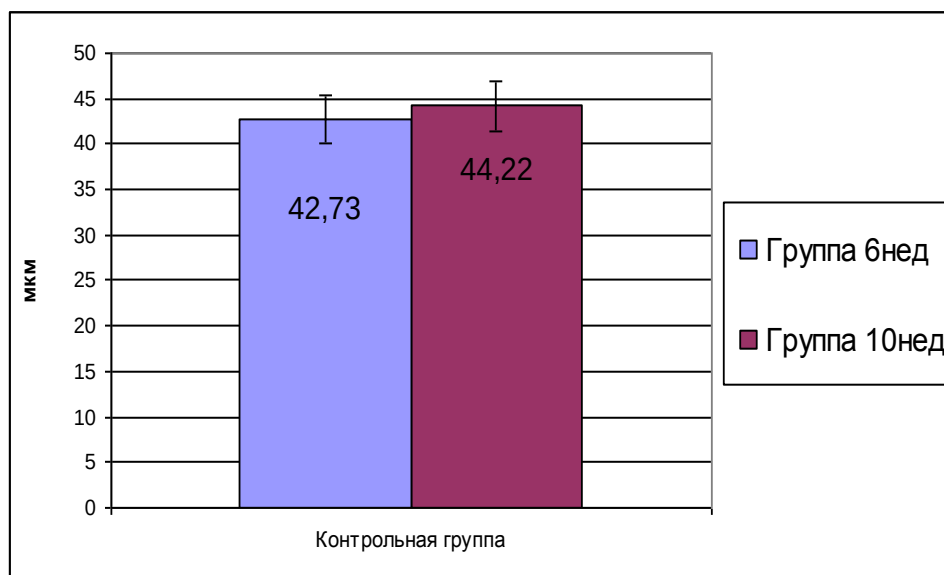


Рис. 10. Ширина субкапсулярного слоя тимуса крыс контрольных групп через 6 и 10 недель после начала эксперимента.

В корковом слое были выявлены участки гибели лимфоцитов с появлением характерной картины «звездного неба». Плотность лимфоцитов

была снижена по сравнению с предыдущим сроком исследования, в результате чего заметны стали ретикулярные эпителиоциты. В корковом веществе также встречались митотически делящиеся клетки. В мозговом веществе отмечалось увеличение количества тимических телец в единице площади среза до $1,84 \pm 0,29$ на мм^2 по сравнению со значениями предыдущего срока исследования (рис. 11).

Среднее количество ретикулярных эпителиальных клеток в тимических тельцах незначительно увеличилось до $3,61 \pm 0,1$.

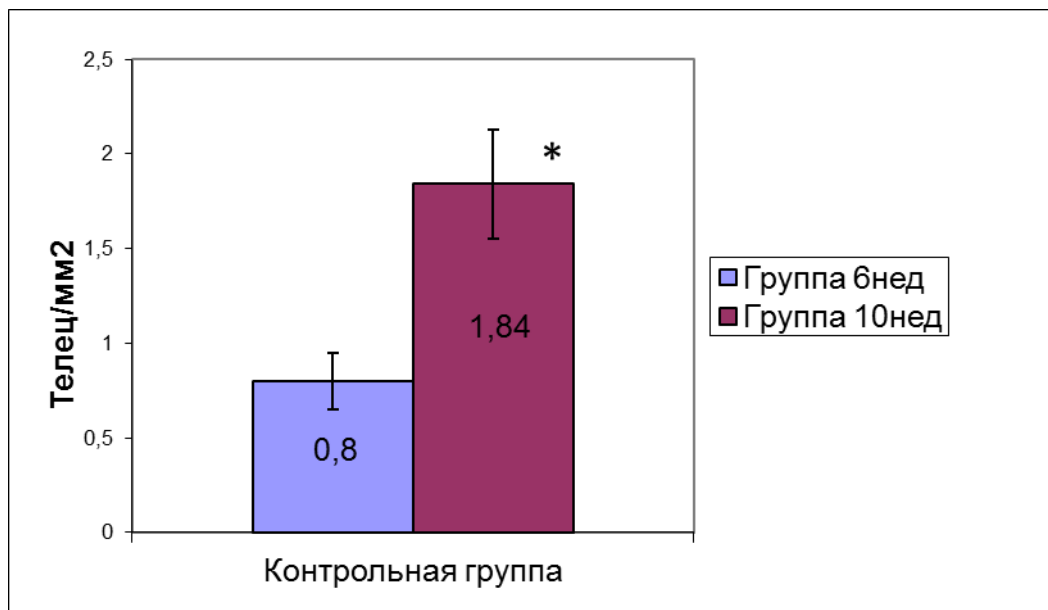


Рис. 11. Количество тимических телец в мм^2 площади среза мозгового вещества тимуса крыс контрольных групп через 6 и 10 недель после начала эксперимента.

* - статистически значимые отличия от значений предыдущего срока исследования.

Выраженные отличия наблюдались в стадиях развития тимических телец. По сравнению с предыдущим сроком исследования выявлено значительное увеличение их новообразования. Доля тимических телец, представляющих собой скопления ретикулярных эпителиоцитов в начальной стадии накопления кератина (рис.12), увеличилась более чем в пять раз и составила $56,48 \pm 4,03\%$ от общего их количества. Тимические тельца более поздней стадии развития, представляющие собой концентрическое наложение

ретикулярных эпителиоцитов с накоплениями кератина, соответственно встречались реже. Их доля составляла $43,52 \pm 4,03\%$.

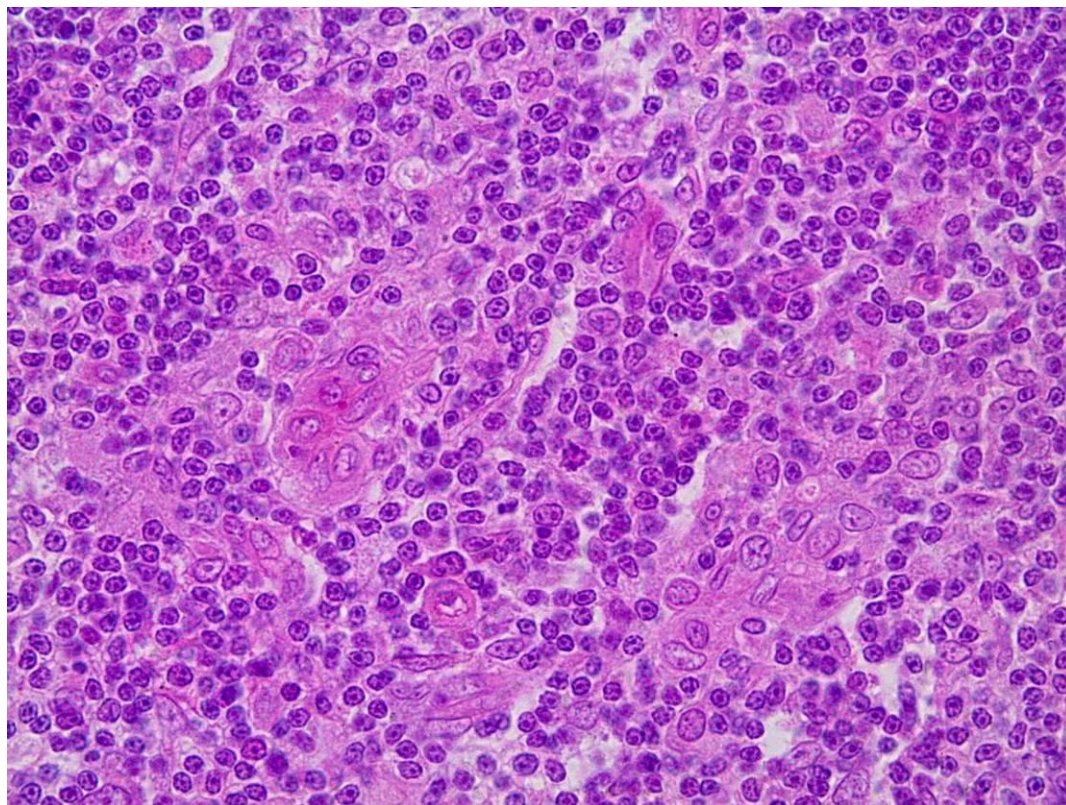


Рис. 12. Строение мозгового слоя тимуса крысы контрольной группы через 10 недель после начала эксперимента.

Тимические тельца I фазы развития образованы скоплением 6-7 ретикулярных эпителиоцитов, начальная стадия накопления кератина. Окраска гематоксилином и эозином. Ув.400.

В просветах большинства артериальных и венозных сосудов находились эритроциты и единичные лейкоциты.

Заключение: Тимус крыс контрольной группы через 6 недель после начала эксперимента имел типичное для данного возраста строение. В тимусе крыс контрольной группы через 10 недель после начала эксперимента, в сравнении с тимусом контрольной группы предыдущего срока исследования, были отмечены следующие статистически значимые отличия: увеличилось количество тимических телец в мм^2 среза мозгового вещества, изменилось соотношение стадий развития тимических телец в сторону увеличения доли телец в начальной стадии развития. В корковом веществе были выявлены участки гибели лимфоцитов, появление картины «звездного неба». Эти фак-

ты говорят о развитии начальной стадии возрастной инволюции тимуса у крыс данного возраста.

3.1.2. Морфологическая характеристика тимуса крыс, потреблявших ДДТ в течение 6 недель – в дозе $1,89 \pm 0,086 \text{ мкг/кг/сут}$

После потребления ДДТ в дозе $1,89 \pm 0,086 \text{ мкг/кг/сут}$ в течение 6 недель при гистологическом исследовании тимус имел дольчатое строение. Снаружи дольки были покрыты капсулой. Толщина соединительнотканых междольковых перегородок не изменялась, но отмечалось увеличение количества жировых клеток в междольковых перегородках по сравнению с контрольной группой. Строение долек тимуса было типичным, но, по сравнению с контрольной группой, граница между корковым и мозговым слоем была менее четкой. Наблюдалось небольшое увеличение доли коркового вещества, не достигшее статистической значимости (рис.13).

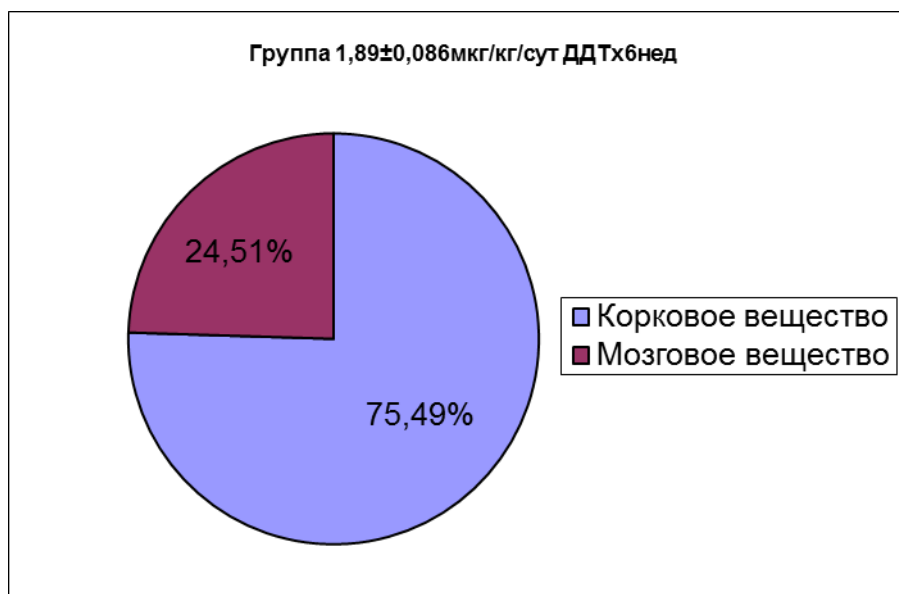


Рис. 13. Соотношение коркового и мозгового вещества тимуса крыс, потреблявших ДДТ в дозе $1,89 \pm 0,086 \text{ мкг/кг/сут}$ в течение 6 недель.

Незначительное расширение субкапсулярного слоя также не достигло статистической значимости (рис. 14).

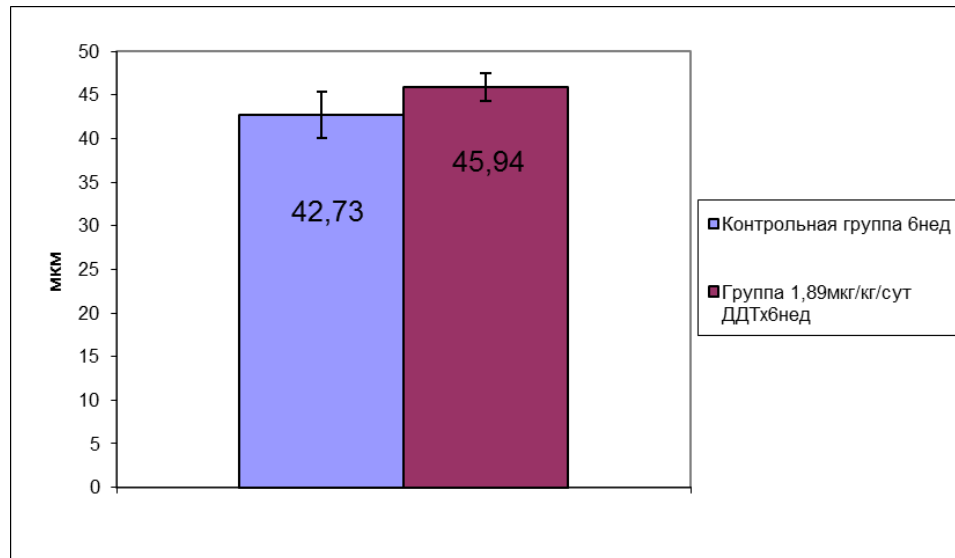


Рис. 14. Толщина субкапсулярного слоя тимуса крыс контрольной группы и группы, потреблявшей ДДТ в дозе $1,89 \pm 0,086$ мкг/кг/сут в течение 6 недель.

У большинства животных в корковом слое наблюдались гибель лимфоцитов, опустошение, появление картины «звездного неба» (рис. 15).

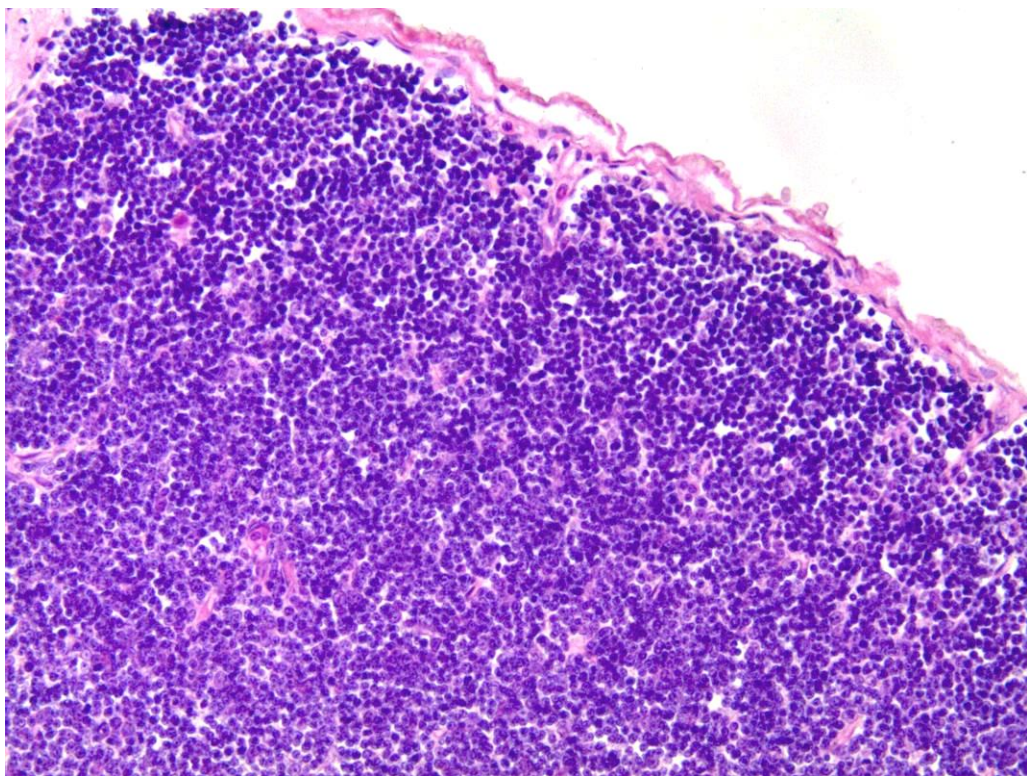


Рис. 15. Строение коркового слоя тимуса крысы, потреблявшей ДДТ в дозе $1,89 \pm 0,086$ мкг/кг/сут в течение 6 недель. Гибель лимфоцитов в корковом веществе, появление картины «звездного неба». Окраска гематоксилином и эозином. Ув.200.

В мозговом веществе наблюдалось увеличение количества тимических телец (рис. 16).

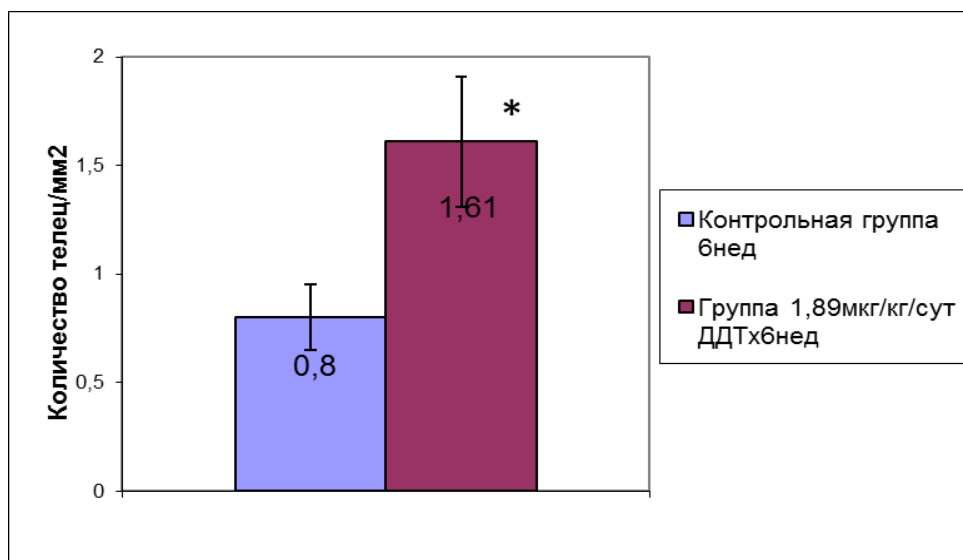


Рис. 16. Количество тимических телец в мм² площади среза мозгового вещества тимуса крыс, потреблявших ДДТ в дозе $1,89 \pm 0,086$ мкг/кг/сут в течение 6 недель, и крыс контрольной группы.

* - статистически значимые отличия от значений контрольной группы

Так же увеличилось количество клеток в составе тимических телец (рис. 17).

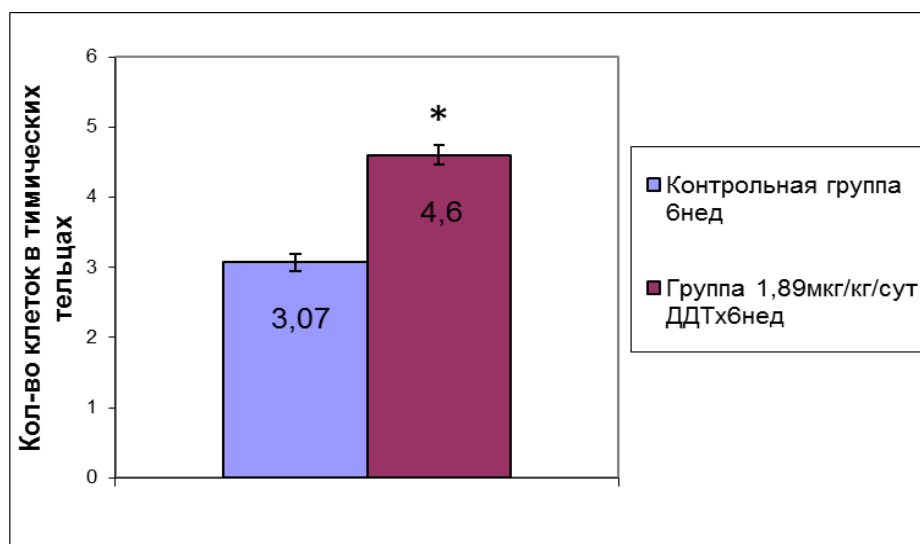


Рис. 17. Количество ретикулярных эпителиоцитов в тимических тельцах тимуса крыс, потреблявших ДДТ в дозе $1,89 \pm 0,086$ мкг/кг/сут в течение 6 недель, и крыс контрольной группы.

* - статистически значимые отличия от значений контрольной группы

В отличие от крыс контрольной группы, у крыс, получавших низкие дозы ДДТ в течение 6 недель, чаще встречались тимические тельца более ранних стадий развития. Тельца, представляющие собой концентрические скопления ороговевших клеток с большими накоплениями кератина в цитоплазме, обнаруживались реже. Изменений со стороны сосудистого русла не наблюдалось.

Заключение: Потребление ДДТ крысами в дозе $1,89 \pm 0,086 \text{ мкг/кг/сут}$ в течение 6 недель, приводило к морфофункциональным изменениям тимуса, обусловленным гибелью лимфоцитов в корковом слое (появление картины «звездного неба», опустошение коркового слоя тимуса, менее четкие границы между корковым и мозговым веществами) и усилением гибели ретикулярных эпителиоцитов путем образования тимических телец.

– в дозе $7,77 \pm 0,17 \text{ мкг/кг/сут}$

У крыс, потреблявших ДДТ в дозе $7,77 \pm 0,17 \text{ мкг/кг/сут}$ тимус имел дольчатое строение. Дольки тимуса плотно прилегали друг к другу и были разделены тонкими соединительнотканными перегородками. В дольках было хорошо развито мозговое вещество, однако граница между корковым и мозговым веществами была менее четкой, чем в тимусе крыс контрольной группы. Соотношение коркового и мозгового веществ не отличалось от значений контрольной группы и группы крыс, потреблявших ДДТ в дозе $1,89 \pm 0,086 \text{ мкг/кг}$. Доля коркового вещества составляла $74,56 \pm 1,19\%$.

В корковом слое наблюдалась гибель лимфоцитов. Часто встречались клетки в гиперхромными пикнотичными ядрами. Встречались участки опустошения коркового слоя, появления картины «звездного неба» (рис. 18). Митотически делящиеся клетки в корковом слое встречались редко.

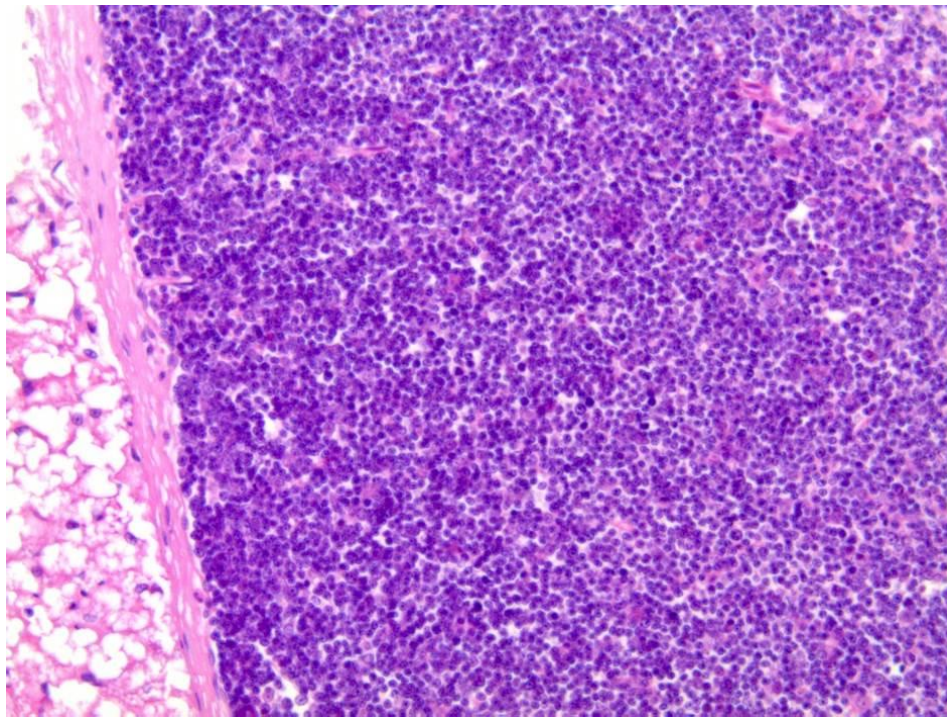


Рис. 18. Строение коркового слоя тимуса крысы, потреблявшей ДДТ в дозе $7,77 \pm 0,17$ мг/кг/сут в течение 6 недель.

Гибель лимфоцитов коркового вещества, появление картины «звездного неба». Окраска гематоксилином и эозином. Ув.200.

Толщина субкапсулярного слоя также не отличалась от показателей контрольной группы, но была меньше, чем у крыс, потреблявших ДДТ в дозе $1,89 \pm 0,086$ мг/кг/сут (рис. 19).

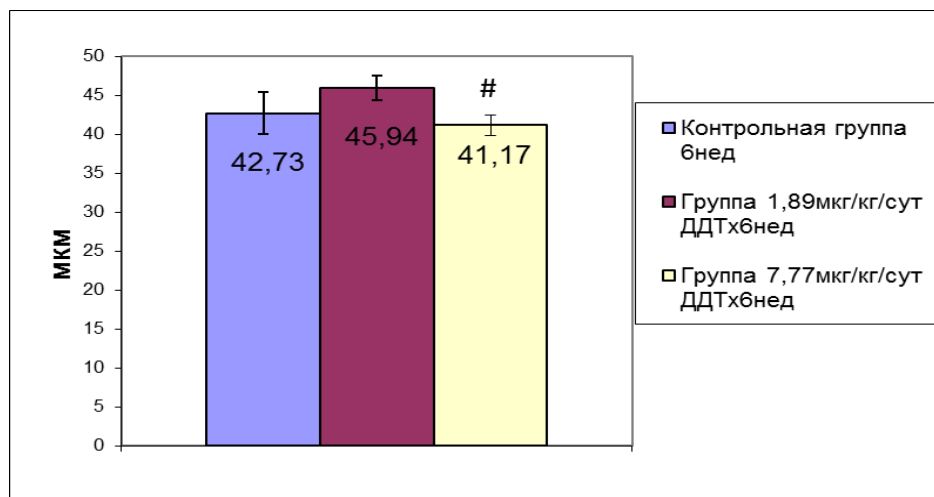


Рис. 19. Ширина субкапсулярного слоя тимуса крыс контрольной и опытных групп, потреблявших различные дозы ДДТ в течение 6 недель.

- статистически значимое отличие от группы, потреблявшей меньшую дозу ДДТ.

В мозговом слое тимуса отмечалось снижение количества лимфоцитов по отношению к ретикулярным эпителиоцитам. Количество тимических

телец в мозговом веществе увеличилась по сравнению с контрольной группой (рис. 20). Тимические тельца в ранней стадии развития в виде скопления ретикулярных эпителиоцитов составляли $52,38 \pm 2,61\%$ от общего количества телец. Тимические тельца, представляющие собой концентрические наслоения клеток с высоким содержанием кератина встречались в $47,62 \pm 2,61\%$ случаев. Этот показатель статистически значимо отличается от соотношения стадий в контрольной и опытной с меньшей дозой ДДТ группах. В единичных препаратах встречались тимические тельца в корковом слое тимуса. Количество клеток, составлявших тимические тельца в этой группе не отличалось от значений в группе, потреблявших ДДТ в дозе $1,89 \pm 0,086 \text{ мкг/кг/сут}$, и было в среднем равно $4,76 \pm 0,19$. Однако этот показатель был статистически значимо выше, чем в контрольной группе.

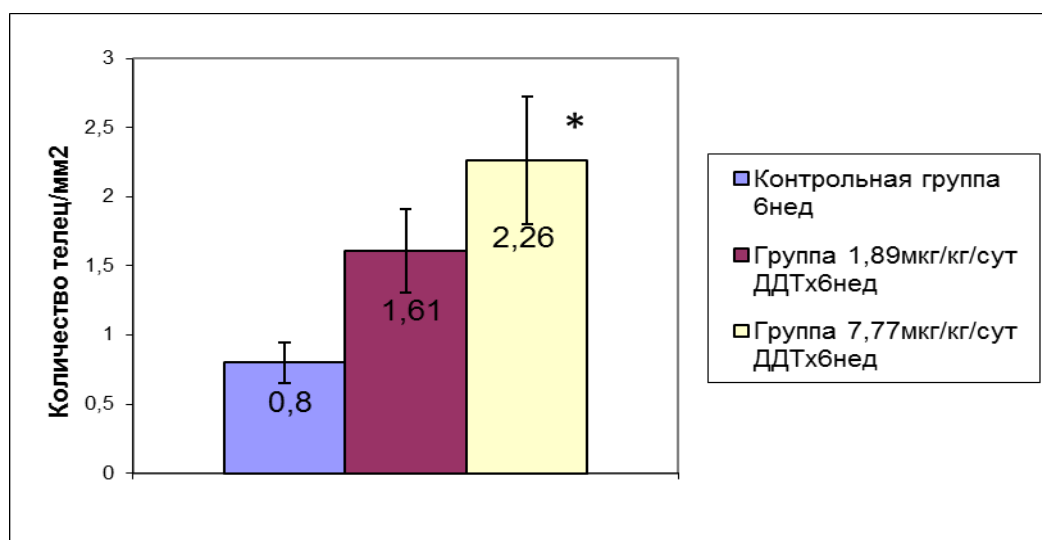


Рис. 20. Количество тимических телец в мозговом веществе тимуса крыс контрольной и опытных групп 6 недель.

* - статистически значимое отличие от контрольной группы.

Закключение: По сравнению с группой, потреблявшей меньшую дозу ДДТ, принципиальных изменений гистологического строения тимуса не было. Как и в группе крыс, потреблявших ДДТ в дозе $1,89 \pm 0,086 \text{ мкг/кг/сут}$ отмечалась гибель лимфоцитов в корковом слое. Структура мозгового вещества тимуса имела ряд отличий, связанных с усилением гибели ретикулярных эпителиоцитов. Эти процессы были более выражены, чем в

контрольной группе и группе, потреблявшей ДДТ в дозе $1,89 \pm 0,086 \text{ мкг/кг/сут}$.

3.1.3. Морфологическая характеристика тимуса крыс, потреблявших ДДТ в течение 10 недель – в дозе $1,89 \pm 0,086 \text{ мкг/кг/сут}$

Орган имел дольчатое строение. Изменений в строении капсулы, междольковых перегородок в сравнении с предыдущим сроком исследования не наблюдалось. Доля коркового вещества не отличалась от показателей контрольной группы, а также группы, потреблявшей ДДТ в этой же дозе в течение 6 недель.

Картина «звездного неба», обусловленная гибелью лимфоцитов и опустошением коркового вещества тимуса также более заметна в этой группе в сравнении с группой, получавшей такую же дозу ДДТ в течение меньшего срока. Ширина субкапсулярного слоя не отличалась от значений контрольной группы. Однако было отмечено более заметное, статистически значимое сужение субкапсулярного слоя по сравнению с группой, получавшей ту же дозу ДДТ в течение меньшего срока (рис. 21).

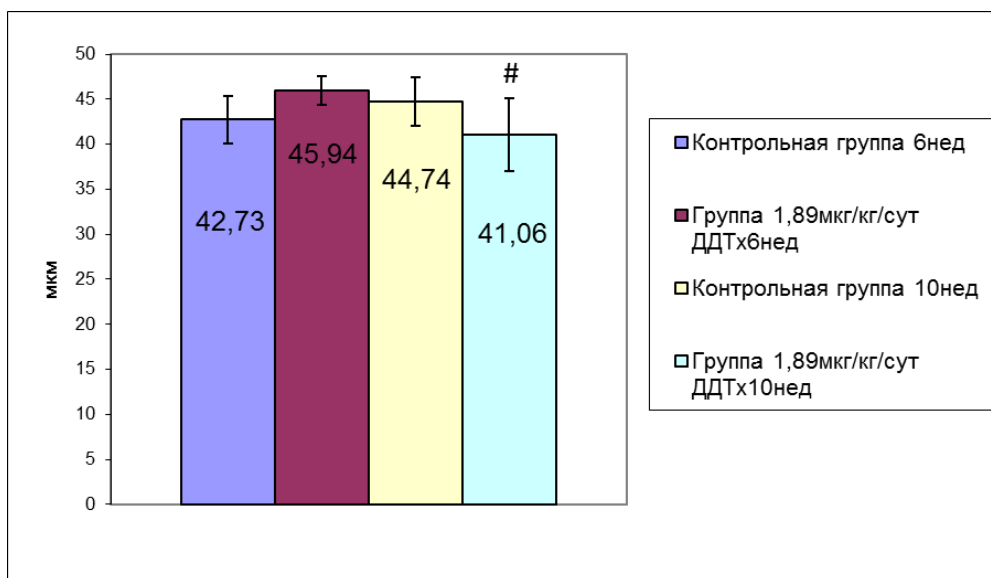


Рис. 21. Ширина субкапсулярного слоя тимуса крыс, потреблявших ДДТ в дозе $1,89 \pm 0,086 \text{ мкг/кг/сут}$ в течение 6 и 10 недель и крыс контрольной группы, соответствующих сроков исследования.

- статистически значимое отличие от группы меньшего срока исследования

Количество тимических телец в мозговом веществе тимуса крыс увеличилось по сравнению с предыдущим сроком исследования (рис. 22).

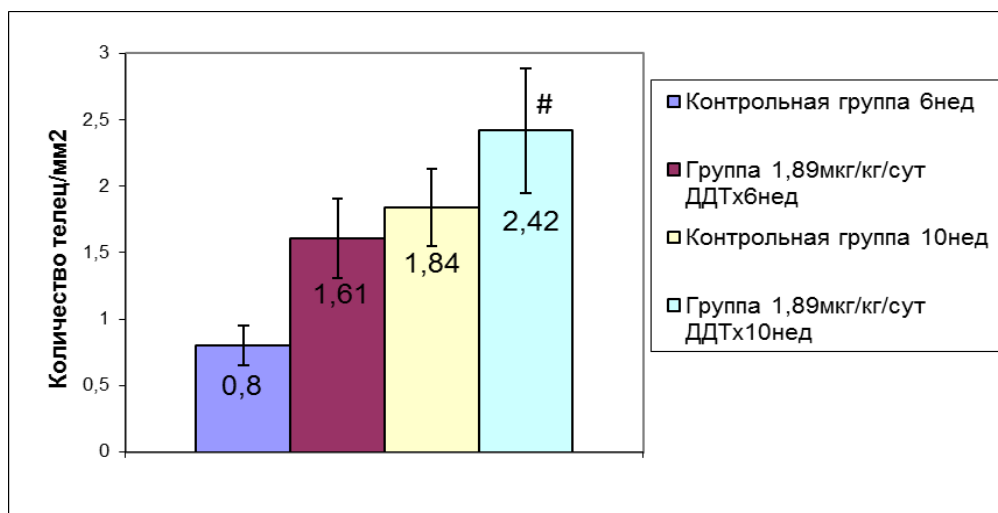


Рис. 22. Количество тимических телец в мм² среза мозгового вещества тимуса крыс, потреблявших ДДТ в дозе $1,89 \pm 0,086$ мкг/кг/сут в течение 6 и 10 недель и крыс контрольных групп, соответствующих сроков исследования.

- статистически значимое отличие от предыдущего срока исследования.

Количество ретикулярных эпителиоцитов в тимических тельцах повысилось по сравнению с предыдущим сроком исследования и статистически значимо превысило значения контрольной группы (рис. 23).

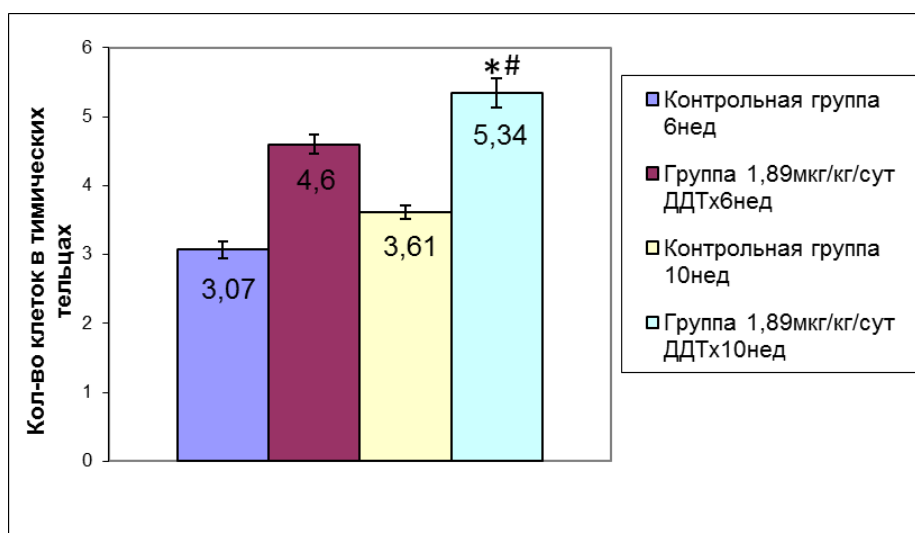


Рис. 23. Количество ретикулярных эпителиоцитов в тимических тельцах крыс, потреблявших ДДТ в дозе $1,89 \pm 0,086$ мкг/кг/сут в течение 6 и 10 недель, и крыс контрольных групп, соответствующих сроков исследования.

* - статистически значимое отличие от контрольной группы;

- статистически значимое отличие от группы меньшего срока исследования.

Доля тимических телец в ранних стадиях развития от общего количества телец увеличилось по сравнению с предыдущим сроком

исследования и значительно превысило показатели контрольной группы. Изменений со стороны сосудистого русла не наблюдалось.

Закключение: По сравнению с предыдущим сроком исследования в тимусе не выявлено выраженных изменений, связанных с гибелью лимфоцитов. Отмечалось прогредиентное снижение ширины слоя лимфобластов, в результате чего, этот показатель был ниже, чем в контрольной группе. Гибель ретикулярных эпителиоцитов в мозговом слое была более выражена, чем в контрольной группе за счет увеличения количества клеток, образующих тимические тельца.

– в дозе $7,77 \pm 0,17 \text{ мкг/кг/сут}$

Тимус крыс после потребления крысами ДДТ в дозе $7,77 \pm 0,17 \text{ мкг/кг/сут}$ в течение 10 недель также имел типичное строение. Соотношение коркового и мозгового слоев статистически значимо изменялось при сравнении с контрольной группой и группой, получавшей меньшую дозу ДДТ в течение 10 недель, а также с группой, получавшей $7,77 \pm 0,17 \text{ мкг/кг/сут}$ ДДТ в течение 6 недель. Доля коркового вещества статистически значимо увеличилась (рис. 24).

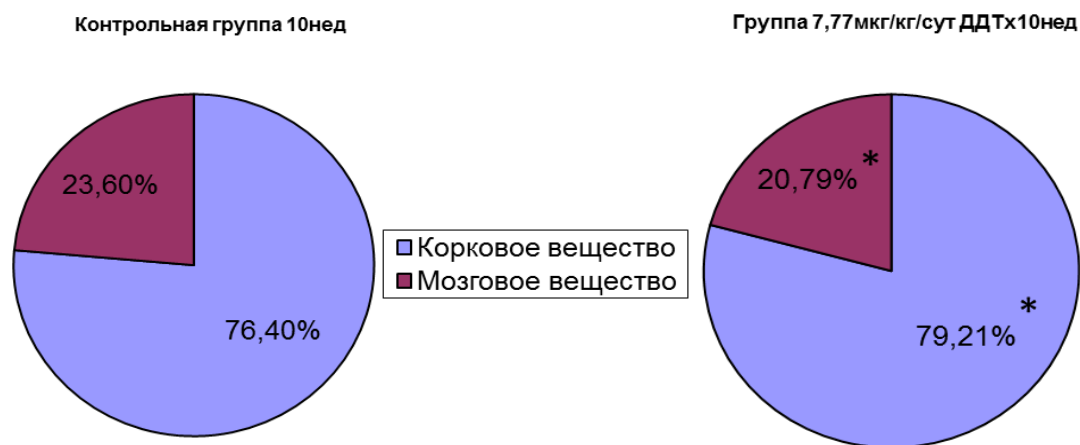


Рис. 24. Соотношение коркового и мозгового вещества тимуса крыс контрольной группы, и опытной группы, потреблявшей ДДТ в дозе $7,77 \pm 0,17 \text{ мкг/кг/сут}$ в течение 10 недель.

В корковом слое имелись участки гибели лимфоцитов, встречались клетки в гиперхромными пикнотичными ядрами. Также встречались митотически делящиеся клетки. Толщина субкапсулярного слоя

уменьшилась. Этот показатель был статистически значимо меньше, чем в контрольной группе, однако практически не отличался от значений опытных групп с меньшей дозой и меньшим сроком воздействия ДДТ (рис. 25).

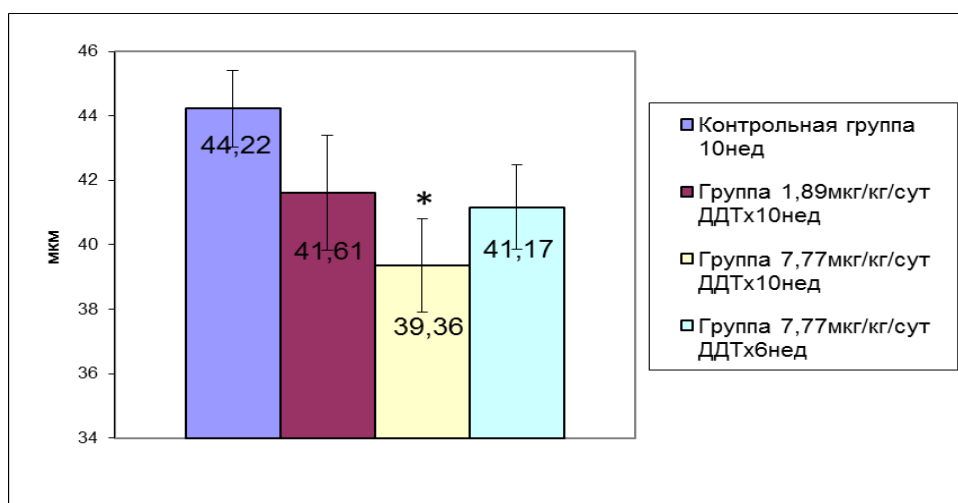


Рис. 25. Ширина субкапсулярного слоя тимуса крыс, потреблявших ДДТ в дозе $1,89 \pm 0,086$ мкг/кг/сут и $7,77 \pm 0,17$ мкг/кг/сут в течение 6 и 10 недель и крыс контрольных групп, соответствующих сроков исследования.

* - статистически значимое отличие от контрольной группы.

Граница между корковым и мозговым веществом была четкой. В мозговом веществе тимуса было увеличилось количество тимических телец (рис. 26).

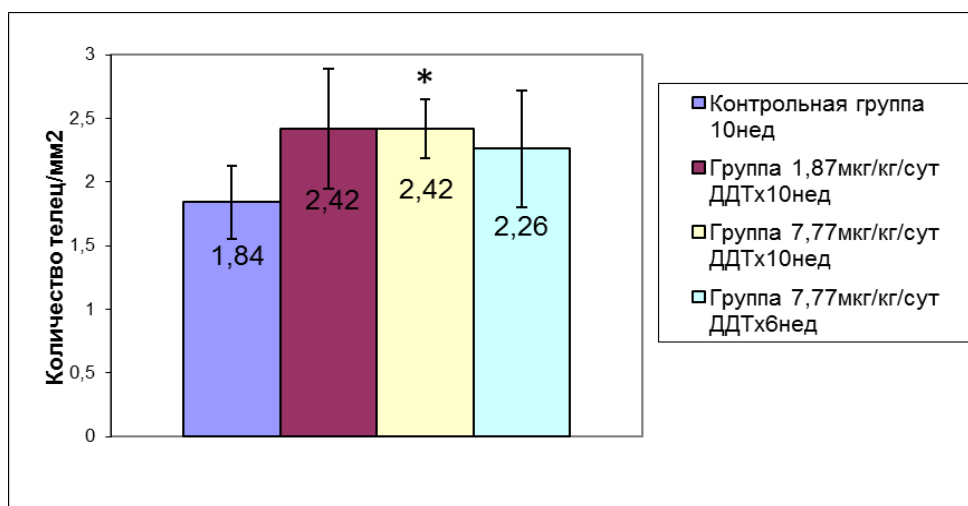


Рис. 26. Количество тимических телец в мм² среза тимуса крыс, потреблявших ДДТ в дозе $1,89 \pm 0,086$ мкг/кг/сут и $7,77 \pm 0,17$ мкг/кг/сут в течение 6 и 10 недель и крыс контрольных групп, соответствующих сроков исследования.

*- статистически значимое отличие от контрольной группы.

Тимические тельца в ранней стадии развития встречались в $62,72 \pm 0,68\%$ случаев. По сравнению со значениями группы крыс,

потреблявших ДДТ в меньшей дозе в течение 10 недель, отмечалось снижение доли тимических телец в ранней стадии развития. И в отличие от всех изучаемых групп сравнения, были выявлены тимические тельца с распадом и образованием полости в центральной части телец (рис. 27).

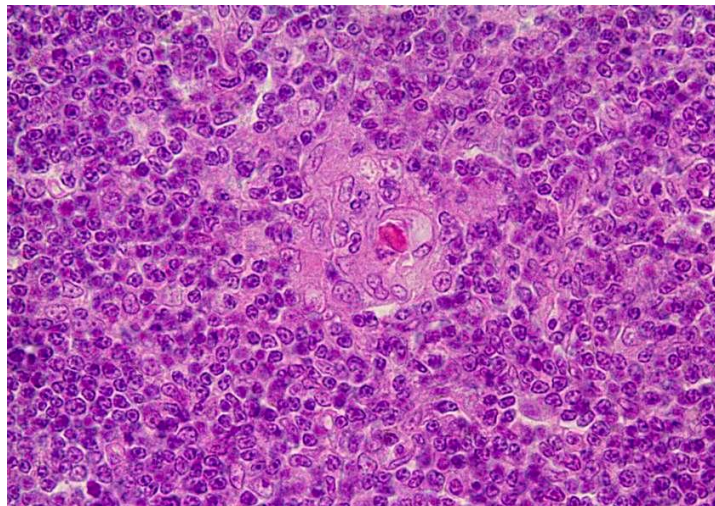


Рис. 27. Строение мозгового слоя тимуса крысы, потреблявшей ДДТ в дозе $7,77 \pm 0,17$ мкг/кг/сут в течение 10 недель.

Встречаются тимические тельца III фазы развития с образованием полости в центральной части телец.

Окраска гематоксилином и эозином. Ув.400.

Они составляли $1,01 \pm 0,68\%$ от общего количества тимических телец. В среднем тимические тельца состояли из статистически значимо большего количества ретикулярных эпителиоцитов (рис. 28).

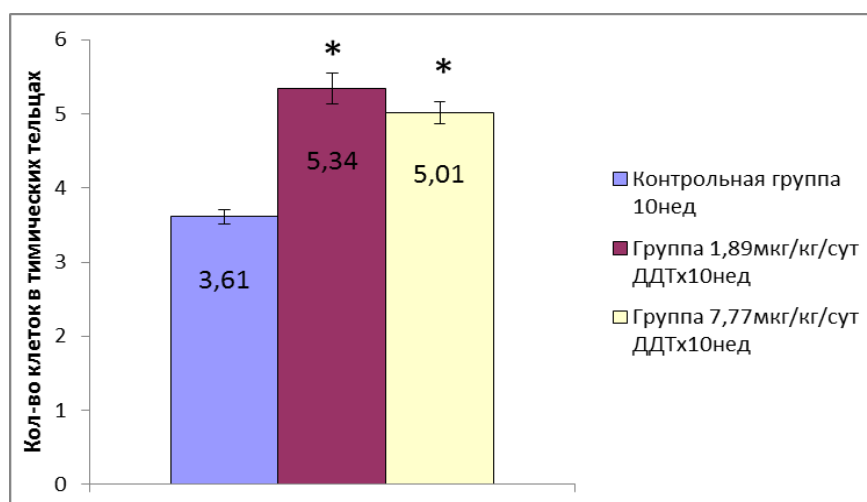


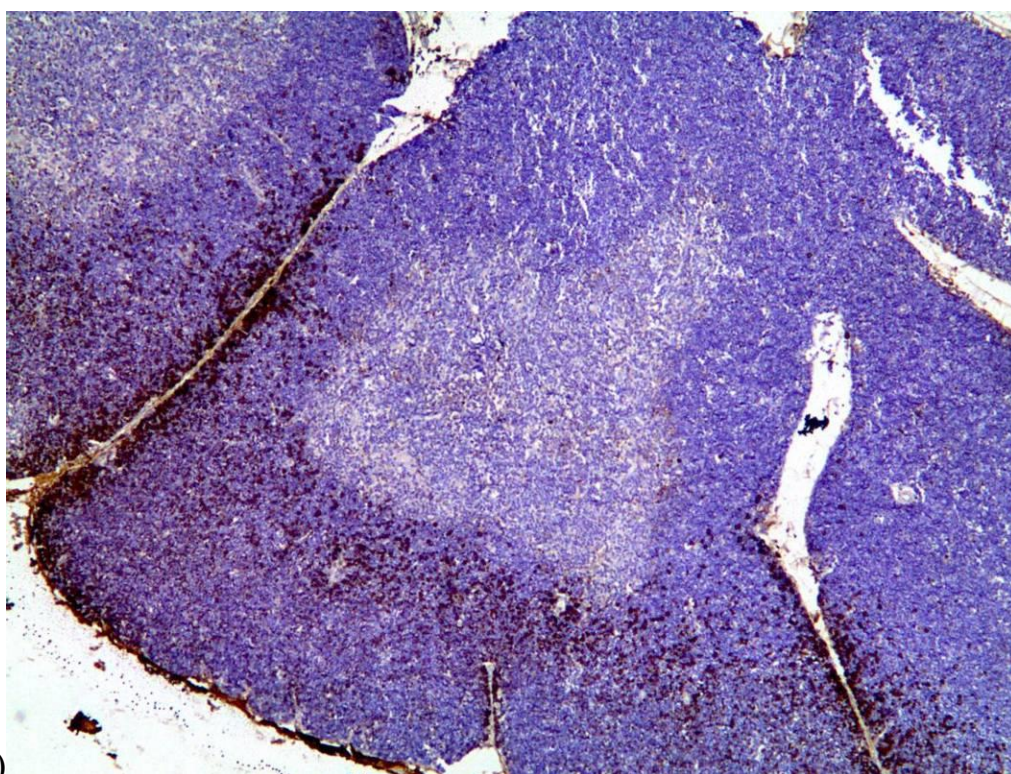
Рис. 28. Количество клеток в тимических тельцах тимуса крыс контрольной группы и крыс, потреблявших ДДТ в дозах $1,89 \pm 0,086$ мкг/кг/сут и $7,77 \pm 0,17$ мкг/кг/сут в течение 10 недель.

* - статистически значимое отличие от контрольной группы.

Заключение: В тимусе крыс, потреблявших ДДТ в течение 10 недель в дозе $7,77 \pm 0,17$ мкг/кг/сут отмечалось изменение соотношения коркового и мозгового веществ в сторону увеличения доли коркового слоя. Имелись признаки гибели лимфоцитов и снижения толщины слоя лимфобластов. Наиболее выраженные изменения отмечались в мозговом веществе. Увеличилось количество гибнущих ретикулярных эпителиоцитов. Клетки в составе тимических телец претерпевали более выраженные по сравнению с предыдущими сроками исследования и меньшими дозами потребления ДДТ дистрофические изменения.

3.1.4. Исследование экспрессии белка p53 клетками тимуса крыс

В тимусе крыс контрольной группы через 6 недель после начала эксперимента экспрессия белка p53 выявлялась приблизительно в $9,20 \pm 0,03\%$ клеток тимуса. p53-позитивные клетки обнаруживались как в субкапсулярном слое, так и на границе коркового и мозгового вещества (рис.29а). Через 10 недель после начала эксперимента этот показатель увеличился более чем в два раза (рис. 31). p53-позитивные клетки располагались в основном субкапсулярно (рис. 30а).



а)

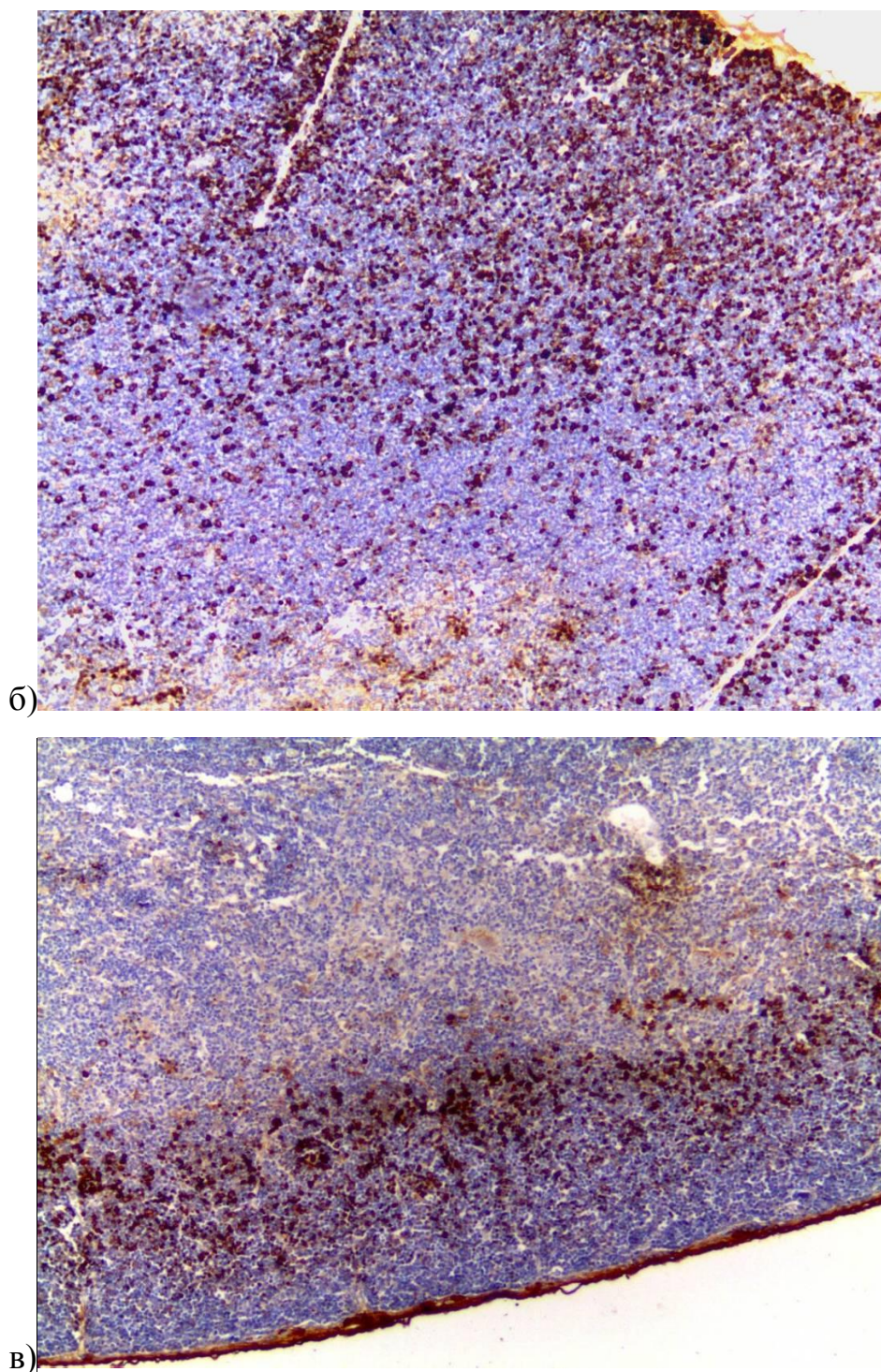
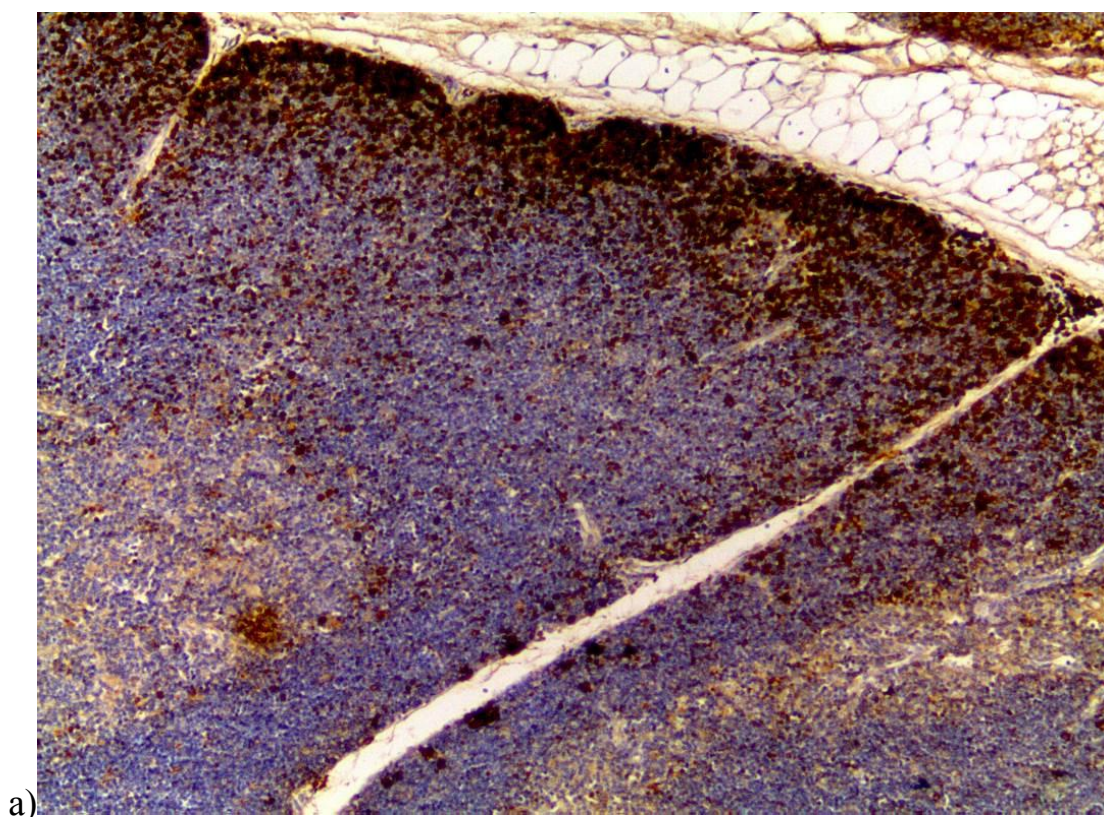


Рис. 29. Экспрессия белка p53 клетками тимуса крыс
 а) контрольной группы через 6 недель после начала эксперимента. p53-
 позитивные клетки обнаруживались как в субкапсулярном слое, так и на гра-
 нице коркового и мозгового вещества;
 б) опытной группы, потреблявших ДДТ в дозе $1,89 \pm 0,086 \text{ мкг/кг/сут}$ в течение
 6 недель. p53- позитивные клетки располагались диффузно в корковом веще-
 стве, а также встречались и в мозговом веществе;
 в) опытной группы, потреблявших ДДТ в дозе $7,77 \pm 0,017 \text{ мкг/кг/сут}$ в течение
 6 недель. p53-позитивные клетки располагались в основном на границе кор-
 кового и мозгового вещества;
 Докраска гематоксилином. Ув.100.

В тимусе крыс, потреблявших ДДТ в дозе $1,89 \pm 0,086$ мг/кг/сут в течение 6 недель, процентное содержание клеток, экспрессирующих белок p53, в два раза превышало соответствующие значения контрольной группы (рис. 31). p53- позитивные клетки располагались диффузно в корковом веществе, а также встречались и в мозговом веществе (рис. 29б).

В тимусе крыс, потреблявших ДДТ в дозе $7,77 \pm 0,17$ мг/кг/сут в течение 6 недель, доля клеток, экспрессирующих белок p53, превышала значения контрольной группы, но была меньше, чем в группе крыс, потреблявших ДДТ в дозе $1,89 \pm 0,086$ мг/кг/сут в течение аналогичного срока (рис. 31). p53- позитивные клетки располагались в основном на границе коркового и мозгового вещества (рис. 29в).

После 10 недель потребления ДДТ в дозе $1,89 \pm 0,086$ мг/кг/сут, процентное содержание клеток, экспрессирующих белок p53, не изменилось по сравнению с контрольной группой. p53-позитивные клетки располагались диффузно в корковом, а также группами в мозговом веществе (рис. 30б).



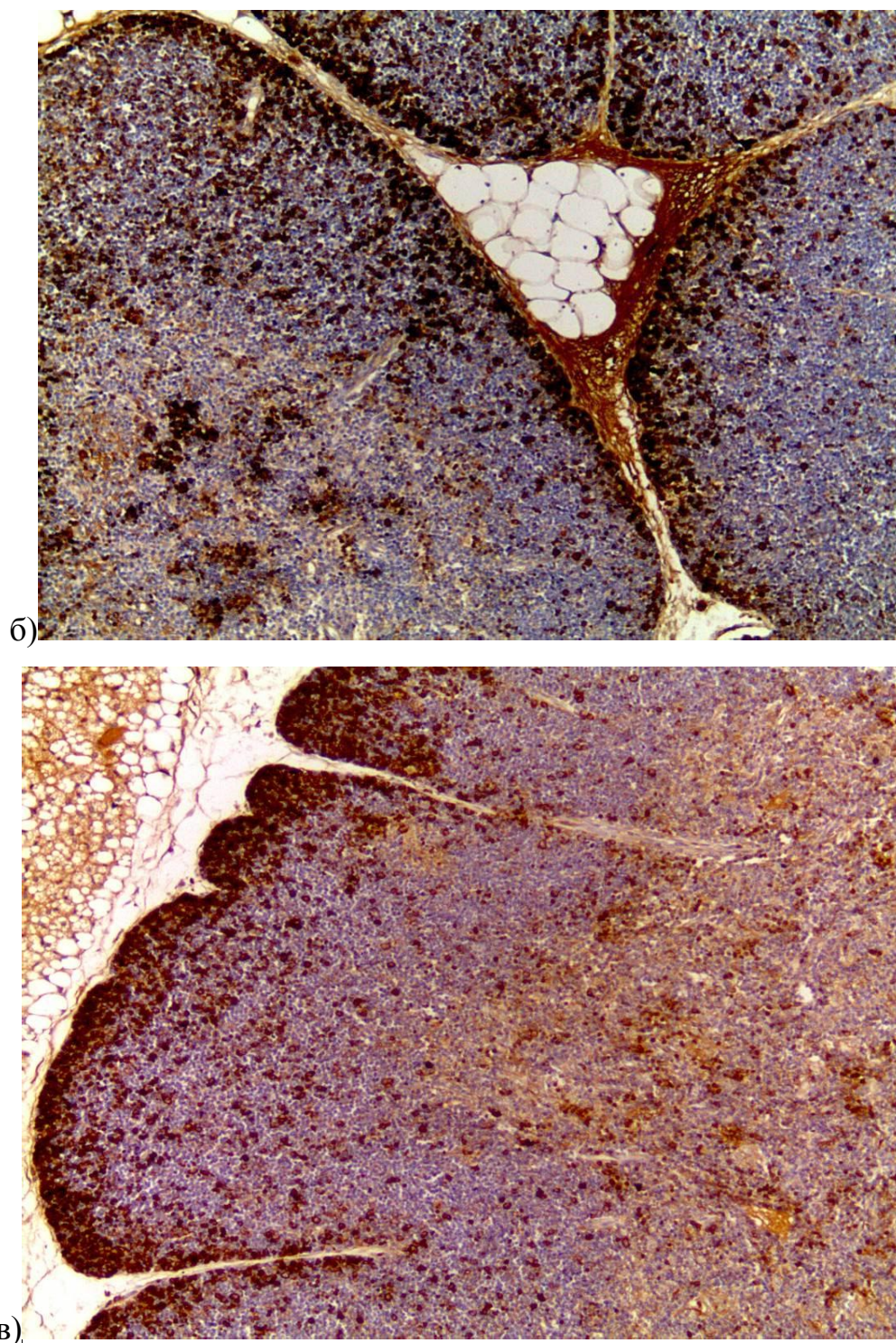


Рис. 30. Экспрессия белка p53 клетками тимуса крысы
 а) контрольной группы через 10 недель после начала эксперимента. p53-позитивные клетки располагались в основном субкапсулярно;
 б) опытной группы, потреблявших ДДТ в дозе $1,89 \pm 0,086$ мкг/кг/сут в течение 10 недель. p53-позитивные клетки располагались диффузно в корковом веществе, а также группами в мозговом веществе;
 в) опытной группы, потреблявших ДДТ в дозе $7,77 \pm 0,017$ мкг/кг/сут в течение 10 недель. p53-позитивные клетки обнаруживались в корковом и мозговом веществе, отмечалось усиление экспрессии белка p53 в субкапсулярном слое. Докраска гематоксилином. Ув.100.

В тимусе крыс, потреблявших ДДТ в течение 10 недель в дозе $7,77 \pm 0,17$ мг/кг/сут, экспрессия белка р53 клетками тимуса возросла по сравнению с контрольной и опытной группой аналогичного срока исследования (рис. 31). Экспрессия р53 тимоцитами обнаруживалась в корковом и мозговом веществе, отмечалось ее усиление в субкапсулярном слое.

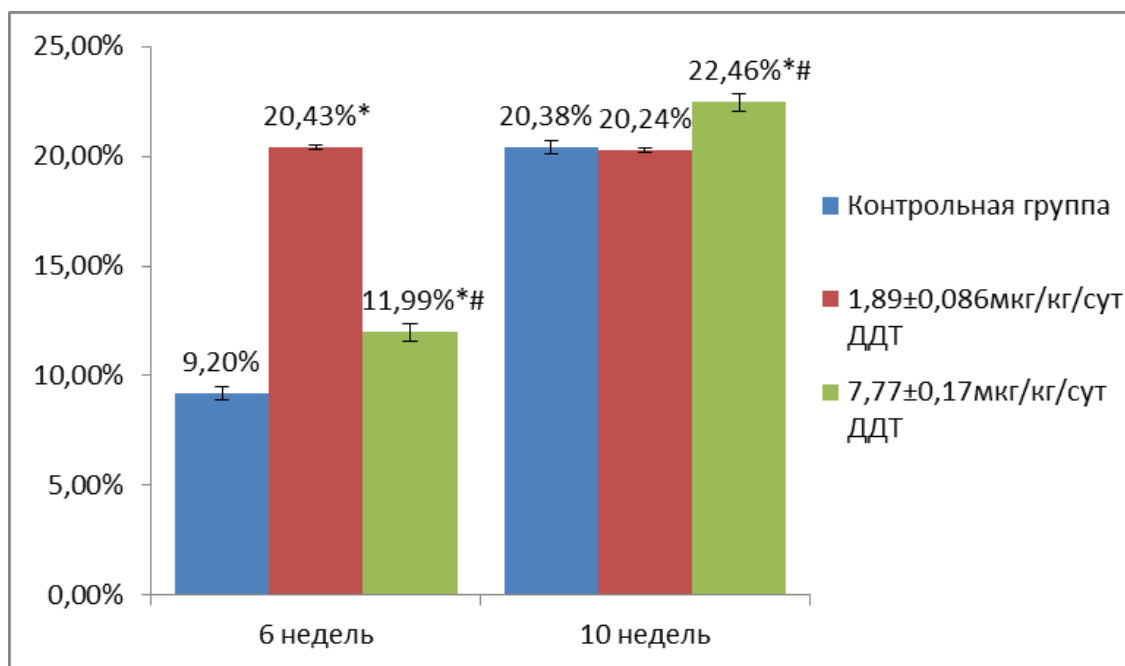


Рис. 31. Процентное содержание клеток тимуса, экспрессирующих белок р53, в контрольных группах через 6 и 10 недель после начала эксперимента, и в опытных группах, потреблявших ДДТ в дозе $1,89 \pm 0,086$ мг/к/сутг и $7,77 \pm 0,17$ мг/кг/сут в течение 6 и 10 недель.

* - статистически значимое отличие от контрольной группы;

- статистически значимое отличие от группы, потреблявшей меньшую дозу ДДТ.

Закключение. Отмечено увеличение числа клеток, экспрессирующих белок р53, в контрольной группе через 10 недель после начала эксперимента, по сравнению со значениями первого срока исследования, что говорит об усилении гибели клеток, связанном с возрастными инволютивными изменениями органа. Увеличение количества клеток, экспрессирующих белок р53, было отмечено в обеих опытных группах через 6 недель после начала эксперимента, а также в группе, получавшей более высокую дозу ДДТ, через 10 недель, по сравнению со значением контрольной группы.

3.1.5. Исследование пролиферативной активности клеток тимуса

Пролиферативная активность *ex tempore* клеток тимуса крыс контрольной группы через 6 недель после начала эксперимента составила $9025,35 \pm 274,00$ имп/мин. Индекс индуцированной пролиферации был равен $2,90 \pm 0,60$.

Значения показателей пролиферации тимоцитов в контрольной группе через 10 недель не отличались от предыдущего срока исследования (рис. 32).

Исследование пролиферативной активности клеток тимуса крыс, потреблявших ДДТ в дозе $1,89 \pm 0,086$ мкг/кг/сут в течение 6 недель, показало статистически значимое усиление пролиферации *ex tempore* тимоцитов по сравнению с контрольной группой, однако пролиферативный ответ на введение митогена не изменялся (рис. 32).

Через 6 недель при потреблении дозы $7,77 \pm 0,17$ мкг/кг/сут отмечалось значительное усиление пролиферации *ex tempore* как по сравнению с контролем, так и по сравнению с предыдущей опытной группой больше, чем в три раза. Значение индекса пролиферации также было значительно выше, чем в контрольной и первой опытной группах (рис. 32).

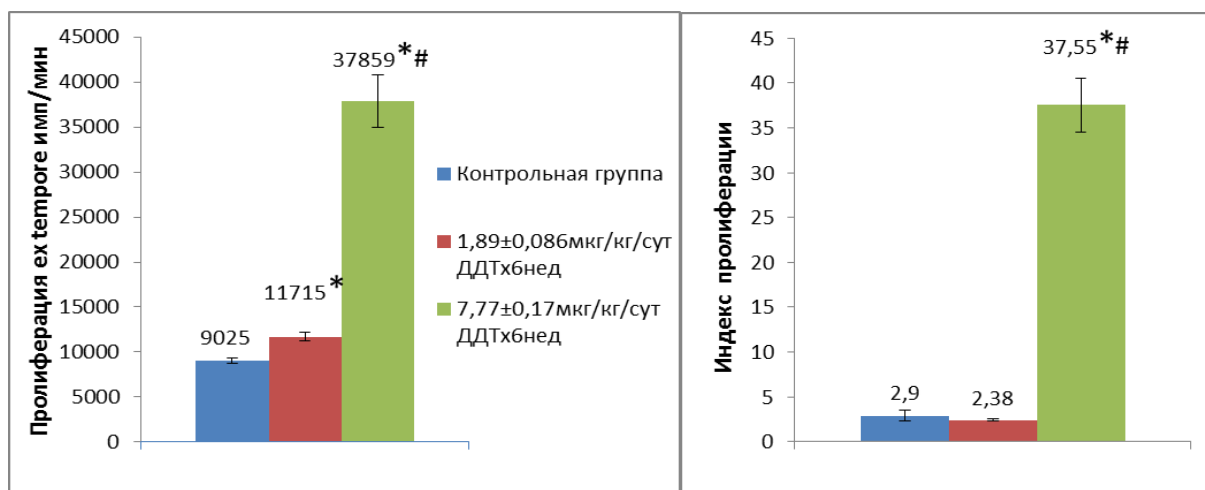


Рис. 32. Пролиферация *ex tempore* и индекс пролиферации клеток тимуса контрольной и опытных групп через 6 недель после начала эксперимента.

* - статистически значимое отличие от контрольной группы;

- статистически значимое отличие от группы, потреблявшей меньшую дозу ДДТ.

Через 10 недель при потреблении ДДТ в дозе $1,89 \pm 0,086$ мкг/кг/сут было отмечено снижение пролиферации *ex tempore* тимоцитов и повышение

пролиферативного ответа на митоген по сравнению с контрольными значениями (рис. 33).

В группе, потреблявшей дозу $7,77 \pm 0,17$ мкг/кг/сут ДДТ в течение 10 недель пролиферация *ex tempore* и индекс пролиферации снизились как в сравнении с контрольной, так и с опытной группой, получавшей меньшую дозу в течение 10 недель (рис. 33).

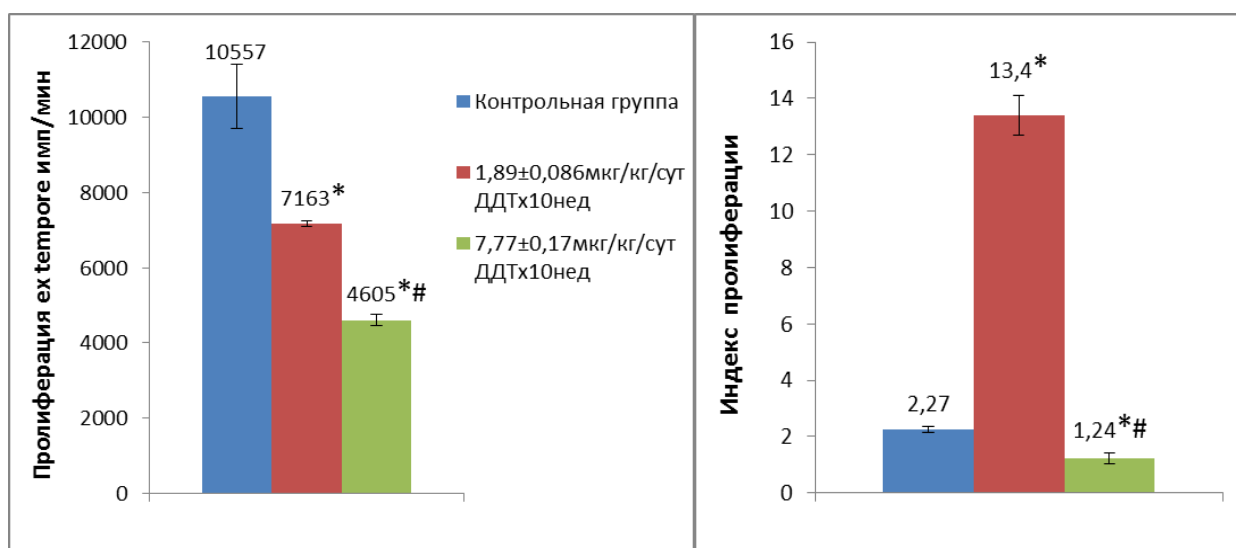


Рис. 33. Пролиферация *ex tempore* и индекс пролиферации клеток тимуса контрольной и опытных групп через 10 недель после начала эксперимента.

* - статистически значимое отличие от контрольной группы;

- статистически значимое отличие от группы, потреблявшей меньшую дозу ДДТ.

Закключение: Было отмечено усиление пролиферации *ex tempore* в обеих опытных группах через 6 недель после начала эксперимента. Затем, в опытных группах через 10 недель после начала эксперимента, наблюдалось усиление гибели и снижение пролиферации тимоцитов. Изменений индекса пролиферации в группе, потреблявшей ДДТ в дозе $1,89 \pm 0,086$ мкг/кг/сут, отмечено не было. При этом тимоциты крыс, получавших дозу ДДТ $7,77 \pm 0,17$ мкг/кг/сут в течение 6 недель и $1,89 \pm 0,086$ мкг/кг/сут в течение 10 недель, реагировали на введение митогена большим усилением пролиферации, чем в контрольной группе. Однако, в группе, потреблявшей ДДТ в дозе $7,77 \pm 0,17$ мкг/кг/сут в течение 10 недель, способность тимоцитов реагировать на введение митогена уменьшалась и была ниже, чем в контрольной группе.

Таблица 4.

Морфометрические показатели и пролиферативная активность клеток тимуса крыс, потреблявших ДДТ в дозе $1,89 \pm 0,086$ мкг/кг/сут и $7,77 \pm 0,17$ мкг/кг/сут в течение 6 и 10 недель и крыс контрольных групп, соответствующих сроков исследования ($M \pm m$).

		6 недель			10 недель		
		Контрольная группа	$1,89 \pm 0,086$ мкг/кг/сут	$7,77 \pm 0,17$ мкг/кг/сут	Контрольная группа	$1,89 \pm 0,086$ мкг/кг/сут	$7,77 \pm 0,17$ мкг/кг/сут
Соотношение слоев, %	Корковый слой	$73,37 \pm 1,40$	$75,49 \pm 0,89$	$74,56 \pm 1,19$	$76,4 \pm 1,00$	$74,98 \pm 1,37$	$79,21 \pm 0,52^{* \# \wedge}$
	Мозговой слой	$26,63 \pm 1,40$	$24,51 \pm 0,89$	$25,44 \pm 1,19$	$23,6 \pm 1,00$	$25,02 \pm 1,37$	$20,79 \pm 0,52^{* \# \wedge}$
Субкапсулярный слой, мкм		$43,56 \pm 1,67$	$45,94 \pm 1,59$	$41,17 \pm 1,31^{\#}$	$44,22 \pm 1,19$	$41,06 \pm 1,79^{\wedge}$	$39,36 \pm 1,44^{* \wedge}$
Количество тимических телец в мозговом слое, телец/мм ²		$0,8 \pm 0,15$	$1,61 \pm 0,30^{*}$	$2,26 \pm 0,46^{*}$	$1,84 \pm 0,29$	$2,42 \pm 0,47^{\wedge}$	$2,42 \pm 0,23^{*}$
Количество клеток в тимических тельцах		$3,07 \pm 0,12$	$4,6 \pm 0,14^{*}$	$4,76 \pm 0,19^{*}$	$3,61 \pm 0,10$	$5,34 \pm 0,21^{* \wedge}$	$5,01 \pm 0,20^{* \wedge}$
Соотношение стадий развития тимических телец, %	1-ая стадия развития	$9,99 \pm 5,09$	$54,14 \pm 4,38^{*}$	$52,38 \pm 2,61^{*}$	$56,48 \pm 4,03$	$74,91 \pm 4,10^{* \wedge}$	$62,72 \pm 0,68^{* \# \wedge}$
	2-ая стадия развития	$90,01 \pm 5,09$	$45,86 \pm 4,38^{*}$	$47,62 \pm 2,61^{*}$	$43,52 \pm 4,03$	$25,09 \pm 4,10^{* \wedge}$	$36,27 \pm 0,68^{* \# \wedge}$
	3-ая стадия развития	0	0	0	0	0	$1,01 \pm 0,68^{* \# \wedge}$
Количество клеток, экспрессирующих белок p53, %		$9,20 \pm 0,03$	$20,43 \pm 0,05^{*}$	$11,99 \pm 0,03^{\#}$	$20,98 \pm 0,03$	$20,24 \pm 0,01$	$22,46 \pm 0,07^{* \# \wedge}$
Пролиферация ex tempore, имп/мин		$9025,35 \pm 274,00$	$11715,90 \pm 513,18^{*}$	$37859,01 \pm 2872,81^{* \#}$	$10557,88 \pm 845,12$	$7163,57 \pm 67,00^{*}$	$4605,05 \pm 154,95^{* \#}$
Индекс пролиферации		$2,90 \pm 0,60$	$2,38 \pm 0,12$	$37,55 \pm 3,00^{* \#}$	$2,27 \pm 0,11$	$13,40 \pm 0,70^{*}$	$1,24 \pm 0,20^{* \#}$

Примечание:

* - статистически значимое отличие от контрольной группы; # - статистически значимое отличие от группы, потреблявшей меньшую дозу ДДТ; ^ - статистически значимое отличие от группы меньшего срока исследования.

3.2. Морфофункциональные изменения селезенки при воздействии низких доз ДДТ

3.2.1. Морфологическая характеристика селезенки крыс контрольной группы – через 6 недель после начала эксперимента

Селезенка крыс контрольной группы через 6 недель после начала эксперимента имела типичное строение. Снаружи она была покрыта капсулой из плотной соединительной ткани. От капсулы внутрь селезенки отходили трабекулы, представленные волокнистой соединительной и гладкой мышечной тканями. Паренхима селезенки была образована лимфоидной тканью в виде лимфатических узелков и периартериальными лимфоидными муфтами (ПАЛМ), составляющими белую пульпу. Между ними находилась красная пульпа. Соотношение белой и красной пульпы было 1:1 (рис. 34).

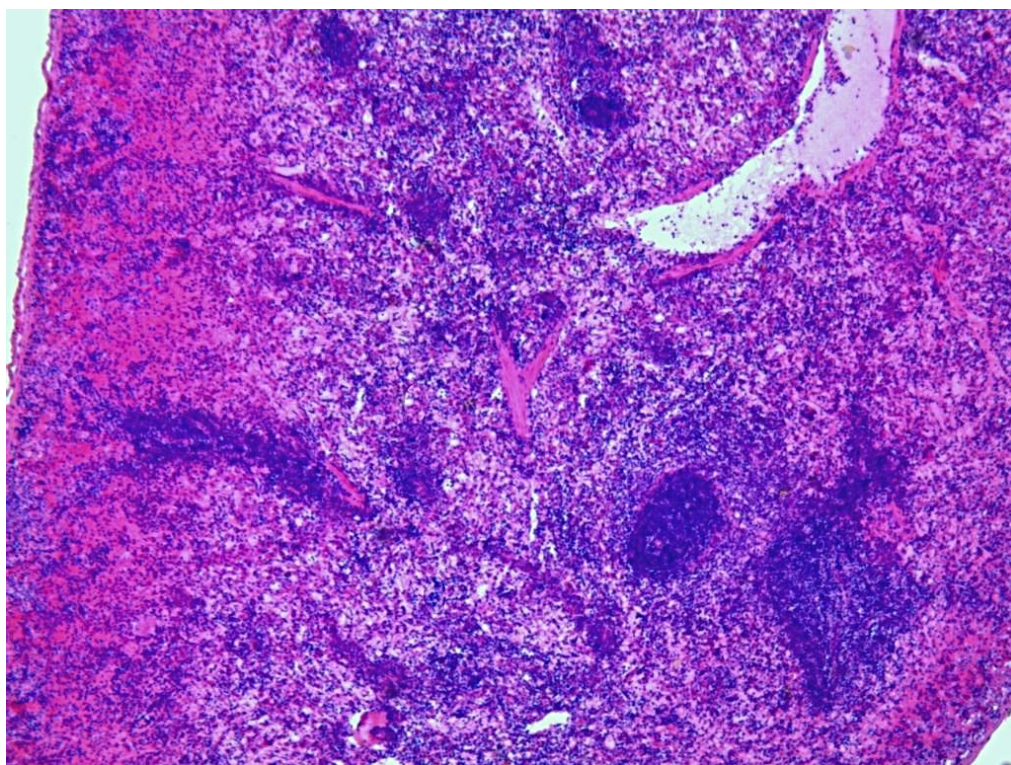


Рис. 34. Селезенка крысы контрольной группы через 6 недель после начала эксперимента.

Соотношение белой и красной пульпы 1:1.

Окраска гематоксилином и эозином. Ув.50.

Первичные лимфатические узелки представляли собой крупные плотные скопления лимфоцитов. Подавляющее большинство узелков являлось

вторичными и имело типичное строение. Центральную часть узелка занимал герминативный центр, представленный плотно лежащими лимфобластами (рис. 35).

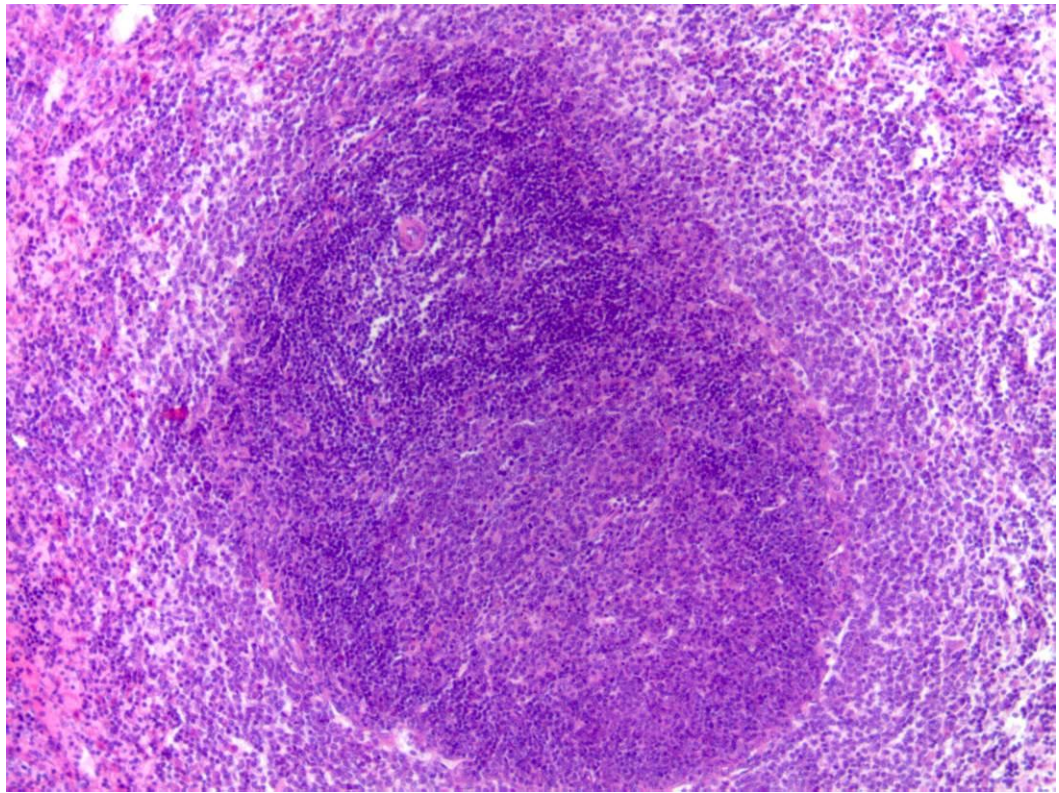


Рис. 35. Структура лимфатического узелка селезенки крысы контрольной группы через 6 недель после начала эксперимента. Хорошо визуализированы все зоны. Герминативный центр представлен плотно лежащими лимфобластами. Окраска гематоксилином и эозином. Ув.400.

В единичных случаях в герминативных центрах лимфатических узлов наблюдались макрофаги и гибнущие клетки с гиперхроматозом ядер, краевой конденсацией хроматина, пикнозом ядер.

Мантийная зона узелков была представлена плотно лежащими малыми лимфоцитами. Маргинальная зона была хорошо выражена, представлена в основном лимфоцитами и небольшим количеством макрофагов.

Красная пульпа была представлена ретикулярной тканью с расположенными в ней форменными элементами крови. В красной пульпе находилось большое количество лимфоцитов и макрофагов. Встречались единичные мегакариоциты.

– через 10 недель после начала эксперимента

Через 10 недель после начала эксперимента в контрольной группе наблюдались возрастные изменения органа. Доля белой пульпы статистически значимо уменьшилась за счет снижения доли ПАЛМ и лимфатических узелков в ее составе (рис. 36).

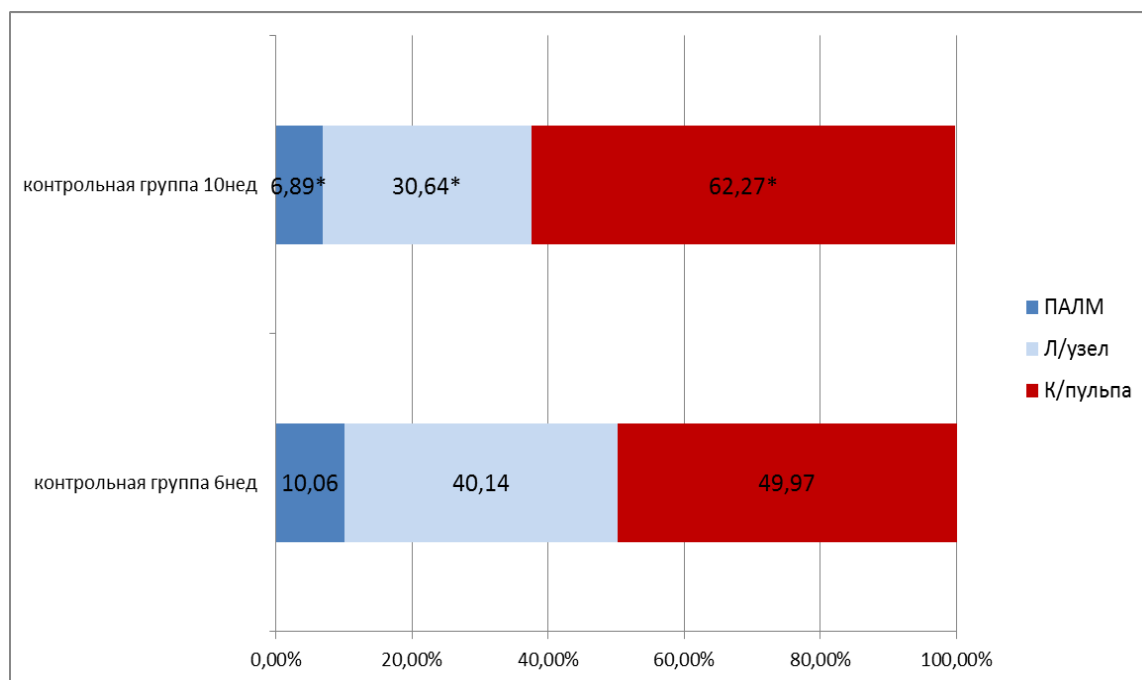


Рис. 36. Соотношение красной и белой пульпы и компонентов белой пульпы селезенки крыс контрольных групп через 6 и 10 недель после начала эксперимента.

*-статистически значимое отличие от значения контрольной группы меньшего срока эксперимента.

Однако количество лимфатических узелков не изменилось, но было отмечено уменьшение их среднего диаметра. Отмечено также увеличение доли первичных узелков (рис. 37). Доля герминативных центров в составе вторичных лимфатических узелков уменьшилась. Доля мантийной зоны статистически значимо увеличилась (рис. 38). Доля маргинальной зоны значимо изменилась только у вторичных узелков, а у первичных осталась без изменений. Было также отмечено увеличение количества лейкоцитов в маргинальной зоне (табл. 5).

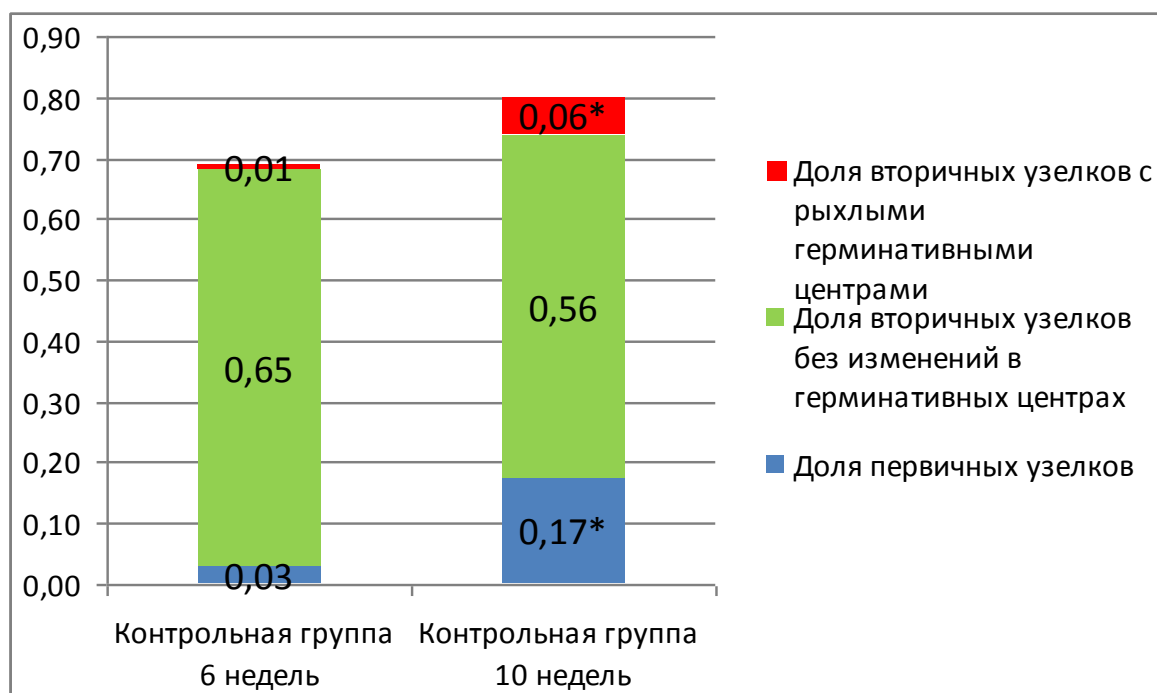


Рис. 37. Соотношение зон вторичных лимфатических узелков селезенки крыс контрольных групп, через 6 и 10 недель после начала эксперимента.

*-статистически значимое отличие от значения контрольной группы меньшего срока эксперимента.

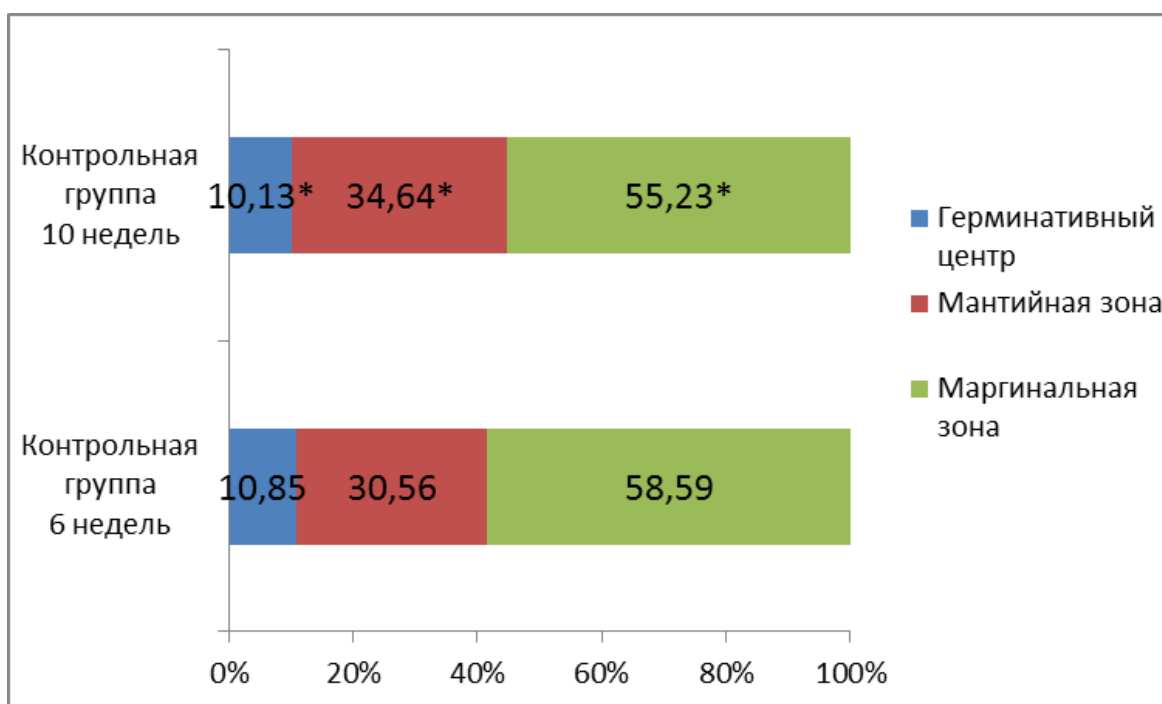


Рис. 38. Соотношение зон вторичных лимфатических узелков селезенки крыс контрольных групп, через 6 и 10 недель после начала эксперимента.

*-статистически значимое отличие от значения контрольной группы меньшего срока эксперимента.

Таблица 5.

Количество лейкоцитов в красной пульпе и маргинальной зоне лимфатических узелков селезенки крыс при воздействии различных малых доз ДДТ в течение 6 и 10 недель ($M \pm m$)

Срок исследования	Группы	Количество лейкоцитов в красной пульпе	Количество лейкоцитов в маргинальной зоне
6 недель	Контрольная группа	12097,14 $\pm$ 464,19	21403,57 $\pm$ 422,56
	1,89мкг/кг/сут ДДТ	15385,71 $\pm$ 498,51*	24625,00 $\pm$ 544,29*
	7,77мкг/кг/сут ДДТ	9591,00 $\pm$ 463,59*#	23125,00 $\pm$ 744,02*#
10 недель	Контрольная группа	10167,00 $\pm$ 554,10^	23050,00 $\pm$ 275,27^
	1,89мкг/кг/сут ДДТ	11006,00 $\pm$ 433,52^	21208,29 $\pm$ 624,94^*
	7,77мкг/кг/сут ДДТ	11583,29 $\pm$ 526,91^	22816,71 $\pm$ 481,46#

Примечание:

* - статистически значимое отличие от контрольной группы; # - статистически значимое отличие от группы, потреблявшей меньшую дозу ДДТ; ^ - статистически значимое отличие от группы меньшего срока исследования.

Доля красной пульпы по сравнению со значениями контрольной группы меньшего срока статистически значимо увеличилась, однако количество клеток в ней значительно снизилось (табл. 5). Количество мегакариоцитов по сравнению с предыдущим сроком исследования не изменилось.

Заключение: Сравнение гистологического строения селезенки крыс контрольных групп через 6 и 10 недель после начала эксперимента выявило ряд возрастных морфофункциональных изменений органа. Через 10 недель после начала эксперимента происходило уменьшение доли белой пульпы, в основном за счет уменьшения лимфатических узелков. Возрастные изменения коснулись также и строения лимфатических узелков, и в частности В-зависимых зон. Было отмечено сужение герминативных центров, а также увеличение в них доли гибнущих клеток.

3.2.2. Морфологическая характеристика селезенки крыс, потреблявших ДДТ
в течение через 6 недель

– в дозе $1,89 \pm 0,086 \text{ мкг/кг/сут}$

Селезенка крыс, потреблявших ДДТ в дозе $1,89 \pm 0,086 \text{ мкг/кг/сут}$ в течение 6 недель имела типичное строение. Доля белой пульпы не изменилась. Однако отмечалось статистически значимое изменение соотношения компонентов белой пульпы. Было отмечено увеличение объемной доли ПАЛМ и снижение доли лимфатических узелков (рис. 39, 40).

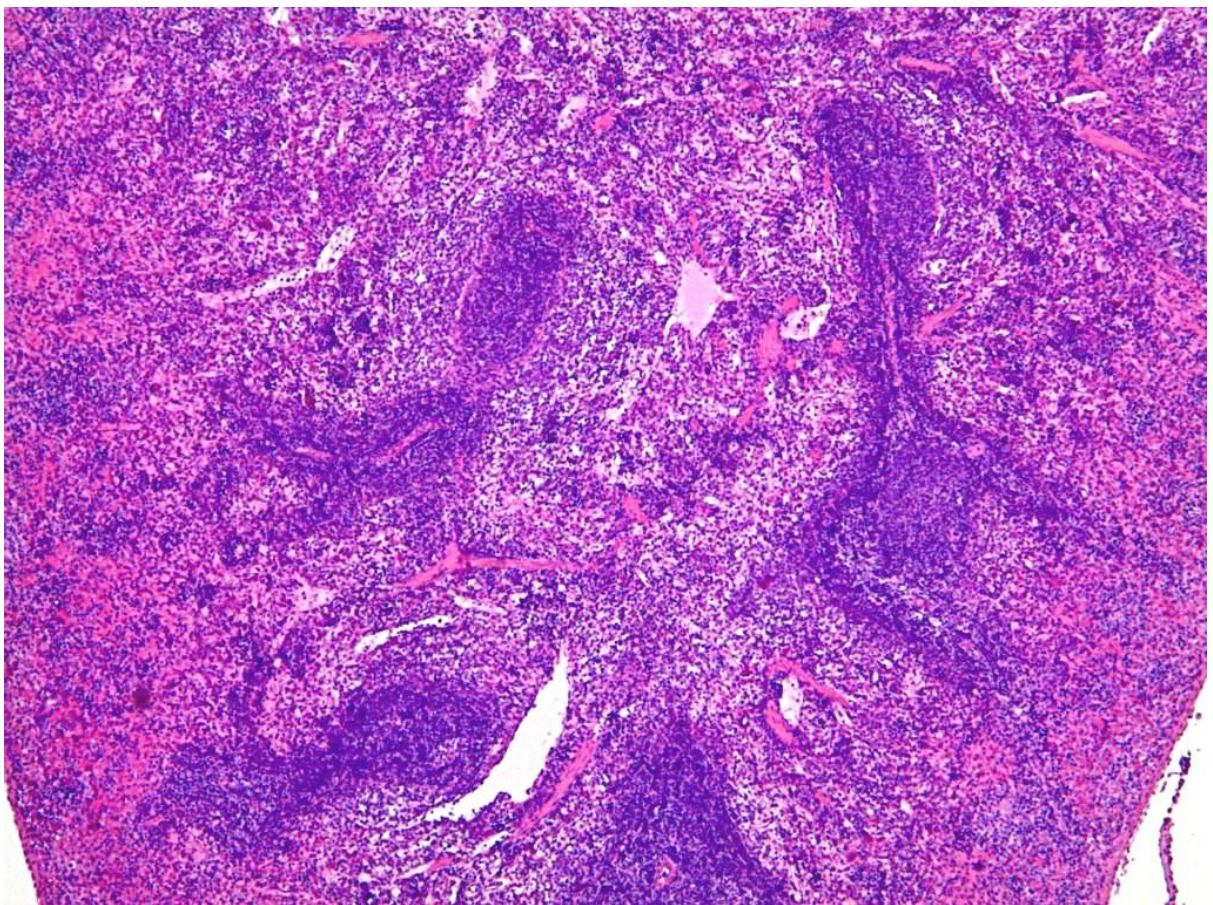


Рис. 39. Структура селезенки крысы, потреблявшей ДДТ в дозе $1,89 \pm 0,086 \text{ мкг/кг/сут}$ в течение 6 недель. Отмечается расширение ПАЛМ-зоны. Окраска гематоксилином и эозином. Ув.50.

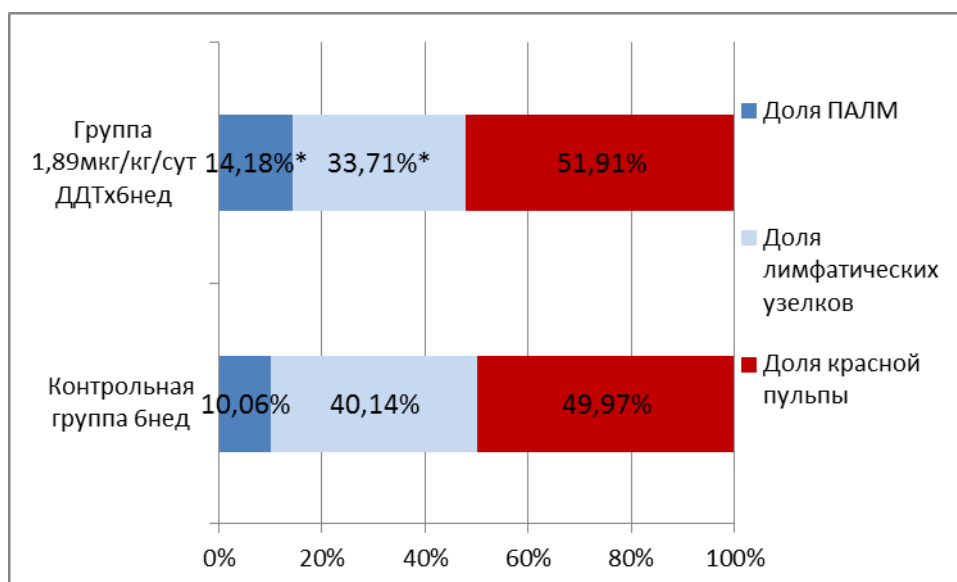


Рис. 40. Соотношение красной и белой пульпы и компонентов белой пульпы селезенки крыс контрольной группы и опытной группы, потреблявшей ДДТ в дозе $1,89 \pm 0,086$ мкг/кг в течение 6 недель.

*-статистически значимое отличие от значения контрольной группы

Количество лимфатических узлов на мм^2 площади среза селезенки и соотношение первичных и вторичных узлов не изменилось (рис. 41). Среди вторичных увеличилось количество лимфатических узлов с гибелью клеток, опустошением герминативных центров и со скоплением эпителиоидноклеточных элементов (рис. 41, 42).

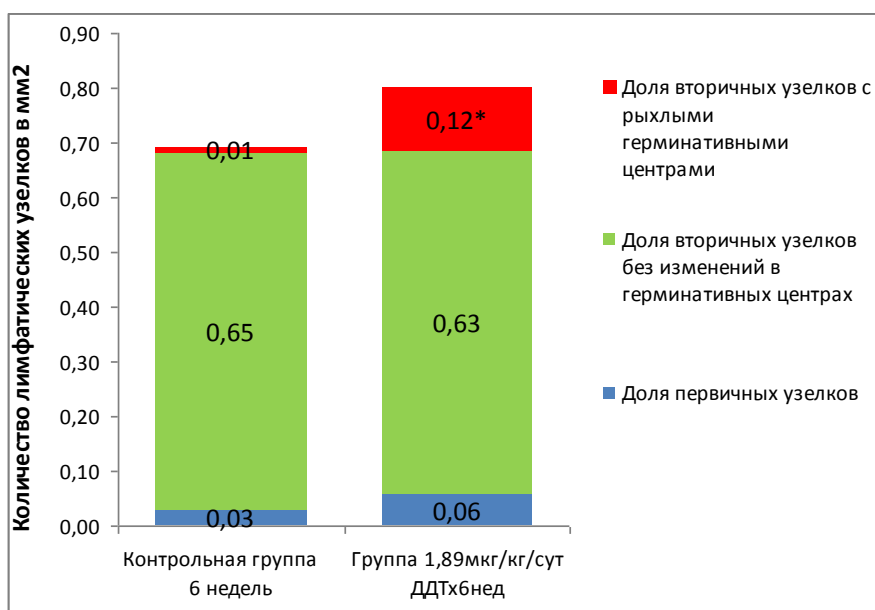


Рис. 41. Соотношение зон вторичных лимфатических узлов селезенки крыс контрольной группы и опытной группы, потреблявшей ДДТ $1,89 \pm 0,086$ мкг/кг/сут в течение 6 недель.

*-статистически значимое отличие от значения контрольной группы.

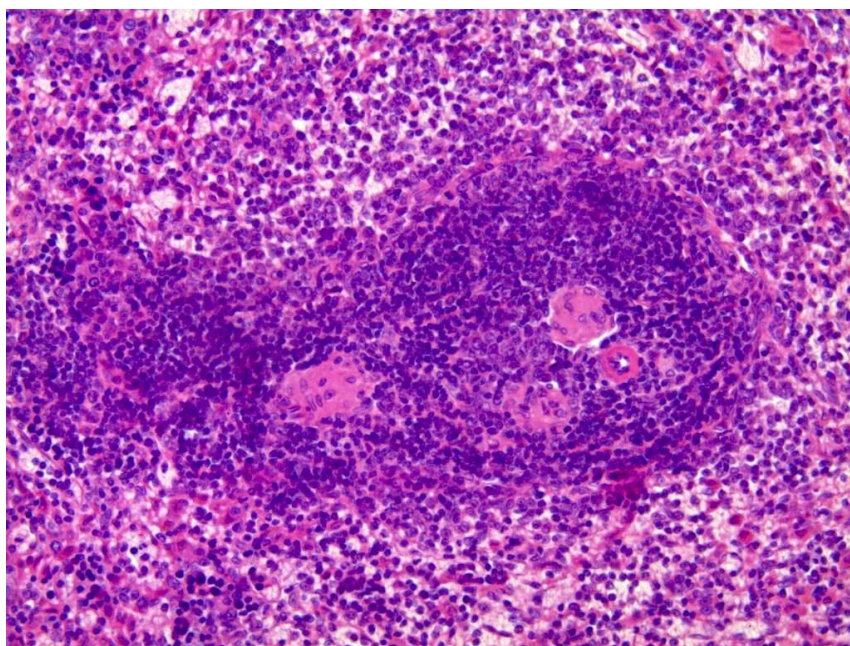


Рис. 42. Структура лимфатического узелка селезенки крысы опытной группы, потреблявшей ДДТ $1,89 \pm 0,086$ мкг/кг/сут в течение 6 недель. В узелке отмечены эпителиоидноклеточные включения. Окраска гематоксилином и эозином. Ув.200.

Диаметр первичных узелков не изменялся. Отмечалось статистически значимое уменьшение диаметра вторичных узелков за счет уменьшения ширины маргинальной зоны (рис. 43). При этом значительно увеличилось количество лейкоцитов в маргинальной зоне в единице площади среза. Однако доля герминативных центров и мантийной зоны в узелках увеличилась (рис. 43). У первичных узелков доля маргинальной зоны не изменилась.

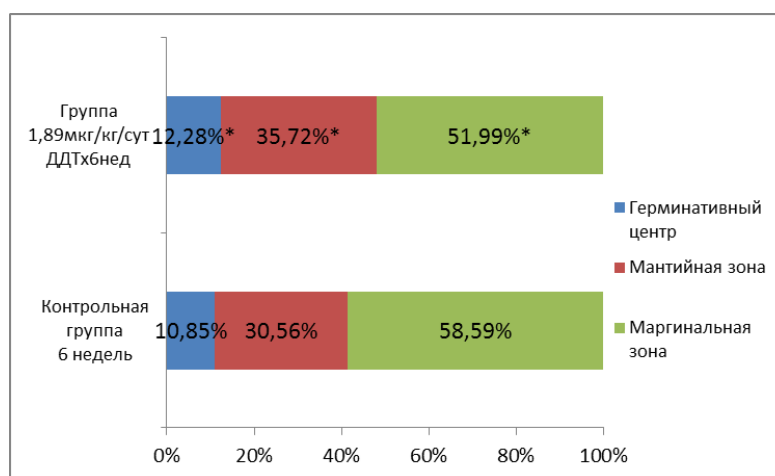


Рис. 43. Соотношение зон вторичных лимфатических узелков селезенки крыс контрольной группы и опытной группы, потреблявшей ДДТ $1,89 \pm 0,086$ мкг/кг/сут в течение 6 недель.

* - статистически значимые отличия от значений контрольной группы.

Доля красной пульпы не изменилась в сравнении со значением контрольной группы. Но в ней значительно возрос показатель численности лейкоцитов на единицу площади среза селезенки (табл. 5). Отмечалось статистически значимое увеличение числа мегакариоцитов (рис. 44).

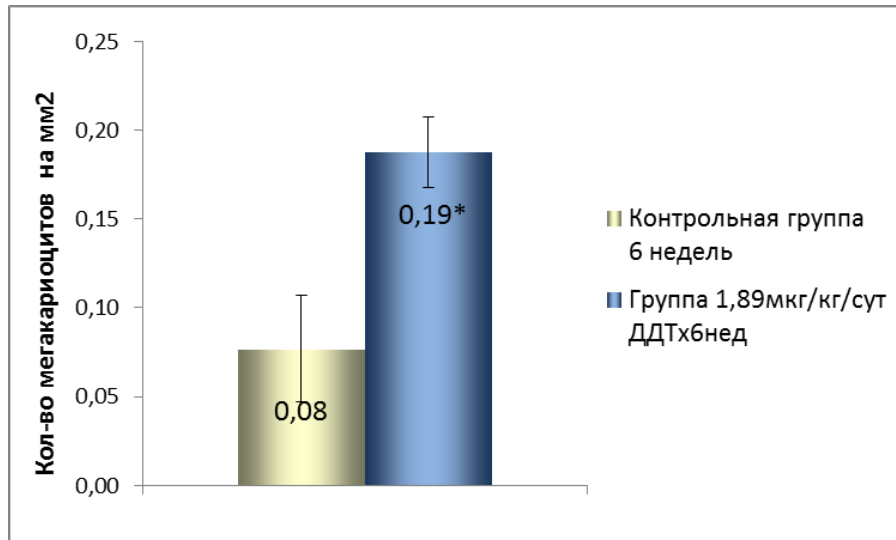


Рис. 44. Количество мегакариоцитов в мм² среза селезенки крыс контрольной группы через 6 недель после начала эксперимента и опытной группы, потреблявшей $1,89 \pm 0,086$ мкг/кг/сут ДДТ в течение 6 недель.

*-статистически значимое отличие от значения контрольной группы.

Закключение: При употреблении ДДТ в течение 6 недель в дозе $1,89 \pm 0,086$ мкг/кг/сут отмечалось увеличение численности лейкоцитов красной пульпы, расширение зоны ПАЛМ и увеличение доли герминативных центров лимфатических узелков. В герминативных центрах отмечено усиление гибели клеток. Возросло количество лейкоцитов в маргинальной зоне.

– в дозе $7,77 \pm 0,17$ мкг/кг/сут

В селезенке крыс, потреблявших ДДТ в дозе $7,77 \pm 0,17$ кг/кг/сут в течение 6 недель отмечалось уменьшение доли белой пульпы за счет суммарного снижения доли лимфатических узелков и ПАЛМ по сравнению со значением контрольной группы (рис. 45). Однако уменьшение доли лимфатических узелков не достигло статистической значимости. Отмечалось уменьшение общего диаметра лимфатических узелков. Статистически значимо снизилась площадь вторичных узелков. Площадь первичных узелков не изменилась по сравнению с контрольной группой и группой потребившей меньшую дозу

ДДТ. Было отмечено увеличение общего количества лимфатических узелков и увеличение среди них доли первичных (рис. 46).

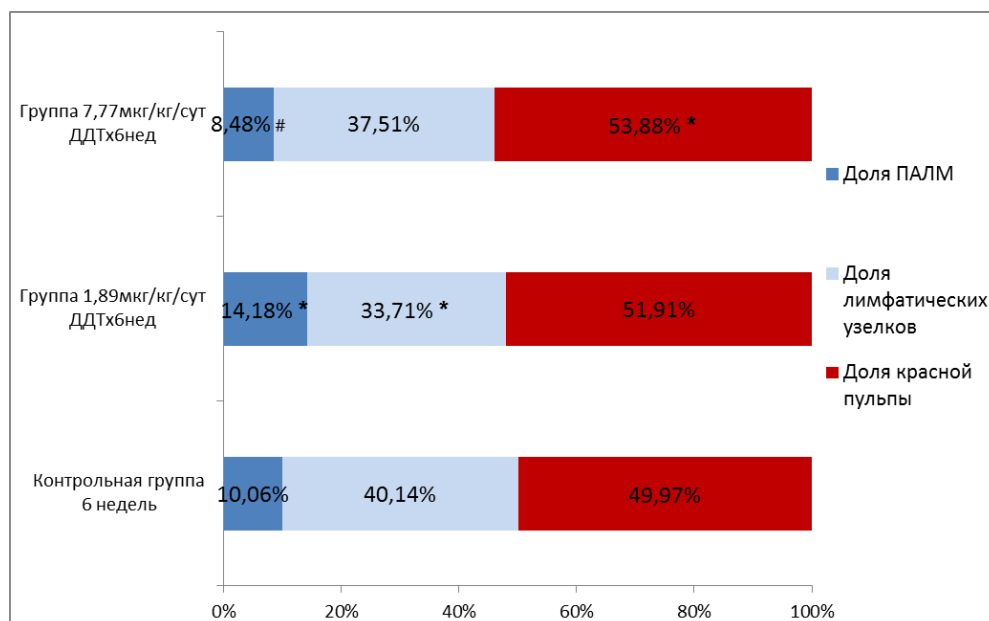


Рис. 45. Соотношение красной и белой пульпы и компонентов белой пульпы селезенки крыс контрольной и опытных групп, потреблявшей ДДТ в дозе $1,89 \pm 0,086$ мкг/кг/сут и $7,77 \pm 0,17$ мкг/кг/сут в течение 6 недель.

*-статистически значимое отличие от значения контрольной группы;

#-статистически значимое отличие от значения опытной группы, потреблявшей меньшую дозу ДДТ.

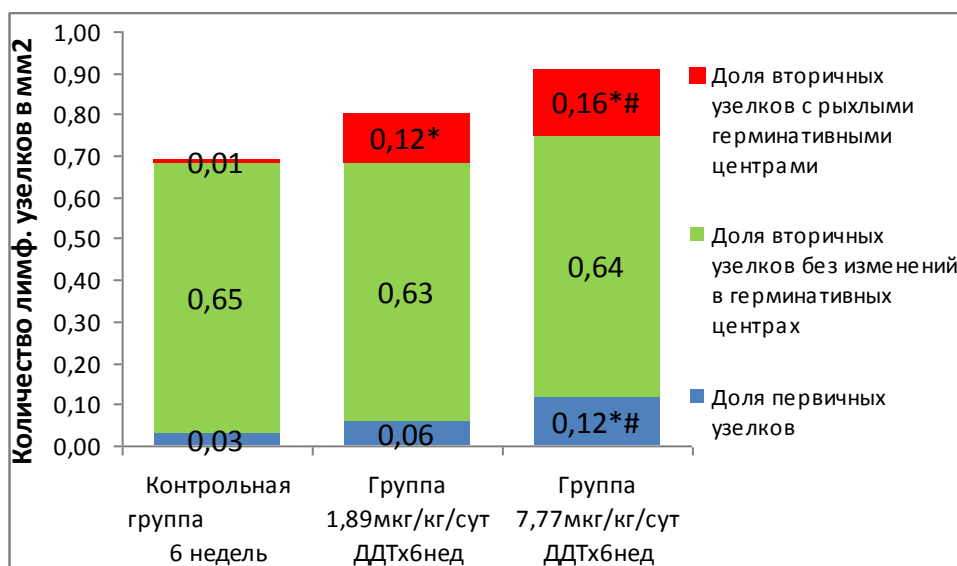


Рис. 46. Количество лимфатических узелков в мм² среза и доля лимфатических узелков с гибнущими клетками в герминативном центре селезенки крыс контрольной и опытных групп, потреблявшей ДДТ в дозе $1,89 \pm 0,086$ мкг/кг/сут и $7,77 \pm 0,17$ мкг/кг/сут в течение 6 недель.

*-статистически значимое отличие от значения контрольной группы;

#-статистически значимое отличие от значения опытной группы, потреблявшей меньшую дозу ДДТ.

Это увеличение отмечено как по сравнению со значением контрольной группы, так и группы, потреблявшей меньшую дозу ДДТ в течение того же срока исследования, что говорит об усилении новообразования узелков в селезенке. Отмечалось увеличение числа лимфатических узелков с опустошением герминативных центров (рис. 47).

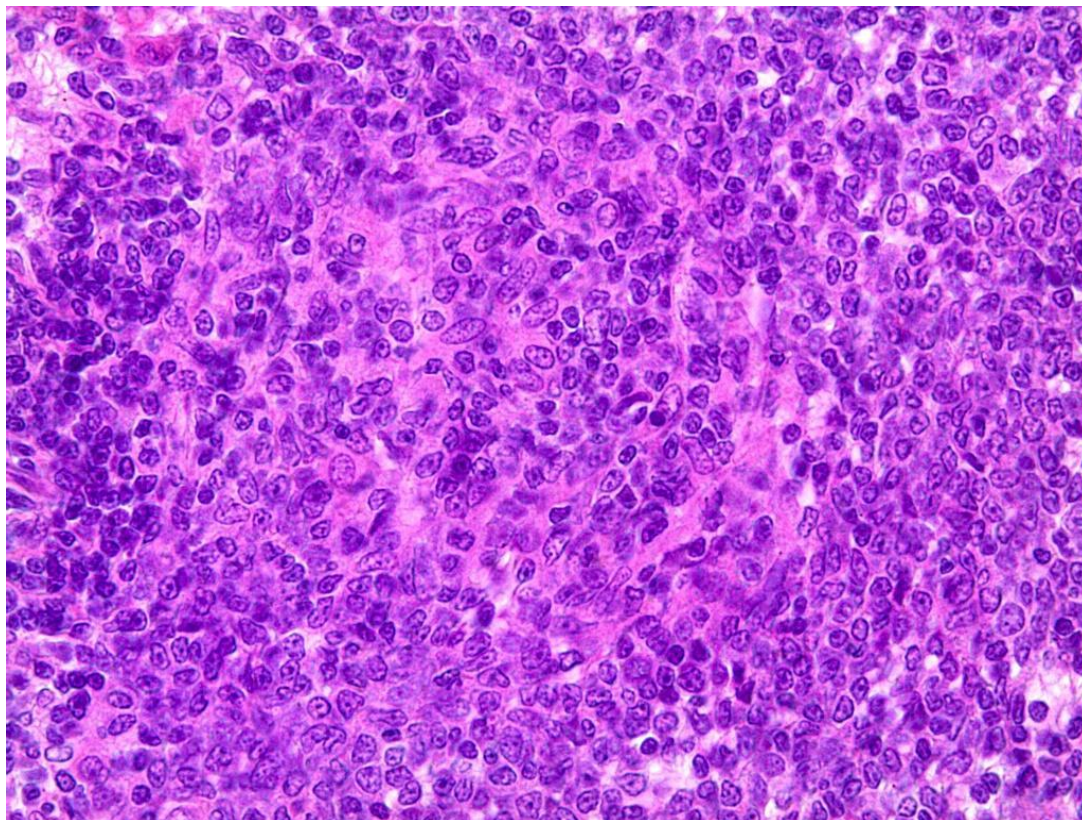


Рис. 47. Лимфатический узелок селезенки крысы, потреблявшей ДДТ в дозе $7,77 \pm 0,17$ кг/кг/сут в течение 6 недель.

В герминативных центрах количество клеток уменьшено. Клетки расположены рыхло, строма обнажена.

Окраска гематоксилином и эозином. Ув.400.

Количество лимфобластов в таких центрах было уменьшено, они располагались рыхло, обнажая строму. Доля герминативных центров в узелках уменьшилась по сравнению со значением группы, получавшей меньшую дозу ДДТ (рис. 48), и вернулась к значениям контрольной группы. Было отмечено также увеличение доли мантийной и снижение доли маргинальной зоны у вторичных узелков по сравнению со значением контрольной группы (рис. 48).

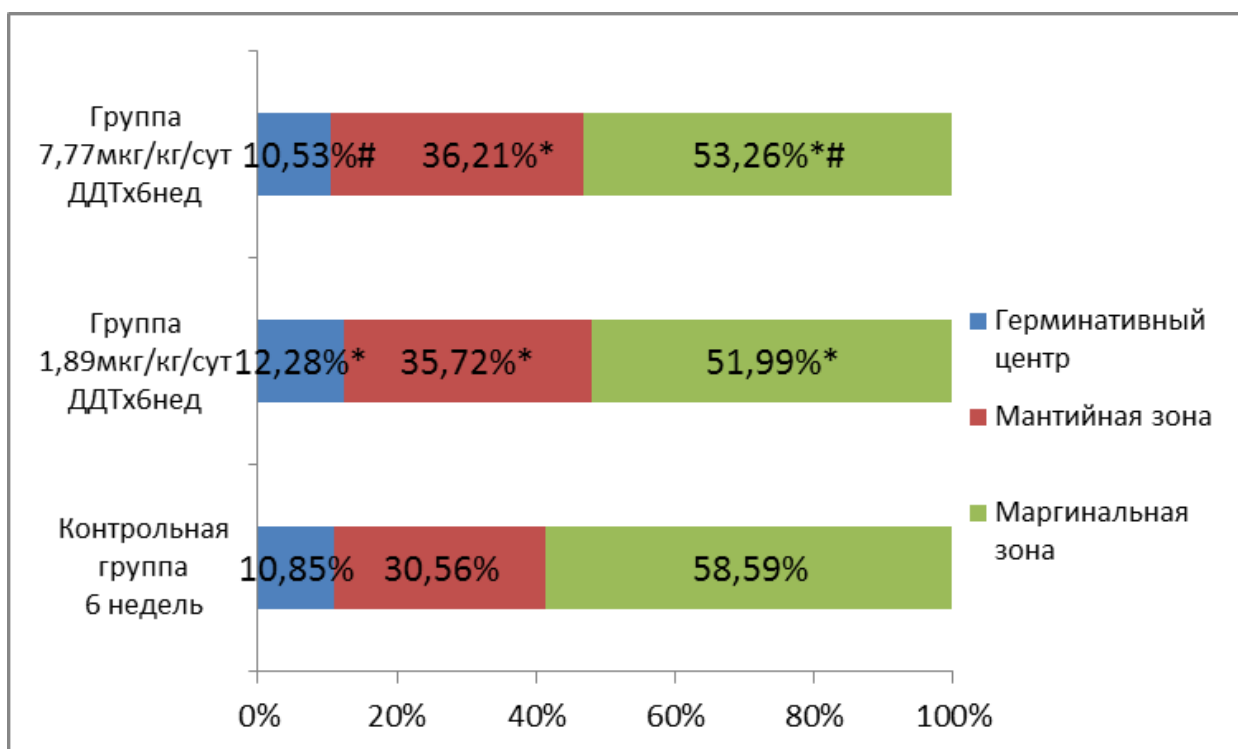


Рис. 48. Соотношение зон вторичных лимфатических узелков селезенки крыс контрольной группы и опытных групп, потреблявшей ДДТ в дозах $1,89 \pm 0,086$ мкг/кг/сут и $7,77 \pm 0,17$ мкг/кг/сут в течение 6 недель.

*-статистически значимое отличие от значения контрольной группы;

#-статистически значимое отличие от значения опытной группы, потреблявшей меньшую дозу ДДТ.

Однако у первичных узелков этот показатель не изменился. Количество клеток в маргинальной зоне увеличилось по сравнению со значением контрольной группы. Отмечено увеличение доли красной пульпы в селезенке. При этом количество лейкоцитов красной пульпы статистически снизилась как в сравнении со значением контрольной группы, так и группы, потреблявшей меньшую дозу ДДТ (табл. 5). Число мегакариоцитов на мм² площади среза селезенки также статистически значимо превышало значения обеих групп сравнения (рис. 49).

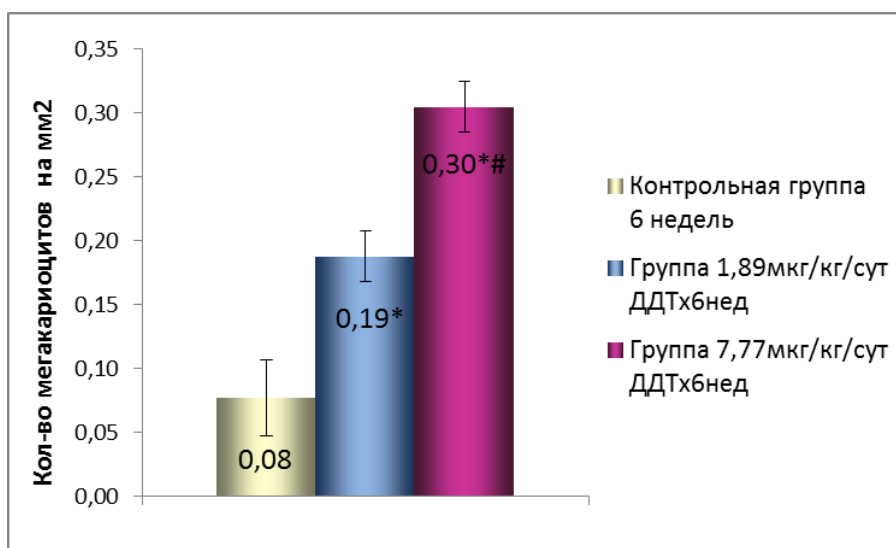


Рис. 49. Количество мегакариоцитов в мм² среза селезенки крыс контрольной группы и опытных групп, потреблявшей ДДТ в дозах $1,89 \pm 0,086$ мкг/кг/сут и $7,77 \pm 0,17$ мкг/кг/сут в течение 6 недель.

*-статистически значимое отличие от значения контрольной группы;

#-статистически значимое отличие от значения опытной группы, потреблявшей меньшую дозу ДДТ.

Заключение: При потреблении ДДТ в дозе $7,77 \pm 0,17$ мкг/кг/сут в течение 6 недель в селезенке крыс отмечено снижение доли ПАЛМ и доли ерминативных центров в лимфатических узелках. Выявлено увеличение доли лимфатических узелков с гибнущими клетками в герминативных центрах и снижение численности лейкоцитов красной пульпы.

3.2.3. Морфологическая характеристика селезенки крыс, потреблявших ДДТ в течение 10 недель

– в дозе $1,89 \pm 0,086$ мкг/кг/сут

По сравнению с контрольной группой, у крыс, потреблявших ДДТ в дозе $1,89 \pm 0,086$ мкг/кг/сут в течение 10 недель, соотношение белой и красной пульпы в селезенке не изменялось. Не изменилось и количество лимфатических узелков на мм² площади среза. Доля первичных и вторичных узелков не изменилась. Диаметр вторичных узелков также остался без изменений. Лимфатические узелки с рыхло лежащими лимфобластами герминативных центров и гибнущими клетками выявлялись в таком же проценте случаев, что и в контрольной группе (рис. 50).

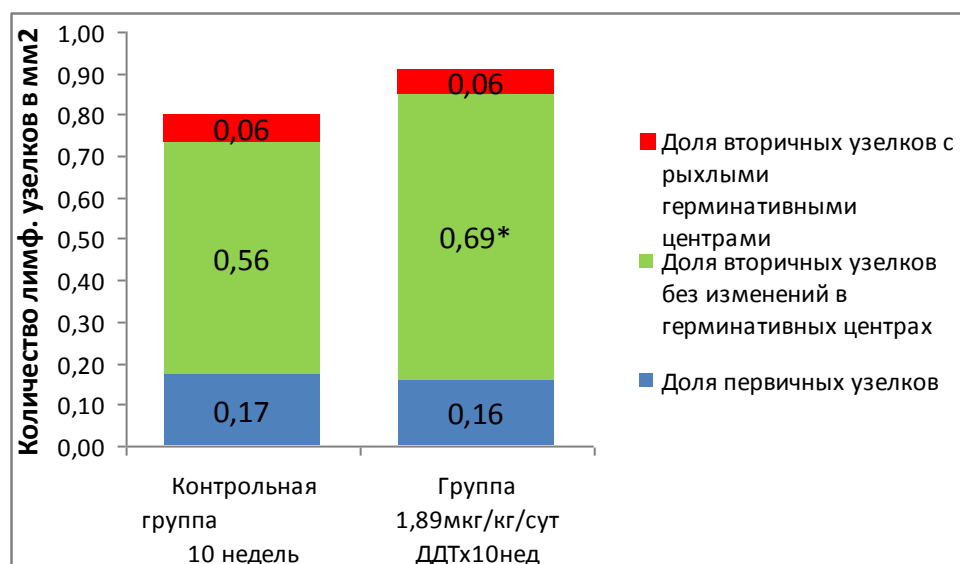


Рис. 50. Количество лимфатических узелков в мм² среза и доля лимфатических узелков с гибнущими клетками в герминативном центре селезенки крыс контрольной группы и опытной группы, потреблявшей ДДТ $1,89 \pm 0,086$ мкг/кг/сут в течение 10 недель.

*-статистически значимое отличие от значения контрольной группы.

Во вторичных лимфатических узелках наблюдались выраженные структурные изменения, заключающиеся в изменении соотношения зон. Заметно расширились по сравнению со значением контрольной группы герминативные центры, а доля маргинальной зоны снизилась (рис. 51, 52).

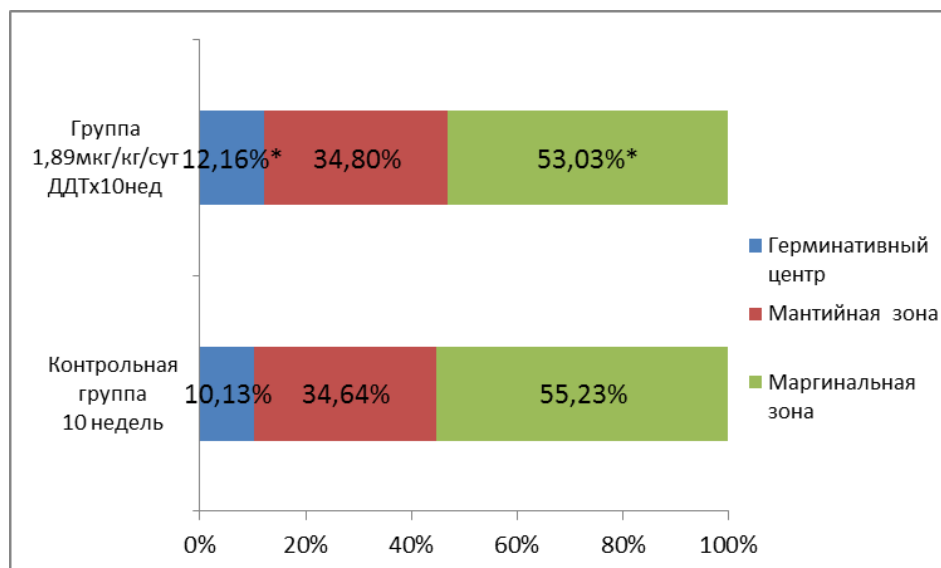


Рис. 51. Соотношение зон вторичных лимфатических узелков селезенки крыс контрольной группы и опытной группы, потреблявшей ДДТ в дозе $1,89 \pm 0,086$ мкг/кг/сут в течение 10 недель.

* - статистически значимые отличия от значений контрольной группы.

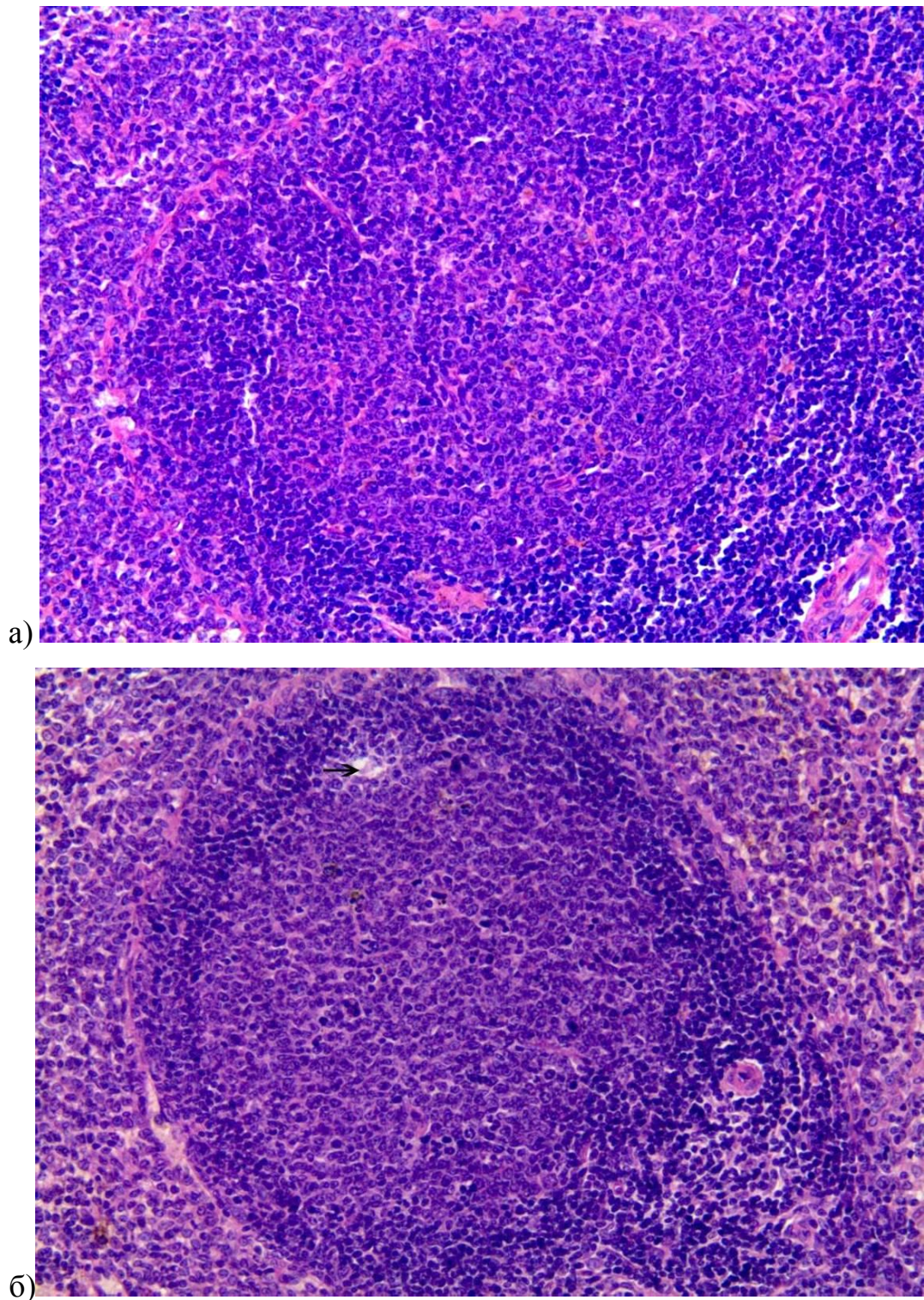


Рис. 52. Структура лимфатического узелка селезенки контрольной крысы (а) и крысы, потреблявшей ДДТ в дозе $1,89 \pm 0,086 \text{ мкг/кг}$ в течение 10 недель (б). Окраска гематоксилином и эозином. Ув.200.

- а) в лимфатическом узелке широкая мантийная зона, герминативный центр умеренно развит, содержит митотически делящиеся лимфобласты;
 б) выраженное расширение герминативного центра и сужение мантийной зоны, на границе мантийной зоны и герминативного центра участок гибели лимфоцитов.

При этом в первичных узелках маргинальная зона значительно увеличилась. Количество лейкоцитов в маргинальной зоне в обоих типах узелков снизилась (табл. 5). Количество лейкоцитов красной пульпы не изменилось по сравнению с контрольными значениями. Было отмечено статистически значимое увеличение числа мегакариоцитов в сравнении со значением контрольной группы (рис. 53).

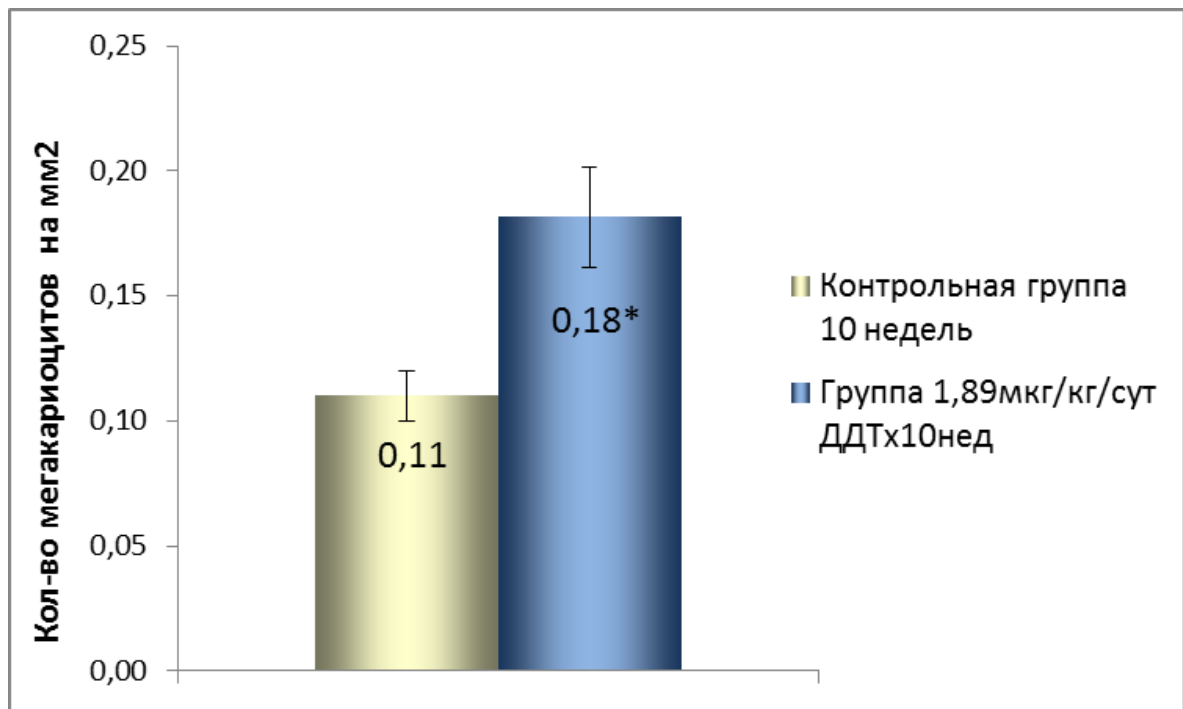


Рис. 52. Количество мегакариоцитов в мм² площади среза селезенки крыс контрольной группы и опытной группы, потреблявшей дозу $1,89 \pm 0,086$ мкг/кг/сут ДДТ в течение 10 недель.

*-статистически значимое отличие от значения контрольной группы.

Заключение: Выявленные изменения морфофункциональных показателей селезенки в группе, потреблявшей дозу $1,89 \pm 0,086$ мкг/кг/сут ДДТ в течение 10 недель, свидетельствуют о том, что длительное воздействие низких доз ДДТ приводит к изменениям в основном в лимфатических узелках селезенки. Наблюдавшееся расширение герминативных центров в группе указывают на снижение количества более зрелых клеток и увеличение количества менее дифференцированных клеток.

– в дозе $7,77 \pm 0,17 \text{ мкг/кг/сут}$

Исследование селезенки крыс, потреблявших ДДТ в дозе $7,77 \pm 0,17 \text{ мкг/кг/сут}$ в течение 10 недель выявило ряд морфологических изменений органа. Соотношение белой и красной пульпы в этой группе значительно изменилось. Отмечено резкое уменьшение доли белой пульпы как по сравнению с контрольной, так и с опытной группой, получившей меньшую дозу ДДТ в течение того же срока эксперимента (рис. 54, 55).

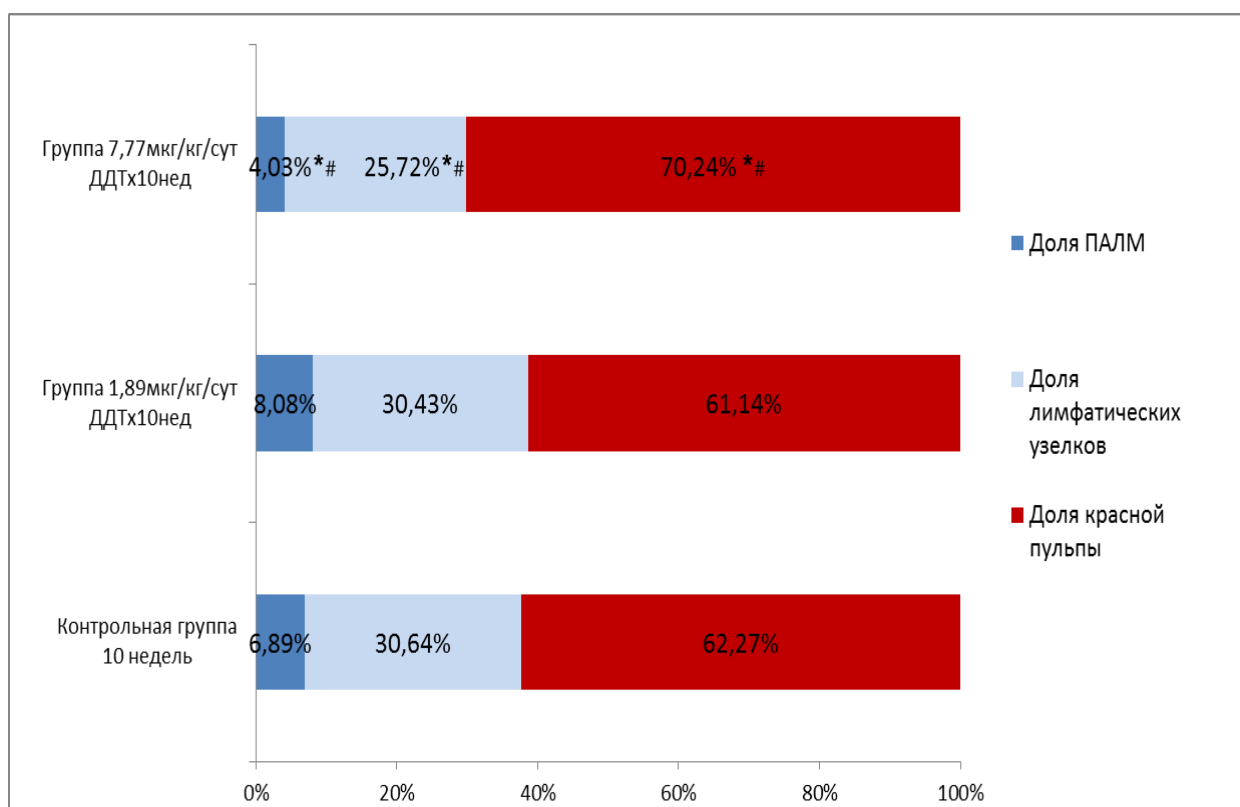


Рис. 54. Соотношение красной и белой пульпы и компонентов белой пульпы селезенки крыс контрольной и опытных групп, потреблявшей ДДТ в дозе $1,89 \pm 0,086 \text{ мкг/кг/сут}$ и $7,77 \pm 0,17 \text{ мкг/кг/сут}$ в течение 10 недель.

*-статистически значимое отличие от значения контрольной группы;

#-статистически значимое отличие от значения опытной группы, потреблявшей меньшую дозу ДДТ.

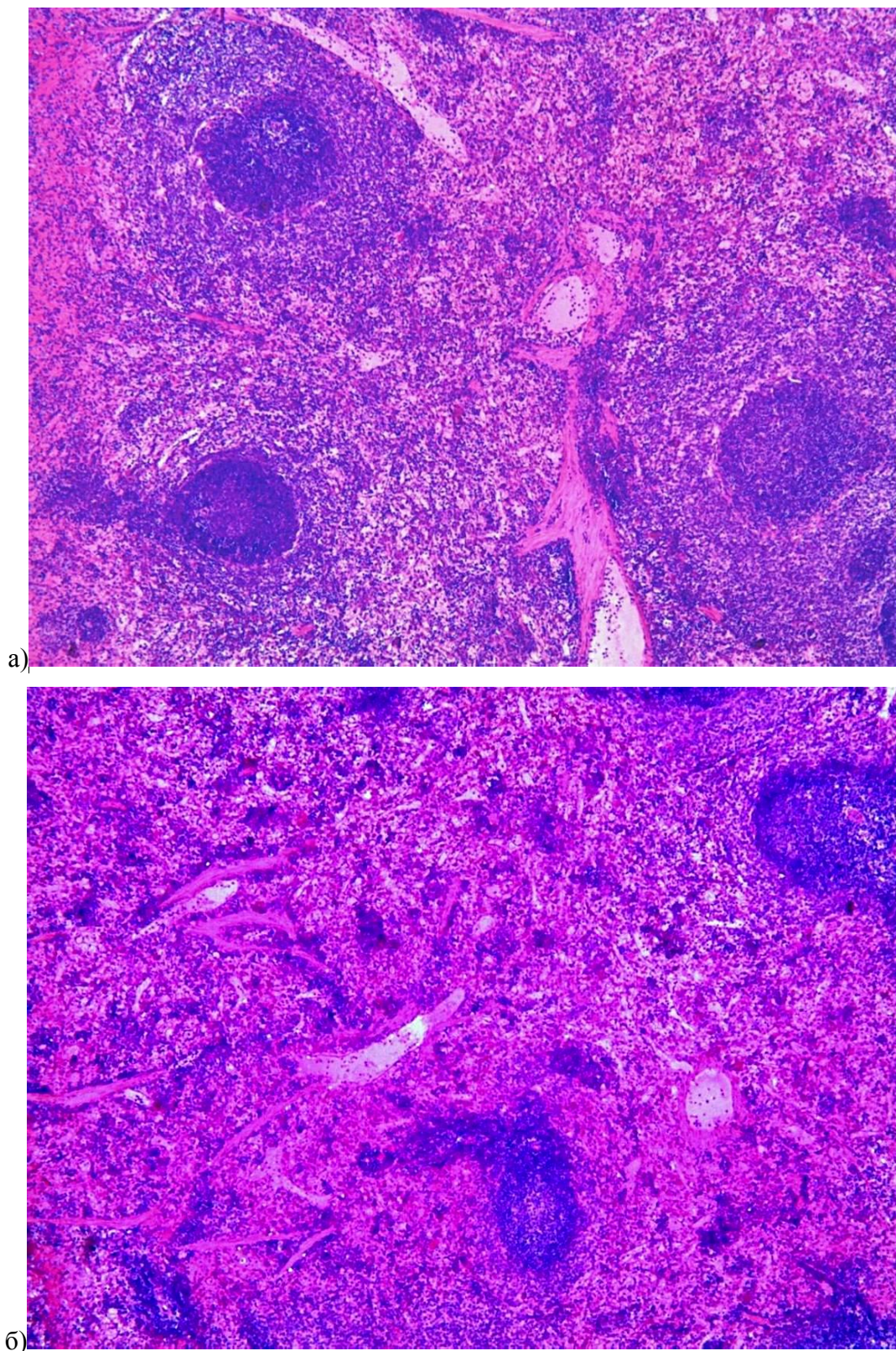


Рис. 55. Соотношение белой и красной пульпы селезенки крысы контрольной группы (а) и крысы, потреблявшей ДДТ в дозе $7,77 \pm 0,17$ мкг/кг/сут в течение 10 недель (б). Окраска гематоксилином и эозином. Ув.50.

а) соотношение белой и красной пульпы 1:1

б) значительное уменьшение доли белой пульпы.

Количество лимфатических узелков при этом не изменилось. Доля первичных узелков статистически значимо снизилась (рис. 56).

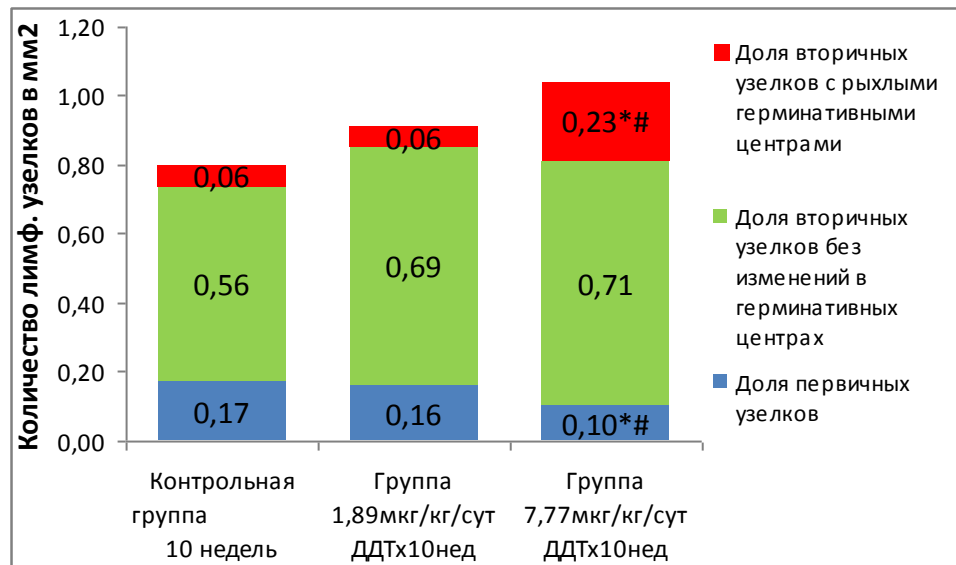


Рис. 56. Количество лимфатических узелков в мм² среза и доля лимфатических узелков с гибнущими клетками в герминативном центре селезенки крыс контрольной группы и опытных групп, потреблявшей ДДТ в дозе $1,89 \pm 0,086$ мкг/кг/сут и $7,77 \pm 0,17$ мкг/кг/сут в течение 10 недель.

*-статистически значимое отличие от значения контрольной группы;

#-статистически значимое отличие от значения опытной группы, потреблявшей меньшую дозу ДДТ.

Выявлено уменьшение среднего диаметра лимфатических узелков за счет снижения диаметра первичных узелков, к которому привело сужение их маргинальной зоны (рис. 57). Диаметр вторичных узелков не изменился. Доля герминативных центров, маргинальная и мантийная зоны вторичных узелков не изменились по сравнению с опытной группой, потреблявшей меньшую дозу ДДТ. Однако значительно усилилась гибель клеток в герминативных центрах (рис. 57).

Доля красной пульпы значительно увеличилась. При этом количество лейкоцитов на единицу среза в ней не изменилось по сравнению со значением контрольной группы и опытной группы, получившей меньшую дозу инсектицида в течение того же срока (табл. 5). Как и в остальных опытных группах, было отмечено статистически значимое увеличение числа мегака-

риоцитов в сравнении со значениями как контрольной, так и опытной групп (рис. 58).

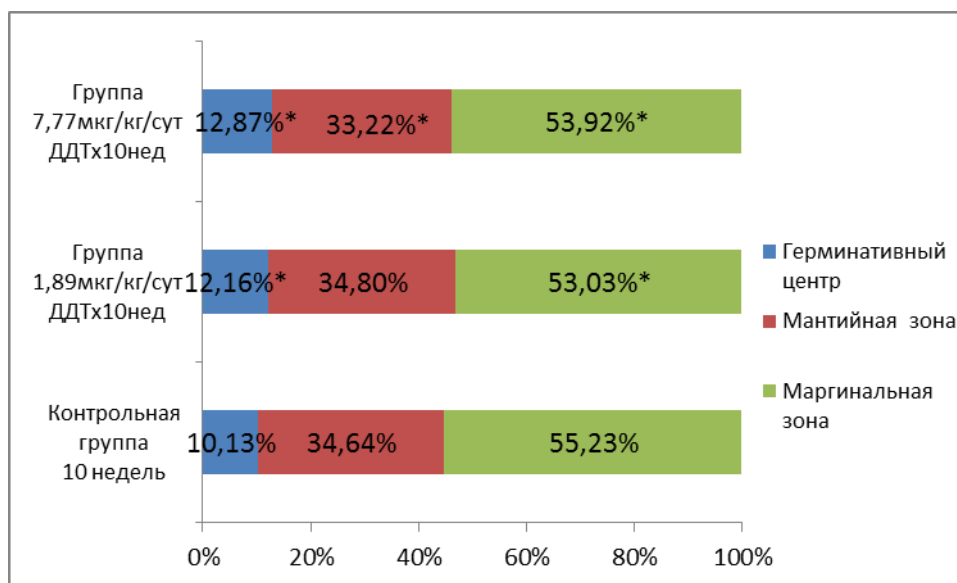


Рис. 57. Соотношение зон вторичных лимфатических узлов селезенки крыс контрольной группы и опытных групп, потреблявшей ДДТ в дозе $1,89 \pm 0,086$ мкг/кг/сут и $7,77 \pm 0,17$ мкг/кг/сут в течение 10 недель.

*-статистически значимое отличие от значения контрольной группы;

#-статистически значимое отличие от значения опытной группы, потреблявшей меньшую дозу ДДТ.

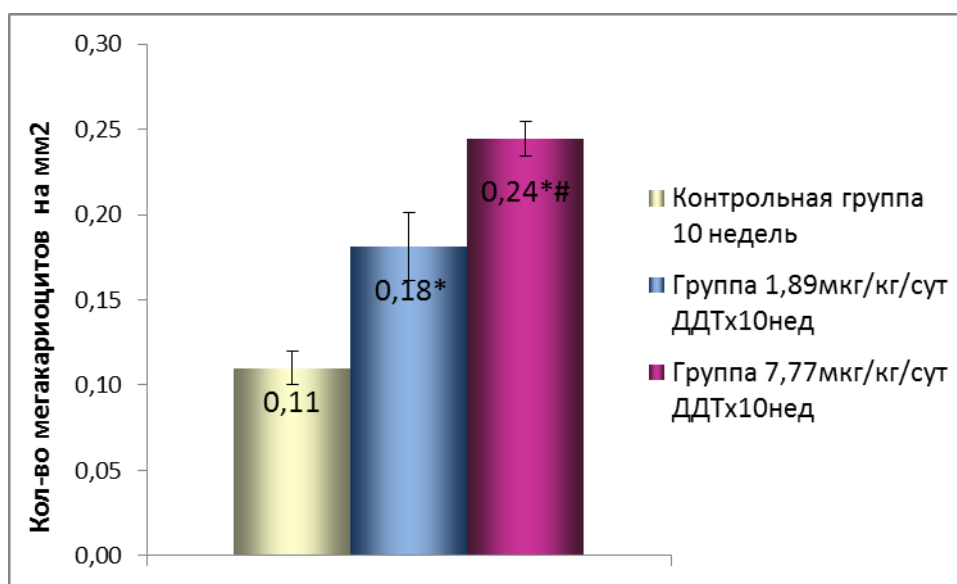


Рис. 58. Количество мегакариоцитов в мм² среза селезенки крыс контрольной группы и опытных групп, потреблявшей ДДТ в дозе $1,89 \pm 0,086$ мкг/кг/сут и $7,77 \pm 0,17$ мкг/кг/сут в течение 10 недель.

*-статистически значимое отличие от значения контрольной группы;

#-статистически значимое отличие от значения опытной группы, потреблявшей меньшую дозу ДДТ.

Закключение: В группе, потреблявшей ДДТ в дозе $7,77 \pm 0,17$ мкг/кг/сут в течение 10 недель, отмечалось значительное уменьшение доли белой пульпы в селезенке. Этот факт говорит о негативном влиянии данной дозы ДДТ в течение 10 недель в первую очередь на клетки белой пульпы. Было отмечено снижение доли первичных лимфатических узелков в составе белой пульпы, что говорит об угнетении процесса новообразования узелков под действием данной дозы. Митозы в герминативных центрах встречались чаще. Этот показатель вместе с расширением герминативных центров говорит о компенсаторном усилении размножения клеток в В-зависимых зонах лимфатических узелков, при увеличении темпов их гибели под действием ДДТ, что подтверждается увеличением доли гибнущих клеток в этих зонах по сравнению со всеми исследованными группами. Показатель клеточной плотности красной пульпы не изменился, что может говорить о меньшей чувствительности клеток красной пульпы к дозе $7,77 \pm 0,17$ мкг/кг/сут ДДТ, потребляемую в течение 10 недель.

3.2.4. Исследование пролиферативной активности клеток селезенки крыс

Пролиферативная активность *ex tempore* клеток селезенки контрольной группы через 6 недель после начала эксперимента составила $1239,18 \pm 118,88$ имп/мин. Индекс индуцированной пролиферации был равен $7,89 \pm 0,39$.

Изучение пролиферативной активности клеток селезенки в контрольной группе через 10 недель после начала эксперимента показало, что пролиферативная активность лимфоцитов не изменилась с возрастом (рис. 59). Исследование пролиферативной активности клеток селезенки крыс опытной группы, потреблявшей ДДТ в дозе $1,89 \pm 0,086$ мкг/кг/сут в течение 6 недель, показало значительное снижение индекса индуцированной пролиферации и увеличение пролиферации *ex tempore* (рис. 59).

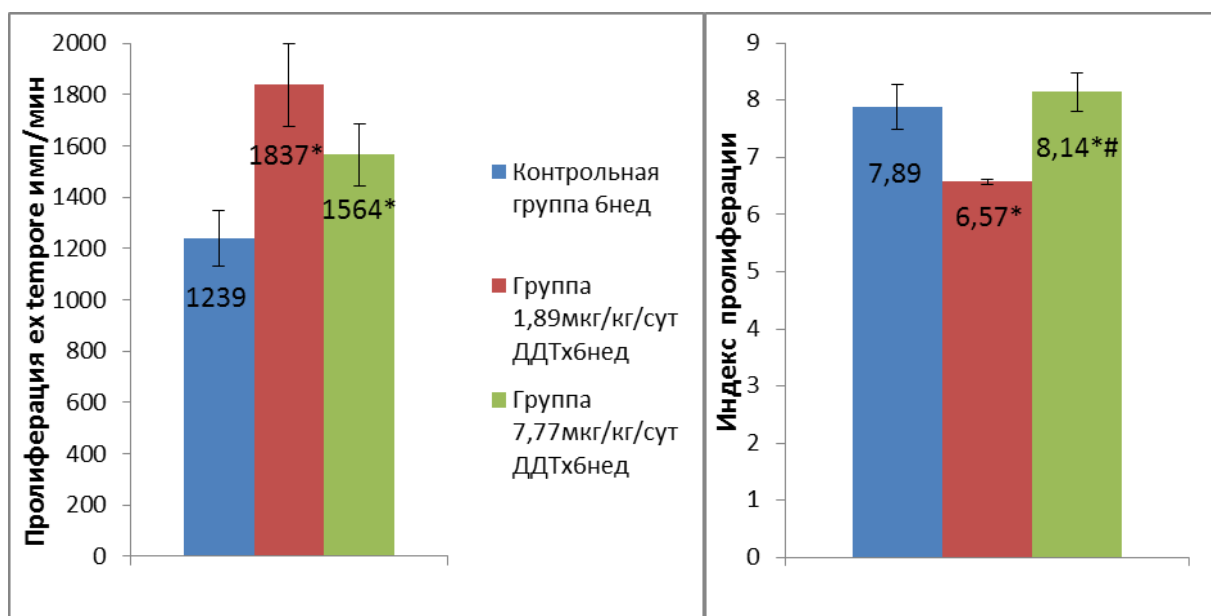


Рис. 59. Пролиферация ех tempore и индекс пролиферации клеток селезенки контрольной группы и опытных групп через 6 недель после начала эксперимента.

*-статистически значимое отличие от значения контрольной группы;

#-статистически значимое отличие от значения опытной группы, потреблявшей меньшую дозу ДДТ.

Исследование пролиферативной активности клеток селезенки крыс, потреблявших ДДТ в дозе $7,77 \pm 0,17$ мкг/кг/сут в течение 6 недель показало, что пролиферация ех tempore статистически значимо повысилась. Индекс пролиферации соответствовал значениям контрольной группы (рис. 59).

По сравнению со значением контрольной группы, у крыс, потреблявших ДДТ в дозе $1,89 \pm 0,086$ мкг/кг/сут в течение 10 недель, пролиферация ех tempore клеток селезенки статистически значимо снизилась. Также снизился более чем в два раза индекс индуцированной пролиферации (рис. 60).

Исследование пролиферативной активности клеток селезенки крыс, потреблявших ДДТ в дозе $7,77 \pm 0,17$ мкг/кг/сут в течение 10 недель показало, что значение пролиферации ех tempore снизилось по сравнению с контрольной группой. Так же было отмечено значительное снижение индекса индуцированной пролиферации (рис. 60).

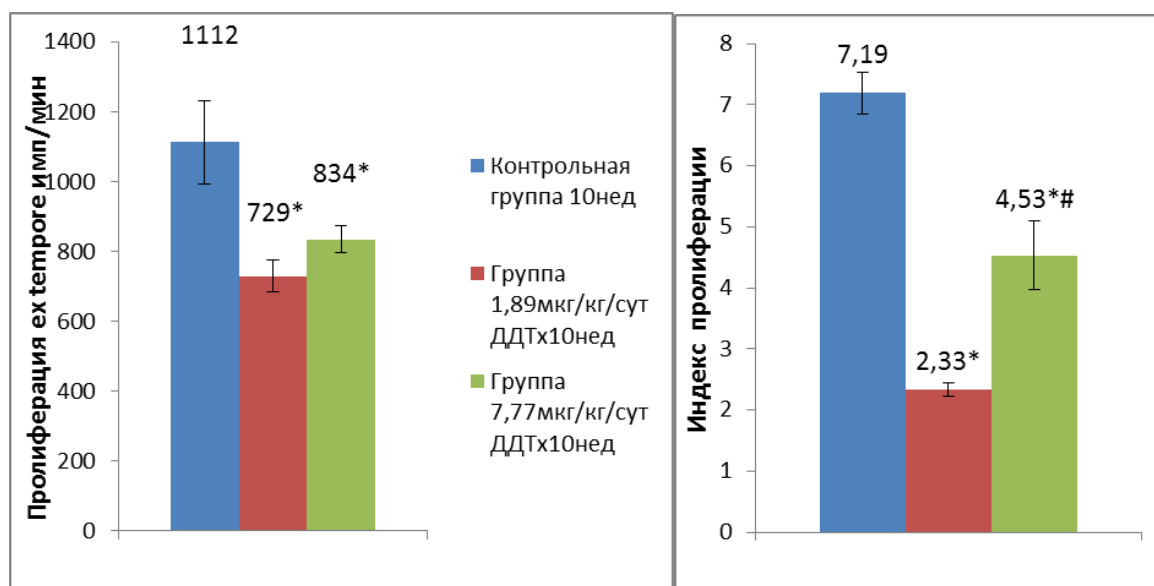


Рис. 60. Пролиферация ex tempore и индекс пролиферации клеток селезенки контрольной и опытных групп через 10 недель после начала эксперимента.

*-статистически значимое отличие от значения контрольной группы;

#-статистически значимое отличие от значения опытной группы, потреблявшей меньшую дозу ДДТ.

Закключение: Исследование пролиферативной активности клеток селезенки показало, что соотношение значений конканавалин А-индуцированной пролиферации к показателям пролиферации ex tempore клеток снижено у крыс, потреблявших ДДТ в дозе $1,89 \pm 0,086$ мкг/кг/сут в течение 6 недель, по сравнению со значениями контрольной группы. Это свидетельствует о нахождении большего количества клеток селезенки в различных стадиях митоза до введения митогена после потребления данной дозы ДДТ. В группе, потреблявшей ДДТ в дозе $1,89 \pm 0,086$ мкг/кг/сут в течение 10 недель, отмечается менее выраженное, но статистически значимое снижение индекса пролиферации. С повышением дозы ДДТ и времени воздействия, отмечается снижение значений пролиферации ex tempore и повышение индекса пролиферации, что говорит о снижении количества клеток селезенки, находящихся в различных стадиях митоза.

Таблица 6.

Морфометрические показатели и пролиферативная активность клеток селезенки крыс, потреблявших ДДТ в дозе $1,89 \pm 0,086$ мкг/кг/сут и $7,77 \pm 0,17$ мкг/кг/сут в течение 6 и 10 недель и крыс контрольных групп, соответствующих сроков исследования ($M \pm m$)

		6 недель			10 недель		
		Контрольная группа	$1,89 \pm 0,086$ мкг/кг/сут	$7,77 \pm 0,17$ мкг/кг/сут	Контрольная группа	$1,89 \pm 0,086$ мкг/кг/сут	$7,77 \pm 0,17$ мкг/кг/сут
Доля красной пульпы, %		$49,97 \pm 1,46$	$51,91 \pm 1,29$	$54,35 \pm 1,18$	$62,27 \pm 1,26^{\wedge}$	$61,14 \pm 1,32^{\wedge}$	$70,24 \pm 1,34^{\wedge* \#}$
Доля белой пульпы, %	ПАЛМ	$10,06 \pm 0,87$	$14,18 \pm 0,85^*$	$8,48 \pm 0,53^{\#}$	$6,89 \pm 0,51^{\wedge}$	$8,08 \pm 0,65^{\wedge}$	$4,03 \pm 0,32^{\wedge* \#}$
	Лимф. уз.	$40,14 \pm 1,72$	$33,71 \pm 1,65^*$	$37,51 \pm 1,28^{\#}$	$30,64 \pm 1,42^{\wedge}$	$30,43 \pm 1,53$	$25,72 \pm 1,25^{\wedge* \#}$
Количество лимф. уз, уз/мм ²		$0,69 \pm 0,09$	$0,80 \pm 0,06$	$0,91 \pm 0,07^*$	$0,80 \pm 0,11$	$0,91 \pm 0,08$	$1,04 \pm 0,1^*$
Доля первичных узелков, %		$3,98 \pm 1,82$	$7,16 \pm 2,00^*$	$12,66 \pm 1,77^* \#$	$21,83 \pm 2,64^{\wedge}$	$17,69 \pm 2,14^{\wedge}$	$9,80 \pm 3,34^* \#$
Доля вторичных узелков, %		$96,02 \pm 1,82$	$92,84 \pm 2,00^*$	$87,34 \pm 1,77^* \#$	$78,17 \pm 2,64^{\wedge}$	$82,31 \pm 2,14^{\wedge}$	$80,20 \pm 3,34^* \#$
Доля маргинальной зоны, %	Первич. узелков	$64,75 \pm 1,67$	$62,47 \pm 0,78^*$	$65,71 \pm 0,79^{\#}$	$62,15 \pm 2,4^{\wedge}$	$68,31 \pm 1,43^{* \wedge}$	$61,43 \pm 1,18^{\#}$
	Вторич. узелков	$58,59 \pm 1,36$	$51,99 \pm 2,76^*$	$53,26 \pm 1,87^* \#$	$55,23 \pm 0,45^{\wedge}$	$53,03 \pm 1,59^*$	$53,92 \pm 1,45^*$
Доля мантийной зоны вторич. узелков, %		$30,56 \pm 1,07$	$35,72 \pm 1,92^*$	$36,21 \pm 1,36^*$	$34,64 \pm 0,38^{\wedge}$	$34,80 \pm 1,25$	$33,22 \pm 1,14^*$
Доля герминативных центров вторич. узелков, %		$10,85 \pm 0,29$	$12,28 \pm 0,84^*$	$10,53 \pm 0,51^{\#}$	$10,13 \pm 0,06$	$12,16 \pm 0,34^*$	$12,86 \pm 0,31^{* \#}$
Мегакариоциты, кл/мм ²		$0,08 \pm 0,03$	$0,19 \pm 0,02^*$	$0,30 \pm 0,02^{* \#}$	$0,11 \pm 0,01$	$0,18 \pm 0,016^*$	$0,24 \pm 0,01^{* \#}$
Пролиферация ex tempore, имп/мин		$1239,18 \pm 118,88$	$1837,80 \pm 200,00^*$	$1564,68 \pm 162,26^*$	$1112,25 \pm 284,00$	$729,45 \pm 47,00^{\wedge*}$	$834,53 \pm 39,28^{\wedge*}$
Индекс пролиферации		$7,89 \pm 0,39$	$0,95 \pm 0,05^*$	$8,14 \pm 0,33^{* \#}$	$7,19 \pm 0,35$	$2,33 \pm 0,11^{\wedge*}$	$4,53 \pm 0,56^{\wedge* \#}$

Примечание:

* - статистически значимое отличие от контрольной группы; # - статистически значимое отличие от группы, потреблявшей меньшую дозу ДДТ; ^ - статистически значимое отличие от группы меньшего срока исследования.

3.3. Исследование концентрации цитокинов и гормонов в сыворотке крови крыс

Проведено исследование цитокинового профиля сыворотки крови крыс контрольных и опытных групп через 6 и 10 недель после начала эксперимента. Также в сыворотке были определены концентрации неоптерина, являющегося интегральным показателем выраженности реакций клеточного иммунитета и кортикостерона – основного глюкокортикоида крыс, обладающего противовоспалительным действием и подавляющего продукцию провоспалительных цитокинов.

Результаты сравнения концентрации цитокинов в сыворотке крови крыс контрольных групп через 6 и 10 недель после начала эксперимента (табл.7) выявили возрастную динамику, выразившуюся в статистически значимом снижении содержания ИЛ-2, ИЛ-12 и неоптерина, у крыс контрольной группы через 10 недель после начала эксперимента.

Таблица 7.

Изменения концентрации цитокинов и гормонов в сыворотке крови крыс, потреблявших ДДТ в различных дозах в течение 6 и 10 недель ($M \pm m$)

	Длительность потребления ДДТ					
	6 недель			10 недель		
	Контрольная группа	1,89±0,086 мкг/кг/сут	7,77±0,17 мкг/кг/сут	Контрольная группа	1,89±0,086 мкг/кг/сут	7,77±0,17 мкг/кг/сут
Неоптерин, нмоль/л	0,93±0,05	1,27±0,09*	1,31±0,13*	0,53±0,09^	0,83±0,06*	0,66±0,08#
ИЛ-12, пг/мл	2234,98 ±98,61	1844,77 ±76,25*	1768,77 ±90,39*	1817,88 ±71,01^	1662,45 ±73,55	1421,45 ±97,45*#
ИЛ-2, пг/мл	118,39 ±16,14	129,17 ±33,15	76,07 ±9,25*	69,07 ± 9,58^	249,24 ±24,48*^	121,94 ±12,68*^#
ИЛ-10, пг/мл	35,35± 5,81	34,33 ±6,65	27,26 ±8,36	40,1 ±6,65	69,26 ±14,29*^	23,11 ±3,46*#
ТФР-β1, нг/мл	105,66 ±6,72	108,35 ±6,14	132,80 ±8,16*	105,39 ±5,24	128,45 ±8,04*^	103,99 ±7,41#^
Кортикостерон, нг/мл	139,09 ±10,99	108,41 ±1,94*	103,25 ±6,61*	127,12 ±8,99	108,09 ±2,75*	97,36 ±5,61*

Примечание:

* - статистически значимое отличие от контрольной группы; # - статистически значимое отличие от группы, потреблявшей меньшую дозу ДДТ; ^ - статистически значимое отличие от группы меньшего срока исследования.

У крыс, потреблявших ДДТ в дозе $1,89 \pm 0,086$ мг/кг/сут, через 6 недель наблюдалось статистически значимое повышение концентрации неоптерина и снижение концентрации ИЛ-12. Отмечалось повышение концентрации ИЛ-2, но оно не достигло статистической значимости. Уровень концентрации ИЛ-10 и ТФР- β не изменился (табл.7). Установлено статистически значимое снижение концентрации кортикостерона по сравнению со значениями контрольной группы аналогичного срока исследования (рис. 61).

У крыс, потреблявших ДДТ в дозе $7,77 \pm 0,17$ мг/кг/сут в течение 6 недель, также отмечалось повышение концентрации неоптерина и снижение концентрации ИЛ-12. В отличие от опытной группы, получавшей меньшую дозу ДДТ в течение такого же срока исследования, наблюдалось статистически значимое повышение концентрации ТФР- β . Концентрация ИЛ-10 не отличалась от значений контрольной группы, но в отличие от предыдущей группы отмечалось снижение концентрации ИЛ-2 (табл. 7). Отмечалось статистически значимое снижение концентрации кортикостерона в сыворотке крови по сравнению со значением контрольной группы, при этом отличий этого показателя от значений опытной группы того же срока исследования, получавшей меньшую дозу ДДТ, отмечено не было (рис. 61).

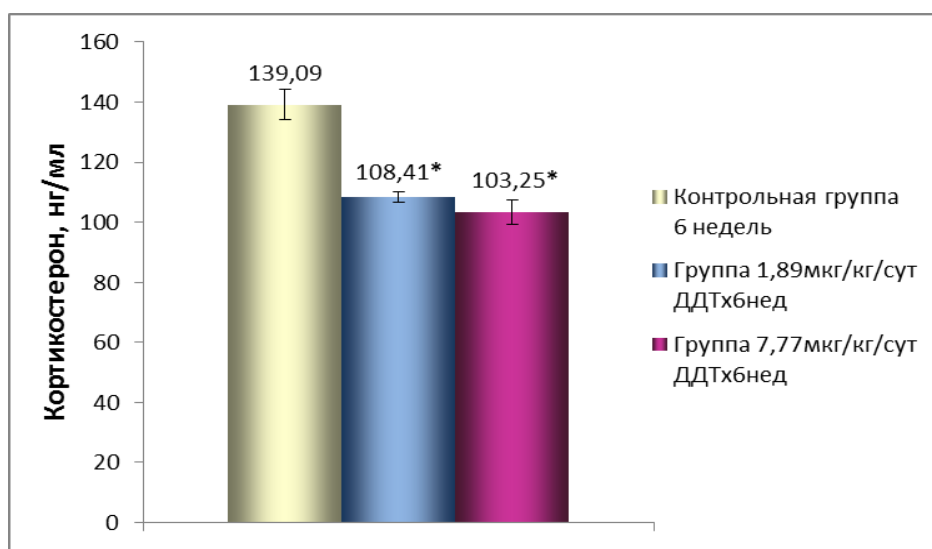


Рис. 61. Изменения концентрации кортикостерона в сыворотке крови крыс при потреблении ДДТ в дозах $1,89 \pm 0,086$ мг/кг/сут и $7,77 \pm 0,17$ мг/кг/сут в течение 6 недель.

* - статистически значимые отличия от значений контрольной группы.

Через 10 недель у крыс, потреблявших ДДТ в дозе $1,89 \pm 0,086$ мкг/кг/сут, в сыворотке крови выявлены повышение концентрации неоптерина, ТФР- β 1 и значительное увеличение концентрации ИЛ-2. Концентрация ИЛ-10 также повысилась по сравнению со значениями контрольной группы и опытной группой, получавшей такую же дозу ДДТ в течение меньшего срока (табл. 7). Было отмечено статистически значимое снижение концентрации кортикостерона в сыворотке крови по сравнению со значением контрольной группы (рис. 62).

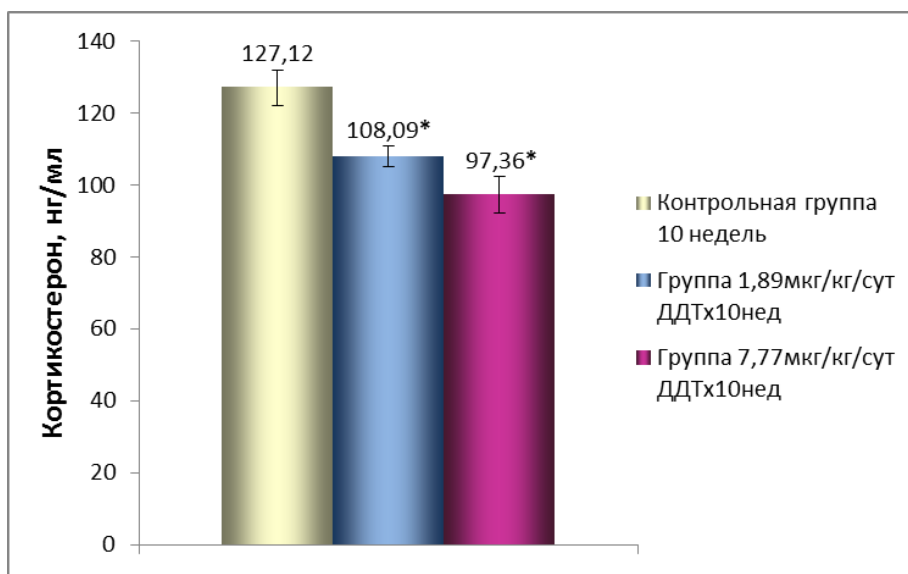


Рис. 62. Изменения концентрации кортикостерона в сыворотке крови крыс при потреблении ДДТ в дозах $1,89 \pm 0,086$ мкг/кг/сут и $7,77 \pm 0,17$ мкг/кг/сут в течение 10 недель.

* - статистически значимые отличия от значений контрольной группы.

У крыс, потреблявших ДДТ в дозе $7,77 \pm 0,17$ мкг/кг/сут, через 10 недель концентрации неоптерина и ТФР- β 1 соответствовали значениям контрольной группы. Отмечалось статистически значимое снижение концентраций ИЛ-12 по сравнению с контрольной группой. Концентрация ИЛ-10 также была достоверно ниже как значений контрольной группы, так и группы, получавшей меньшую дозу в течение того же срока. Уровень сывороточного ИЛ-2 повысился по сравнению с контрольным, но был значительно ниже, чем в группе сравнения (табл. 7). Концентрация кортикостерона в сыворотке крови крыс, потреблявших ДДТ в течение 10 недель, не отличалась от предыдущего сро-

ка исследования, при этом была значительно ниже, чем в контрольной группе (рис. 62).

Заключение: Изучение цитокинового профиля выявило статистически значимое увеличение продукции ИЛ-12 как через 6, так и через 10 недель воздействия ДДТ. Отмечено также увеличение концентрации ИЛ-2 через 10 недель воздействия обеих доз ДДТ. Увеличение синтеза ИЛ-2 приводило к транзиторному повышению концентрации ТФР- β 1 и ИЛ-10 у крыс, получавших меньшую дозу. Эти изменения наблюдались на фоне пониженной продукции кортикостерона надпочечниками во всех исследуемых опытных группах.

3.4. Изучение зависимости показателей цитокинового профиля и морфофункциональных показателей тимуса и селезенки

При сопоставлении морфофункциональных характеристик тимуса и уровней цитокинов в сыворотке крови крыс, у крыс опытной группы, потреблявших ДДТ в дозе $1,89 \pm 0,086$ мкг/кг/сут в течение 6 недель, статистически значимые корреляции между морфологическими изменениями тимуса и концентрации неоптерина, ИЛ-2 и TGFb в сыворотке крови не наблюдались. Концентрация ИЛ-12 снижалась по мере роста продукции ИЛ-2, но чем медленнее это происходило, тем больше была толщина коркового слоя ($R=0,79$, $p=0,000013$) и количество тимических телец ($R=0,51$, $p=0,015$). То есть на данном этапе ИЛ-12 являлся достоверным маркером пролиферации вместо ИЛ-2. В тимусе крыс, потреблявших ДДТ в дозе $7,77 \pm 0,17$ мкг/кг/сут в течение 6 недель, отмечена обратная зависимость между уровнем неоптерина в сыворотке крови и количеством тимических телец в мозговом веществе ($R=-0,77$, $p=0,0006$), а также количеством ретикулярных эпителиоцитов в составе телец ($R=0,56$, $p=0,02$).

Между возрастными изменениями морфофункциональных показателей тимуса и изменениями цитокинового профиля сыворотки крови крыс были выявлены следующие взаимосвязи. В контрольной группе, через 10 недель после начала эксперимента, была отмечена сильная зависимость ($R=-0,78$, $p=0,00014$) между снижением неоптерина и увеличением количества гибнущих ретикулярных эпителиоцитов. Темпы снижения ИЛ-2 в этой группе четко отражались в морфологических возрастных изменениях тимуса. В тимусе у крыс с более высокими значениями ИЛ-2 был более широкий субкапсулярный слой, также отмечена зависимость между уровнем ИЛ-2 и гибелью ретикулярных эпителиоцитов ($R=0,56$, $p=0,015$). ИЛ-2, являющийся фактором роста Т-лимфоцитов, в возрасте, когда начинается инволюция тимуса, отражал пролиферацию лимфоцитов и гибель ретикулярных эпителиоцитов. Возрастные изменения тимуса контрольных крыс коррелировали с продукцией TGFb. Наблюдалась отрицательная зависимость между уровнем TGFb и

шириной субкапсулярного слоя ($R=-0,63$, $p=0,0061$), а также количеством тимических телец ($R=-0,56$, $p=0,015$). Таким образом, TGFb в норме выступал как антагонист ИЛ-2 по действию на клетки тимуса.

В тимусе крыс, потреблявших ДДТ в дозе $1,89\pm 0,086$ мкг/кг/сут в течение 10 недель, появилась прямая зависимость между концентрацией TGFb и количеством тимических телец ($R=0,78$, $p=0,0004$). Также подтвердилась зависимость уровня ИЛ-2 с количеством гибнущих ретикулярных эпителиоцитов ($R=0,59$, $p=0,005$). В группе, потреблявшей ДДТ в дозе $7,77\pm 0,17$ мкг/кг/сут в течение 10 недель, так же, как и в контрольной группе, наблюдалась отрицательная корреляция между уровнем TGFb и шириной субкапсулярного слоя ($R=-0,61$, $p=0,003$), а также количеством тимических телец ($R=-0,72$, $p=0,002$). Этот факт подтвердил усиление возрастных изменений тимуса крыс данной группы.

При изучении цитокинового профиля и морфофункциональных характеристик селезенки крыс, потреблявших ДДТ в дозе $1,89\pm 0,086$ мкг/кг/сут в течение 6 недель, отмечалась прямая зависимость между концентрацией ИЛ-2 и долей лимфатических узелков с опустошением герминативных центров ($R=0,57$, $p=0,0052$). То есть, ИЛ-2, определяющий интенсивность пролиферативных процессов в норме, отражал интенсивность гибели лимфоцитов селезенки. Усиление гибели клеток закономерно приводило к росту продукции неоптерина, что демонстрировала умеренная зависимость между его концентрацией в сыворотке крови и долей лимфатических узелков с рыхлыми герминативными центрами ($R=0,48$, $p=0,021$). Концентрация TGFb не изменялась, но наибольшие его значения отмечались у крыс с более выраженной гибелью клеток герминативных центров лимфатических узелков ($R=0,67$, $p=0,00069$). У крыс, потреблявших ДДТ в дозе $7,77\pm 0,17$ мкг/кг/сут в течение 6 недель, в селезенке наблюдались уменьшение доли как лимфатических узелков, так и ПАЛМ, гибель клеток в герминативных центрах, увеличение количества первичных лимфатических узелков, сопровождавшееся снижением продукции ИЛ-2 и повышением TGFb. Повышенный уровень неоптерина

коррелировал с опустошением герминативных центров ($R=0,79$, $p=0,000029$), то есть так же отражал активность макрофагов.

У крыс контрольной группы, через 10 недель после начала эксперимента, было выявлено снижение доли белой пульпы, увеличение количества узелков без светлых центров. На этом этапе усилилась ранее статистически незначимая прямая зависимость между концентрацией кортикостерона, в физиологических условиях обеспечивающего развитие лимфатических узелков селезенки, и объемной долей лимфатических узелков ($R=0,68$, $p=0,0076$) и развитием в них герминативных центров ($R=0,50$, $p=0,0047$).

Через 10 недель потребления ДДТ в дозе $1,89 \pm 0,086$ мг/кг/сут, когда уровни TGFb, ИЛ-2 и неоптерина достигли максимальных значений, появилась обратная зависимость между концентрацией TGFb и объемной долей белой пульпы селезенки ($R=-0,45$, $p=0,047$). При потреблении ДДТ в дозе $7,77 \pm 0,17$ мг/кг/сут в течение 10 недель, данная зависимость подтвердилась ($R=-0,30$, $p=0,005$), а также, как и в контрольной группе, была выявлена зависимость между концентрацией ИЛ-2 и долей лимфатических узелков с опустошением герминативных центров ($R=0,63$, $p=0,004$).

Сопоставив данные об изменениях цитокинового профиля и показателей спонтанной пролиферативной активности клеток тимуса и селезенки мы обнаружили четкую зависимость между продукцией ИЛ-2 и пролиферацией клеток. Реактивное повышение пролиферативной активности в связи с гибелью клеток приводило к снижению ИЛ-2, а понижение пролиферативной активности как клеток тимуса, так и селезенки влекли за собой повышение синтеза ИЛ-2. Также обнаруживалась прямая зависимость между изменением концентрации ИЛ-2 и количеством клеток тимуса, экспрессирующих белок p-53. При значительной апоптотической гибели тимоцитов, отмечалось усиление продукции ИЛ-2. При снижении темпов гибели клеток, уровень ИЛ-2 также снижался (рис.63 а,б).

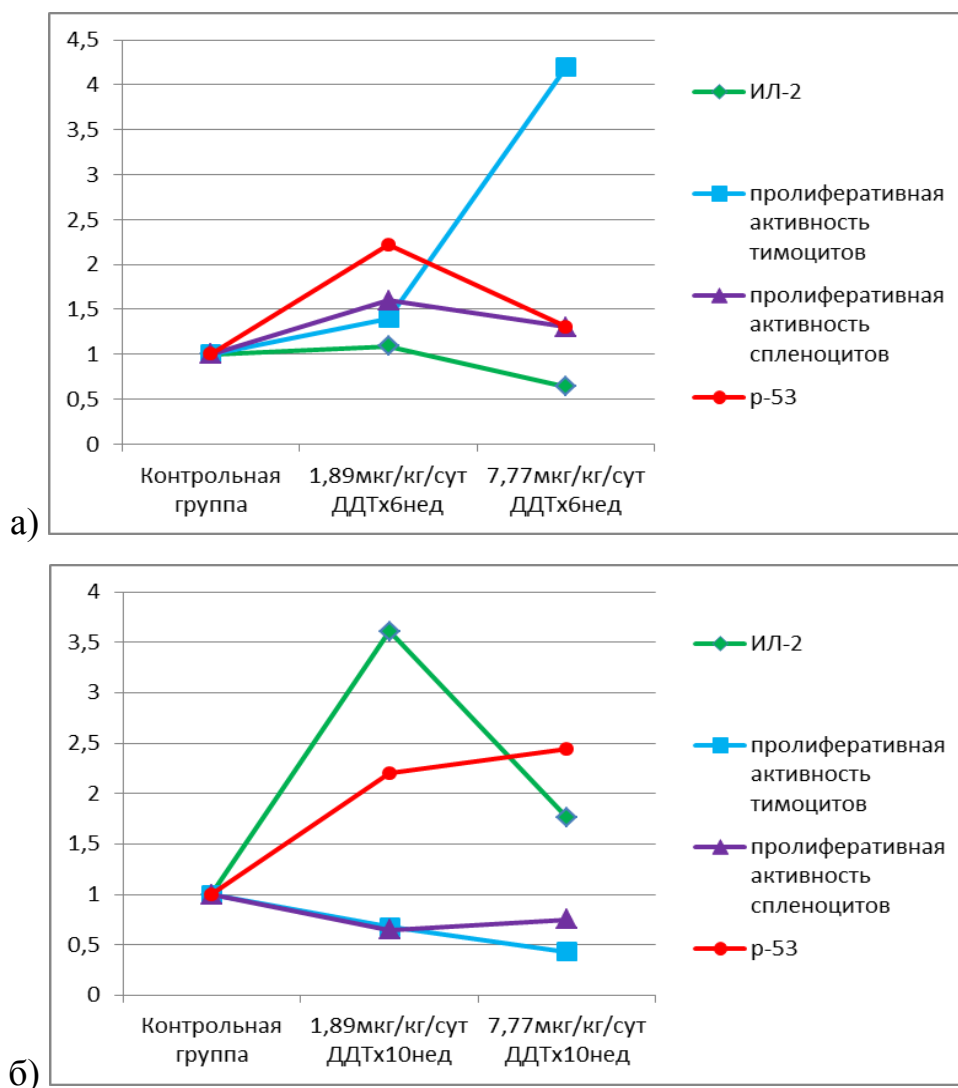


Рис. 63. Изменения относительных значений концентрации ИЛ-2 в сыворотке крови, пролиферативной активности клеток селезенки и тимуса крыс и доля клеток тимуса, экспрессирующих белок p53 при воздействии различных доз ДДТ.

а) Через 6 недель после начала эксперимента;

б) Через 10 недель после начала эксперимента.

Значения контрольных групп приняты за единицу.

ГЛАВА 4. ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ СОБСТВЕННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ

Морфофункциональные изменения тимуса при воздействии низких доз ДДТ

При изучении гистологических препаратов тимуса крыс всех опытных групп, в первую очередь, была отмечена гибель тимоцитов, проявляющаяся наличием участков опустошения коркового вещества, появлением картины «звездного неба». Данные признаки усиливались с увеличением среднесуточной потребленной дозы ДДТ и длительности потребления. Известно, что гибель клеток тимуса в процессах негативной селекции происходит, в основном, за счет апоптоза. По данным работ Tebourbi и соавторов воздействие больших доз ДДТ инициирует гибель тимоцитов также путем апоптоза [129]. При этом имеют место два механизма апоптоза тимоцитов – p53-зависимый и p53-независимый пути [47]. p53-независимый путь индуцируется гормонами надпочечников – глюкокортикоидами. В связи с этим, для установления механизмов запуска апоптоза тимоцитов при действии на них низких доз ДДТ, было проведено определение концентрации кортикостерона в сыворотке крови, являющегося основным глюкокортикоидом у крыс. Еще в 60-х гг. прошлого века было установлено, что производные ДДТ в больших дозах оказывают цитостатическое действие на клетки карциномы надпочечников и соответственно, снижают продукцию глюкокортикоидов [96]. В 70-е гг. препараты на основе ДДТ применялись в химиотерапии карциномы надпочечников, и в настоящее время продолжаются разработки новых цитостатических препаратов на основе ДДТ [53]. Но механизм действия ДДТ остается до сих пор невыясненным. В нашем исследовании, во всех опытных группах отмечено снижение уровня кортикостерона по сравнению с контрольными значениями. Этот факт позволяет утверждать, что в тимусе крыс под действием ДДТ, задействован p53-зависимый путь апоптоза.

Потребление ДДТ крысами в дозе $1,89 \pm 0,086$ мкг/кг/сут в течение 6 недель, приводило к морфофункциональным изменениям тимуса, обусловлен-

ным гибелью как лимфоцитов, так и ретикулярных эпителиоцитов. Гибель лимфоцитов подтверждало двукратное увеличение по сравнению с контрольной группой процентного содержания клеток, экспрессирующих белок p53. p53-позитивные клетки располагались диффузно в корковом веществе, а также встречались и в мозговом веществе, то есть апоптозу подвергались как дифференцирующиеся, так и дифференцированные тимоциты. Усиление гибели ретикулярных эпителиоцитов было выражено в увеличении количества тимических телец. Таким образом, ДДТ даже в самой низкой исследованной дозе, способен усиливать гибель клеток в тимусе. Гибель клеток вызывала реактивное усиление пролиферации тимоцитов. Было отмечено статистически значимое усиление пролиферации *ex tempore* тимоцитов по сравнению с контрольной группой, при этом пролиферативный ответ на введение митогена не снижался. За счет усиления пролиферации началось расширение субкапсулярного слоя, не достигшее, однако, статистически значимых отличий от контрольной группы.

В группе, потреблявшей ДДТ в дозе $7,77 \pm 0,17$ мг/кг/сут в течение 6 недель, по сравнению с группой, потреблявшей меньшую дозу ДДТ, принципиальных изменений гистологического строения тимуса не было. Как и в группе крыс, потреблявших ДДТ в дозе $1,89 \pm 0,086$ мг/кг/сут, отмечалась гибель лимфоцитов в корковом веществе. Значительное усиление апоптоза клеток, отмеченное в группе, потреблявшей меньшую дозу ДДТ в течение того же срока исследования, дает возможность предположить, что в данной, более высокой, дозе ДДТ, массовая гибель клеток могла наблюдаться ранее, что и привело к сужению субкапсулярного слоя по сравнению со значением опытной группы, получавшей меньшую дозу ДДТ. Доля клеток, экспрессирующих белок p53, превышала значения контрольной группы, но была меньше, чем в группе крыс, потреблявших ДДТ в дозе $1,89 \pm 0,086$ мг/кг/сут в течение аналогичного срока. p53-позитивные клетки располагались в основном на границе коркового и мозгового вещества. При этом соотношение коркового и мозгового веществ не изменялись. Однако

структура мозгового вещества тимуса имела ряд отличий, связанных с усилением гибели ретикулярных эпителиоцитов. Эти процессы были выражены в увеличении количества тимических телец и ретикулярных эпителиоцитов в их составе как в сравнении с контрольной группой, так и с группой, потреблявшей ДДТ в дозе $1,89 \pm 0,086$ мкг/кг/сут в течение 6 недель. Все эти изменения привели к реактивному усилению пролиферативной активности тимоцитов как по сравнению с контролем, так и по сравнению с предыдущей опытной группой, больше, чем в три раза. Также было отмечено значительное повышение ответной реакции клеток на митоген.

Через 10 недель после начала эксперимента в тимусе крыс наблюдались отличия, связанные как с воздействием ДДТ, так и возрастными изменениями.

В тимусе крыс контрольной группы через 10 недель после начала эксперимента в сравнении с тимусом контрольной группы предыдущего срока исследования, было отмечено усиление гибели ретикулярных эпителиоцитов, выразившееся в статистически значимом увеличении количества тимических телец в мм² среза мозгового вещества, а также изменении соотношения стадий развития тимических телец в сторону увеличения доли телец в начальной стадии. Отмечалось также усиление гибели лимфоцитов. Экспрессия белка p53 клетками тимуса увеличилась более чем в два раза. p53-позитивные клетки располагались в основном субкапсулярно. В корковом веществе были выявлены участки гибели лимфоцитов, появление картины «звездного неба». Эти факты говорят о развитии начальной стадии возрастной инволюции тимуса у крыс данного возраста [123]. Известно, что тимус достигает максимума развития к периоду полового созревания, затем начинаются возрастные изменения, появляющиеся усилением гибели лимфоцитов, увеличением образования тимических телец, увеличением числа клеток в тимических тельцах, что в конечном итоге приводит к сморщиванию долек [48, 90, 94].

После 10 недель потребления ДДТ в дозе $1,89 \pm 0,086$ мг/кг/сут, гибель ретикулярных эпителиоцитов в мозговом слое была более выражена, чем в контрольной группе за счет увеличения количества клеток, образующих тимические тельца. Однако, процентное содержание клеток, экспрессирующих белок p53, не изменилось по сравнению с контрольной группой. В отличие от контрольной группы, где p53-позитивные клетки располагались в основном субкапсулярно, в группе, потреблявшей ДДТ в дозе $1,89 \pm 0,086$ мг/кг/сут в течение 10 недель, клетки, экспрессирующие белок p53, располагались диффузно в корковом веществе, а также группами в мозговом веществе. Соотношение коркового и мозгового вещества не изменялось и не отличалось от значений контрольной группы. Тем не менее, отмечалось прогредиентное снижение ширины субкапсулярного слоя, в результате чего, этот показатель был ниже, чем в контрольной группе. Данный факт объясняется значительной гибелью лимфобластов на более раннем сроке исследования данной дозы ДДТ, а также снижением пролиферативной активности тимоцитов в данной опытной группы, что не дало возможности восстановить численность клеток в субкапсулярном слое. Стоит также отметить, что в данной дозе исследования значительно увеличилась ответная реакция тимоцитов на введение митогена.

В тимусе крыс, потреблявших ДДТ в течение 10 недель в дозе $7,77 \pm 0,17$ мг/кг/сут, имелись признаки усиления гибели лимфоцитов. Экспрессия белка p53 клетками тимуса возросла по сравнению с контрольной и опытной группой аналогичного срока исследования, потреблявшей меньшую дозу ДДТ. p53-позитивные тимоциты обнаруживались в корковом и мозговом веществе, а также отмечалось увеличение их количества в субкапсулярном слое, что вместе со значительным снижением пролиферативной активности в данной группе, привело к снижению толщины слоя лимфобластов. Значительные изменения отмечались также и в строме тимуса. Увеличилось количество гибнущих ретикулярных эпителиоцитов за счет увеличения как числа тимических телец, так и количества клеток в них. При этом только в

данной опытной группе, были выявлены тимические тельца с распадом и образованием полости в центральной части телец. Значительная гибель ретикулярных эпителиоцитов привела к уменьшению доли мозгового вещества в тимусе крыс данной группы.

Сравнение изменений в группах показало, что их характер одинаков в контрольных и опытных группах, но темпы гибели клеток тимуса при потреблении ДДТ были ускорены. В опытной группе через 6 недель после начала эксперимента изменения были схожи с показателями контрольной группы через 10 недель. Поскольку в контрольной группе более длительного срока исследования наблюдались возрастные изменения тимуса, то схожесть показателей может говорить о более быстром течении этих процессов у крыс, получавших низкие дозы ДДТ в течение 6 недель. При этом данные изменения не носят адаптивный характер, т.к. известно, что в начальные сроки адаптации, любые, даже кратковременные стимулы, вызывают стимуляцию коры надпочечников [22, 34, 38]. Однако, изучение концентрации кортикостерона в нашем исследовании, показало снижение его уровня во всех опытных группах.

После потребления ДДТ в течение 10 недель выявленные изменения в тимусе усилились в сравнении с предыдущим сроком исследования и контрольной группой. Но характер изменений также был схож у сравниваемых групп, за исключением того факта, что тимоциты крыс, потреблявших ДДТ в течение 10 недель в меньшей дозе приобрели свойство реагировать на митоген резким усилением пролиферации на фоне пониженной пролиферативной активности, что не наблюдалось в контрольной группе и группе, потреблявшей ДДТ в большей дозе.

Выраженная гибель ретикулярных эпителиоцитов, наблюдаемая как через 6, так и через 10 недель в опытной группе, указывает на возможное нарушение секреции тимических гормонов и созревания Т-лимфоцитов. Это усиление инволютивных изменений может говорить о негативном влиянии малых доз ДДТ на функционирование тимуса, а, следовательно, и быть при-

чиной нарушения реакций в первую очередь клеточного иммунитета также как и при действии субтоксических доз ДДТ [56, 133].

Морфофункциональные изменения селезенки при воздействии низких доз ДДТ

Выявленные изменения морфофункциональных показателей селезенки свидетельствуют о том, что длительное воздействие низких доз ДДТ приводит к изменениям как в белой пульпе, так и красной пульпе.

При потреблении ДДТ крысами в дозе $1,89 \pm 0,086$ мкг/кг/сут в течение 6 недель, отмечалось увеличение доли ПАЛМ, объясняемое выявленным усилением пролиферативной активности клеток тимуса при воздействии аналогичной суточной дозы ДДТ на данном сроке исследования. Заметно увеличилось количество узелков с гибелью клеток герминативных центров. Значительная гибель лимфоцитов подтверждается и данными других авторов, работавших с более высокими дозами [102, 114]. При этом отмечено увеличение доли герминативных центров в лимфатических узелках селезенки и значительное увеличение количества лейкоцитов в маргинальной зоне, происшедшее за счет усиления пролиферативной активности клеток селезенки. Однако доля маргинальной зоны у вторичных узелков уменьшилась за счет реактивного расширения герминативных центров. Также выявлено значительное снижение индекса индуцированной пролиферации, что свидетельствует о нахождении большего количества клеток селезенки в различных стадиях митоза до введения митогена. Данная реакция была вызвана усилением гибели клеток в герминативных центрах, отмеченным в этой группе. В красной пульпе выявлено увеличение численности лейкоцитов в единице площади среза селезенки, что является реактивным изменением в ответ на потребление этой дозы ДДТ. К низкой дозе инсектицида оказались чувствительны также мегакариоциты, что подтверждает отмеченное увеличение их количества в красной пульпе. Такое же увеличение отмечено в работах других авторов, изучавших воздействие различных веществ на селезенку. Так, выявлено, что длительное введение в организм крыс Т-2 токсина приводило к увеличению количества мегакариоцитов в селезенке [43]. Также под влиянием

загрязненной территории в зоне Сибирского химического комбината было установлено увеличение числа мегакариоцитов у мышей [26].

В группе, потреблявшей ДДТ в дозе $7,77 \pm 0,17$ мкг/кг/сут в течение 6 недель, выявлено сужение доли ПАЛМ, что привело к уменьшению доли белой пульпы в селезенке данной опытной группы. Также уменьшилась доля герминативных центров в лимфатических узелках. При этом узелки с большим количеством гибнущих клеток в герминативных центрах встречались чаще, чем в контрольной группе и группе, потреблявшей меньшую дозу ДДТ. Усиление гибели клеток селезенки при увеличении дозы подтверждается также уменьшением количества лейкоцитов в маргинальной зоне при сравнении с опытной группой, потреблявшей меньшую дозу ДДТ. На фоне значительной гибели клеток селезенки под действием ДДТ отмечено ответное реактивное усиление пролиферативной активности. Показатель же индуцированной пролиферации вернулся в пределы значений контрольной группы. Было отмечено увеличение количества первичных узелков, что также указывает на восстановление в ответ на значительную гибель клеток под действием ДДТ. Отмечено снижение численности лейкоцитов красной пульпы, что указывает на усиление инволютивных изменений органа под действием ДДТ [32]. Отмечено также увеличение числа мегакариоцитов, как в сравнении со значениями контрольной группы, так и группы, потреблявшей меньшую дозу ДДТ. Данный факт указывает на их дозозависимую чувствительность к низким дозам инсектицида.

Изучение гистологического строения селезенки крыс контрольных групп выявило ряд возрастных морфофункциональных изменений органа через 10 недель после начала эксперимента. Происходило уменьшение доли белой пульпы, в основном за счет уменьшения лимфатических узелков. Возрастные изменения коснулись также и строения лимфатических узелков, и в частности В-зависимых зон. Было отмечено сужение герминативных центров, а также увеличение числа узелков с опустошением герминативных центров. Известно, что возрастные изменения селезенки проявляются в сокра-

щении доли белой пульпы, снижение доли периартериальных лимфоидных муфт и лимфатических узелков, постепенном исчезновении герминативных центров в узелках с возрастом [25, 27, 33].

В селезенке крыс, потреблявших ДДТ в дозе $1,89 \pm 0,086$ мг/кг/сут в течение 10 недель, герминативные центры в лимфатических узелках заметно расширились по сравнению с контрольными значениями, а доля маргинальной зоны и количество лейкоцитов в ней снизилось, что указывает на снижение количества более зрелых клеток. Т.е. тенденция, наблюдаемая в опытной группе, получавшей ту же дозу ДДТ в течение меньшего срока исследования сохранилась. При этом усиление пролиферации, наблюдаемое через 6 недель, которое привело к расширению герминативных центров, на сроке 10 недель сменилось снижением пролиферативной активности. Однако, клеток, находящихся на ранних стадиях митоза, также как и через 6 недель исследования, было значительно больше, чем в контрольной группе. Это подтверждает снижение более чем в два раза значения индуцированной пролиферации по сравнению с данными контрольной группы. В красной пульпе отмечено увеличение числа мегакариоцитов как по сравнению со значением контрольной группы.

После 10 недель потребления ДДТ в дозе $7,77 \pm 0,17$ мг/кг/сут, значительно уменьшилась доля белой пульпы в селезенке. В ее составе было отмечено уменьшение доли ПАЛМ, вызванное снижением пролиферативной активности клеток тимуса, отмеченное в этой опытной группе. Было отмечено снижение доли первичных лимфатических узелков в составе белой пульпы, что говорит об угнетении процесса новообразования узелков под действием данной дозы и указывает на ускорение под действием ДДТ начинающихся в данном возрасте инволютивных изменений. Доля гибнущих клеток в герминативных центрах была значительно больше, чем во всех остальных группах исследования. Ширина маргинальной зоны и количество клеток в ней уменьшились. При этом отмечено расширение герминативных центров, а также увеличение количества клеток на ранних стадиях митоза, что подтвер-

ждается снижением ответной реакции на введение митогена в данной группе. Однако пролиферативная активность, как и в группе, потреблявшей меньшую дозу ДДТ, осталась сниженной по сравнению со значениями контрольной группы, т.е. реактивный ответ на гибель клеток под действием ДДТ с увеличением дозы и времени воздействия снижается. По данным других авторов более высокие дозы и более длительное воздействие ДДТ также снижали пролиферативную активность лимфоцитов селезенки [114]. Эти данные говорят о компенсаторном усилении размножения клеток в В-зависимых зонах лимфатических узелков, при увеличении темпов их гибели под действием ДДТ. В красной пульпе сохранилась тенденция увеличения числа мегакариоцитов, что подтверждает дозозависимый эффект инсектицида на эти клетки.

Таким образом, результаты морфологического исследования тимуса и селезенки крыс свидетельствуют, что потребление даже столь низких доз ДДТ вызывает гибель клеток, в первую очередь лимфоидного происхождения. Эти данные подтверждают результаты исследований *in vitro* об усилении гибели лимфоцитов периферической крови человека [93].

Изменения цитокинового профиля сыворотки крови крыс при воздействии низких доз ДДТ

При выборе цитокинов для изучения изменений цитокинового профиля под воздействием ДДТ нами были выбраны в качестве показателей функциональной активности Т-хелперных клонов ИЛ-12 как основной цитокин, вызывающий дифференцировку Th0-лимфоцитов в Th1, и ИЛ-2 как один из Th1 цитокинов в связи с тем, что в литературных данных имелись разрозненные сведения о подавлении продукции ИЛ-2 под воздействием ДДТ *in vitro* [109] и сдвигом баланса Th1-Th2 цитокинов в сторону Th2 у лиц, ранее подвергавшихся воздействию ДДТ, и имеющих остаточные концентрации ДДТ в сыворотке крови. При изучении другими авторами продукции цитокинов под воздействием низких доз ДДТ получены данные об увеличении синтеза Th2 и снижении синтеза Th1 цитокинов [79, 109]. При исследовании группы лиц,

занятых в сельскохозяйственных работах и подвергавшихся воздействию ДДТ более 20 лет назад, имеющих низкие концентрации метаболитов ДДТ в сыворотке крови, авторами отмечалось снижение продукции ИЛ-2 и повышение содержания в сыворотке крови ИЛ-4 [79]. При изучении функциональных показателей иммунной системы у детей 7-10 лет, имеющих в крови аналогичные низкие концентрации ДДТ и его метаболитов, обусловленные фоновым содержанием ДДТ в продуктах питания, авторами обнаруживались умеренный лейкоцитоз и повышение концентрации IgG, IgA, но более всего IgE, что расценивалось как поляризация иммунного ответа по Th2 типу [103]. В связи с этим нами было также проведено определение уровня неоптерина как интегрального показателя выраженности реакций клеточного иммунитета и ИЛ-10, подавляющего продукцию ИЛ-2 Т-лимфоцитами [107], и ТФР- β 1 как основного цитокина регуляторных Т-лимфоцитов, оказывающего иммуносупрессивное действие. Также, как было отмечено ранее, изучался уровень кортикостерона, который в свою очередь обладает выраженной противовоспалительной активностью и является ингибитором продукции ИЛ-2 и ИЛ-1, подавляет пролиферацию Т-лимфоцитов, модулирует синтез и активность нуклеарных факторов AP и NF κ B [20, 121].

Через 6 недель потребления ДДТ в дозе $1,89 \pm 0,086$ мг/кг/сут началось усиление продукции ИЛ-2. Также отмечалось повышение концентрации неоптерина и снижение ИЛ-12. У крыс, потреблявших ДДТ в дозе $7,77 \pm 0,17$ мг/кг/сут через 6 недель также отмечалось увеличение концентрации неоптерина и снижение содержания ИЛ-12. Таким образом, на фоне пониженного уровня кортикостерона на данном сроке эксперимента отмечалось усиление показателей клеточного иммунитета.

При употреблении ДДТ в дозе $1,89 \pm 0,086$ мг/кг/сут через 10 недель отмечалось увеличение концентрации продукции ИЛ-2 и неоптерина на фоне пониженного уровня кортикостерона. Столь резкое усиление синтеза ИЛ-2 неизбежно должно было привести к усилению секреции цитокинов Трег

лимфоцитами, что проявилось в повышении концентрации ТФР- β 1 в сыворотке крови, а также вызвало компенсаторное усиление продукции ИЛ-10.

Наметившееся снижение продукции ИЛ-10 подтвердилось через 10 недель. Длительный прием ДДТ в дозе $7,77 \pm 0,17$ мкг/кг/сут по сравнению с дозой $1,89 \pm 0,086$ мкг/кг/сут приводил к более медленному увеличению уровня неоптерина и ИЛ-2, а также снижению в сыворотке крови концентрации как ИЛ-12, так и ИЛ-10 и снижению продукции ТФР- β по сравнению с предыдущим сроком исследования. Цитокиновый профиль крыс, потреблявших ДДТ в дозе $7,77 \pm 0,17$ мкг/кг/сут через 10 недель, соответствовал значениям, наблюдаемым у крыс, получавших меньшую дозу, через 6 недель приема ДДТ. Вероятно, это отставание проявлялось вследствие токсического воздействия ДДТ на организм в целом. Эти процессы также протекали на фоне пониженного синтеза кортикостерона надпочечниками.

Усиление синтеза ИЛ-2 в сочетании с ростом продукции неоптерина, выявленное в настоящем исследовании, не позволяет согласиться с мнением авторов, утверждающих, что воздействие ДДТ приводит к подавлению синтеза ИЛ-2 и поляризации иммунного ответа по Th2 типу.

При воздействии на организм низких доз ДДТ, отмечалась прямая зависимость между длительностью приема инсектицида и увеличением концентрации ИЛ-2, являющегося фактором пролиферации и дифференцировки в том числе и Т-регуляторных лимфоцитов, сопровождавшееся повышением концентрации их основных цитокинов – ТФР- β 1 и ИЛ-10. Известно, что основными продуцентами ИЛ-2 являются активированные Th1 лимфоциты. Активация синтеза ИЛ-2 происходит в том числе и под действием различных митогенов, например, конканавалина А и фитогемагглютинаина [19], но способность синтезировать ИЛ-2 лимфоциты приобретают в процессе тимического созревания. Полученные данные об изменениях концентрации ИЛ-2 и кортикостерона под воздействием ДДТ показывают, что увеличение продукции ИЛ-2 происходил на фоне снижения продукции кортикостерона, однако между численными значениями прямой корреляции отмечено не было. Воз-

можен и другой непрямой механизм активации синтеза ИЛ-2. Снижение синтеза глюкокортикоидов замедляет возрастную инволюцию тимуса, обеспечивая пролиферацию и дифференцировку лимфоцитов. Но по нашим данным действие низких доз ДДТ приводило к ускорению инволюции тимуса и снижению пролиферативной активности тимоцитов. Следовательно, увеличение секреции ИЛ-2 имело мультифакториальные механизмы, и возможно одними из них были прямое действие ДДТ и его дизрапторное действие на органы эндокринной системы. Возможной причиной противоречий с данными других исследовательских групп являлось мало изученность изменений цитокинового профиля в динамике, а также не изученность зависимости от длительности и дозы потребления ДДТ авторами, проводимыми исследования.

Для изучения связи между морфологическими изменениями тимуса и селезенки и изменениями цитокинового профиля крови мы провели исследование по отдельности для тимуса и селезенки контрольных и опытных животных, так как из литературных данных известно, что цитокины могут оказывают разное действие на центральные и периферические органы иммунной системы [49].

ИЛ-2 является одновременно митогенным и проапоптотическим фактором по отношению к лимфоцитам [112, 114, 116]. Наши данные свидетельствовали, что ИЛ-2 являлся показателем гибели ретикулярного эпителия тимуса как в стадии развития, так и в стадии возрастной инволюции органа. ИЛ-2, являющийся фактором роста Т-лимфоцитов, в возрасте, когда начинается возрастная инволюция, задерживал инволютивные изменения, связанные с гибелью лимфоцитов. У крыс, потреблявших ДДТ в дозе $1,89 \pm 0,086$ мкг/кг/сут, изменения продукции ИЛ-12 коррелировали с морфологическими изменениями и являлись маркером пролиферации лимфоцитов вместо ИЛ-2. В селезенке ИЛ-2, определяющий интенсивность пролиферативных процессов в норме, отражал интенсивность гибели лимфоцитов наряду с неоптеринном, указывающим на активацию макрофагов. Отмечавшийся через 10 недель 4-х кратный рост концентрации ИЛ-2, и вслед за ним Th2 и Treg цито-

кинов, видимо был направлен на повышение пролиферации клеток селезенки. ТФР β 1 в норме выступающий как антагонист ИЛ-2 и при воздействии ДДТ также обратно коррелировал со степенью развития лимфоидных образований и степенью их зрелости.

Таким образом, сопоставление морфологических изменений тимуса и селезенки и концентрации сывороточных цитокинов опытных животных, показало, что изменения цитокинового профиля были обусловлены гибелью клеток и реактивными изменениями, направленными на восстановление структуры органов иммунной системы. То есть усиление продукции ИЛ-2 было направлено на повышение пролиферации лимфоцитов, гибнущих при воздействии ДДТ. Наша гипотеза об отражении в цитокиновом профиле гибели клеток и реактивном изменении пролиферации клеток нашла свое подтверждение при сопоставлении характеристик цитокинового профиля и пролиферативной активности клеток тимуса и селезенки, выявившем реципрокное соотношение концентрации ИЛ-2 и пролиферативной активности клеток.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Воздействие низких доз ДДТ, предусмотренных МДУ его содержания в продуктах питания, вызывает морфофункциональные изменения органов иммунной системы, обусловленные гибелью клеток лимфоидного происхождения, в том числе и Т-лимфоцитов, В-лимфоцитов, что вначале вызывает усиление их пролиферации, а затем приводит к значительному снижению пролиферативной активности. В тимусе крыс длительное воздействие низких доз ДДТ усиливает также гибель ретикулярных эпителиоцитов, что приводит к ускорению инволютивных изменений органа (рис. 64).

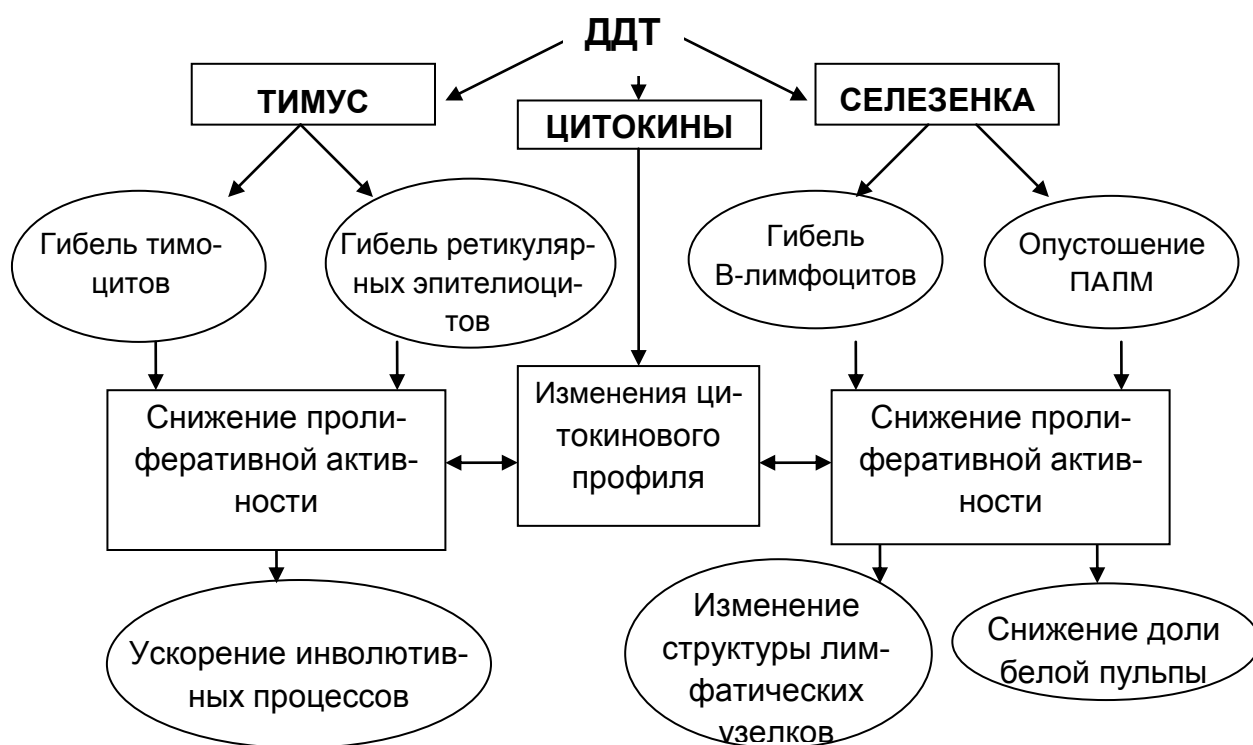


Рис. 64. Схема морфофункциональных изменений иммунной системы крыс опытных групп, потреблявших ДДТ в дозах $1,89 \pm 0,086$ мкг/кг/сут и $7,77 \pm 0,17$ мкг/кг/сут в течение 6 и 10 недель.

Изменения цитокинового профиля при воздействии низких доз ДДТ, обусловлены в первую очередь его иммунотоксическим действием, отражают дисбаланс между гибелью и пролиферацией клеток тимуса и селезенки и коррелируют с морфологическими изменениями этих органов. Наблюдаемое

аварийное реагирование органов иммунной системы на воздействие ДДТ способно нарушать гомеостатические и саногенетические механизмы, приводя к развитию заболеваний, обусловленных нарушением реакций как клеточного, так и гуморального иммунитета.

ВЫВОДЫ

1. Длительное воздействие низких доз ДДТ, предусмотренных максимальными допустимыми уровнями его содержания в продуктах питания, приводит к развитию морфофункциональных изменений органов иммунной системы крыс Вистар.
2. Воздействие низких доз ДДТ вызывает морфофункциональные изменения тимуса крыс, обусловленные усилением гибели лимфоцитов и ретикулярных эпителиоцитов, что приводит к более раннему проявлению инволютивных изменений органа.
3. Гибель тимоцитов под действием низких доз ДДТ происходит при участии p53-зависимого пути апоптоза.
4. Воздействие низких доз ДДТ вызывает морфофункциональные изменения селезенки крыс, обусловленные гибелью клеток в герминативных центрах, а увеличение дозы и длительности потребления ДДТ приводит к изменениям структуры лимфатических узелков в виде расширения герминативных центров и уменьшения ширины мантийной зоны и снижению доли белой пульпы селезенки.
5. Усиление гибели клеток тимуса и селезенки при воздействии низких доз ДДТ вызывает реактивное усиление их пролиферативной активности и пролиферативного ответа на введение митогена. Дальнейшее увеличение дозы ДДТ и времени его воздействия, приводит к снижению пролиферативного потенциала клеток тимуса. Увеличение пролиферации клеток селезенки в ответ на введение митогена на фоне пониженной пролиферативной активности свидетельствует о сохранении пролиферативного потенциала.
6. Воздействие низких доз ДДТ приводит к изменениям цитокинового профиля, коррелирующим с морфофункциональными изменениями тимуса и селезенки, но не вызывает стойкого сдвига в балансе Th1-Th2 цитокинов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Александрян А. В. Остаточные количества хлорорганических пестицидов в пищевых продуктах в Республике Армения // Токсикологический вестник. – 2010. - № 2. - С. 25-29.
2. Брагинский Л.П. Пестициды и жизнь водоёмов // Киев: Наук, думка. - 1972. - 236 с.
3. Виевский Н.А. Сравнительная характеристика аллергенного действия некоторых пестицидов в эксперименте // Врачебное дело. — 1974. - №5.- С. 126-130.
4. Гигиенические нормативы содержания пестицидов в объектах окружающей среды (перечень) // ГН 1.1.546-96. Госкомсанэпиднадзор РФ.- М.: Минздрав РФ. - 1997. - 51 с.
5. Гигиенические требования безопасности и пищевой ценности пищевых продуктов // СанПин 2.3.2.1078-01. – 2008.
6. Гичев Ю. П. Здоровье человека как индикатор экологического риска индустриальных регионов // Вестн. Рос. АМН. – 1995. - №8. - С. 52-54.
7. ГОСТ Р. 51209-98 Вода питьевая. Метод определения содержания хлорорганических пестицидов газожидкостной хроматографией // М.: Изд-во стандартов. - 1998.
8. Гравель И.В. Оценка перехода ДДТ и его метаболитов в жидкие экстракты и настойки из лекарственного растительного сырья // Традиционная медицина. - 2005. - № 1. - С.28-31.
9. Гриффин Дж., Охеда С. Физиология эндокринной системы; пер. с англ. // М.: Бином. Лаборатория знаний. - 2010. - 496с.
10. Демиденко Н.М., Журавлева Р.А. Изменения лимфоидной ткани при воздействии некоторыми пестицидами // Тез. докл. 7-го Всесоюзн. съезда патологоанатомов. Ташкент: Медицина. - 1983. - С. 127-128.
11. ДДТ и его производные. Совмест. изд. Progr. ООН по окружающей среде // Междунар. орг. труда и ВОЗ: Пер. с англ – 1973.

12. ДДТ и его производные. Совмест. изд. Прогр. ООН по окружающей среде // Междунар. орг. труда и ВОЗ: Пер. с англ – 1982.
13. ДДТ и его производные. Экологические аспекты. Совмест. изд. Прогр. ООН по окружающей среде // Междунар. орг. труда и ВОЗ : Пер. с англ – 1991.
14. Демченко В.Ф., Клисенко М.А., Заец Е.Р. Новые данные пилотных исследований загрязнения стойкими хлорорганическими пестицидами грудного молока жительниц Украины // Актуальные проблемы экогигиены и токсикологии. Киев. - 1998. С. 86-85.
15. Единая государственная система информации об обстановке в мировом океане // Федеральная целевая программа «Мировой океан» - 2004.
16. Захаренко В. А. Экономические и экологические проблемы использования пестицидов // Защита растений. М. 1995. - № 3. - с. 6-7.
17. Инструкция по правилам поведения сотрудников НИИ Морфологии РАМН в помещениях лабораторий // НИИ Морфологии РАМН, 2005 г.
18. Каган Ю.С. Общая токсикология пестицидов // Киев: Здоровье. – 1981.
19. Кетлинский С.А., Симбирцев А.С. Цитокины // СПб, Изд. «Фолиант». – 2008. – С.268-269.
20. Ланин Д. В., Зайцева Н. В., Долгих О. В. Молекулярные основы действия и иммуномодулирующие эффекты глюкокортикоидных гормонов. // Иммунология. – 2010. - №6. – С.334-337.
21. Медведь Л.И. Справочник по пестицидам // Киев: Урожай. - 1977. – 350с.
22. Меерсон Ф. З. Общий механизм адаптации и профилактики // М.: Наука, 1973. — 360 с
23. Мельников Н.Н., Новожилов К.В., Белан С.Р., Пылова Т.Н. Справочник по пестицидам. М.: Химия, 1985. – 352 с.
24. Методологический аспект комплексной оценки экологической емкости территорий // Вестник ИрГТУ – Иркутск. – 2007. – 233с.

25. Молдавская А.А., Долин А.В. Морфологические критерии строения селезенки в постнатальном онтогенезе // Успехи современного естествознания. – 2009. – № 2. – С. 15–18.
26. Москвитина Н.С., Падеров Ю.М., Прочая О.А. Морфологическое изучение селезенки грызунов в системе экологического мониторинга // Актуальные вопросы экспериментальной морфологии. Сб. науч. трудов. – Томск. – 1999. – С. 139-141.
27. Моталов В.Г. Структурно - функциональная характеристика и закономерности морфогенеза селезенки человека в постнатальном онтогенезе // дис. –Москва. - 2002. С. 263-293.
28. Пестициды: общие вопросы, хранение и использование в Республике Таджикистан // Тадж. – 2008. - 63с.
29. Поллак Дж. М., Блум С.Р. Пептидергическая иннервация желудочно-кишечного тракта // Под ред. М. Гроссмана.- М.: Медицина. 1981.- С.31-53.
30. Рахмилевич А.Л., Обернихин С.С. Усиление чувствительности клеток селезенки мышей к интерлейкину-2 после внутреннего введения конкана-валина А // Иммунология. 1990. - №1. - С.68-69.
31. Ревич Б.А., Спирин В.Ф. и др. Оценка загрязнения стойкими органическими загрязнителями куриных яиц в различных регионах России // Москва. – 2005. – 98 с.
32. Рябикина А.И. и др. Гистофизиология Т-клеточных компартментов белой пульпы селезенки в возрастном аспекте // Современные наукоёмкие технологии - 2008. - №2. - С.51-52.
33. Сапин М.Р., Самойлов М.В. Лимфоидные образования селезенки у людей разного возраста.// Архив анат., гистол. и эмбриол.- 1980 - Т. 94, №2. - С.35-40.
34. Селье Г. Очерки об адаптационном синдроме // М.: Медгиз. – 1960 – 352 с.
35. Сербин М. Е., Щербак Е. В. Апоптоз и его молекулярные эффекторы // Актуальные проблемы биологии, медицины и экологии : Сборник. Под редакцией проф., д.м. н. Н. Н. Ильинских. — Томск. - 2004. – 125с.

36. Сперанский В.В. Влияние инсектицидов на иммунологическую реактивность животных // Автореферат дис. докт. вет. наук. - СПб. - 1993. - 47с.
37. Сумбаев В.В. *In vitro* влияние кортикостероидов, ДДТ и 4,9-дихлордифенилдиоксида на активность ксантиноксидазы печени крыс. Обратная зависимость активности ксантиноксидазы и количества цитохрома Р450 в печени крыс *in vivo* // Биохимия. – 2000 - Т.65. - №8. - С. 1146-1150.
38. Ткаченко Б.И. Основы физиологии человека // Учебник для высших учебных заведений, в 2-х томах. - СПб., - 1994. - Т.1 - 567с, Т.2 - 413 с.
39. Турусов В.С., Ракитский В.Н., Томатис Л. Дихлордифенилтрихлорэтан (ДДТ) и его метаболиты: гормономиметические и канцерогенные свойства // Вопросы онкологии: Научно-практический журнал. - 2003. - Т.49. - №3. - С. 257-260.
40. Харченко В.П., Саркисов Д.С, Ветшев П.С и др. Болезни вилочковой железы. // М.: «Триада-Х». – 1998. - 232 с.
41. Цыденова О.В., Батоев В.Б., Вайсфлог Л., Венцель К.-Д. Загрязнение бассейна озера Байкал: хлорорганические пестициды // Химия в интересах устойчивого развития. - 2003. - Т. 11. - 349-352.
42. Шаблинская А. В., Антиоксиданты как защитные средства при длительном воздействии пестицидов // Актуальные проблемы профессиональной и экологической патологии. – 1994. - С. 211-212.
43. Щебенцовская О.Н. Морфофункциональное состояние органов иммунной системы крыс и кур при применении раствора натрия гипохлорита на фоне Т-2 токсикоза // Белоцерковский ГАУ. - Белая Церковь, 2008. - 23 с.
44. Яглова Н. В., Обернихин С. С. Влияние активации иммунной системы материнского организма в ранние сроки беременности на постнатальный морфогенез органов иммунной системы потомства // Проблемы репродукции - 2013. - Т.19. - №1. - С.73-77.
45. Яглова Н.В., Яглов В.В. Изменения тиреоидного статуса крыс при длительном воздействии низких доз дихлордифенилтрихлорэтана // Бюллетень

- экспериментальной биологии и медицины. - 2013. - Т.156. - №12. - С.720-722.
46. Яглова Н.В., Яглов В.В. Эндокринные дизрапторы - новое направление исследований в эндокринологии // Вестник Российской академии медицинских наук. - 2012. - № 3. - С. 56-61.
 47. Ярилин А.А. Апоптоз и его место в иммунных процессах // Иммунология. - 1996. - №6. - С. 10-23.
 48. Ярилин А.А. Возрастные изменения тимуса и Т-лимфоцитов. // Иммунология. - 2003. - №2. - С. 117-127.
 49. Ярилин А.А. Цитокины в тимусе. Биологическая активность и функции цитокинов в тимусе. // Цитокины и воспаление. - 2003. - Т.2. - №2. - С.3-11.
 50. Albane E., Eglinton G., Evans N., Hunter J.M. Distributions and fate of chlorinated pesticides, biomarkers and polycyclic aromatic hydrocarbons in sediments along a contamination gradient from a point-source in San Francisco Bay, California // Environ. Sci. Technol. – 1972. - Vol.6. - P.914.
 51. Amer S., Fahmy M., Donya S.. Cytogenetic effect of some insecticides in mouse spleen. // J Appl Toxicol. – 1996. - Vol.16. – P.1-3.
 52. Andersen A., Kasperlik-Zaluska A., Warren D., Determination of mitotane (o,p-DDD) and its metabolites o,p-DDA and o,p-DDE in plasma by high-performance liquid chromatography. Ther.Drug Monit. - 1999. - Vol.21. - P.355-359.
 53. Asp V., Ulleras E., Lindstrom V., Bergstrom U., Oskarsson A., Brandt I. Biphasic hormonal responses to the adrenocorticolytic DDT metabolite 3-methylsulfonyl-DDE in human cells. // Toxicol. Appl. Pharmacol. – 2010. – Vol.242. – N.3. – P.281-289.
 54. Attaran A., Maharaj R. DDT for malaria control should not be banned // Brit. Med. J. - 2000. - Vol. 321, - P. 1403-1404.
 55. Bachman M., Keller J., West K., Jensen B. Persistent organic pollutant concentrations in blubber of 16 species of cetaceans stranded in the Pacific Islands from 1997 through 2011 // Sci Total Environ. – 2014. - Vol.9. – P.115-123.

56. Banerjee B. Effects of sub-chronic DDT exposure on humoral and cell-mediated immune responses in Albino rats // Bulletin of the Environmental Contamination and Toxicology. 1987. - Vol. 39. - № 5. - P. 827-834.
57. Banerjee B., Koner B., Ray A. Influence of stress on DDT-induced humoral immune responsiveness in mice // Environ Res.- 1997.- Vol.74.- №1.- P.43-47.
58. Beard J. DDT and human health // Sci. Total Environ. - 2006. – Vol. 355. - №1 – P.78-89.
59. Benson W., Gabica J., Beecham J. Pesticide and mercury levels in bear // Bull. environ. Contam. Toxicol. – 1974. - Vol.11. - P.1-4.
60. Benson W.W., Smith P. Pesticide levels in deer // Bull. environ. Contam. Toxicol. – 1972. - Vol.8. - P.1-9.
61. Bidleman T., Matthews J., Olney C., Separation of polychlorinated biphenyls, chlordane, and p,p'-DDD from toxaphene by silicic acid column chromatography // J.Assoc.Off.Anal.Chem. - 1978. - Vol.61. - P.820-828.
62. Biessmann A., Faber H. Effects of DDT and its metabolites on the adrenal gland of Japanese quail // Environmental Pollution. Series A, Ecological and Biological. – 1981. - Vol.25. – P. 99-104.
63. Blus L. Short-tailed shrews: toxicity and residue relationships of DDT, dieldrin and endrin // Arch. environ. Contam. Toxicol. – 1978. - Vol.7. - P.83-98.
64. Bornman, M., Pretorius, E., Marx, J., Smit, E., Van Der Merwe, C. Ultrastructural effects of DDT, DDD, and DDE on neural cells of the chicken embryo model // Environmental Toxicology. – 2007. - Vol.22. - №3. - P. 328-336.
65. Bouwman H., Booyens P., Govender D., Pienaar D., Polder A. Chlorinated, brominated, and fluorinated organic pollutants in Nile crocodile eggs from the Kruger National Park, South Africa // Ecotoxicol Environ Saf. - 2014. – Vol.104. – P. 393-402.
66. Braham H., Neal C. The effects of DDT on energetics of the short-tailed shrew, *Blarina brevicauda* // Bull. environ. Contam. Toxicol. – 1974. - Vol.12. - P.32-37.

67. Brauner E., Sorensen M., Gaudreau E. A Prospective Study of Organochlorines in Adipose Tissue and Risk of Non-Hodgkin Lymphoma. // *Environ Health Perspect.* - 2012 January. – V.120, N.1, - P. 105–111.
68. Capen C.C. Mechanisms of chemical injury of thyroid gland // *Prog. Clin. Biol. Res.* – 1994. - Vol.387. – P.173-191.
69. Castellanos C., Sorvik I., Tanum M., Verhaegen S., Brandt .I, Ropstad E. Differential effects of the persistent DDT metabolite methylsulfonyl-DDE in nonstimulated and LH-stimulated neonatal porcine Leydig cells // *Toxicol Appl Pharmacol.* 2013 – Vol.267 - №3 - P.247-255.
70. Cárdenas-González M., Gaspar-Ramírez O., Pérez-Vázquez F., Alegría-Torres J., González-Amaro R., Pérez-Maldonado I. p,p'-DDE, a DDT metabolite, induces proinflammatory molecules in human peripheral blood mononuclear cells "in vitro" // *Exp Toxicol Pathol.* - 2013. - Vol.6 – №5. – P.661-665.
71. Chen A, Rogan W. Nonmalarial infant deaths and DDT use for malaria control // *Emerging Infect.* 2003. - Vol.9. - №8. - P. 960–964.
72. Cheng H., Lin T., Zhang G., Liu G., Zhang W., Qi S., Jones K., Zhang X. DDTs and HCHs in sediment cores from the Tibetan Plateau // *Chemosphere.* – 2014. - Vol.94. – P.183-189.
73. Clark D., Roll J. Effects of DDE on experimentally poisoned free-tailed bats (*Tadarida brasiliensis*): lethal brain concentrations // *Toxicol. environ. Health.* – 1977. - Vol.3. - P.893-901.
74. Codru N., Schymura M., Negoita S., Diabetes in Relation to Serum Levels of Polychlorinated Biphenyls and Chlorinated Pesticides in Adult Native Americans. // *Environ. Health Perspect.* – 2007. - Vol.48. - P.120.
75. Colborn T., vom Saal F., Soto A. Development effects of endocrine-disrupting chemicals in wildlife and humans. // *Environ. Health Perspect.* – 1993. – Vol.101. – №5. – P.378-384.
76. Cooper G., Martin S., Longnecker M. Associations between plasma DDE levels and immunologic measures in African-American farmers in North Carolina. // *Environ Health Perspect.* - 2004. - Vol.112. - P.1080-1084.

77. Cox Sh., Niskar A., Narayan K., Marcus M. Prevalence of Self-Reported Diabetes and Exposure to Organochlorine Pesticides among Mexican Americans: Hispanic Health and Nutrition Examination Survey, 1982–1984 // *Environ. Health Perspect.* – 2007. - T.12. - Vol.115. - P.1747-1752.
78. Cupul-Uicab L., Gladen B., Hernández-Avila M., Weber J., Longnecker M., DDE, a Degradation Product of DDT, and Duration of Lactation in a Highly Exposed Area of Mexico // *Environ. Health Perspect.* – 2008. - Vol.116 - №2. – P.179-183.
79. Daniel V., Huber W., Bauer K. Associations of dichlorodiphenyltrichloroethane (DDT) 4.4 and dichlorodiphenyldichloroethylene (DDE) 4.4 blood levels with plasma IL-4. // *Arch Environ Health.* – 2002. - Vol. 57. - №6. – P.541-547.
80. DDT in Eggs. International POPs Elimination Project (IPEP) // Report, Prague 2006
81. Dewwailly E., Ayotte P., Bruneau S. et al. Susceptibility to infections and immune status in Inuit infants exposed to organochlorines // *Environ Health Perspect.* - 2000. - Vol.108. - P.205-211.
82. Dimond J., Sherburne J. Persistence of DDT in wild populations of small mammals // *Journal of Toxicology and Environmental.* – 1969. - Vol.34. - P.495-507.
83. Driessen P. Concern over excessive DDT use in Jiribam fields // *The Imphal Free Press.* - 2008. - Vol.17. - P.128.
84. Dutta R., Mondal A., Arora V., Nag T., Das N. Immunomodulatory effect of DDT (bis[4-chlorophenyl]-1,1,1- trichloroethane) on complement system and macrophages // *Toxicology.* – 2008. - Vol.84. - №12. – P.957–966.
85. El-Gawish R., Ghanem M., Maeda T. Low doses of bisphenol A and o, p'- DDT at early stage of life delayed sexual maturity in female Japanese quail // *Livestock Research for Rural Development.* – 2008. - Vol.20. - P.11.
86. El-Gawish R., Ghanem, M., Maeda T. Effects of low doses of bisphenol A and o, p'- DDT on reproductive function of posthatching male Japanese quail // *Toxicological and Environmental Chemistry.* – 2008. - Vol.90. – P.1099-1107.
87. Eskenazi B. DDT «link» to slow child progress // BBC. Retrieved 2006-07-05.

88. Ferriman A. Attempts to ban DDT have had tragic consequences // Brit. Med. J. – 2001. - Vol.322, P.1270.
89. Forsyth D., Peterle T. Species and age differences in accumulation of ³⁶Cl-DDT by voles and Shrews in the field // Environmental Pollution Series A, Ecological and Biological. – 1984. - Vol.33. - P.327-340.
90. French R., Broussard S., Meier W. Age-associated loss of bone marrow hematopoietic cells is reversed by GH and accompanies thymic reconstitution // Endocrinology. – 2002. - Vol.143. – P.690-699.
91. Gabliks J. DDT and immunological responses // Arch. Environ. Health. -1973. - Vol.26. - №6. - P.305-312.
92. Geluso K., Altenbach J., Wilson D. Bat mortality: pesticide poisoning and migratory stress // Science. – 1976. - Vol.194. - P.184-186.
93. Geric M., Ceraj-Ceric N., Gajski G. Cytogenetic status of human lymphocytes after exposure to low concentrations of p,p-DDT, and its methabolites (p,p-DDE, and p,p-DDD) in vitro. // Chemosphere. – 2012. – V.87. - №11. – P.1288-1294.
94. Greenstein B., Fitzpatrick F., Adcock I., Kendall M., Wheeler M. Reappearance of the thymus in old male rats after orchidectomy: Inhibition of regeneration by testosterone // Endocrinol. - 1986. - Vol.110. - P.417–422.
95. Harley K., Marks A., Bradman A, Barr D., Eskenazi B. DDT Exposure, Work in Agriculture, and Time to Pregnancy Among Farmworkers in California // J. Occup. Environ. Med. – 2008. - Vol.50. - №12. – P.1335–1342.
96. Hoffman D., Mattox V. Treatment of adrenocortical carcinoma with o,p'-DDT. // Med. Clin. North. Am. – 1972. – Vol.56. – №4. – P.999-1012.
97. Jefferies D. Organochlorine insecticide residues in British bats and their significance // J. Zool. – 1972. - Vol.166. - P.245-263.
98. Jefferies D., French M. Avian thyroid: effect of p p-DDT on size and activity // Science. – 1969. - Vol.166. - P.1278.
99. Jones Oliver A., Maguire M., Griffin J. Environmental pollution and diabetes: a neglected association // Lancet. - 2008. - Vol.371. - №9. - P.287-288.

100. Jin X., Chen M., Song L., Li H., Li Z. The evaluation of p,p'-DDT exposure on cell adhesion of hepatocellular carcinoma // *Toxicology*. - 2014. - Vol.8. - №4. - P.54-59.
101. Kabula B., Tungu P., Malima R., Rowland M., Minja J., Wililo R., Ramsan M., McElroy P.D., Kafuko J., Kulkarni M., Protopopoff N., Magesa S., Mosha F., Kisinza W. Distribution and spread of pyrethroid and DDT resistance among the *Anopheles gambiae* complex in Tanzania // *Med Vet Entomol*. - 2013 - Vol.5. - P.113-116.
102. Kannan K., Sharma J. Defective lymphocyte transformation by DDT in vitro responsiveness of rabbit peripheral blood lymphocytes to PHA // *Indian. J. Exp. Biol.* -1979. - Vol. 17. - №8. -P.805-806.
103. Karmaus W., Brooks K., Nebe T., Witten J., Obi-Osius N., Kruse H. Immune function biomarkers in children exposed to lead and organochlorine compounds: a cross-sectional study. // *Environ. Health*. – 2005. – Vol.14. – №1. – P.5.
104. Kwekel J., Forgacs A., Williams K., Zacharewski T. o-p'-DDT-mediated uterotrophy and gene expression in immature C57BL/6 mice and Sprague-Dawley rats // *Toxicol Appl Pharmacol*. – 2013. - Vol.273 - №3. – P.532-541.
105. Luckens M., Davis W. Bats: sensitivity to DDT // *Science*. – 1964. - Vol.146. - P.948.
106. Moriarty F. Influence of cuticle structure and hypodermal cells on DDT absorption by *Phormia terraenovae* // *Insect Physiol*. – 1968. - Vol.11. - P.683-694.
107. Mosmann T., Sad S. The expanding universe of T-cell subsets: Th1, Th2 and more. // *Immunol. Today*. – 1996. – Vol.17. – №3. – P.138-146.
108. National Toxicology Program's report of the endocrine disruptors low dose peer review. Research Triangle Park, NC: National Institute of Environmental Health Sciences // *National Toxicology Program*. - 2001
109. Ndebele K., Tchounwou P., McMurray R. Coumestrol, bisphenol A, DDT, and TCDD modulation of interleukin-2 expression in activated CD4⁺ Jurkat T cells. // *Int. J. Environ. Res. Public Health*. – 2004. – Vol.1. – №1. – P.3-11.

110. Palanza P., Parmigiani S. , Liu H., Saal F. Prenatal exposure to low doses of the estrogenic chemicals diethylstilbestrol and o,p'-DDT alters aggressive behavior of male and female house mice // *Pharmacology Biochemistry and Behavior.* - 1999. - Vol.64. - №4. - P.665-672.
111. Pérez-Maldonado I., Athanasiadou M., Yáñez L., González-Amaro R., Bergman A., Díaz-Barriga F. DDE-induced apoptosis in children exposed to the DDT metabolite // *Sci Total Environ.* – 2006. - Vol.370. – P.343–351.
112. Porter B., Malek T. Thymic and intestinal T lymphocyte development are each regulated by γ (c)-dependent cytokines IL-2, IL-7, and IL-15. // *Semin. Immunol.* – 2000. – Vol.12. – P.465-474.
113. Quality Assurance of Information in Marine Environmental monitoring Laboratory Performance Studies. Year 9: June 2004 - May 2005. -2004. - №1. – 49 P.
114. Rehana T., Rao P. Effect of DDT on the immune system in Swiss albino mice during adult and perinatal exposure: Humoral responses // *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology.* - 1992. - №48. - P. 535-540.
115. Report of the Third Expert Group Meeting on DDT // *Stockholm Convention on Persistent Organic Pollutants.* – 12 November 2010.
116. Reya T., Bassiri H., Biancaniello R., Carding S. Thymic stromal cells abnormalities and dysregulated T-cell development in IL-2-deficient mice // *Dev. Immunol.* – 1998. – Vol.5. – P.287-302.
117. Roberts D., Curtis C., Tren R., Sharp B., Shiff C., Bate R. Malaria control and public health // *Emerg Infect Dis.* – 2004. – Vol.10. - №6. - P.1170-1171.
118. Sadasivaiah Sh., Tozan Y., Breman J. Dichlorodiphenyltrichloroethane (DDT) for Indoor Residual Spraying in Africa: How Can It Be Used for Malaria Control // *Environ. Health Perspect.* – 2008. - Vol.109. - P.265.
119. Sagiv S.K., Nugent J.K., Brazelton T.B. Prenatal organochlorine exposure and measures of behavior in infancy using the Neonatal Behavioral Assessment Scale (NBAS) // *Environ. Health Perspect.* – 2008. – Vol.116. - №5. – P.666–673.

120. Scribner J., Mottet N. DDT acceleration of mammary gland tumors in the male Sprague-Dawley rat by 2-acetylaminodiphenylmethane // *Carcinogenesis*. – 1981. – Vol. 2. – P. 1235-1239.
121. Scudeletti M., Muselli C., Lanza L., Peirano L., Puppo F., Indiveri F. The immunological activity of corticosteroids. // *Recenti Prog. Med.* – 1996. – Vol.87. – №10. – P.508-515.
122. Semb S.I., Brevik E.M., Pedersen-Bjergaard S., Capillary gas chromatography combined with atomic emission detection for the analysis of DDT and metabolites // *Chemosphere*. - 1998. - Vol.36. - P.213-224.
123. Shanley D., Aw D., Manley N., Palmer D. An evolutionary perspective on the mechanisms of immunosenescence // *Trends in immunology*. – 2009. – Vol.30. - №7. – P.374-381.
124. Shin Y., Chodan J., Wolcott A. Adsorption of DDT by soils, soil fractions and biological materials // *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. – 1970. - Vol.18. - P.1129-1133.
125. Shutoh Y., Takeda M., Ohtsuka R. Low dose effects of dichlorodiphenyltrichloroethane (DDT) on gene transcription and DNA methylation in the hypothalamus of young male rats: Implication of hormesis-like effects // *Journal of Toxicological Sciences*. – 2009. – Vol.34. - №5. – P.469-482.
126. Stuetz W., Prapamontol T., Erhardt J., Classen H. Organochlorine pesticide residues in human milk of a hill tribe living in Northern Thailand // *Sci. Total Environ.* - 2001. - Vol.273. - P.53-60.
127. Sunyer J., Garcia-Esteban R., Alvarez M. DDE in mothers' blood during pregnancy and lower respiratory tract infections in their infants // *Epidemiology*. – 2010. – Vol.21(5). – P.729-735.
128. Tebourbi O., Driss M., Sakly M. Part B Pesticides, Food Contaminants, and Agricultural Wastes // *Journal of Environmental Science and Health March*. - 2006. - Vol.41, №2. - P.167-176.
129. Tebourbi O., Rhouma K., Sakly M. DDT induces apoptosis in rat thymocytes // *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* - 1998. – Vol.61. - P.216-223.

130. Tomatis L., Turusov V. Studies on the carcinogenicity of DDT // Gann Monogr. – 1975. - Vol.17. - P.219-241.
131. Tomita M., Yoshida T., Fukumori J., Yamaguchi S., Kojima S., Fukuyama T., Ohnuma-Koyama A., Takahashi N., Takeuchi-Kashimoto Y., Kuwahara M., Nakashima N., Ohtsuka R., Takeda M., Kosaka T., Harada T. p,p'-DDT induces microcytic anemia in rats // J Toxicol Sci. – 2013. – Vol.38. - №5. – P.775-782.
132. Turyk M. Organochlorine Exposure and Incidence of Diabetes in a Cohort of Great Lakes Sport Fish Consumers // Environ. Health Perspect. – 2009. - Vol.3. - P.17.
133. Udoji F., Martin T., Etherton R., Whalen M.M. Immunosuppressive effects of triclosan, nonylphenol, and DDT on human natural killer cells in vitro. // J Immunotoxicol. – 2010. – Vol.7. - №3. – P.205-212.
134. Vall O., Gomez-Culebras M., Puig C., Rodriguez-Carrasco E., Gomez Baltazar A., Canchucaja L., Joya X., Garcia-Algar O. Prenatal and postnatal exposure to DDT by breast milk analysis in Canary Islands // PLoS One. – 2014. - Vol.9. – №1. – P.830-831.
135. Vandenberg L., Colborn T., Hayes T., Heindel J., Jacobs D., Duk-Hee L., Shi-oda T., Soto A., Saal F., Welshons W., Zoeller R., Myers J. Hormones and Endocrine-Disrupting Chemicals: Low-Dose Effects and Nonmonotonic Dose Responses // Endocrine Reviews. – 2012. - Vol. 33. – P.378–455.
136. Velasco A., Hernández S., Ramírez M., Ortiz I. Detection of residual organochlorine and organophosphorus pesticides in agricultural soil in Rio Verde region of San Luis Potosi, Mexico // J Environ Sci Health B. – 2014. – Vol.49. -№7. – P.498-504.
137. Venners S., Korrick S., Xu X. Preconception serum DDT and pregnancy loss: a prospective study using a biomarker of pregnancy // Am. J. Epidemiol. – 2005. - Vol.162. - №8. - P.709-716.
138. Webster J., Tonelli L., Sternberg E. Neuroendocrine regulation of immunity // Annu. Rev. Immunol. – 2002. – Vol.20. – P.125-163.

139. Weiss B. Endocrine disruptors as a threat to neurological function // J Neurol Sci. – 2011. – Vol.305. - №2. – P.11-21.
140. Wheatley G., Hardman J. Factors governing the toxicity of DDT dust deposits to the pea aphid // Annals of Applied Biology. – 1965. - Vol. 44. - P.200-210.
141. WHO gives indoor use of DDT a clean bill of health for controlling malaria // WHO. – 2008. - Vol.16. - P.3
142. William E. Fundamental Immunology // Lippincott Williams & Wilkins. – 2008. – 1584 P.
143. Zetler G. The peptidiergic neuron – a working hepothesis // Biochem. Pharmacol. - 1978. – Vol. 25. – P.1817-1818.
144. Zhuang S., Zhang J., Wen Y., Zhang C., Liu W. Distinct mechanisms of endocrine disruption of DDT-related pesticides toward estrogen receptor α and estrogen-related receptor γ // Environ Toxicol Chem. – 2012. – Vol.31. - №11. P.2597-2605.
145. Zhulidov A., Robarts R., Headley J., Liber K., Zhulidov D., Zhulidova O., Pavlov D. Levels of DDT and hexachlorocyclohexane in burbot (*Lota lota* L.) from Russian Arctic rivers// Sci. Total Environ. - 2002. – Vol.292. -P.231-246.