

Дорджиева Джиргала Евгеньевна

**ВЛИЯНИЕ ПОЛИОКСИДОНИЯ ПРИ ПРИМЕНЕНИИ В РАЗЛИЧНЫХ
ДОЗАХ И КОМБИНАЦИИ С ДИМЕФОСФОНОМ И НАТРИЯ
АДЕНОЗИНТРИФОСФАТОМ НА МОРФОФУНКЦИОНАЛЬНОЕ
СОСТОЯНИЕ ОРГАНИЗМА ЛАБОРАТОРНЫХ ЖИВОТНЫХ**

06.02.03 – ветеринарная фармакология и токсикология

Автореферат
диссертации на соискание ученой степени
кандидата ветеринарных наук

Работа выполнена в федеральном государственном бюджетном образовательном учреждении высшего образования «Казанская государственная академия ветеринарной медицины имени Н.Э. Баумана»

- Научный руководитель:** доктор биологических наук
Усенко Виктор Иванович
- Официальные оппоненты:** **Уразаев Дмитрий Николаевич** – доктор ветеринарных наук, профессор, профессор кафедры физиологии, фармакологии и токсикологии имени А.Н. Голикова и И.Е. Мозгова ФГБОУ ВО «Московская государственная академия ветеринарной медицины и биотехнологии – МВА имени К.И. Скрябина»
Савинков Алексей Владимирович – доктор ветеринарных наук, доцент, заведующий кафедрой эпизоотологии, патологии и фармакологии ФГБОУ ВО «Самарская государственная сельскохозяйственная академия»
- Ведущая организация:** ФГБОУ ВО «Санкт-Петербургская государственная академия ветеринарной медицины»

Защита диссертации состоится «8» декабря 2017 года в «13⁰⁰» часов на заседании диссертационного совета Д 220.034.02 при ФГБОУ ВО «Казанская государственная академия ветеринарной медицины имени Н.Э. Баумана» по адресу: 420029, г. Казань, Сибирский тракт, 35.

диссертацией можно ознакомиться в библиотеке ФГБОУ ВО «Казанская государственная академия ветеринарной медицины имени Н.Э. Баумана» и на сайтах <http://www.vak.ed.gov.ru> и www.ksavm.senet.ru

Автореферат разослан « ____ » _____ 2017 года

Ученый секретарь
диссертационного совета

Р.Я. Гильмутдинов

1 ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы исследования. Необходимым условием развития животноводства в стране является его лекарственная обеспеченность эффективными средствами, позволяющими проводить лечебно-профилактические мероприятия на современном уровне. Значительное место в этих мероприятиях занимают препараты, влияющие на иммунную систему животных. Любой иммуномодулятор, специфически действующий на какое-либо звено иммунной системы, одновременно будет действовать и на ее другие составные части (Алексеев Л.П. Регуляторная роль иммунной системы в организме / Л.П. Алексеев, Р.М. Хаитов // Рос. физиологический журнал им. И.М. Сеченова, 2010. Т.96, N8. С.787-805). Известно также, что один и тот же иммуномодулятор в зависимости от дозы и способа введения способен оказывать на иммунную систему либо стимулирующее действие, либо угнетать ее (Романцов М.Г. Противовирусные и иммуностропные препараты в детской практике / М.Г. Романцов, Л.Г. Горячева, А.Л. Коваленко. СПб, 2009. 352 с.).

Применение при лечении животных малых доз препаратов способно обеспечить менее выраженную токсичность сильнодействующих веществ и значительно уменьшить их содержание в конечных продуктах животноводства, потребляемых населением. Кроме того, применение малых доз препаратов способно снизить возможность развития побочных эффектов от их применения (Подколзин А.А. Закономерности действия биологически активных веществ в малых дозах / А.А. Подколзин, К.Г. Гуревич, М.: Изд-во КМК, 2002. 170 с.).

Лекарственные средства, полученные с помощью нанотехнологий, имеют свои преимущества в оказываемом действии на организм и поиск таких новых препаратов и способов введения активно продолжается не только в нашей стране, но и за рубежом (Балабанов В.И. Нанотехнологии: наука будущего / В.И. Балабанов. М.: Эксмо, 2009. 247с.; Шимановский Н.Л. Молекулярная нанофармакология / Н.Л. Шимановский, М.А. Епинетов, М.Я. Мельников. М.: ФИЗМАТЛИТ, 2010. 624с.). Разработка новых лекарственных средств, методов их использования в лечебных схемах и поиск новых подходов к применению уже известных современных лекарственных препаратов при отдельном и сочетанном введении является перспективным научным направлением в ветеринарной фармакологии.

Степень разработанности темы исследования. На современном этапе достаточно много внимания уделяется разработке новых лекарственных средств и используемых в ветеринарной практике биологически активных веществ, применяемых для коррекции морфофункционального состояния иммунной системы животных и повышения ее защитных возможностей в условиях интенсификации животноводства, сопровождаемой влиянием различных стрессоров на животных. В настоящее время ветеринарная фармакология располагает значительным количеством иммуномодуляторов различной природы, в том числе микробного и растительного происхождения, пептидов, синтетических средств и др. Востребованность у ветеринарных специалистов приобретают относительно дешевые иммуномодулирующие лекарственные средства, полученные на основе химического синтеза, отличающиеся разноплановым влиянием на организм. Одним из таких лекарственных средств, которое в

последнее время успешно применяется в ветеринарной практике, является Полиоксидоний–вет.

В современных научных исследованиях последнего времени все больше внимания уделяется развитию нанофармакологии. Поэтому проведение научных исследований, которые рассматривают влияние растворов биологически активных веществ в малых и сверхмалых дозах на иммунную систему организма животных, является актуальным в современной фармакологии. Необходимость разработки новых методов применения таких лекарственных средств как полиоксидоний и димефосфон и характера их влияния в малых и сверхмалых дозах, обеспечивающих профилактический режим влияния на иммунную систему организма, и определяет цель и задачи нашего исследования.

Целью исследования является выяснение влияния малых и сверхмалых доз полиоксидония при раздельном и сочетанном введении с димефосфоном и натрия аденозинтрифосфатом по отдельности лабораторным животным после предварительного определения физико-химическими методами «активных» водных растворов этих препаратов.

При этом ставились следующие задачи:

1. На основе физико-химических методов определить «активные» концентрации водных растворов полиоксидония, димефосфона и натрия аденозинтрифосфата в динамических рядах;

2. Исследовать влияние водного раствора полиоксидония в малых и сверхмалой дозах при раздельном внутримышечном введении на морфологические, биохимические и иммунологические показатели крови лабораторных животных;

3. Изучить влияние водного раствора димефосфона в малой и сверхмалой дозах при раздельном внутримышечном введении на морфологические, биохимические и иммунологические показатели крови лабораторных животных;

4. Выяснить влияние малых доз водного раствора полиоксидония при сочетанном внутримышечном введении с таковыми димефосфона и АТФ в отдельности на морфологические, биохимические и иммунологические показатели крови лабораторных животных.

Научная новизна. С помощью современных физико-химических методов проведено определение оптимальных малых и сверхмалых концентраций полиоксидония с дальнейшим выявлением их биологической активности после применения лабораторным животным. Впервые изучено влияние водных растворов полиоксидония, димефосфона и натрия аденозинтрифосфата при раздельном применении в предлагаемых нами малых и сверхмалых дозах на организм животных. Впервые исследовано сочетанное применение полиоксидония с димефосфоном в сравнительном аспекте с его раздельным применением. Доказано воздействие полиоксидония в малых и сверхмалых дозах на морфофункциональное состояние организма лабораторных животных и его иммунной системы в частности.

Теоретическая и практическая значимость работы. Показано положительное влияние на организм крыс после применения водных растворов полиоксидония и димефосфона в малых и сверхмалых дозах, концентрации действующих веществ которых были отобраны на основе использования физико-химических методов динамического и электрофоретического светорассеяния, кондуктометрии и рН-метрии, на состояние специфической и неспецифической иммунологической защиты организма крыс. Полученные результаты могут быть использованы

ветеринарными специалистами при коррекции иммунодефицитных состояний у животных. Материалы исследований используются на различных кафедрах ФГБОУ ВО Казанская ГАВМ, Ижевская ГСХА, Самарская ГСХА и Чувашская ГСХА для организации учебного процесса при подготовке и повышении квалификации специалистов ветеринарной медицины.

Методология и методы исследования. В процессе выполнения диссертационной работы применяли физико-химические, клинико-физиологические, фармакологические, гематологические, иммунологические, биохимические и зоотехнические методы. Исследование включало группы животных (белые крысы), формируемые по принципу аналогов, использование современных измерительных приборов, определение оптимальных доз препаратов для многократного их введения малыми и сверхмалыми дозами, определение морфологического состава крови и соотношения в лейкограмме клеток разных видов, показателей клеточного и гуморального иммунитета. Подробное описание методологии и методов проведенных исследований отражено в подглаве «Материал и методы исследований».

Положения, выносимые на защиту:

1. На основе физико-химических исследований в динамических рядах определены расчетные концентрации полиоксидония, димефосфона и натрия аденозинтрифосфата, характеризующиеся как малые и сверхмалые, и произведен отбор среди них оптимальных концентраций, способных оказать положительное влияние на организм лабораторных животных.

2. Применение белым крысам водных растворов полиоксидония в малых и сверхмалой дозах характеризуется их положительным влиянием на ряд показателей крови (морфологических, биохимических и иммунологических) у лабораторных животных, при этом обеспечивается дифференцированное влияние в зависимости от этих доз на развитие микро- и макрофагального звена клеточного иммунитета.

3. Результаты применения водных растворов димефосфона в малой и сверхмалой дозах крысам и их дифференцированное влияние на отдельные морфофункциональные показатели крови в организме лабораторных животных.

4. Показана возможность и особенность сочетанного применения крысам водных растворов полиоксидония и димефосфона в малых дозах и характеристика их влияния на различные показатели крови по сравнению с отдельным введением этих препаратов.

Степень достоверности и апробация результатов работы. Научные выводы и практические предложения теоретически и экспериментально обоснованы, что подтверждается фактическими данными. Они логически вытекают из содержания работы, согласуются с поставленными целью и задачами. Основные положения и практические результаты диссертации доложены на Международной конференции «Структура воды: физические и биологические аспекты» Российская академия наук (СПб, 2013); Международной научно-практической конференции «Актуальные вопросы морфологии и биотехнологии в животноводстве», посвященной 100-летию со дня рождения проф. О.П. Стуловой (Самара, 2015); IV Всероссийской конференции с Международным участием «Современные проблемы химической науки и фармации», посвященной 80-летию со дня рождения В.В. Базыльчика (Чебоксары, 2015), Всероссийской научно – методической конференции «Аграрная наука в условиях модернизации и

инновационного развития АПК России», посвященной 85 - летию Ивановской ГСХА имени Д.К. Беляева (Иваново, 2015), Международной научной конференции студентов, аспирантов и учащейся молодежи «Современные проблемы и тенденции развития агропромышленного комплекса» (Казань, 2016); XII Всероссийской научно-практической конференции молодых ученых, аспирантов и студентов «Молодежь и инновации» (Чебоксары, 2016).

Публикация результатов исследований. Основные материалы диссертации опубликованы в 12-ти научных статьях в журналах и сборниках региональных и межвузовских научно-практических конференций, в том числе две из них в рецензируемых научных изданиях, рекомендованных ВАК РФ.

Объем и структура диссертации. Диссертация изложена на 169 страницах компьютерного текста и состоит из введения, обзора литературы, собственных исследований, включающих материалы и методы, их результатов и обсуждения в виде заключения, практических предложений, списка сокращений и условных обозначений, списка иллюстративного материала, списка использованной литературы, включающего 316 литературных источников, в том числе 77 - иностранных авторов, иллюстрирована 11 таблицами и 58 рисунками.

2 ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

2.1 МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Исследования по диссертационной работе были проведены в период с 2012 по 2015 гг. на базе кафедры фармакологии и токсикологии и кафедры анатомии, патологической анатомии и гистологии ФГБОУ ВО «Казанская государственная академия ветеринарной медицины имени Н.Э. Баумана» на основании научной тематики кафедры фармакологии и токсикологии «Фармакология и токсикология новых биологически активных соединений» номер государственной регистрации 01980002094 и программы фундаментальных исследований Президиума РАН №28 (проект № 13-03-00002).

Экспериментальные исследования проводились на 55 самцах беспородных белых крыс массой 180-200 г, содержащихся в виварии кафедры фармакологии и токсикологии, согласно зоотехнических требований. Работа проводилась в соответствии с требованием «Правил проведения работ с использованием экспериментальных животных (1977)», а контрольные и подопытные крысы получали сбалансированный по питательным веществам рацион и имели свободный доступ к питьевой воде.

При выполнении экспериментальной части работы и определения дозы для введения животным мы использовали различные методы исследования. Материалом для исследований служила кровь и ее сыворотка. Определение оптимальных малых и сверхмалых доз препаратов и экспериментальную часть работы проводили в 3 этапа по схеме, представленной в виде дизайна исследований диссертационной работы (схема проведенных исследований – рисунок 1). Этапы работы включали: 1 – изучение самоорганизации и физико-химических свойств биологически активных веществ (БАВ) препаратов и приготовление малых и сверхмалых доз водных растворов для введения животным; 2 – формирование контрольной и подопытных групп животных и введение им различных препаратов

в терапевтической, малой и сверхмалой дозах по определенной схеме; 3 – взятие крови для гематологических, морфологических, биохимических и иммунологических исследований. Водные растворы препаратов животным вводили в терапевтической, малой и сверхмалой дозах (СМД). Определение малой и СМД препаратов для лабораторных животных проводилось на основании прогнозирования концентраций растворов, при введении которых возможно максимальное проявление биоэффекта полиоксидония (ПО), димефосфона (ДФ) и натрия аденозинтрифосфата (АТФ). Поиск интервалов концентраций осуществляли с использованием методов динамического светорассеяния (ДСР), электрофореза, кондуктометрии и рН-метрии. В широкой области концентраций (1×10^{-20} – 10^{-3} мг/мл) изучались самоорганизация и физико-химические свойства растворов БАВ. При приготовлении растворов ПО, ДФ и АТФ использовали свежеприготовленную бидистиллированную воду, удельная электропроводность которой не превышала $1,5 \text{ мкСм} \cdot \text{см}^{-1}$. Растворы малых и сверхмалых доз ПО, ДФ и АТФ готовили методом последовательных десятичных разбавлений из исходных растворов препаратов. Перемешивание растворов осуществляли с помощью минишейкера «IKA Lab Dancer». Отдельные фрагменты работы были выполнены с участием д-ра хим. наук И.С. Рыжкиной, м.н.с. С.Ю. Сергеевой, за что приносим им благодарность.

СХЕМА ЭКСПЕРИМЕНТА

Предварительный анализ полиоксидония, димефосфона и АТФ с целью определения оптимальных концентраций водных растворов для применения животным

Экспериментальные исследования

ОБЪЕКТЫ ИЗУЧЕНИЯ

Наноассоциаты препаратов в дозах 1×10^{-20} – 1×10^{-3} мг/мл

Крысы, кровь, сыворотка крови, мазки крови

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Физико-химические:

- а) метод динамического светорассеяния (ДСР)
- б) метод электрофоретического рассеяния (ЭРС)
- в) метод кондуктометрии
- г) метод рН-метрии

1. Клинико-физиологические
2. Фармакологические
3. Биохимические
4. Гематологические
5. Иммунологические
6. Морфологические
7. Зоотехнические
8. Статистические

Рисунок 1 - Схема проведенных исследований

Удельную электропроводность (χ), поверхностное натяжение (σ), рН растворов измеряли на кондуктометре inoLab Cond Level 1, тензиометре Sigma 720 ET, рН-

метре inoLab pH 720 в условиях термостатирования при $25 \pm 0,1^\circ\text{C}$. Размер частиц (D, эффективный гидродинамический диаметр кинетически подвижных частиц в максимуме кривой распределения) определяли методом динамического светорассеяния на высокочувствительном анализаторе Zetasizer Nano ZS («Malvern Instruments», Великобритания).

По принципу аналогов (таблица 1) было сформировано 11 групп животных по 5 самцов в каждой из них для исследования влияния на их организм различных БАВ водных растворов ПО, АТФ и ДФ. Все использованные нами препараты для приготовления растворов включены в регистр лекарственных средств России. Первая группа животных была контрольной, II – XI группы – подопытными, которым вводили растворы в объеме 1 мл внутримышечно с внутренней поверхности бедра, разведенные в бидистиллированной воде. Контрольным животным вводили 1 мл бидистиллированной воды. Во II подопытной группе (ПО), а также при введении ДФ (VI группа) и АТФ (IX группа) определение количества вводимого препарата проводили согласно рекомендуемой дозы, отраженной в инструкциях по применению препарата (терапевтическая доза), а далее проводили ее пересчет на крысу средней массой 200 г (кг/5). В III-V подопытных группах препарат ПО вводили соответственно в виде водного раствора 1×10^{-6} мг/мл, 1×10^{-9} и 1×10^{-14} мг/мл, ДФ в VII и VIII группах соответственно в дозах 2×10^{-2} и 2×10^{-12} мг/мл. Белым крысам раствор ПО в терапевтической дозе вводили в дозе 0,1 мг/кг массы тела, АТФ – 0,2 мг/кг

Таблица 1 - Группы экспериментальных лабораторных животных, наименования препаратов и их дозы

| Группа крыс | Наименование препарата и дозы, вводимые в/м |
|-----------------|--|
| I - контрольная | Бидистиллированная вода |
| II - опытная | ПО в дозе 0,1 мг/кг массы тела (терапевтическая) |
| III - опытная | ПО в дозе 1×10^{-6} мг/мл |
| IV - опытная | ПО в дозе 1×10^{-9} мг/мл |
| V - опытная | ПО в дозе 1×10^{-14} мг/мл |
| VI - опытная | ДФ в дозе 20 мг на одно животное (терапевтическая) |
| VII - опытная | ДФ в дозе 2×10^{-2} мг/мл |
| VIII - опытная | ДФ в дозе 2×10^{-12} мг/мл |
| IX – опытная | ПО в дозе 1×10^{-6} мг/мл + ДФ в дозе 2×10^{-2} мг/мл |
| X - опытная | АТФ в дозе 0,2 мг/кг массы тела (терапевтическая) |
| XI - опытная | ПО в дозе 1×10^{-6} мг/мл + АТФ в дозе 6×10^{-4} мг/мл |

массы тела, ДФ – 20 мг одной особи. В двух последних подопытных группах белых крыс препараты вводили сочетанным способом: в X – ПО в дозе 1×10^{-6} мг/мл и ДФ – 2×10^{-2} мг/мл, в XI – ПО в дозе 1×10^{-6} мг/мл и АТФ – 6×10^{-4} мг/мл. Различные концентрации водных растворов ПО, ДФ и АТФ предварительно готовились методом последовательных серийных разбавлений с использованием бидистиллированной воды. Продолжительность опыта составляла 25 суток и включала 5 серий инъекций препарата и бидистиллированной воды последовательно через каждые 5 суток. Контрольных и подопытных животных из

опыта выводили в соответствии с требованиями Европейской конвенции по защите экспериментальных животных 86/609/ЕЕС путем обескровливания под эфирным наркозом. Взятие крови у животных для исследования осуществляли из наружной яремной вены. В процессе выполнения экспериментального исследования были использованы гематологические методы с выполнением общего анализа крови с помощью общепринятых методов, а также на автоматическом гемоанализаторе SYSMEXXS 800i. Для определения гематологических показателей в периферической крови подсчитывали количество эритроцитов ($10^{12}/л$), общее количество лейкоцитов ($10^9/л$), лейкограмму, абсолютное и относительное количество нейтрофилов, лимфоцитов и моноцитов с дальнейшим вычислением индексов: нейтрофильно-лимфоцитарного (НЛО) и нейтрофильно-моноцитарного (НМО). Содержание эритроцитов и лейкоцитов в крови подсчитывали общепринятым методом с использованием клавишного механического счетчика крови (ЗАО «ЛЮИП», СПб., 1999) и камеры Горяева после разведения образцов цельной крови 3% раствором генцианвиолета, приготовленного на 0,9%-ном растворе натрия хлорида. Лейкоцитарный профиль крови исследовали в мазках, окрашенных по Романовскому-Гимза. Концентрацию гемоглобина в крови определяли гематиновым методом Сали с помощью гемометра ГС-3, СОЭ – микрометодом Панченкова, уровень общего белка в сыворотке крови – биуретовой реакцией, а в качестве стандарта использовали препарат бычьего сывороточного альбумина. Фагоцитарную активность нейтрофилов определяли по методу С.А. Кост и М.И. Стенко (1974) *in vitro* путем инкубации цельной крови с культурой *St. aureus* и последующим цитологическим исследованием мазков инкубатов. В мазках определяли фагоцитарную активность нейтрофилов, подсчитывая количество активных фагоцитов (КАФ), фагоцитарный показатель (ФП), фагоцитарное число (ФЧ) или среднее количество поглощенных стафилококков в пересчете на один фагоцитирующий нейтрофил, абсолютный фагоцитарный показатель (АФП) или количество стафилококков, которое способны поглотить нейтрофилы, содержащиеся в 1 мкл крови (фагоцитарная емкость крови). Кроме того, с сывороткой крови экспериментальных животных проведены иммунологические исследования: определение комплемента (CH^{50}) по 50% гемолизу, сывороточных иммуноглобулинов классов А, М и G турбидиметрическим методом с использованием тест-системы «Turbiquant» (Behring, Германия) и учетом результатов на анализаторе «Turbitimer» (Behring) при длине волны 340 нм. Содержание циркулирующих иммунных комплексов (ЦИК) в сыворотке крови определяли методом осаждения в полиэтиленгликоле молекулярной массой 6000 (ПЭГ-преципитация).

Статистическую обработку полученных в опыте цифровых данных проводили методом вариационной статистики с помощью программного обеспечения «Microsoft Excel-2003». Для каждой величины определяли среднее арифметическое значение (M), среднестатистическую ошибку средней величины ($\pm m$) и достоверность разницы между средними арифметическими двух вариационных рядов по критерию достоверности Стьюдента. Полученные различия в цифровых данных считали статистически значимыми при $p < 0,05$.

2.2 РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

2.2.1 Исследование свойств водных растворов полиоксидония, димефосфона и натрия аденозинтрифосфата в широком интервале расчетных концентраций

Изучение водных растворов полиоксидония методом динамического светорассеяния (ДРС) показало, что во всех изученных нами интервалах концентраций растворов они являлись сложными дисперсными системами. Концентрация раствора полиоксидония для инъекций, приготовленных согласно инструкции, составляет 3 мг/мл. При концентрации препарата в диапазоне от 3-х до 1 мг/мл наблюдались два отдельных максимума, отвечающих за образование частиц, а размер этих частиц составлял десятки и сотни нм. Частицы размером в десятки нм представляют собой супрамолекулярные ассоциаты действующего и вспомогательных веществ, а в сотни нм - как супрамолекулярные домены, образованные структурами воды и молекулами вещества (Свойства супрамолекулярных наноассоциатов, образующихся в водных растворах низких и сверхнизких концентраций биологически активных веществ / Рыжкина И.С. [и др.] //ДАН. 2009. Т.428,№4. С.487-491). В интервале концентраций $1 \times 10^{-1} - 1 \times 10^{-8}$ мг/мл (рисунок 2а) распределение частиц в растворах приблизительно такое же, как и в растворе с концентрацией 3 мг/мл. В интервале растворов с расчетными концентрациями $1 \times 10^{-9} - 1 \times 10^{-14}$ мг/мл на кривых ДРС редко присутствуют максимумы в диапазоне десятков нм (рисунок 2б), чаще всего наблюдается мономодальное распределение по размеру частиц диаметром в сотни нм (рисунок 2 в). В зависимости от разбавления размер доминирующих частиц изменяется в интервале от 90 до 160 нм. При изучении удельной электропроводности χ и pH растворов было установлено, что по мере разбавления их значения в интервале $1 \times 10^{-1} - 1 \times 10^{-18}$ мг/мл изменяются не монотонно, что характерно для высокоразбавленных растворов БАВ, способных проявлять биоэффекты. Следует отметить, что при разбавлении раствора ПО до значений 1×10^{-6} , 1×10^{-11} , 1×10^{-14} и 1×10^{-17} мг/мл на зависимости удельной электропроводности и pH наблюдаются максимумы, которые могут сопровождаться проявлением биоэффектов в организме при этих концентрациях.

По методике, применяемой для исследования ПО, в дальнейшем были изучены и растворы ДФ и АТФ. Лекарственная форма димефосфона представляет собой 15%-ый раствор, что в пересчете на мг/мл составляет $7,2 \times 10^{-1}$. При исследовании методом ДРС водного раствора димефосфона в концентрации $7,2 \times 10^{-1}$ мг/мл, было выявлено, что в нем содержатся однородные частицы с максимумом размера в диапазоне единиц нм. Стабильно регистрируемый максимум на кривой ДРС (рисунок 3 а) предполагает наличие частиц в растворе примерно одинаковой природы, и эти частицы следует отнести к агрегатам действующего вещества, так как других отдельных максимумов, соответствующих десяткам и сотням нм на кривой ДРС не выявляется. При дальнейшем растворении исходного раствора димефосфона ($7,2 \times 10^{-1}$ мг/мл) наблюдаются три отдельных максимума, отвечающих за образование частиц, размер которых находится в пределах единиц, десятков и сотен нм (рисунок 3 б). Следовательно, эти максимумы в распределении частиц могут свидетельствовать о появлении в растворе димефосфона частиц различной природы. При анализе выявленной тримодальности на кривой ДРС следует отметить, что наряду с уже имеющимися агрегатами действующего

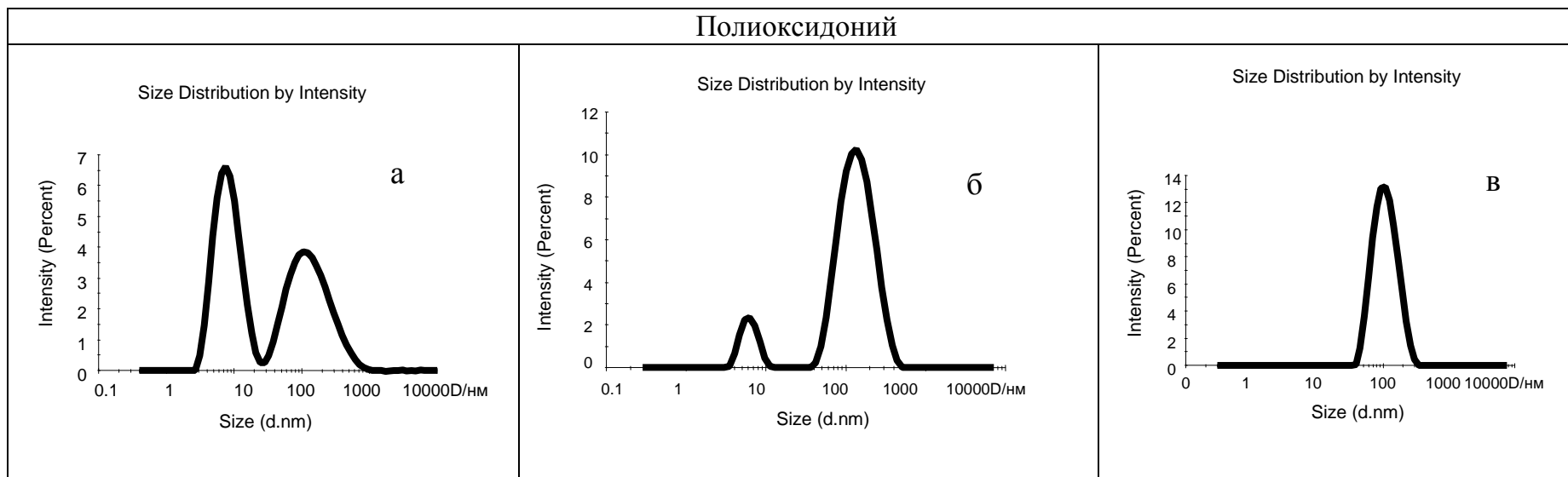


Рисунок 2 - Распределение частиц по размерам в водном растворе полиоксидония в концентрации 1×10^{-1} мг/мл (а), 1×10^{-9} мг/мл (б), 1×10^{-14} мг/мл (в), 25°C. Приведено в координатах размера частиц (нм) и интенсивности (%) рассеяния света.

11

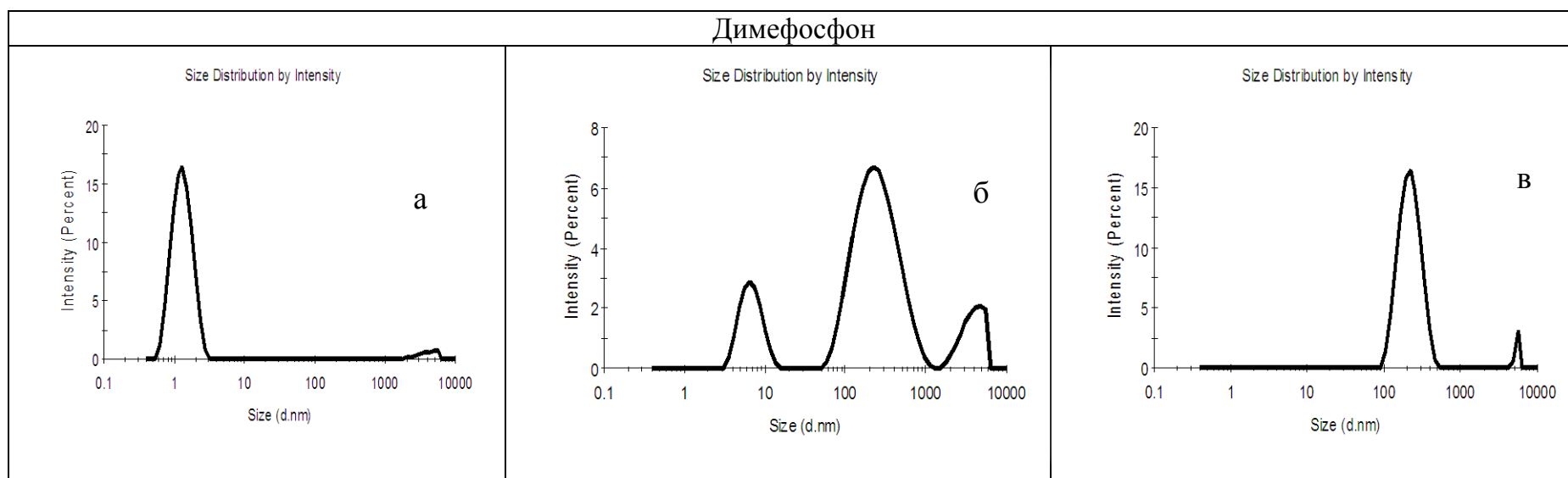


Рисунок 3 - Распределение частиц по размерам в водном растворе димефосфона в концентрации $7,2 \times 10^{-1}$ мг/мл (а), 2×10^{-2} мг/мл (б), 2×10^{-12} мг/мл (в), 25°C. Приведено в координатах размера частиц (нм) и интенсивности (%) рассеяния света.

вещества, находящегося в диапазоне единиц нм, появляются частицы в виде супрамолекулярных ассоциатов в диапазоне нескольких десятков нм, а также формируются домены размером в сотни нм, образованные молекулами растворенных веществ и структурами воды. Третий максимум на кривой более 1000 нм свидетельствует об образовании в растворе более крупных частиц, но их определение и характеристика находятся за пределами возможностей анализатора. При концентрации 2×10^{-2} мг/мл в водном растворе выявляются домены размером в сотни нм, и согласно интенсивности рассеяния света они значительно преобладают. При более высоком разбавлении раствора димефосфона (2×10^{-12} мг/мл) на кривой ДРС наблюдается мономодальное распределение по размеру частиц в сотни нм, что может свидетельствовать об образовании в растворе наноассоциатов, сформированных в основном структурами воды (рисунок 3 в).

Концентрация раствора АТФ для инъекций составляет 10 мг/мл. При исследовании с помощью физико-химических методов водного раствора АТФ в концентрации 10 мг/мл было установлено, что на кривой ДРС выявляется наличие бимодальности с частицами средним размером 1,1 и 18 нм, имеющих примерно одинаковую природу (рисунок 4 а). Эти частицы следует отнести к агрегатам действующего вещества. При дальнейшем разбавлении раствора натрия аденозинтрифосфата, предназначенного для введения животным, было установлено, что в интервале концентраций 10 мг/мл - 6×10^{-4} мг/мл происходили изменения структуры раствора, характеризующиеся мономодальным распределением частиц по размерам (рисунок 4 б). Так, на кривой ДРС выявлялись домены в несколько сотен нм со средним размером 200 нм, представляющие действующее вещество препарата и структуры воды.

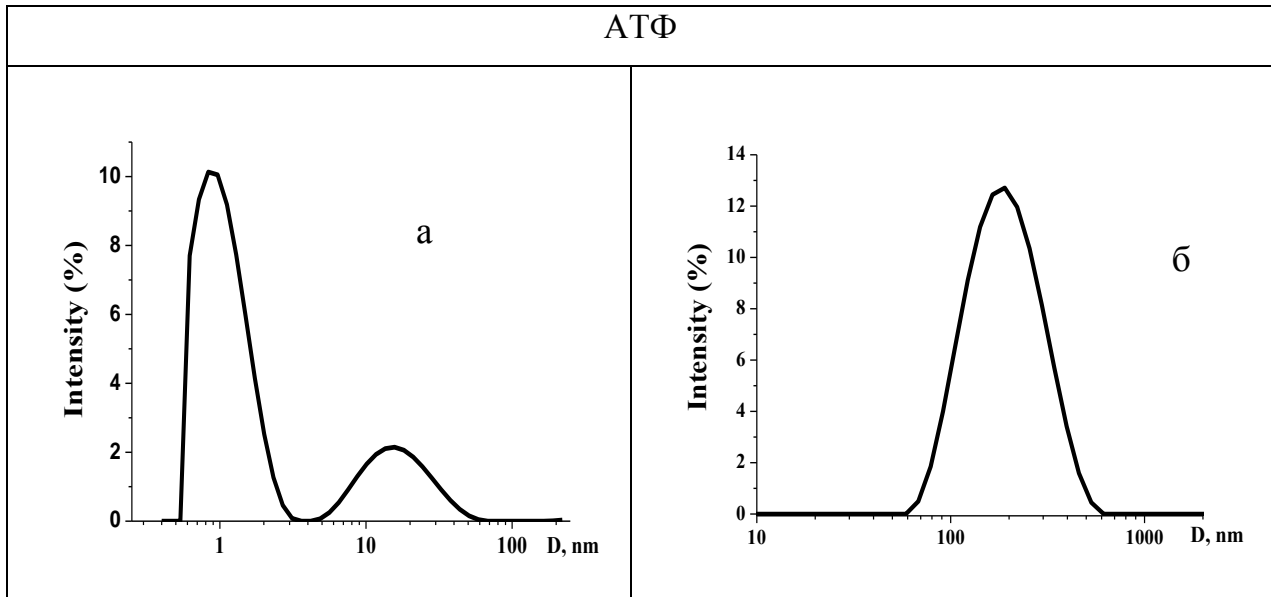


Рисунок 4 - Распределение частиц по размерам в водном растворе АТФ в концентрации 10 мг/мл (а) и 6×10^{-4} мг/мл (б), 25°С. Приведено в координатах размера частиц (нм) и интенсивности (%) рассеяния света.

Таким образом, на основании проведенных исследований для определения биологического действия на организм белых крыс с использованием физико-химических методов согласно ранее установленных закономерностей были отобраны водные растворы препаратов в следующих концентрациях: ПО - 1×10^{-6} ; 1×10^{-9} и 1×10^{-14} мг/мл; ДФ - 2×10^{-2} и 2×10^{-12} мг/мл; АТФ - 6×10^{-4} мг/мл.

3.2 Влияние водных растворов полиоксидония, димефосфона и натрия аденозинтрифосфата в терапевтических дозах на лабораторных животных

При изучении уровня общего белка установлено, что после введения крысам ПО и АТФ отмечалось его увеличение в сыворотке крови соответственно на 7,8% и 12,3%, а после введения ДФ – снижение на 14,6%. Количество эритроцитов и уровень гемоглобина в крови после введения ПО, по сравнению с контролем, возрастали соответственно на 12,9% и 5,2%, а после инъекции ДФ и АТФ – значения этих показателя снижались. СОЭ во всех подопытных группах, по сравнению с контролем, повышалось. После введения крысам ПО в крови значительно возросла численность лейкоцитов, которая превышала ее значение не только у контрольных животных, но и в двух других подопытных группах (таблица 2).

Таблица 2 - Значения различных показателей крови после введения крысам терапевтических доз полиоксидония, димефосфона и АТФ

| Показатель | Группа лабораторных животных | | | |
|-----------------------------------|------------------------------|---------------|--------------|--------------|
| | контроль | полиоксидоний | димефосфон | АТФ |
| Общий белок, г/л | 52,20±1,23 | 56,27±1,74* | 45,56±1,97 | 58,60±2,43* |
| Эритроциты, 10 ¹² /л | 5,49±0,14 | 6,20±0,40 | 4,45±0,29 | 4,96±0,39 |
| Гемоглобин, г/л | 147,60±5,70 | 155,30±4,80 | 114,40±7,40 | 126,00±4,20 |
| СОЭ, мм/час | 1,10±0,14 | 1,33±0,13 | 1,50±0,12* | 2,50±0,19* |
| Лейкоциты, 10 ⁹ /л | 4,42±0,36 | 11,20±0,53* | 5,84±0,32* | 8,18±0,71* |
| Нейтрофилы, 10 ⁹ /л | 1,27±0,21 | 2,10±0,27* | 1,63±0,20 | 2,39±0,26* |
| Нейтрофилы, % | 28,73±1,25 | 18,67±2,05 | 28,00±1,60 | 29,22±3,39 |
| Эозинофилы, 10 ⁹ /л | 0,09±0,01 | 0,050±0,005 | 0,06±0,01 | 0,41±0,01* |
| Эозинофилы, % | 2,04±0,22 | 0,50±0,06 | 1,02±0,12 | 5,01±0,28* |
| Базофилы, 10 ⁹ /л | 0,020±0,002 | 0 | 0 | 0,06±0,01 |
| Базофилы, % | 0,45±0,05 | 0 | 0 | 0,86±0,11* |
| Лимфоциты, 10 ⁹ /л | 2,84±0,07 | 8,70±0,50* | 3,97±0,19* | 4,82±0,51* |
| Лимфоциты, % | 64,26±1,91 | 77,67±3,75* | 67,98±2,07* | 58,92±2,01 |
| Моноциты, 10 ⁹ /л | 0,20±0,03 | 0,35±0,02 | 0,18±0,03 | 0,50±0,01* |
| Моноциты, % | 4,52±0,05 | 3,16±0,23 | 3,00±0,22 | 5,99±0,42* |
| НЛО, индекс | 0,45±0,05 | 0,24±0,02 | 0,41±0,03 | 0,49±0,06 |
| НМО, индекс | 6,35±0,37 | 6,00±0,22 | 9,06±0,43* | 4,78±0,39 |
| КАФ, 10 ⁹ /л | 0,90±0,11 | 1,83±0,14 | 0,60±0,05 | 1,19±0,15* |
| ФП, % | 73,00±1,02 | 87,00±1,73* | 69,80±2,14 | 81,80±2,41* |
| ФЧ, м.т. | 7,90±0,57 | 5,67±0,40 | 6,60±0,51 | 6,32±0,57 |
| АФП, ед./мкл | 7,11±0,53 | 27,98±1,61* | 3,71±0,49 | 7,45±0,85 |
| JgA, г/л | 0,05±0,01 | 0,39±0,03* | 2,15±0,16* | 2,25±0,28* |
| JgM, г/л | 0,56±0,07 | 1,80±0,08* | 1,50±0,14* | 1,74±0,18* |
| JgG, г/л | 3,78±0,21 | 12,95±0,24* | 12,91±0,17* | 12,21±0,19* |
| Уровень компле- мента, НЕСН 50 | 56,00±1,54 | 83,33±2,45* | 65,27±2,61* | 15,40±1,35 |
| ЦИК, ед. | 0,020±0,002 | 0,066±0,004* | 0,037±0,003* | 0,024±0,002* |

* - p<0,05

Анализ лейкограммы показал, что после внутримышечного введения крысам водного раствора ПО, количество лимфоцитов возросло, оно значительно превышало их значение не только в контрольной группе, но и у животных двух других подопытных групп. Количество нейтрофилов в крови повышалось у всех крыс подопытных групп, но в наибольшей степени у животных, которым вводили АТФ. Индекс нейтрофильно-лимфоцитарного отношения после внутримышечного введения крысам ПО и ДФ в крови снижался, а после введения АТФ – повышался на 8,9%, по сравнению с контролем.

Количество моноцитов в крови наиболее активно повышалось после введения крысам АТФ и уменьшалось, по сравнению с контролем, после введения ДФ. После введения крысам ПО абсолютное число моноцитов в крови, по сравнению с контролем, возросло, но в меньшей степени, чем после введения АТФ (таблица 2).

Таким образом, водный раствор ПО в терапевтической дозе наиболее активно влияет на такие показатели крови как количество эритроцитов, уровень содержания гемоглобина, количество лейкоцитов, лимфоцитов, повышая их, по сравнению с контролем, водный раствор АТФ активно влияет на уровень содержания общего белка в сыворотке крови, СОЭ, количество нейтрофилов, эозинофилов, базофилов, моноцитов; водный раствор ДФ в терапевтической дозе по своему влиянию на исследованные показатели крови занимает промежуточное положение между результатами вышеназванных препаратов (таблица 2).

Исследование показателей клеточного и гуморального иммунитета показало, что количество активных фагоцитов (КАФ) в крови животных наиболее активно повышается после введения водного раствора ПО, а после инъекции ДФ, наоборот, снижается. Фагоцитарный показатель (ФП), по сравнению с контролем, наиболее активно возрастает после введения крысам ПО, а после введения АТФ, наоборот, снижается. Фагоцитарное число (ФЧ) у контрольных лабораторных животных имело наибольшее значение, а у крыс всех остальных подопытных групп оно характеризовалось меньшей величиной (таблица 2). Абсолютный фагоцитарный показатель (АФП) был наиболее выражен в группе крыс, которым вводили раствор ПО. Изучение в сыворотке крови уровня основных классов иммуноглобулинов (IgA, IgM и IgG) показало, что наибольшее их количество приходится на IgG, и их уровень в сравнении с другими (IgA, IgM) в контрольной группе был выше соответственно в 75,6 и в 6,7 раза, после инъекции ПО – в 33,2 и в 7,2 раза, ДФ - в 6,0 и в 8,6 раза, АТФ – в 5,4 и в 7,0 раз. Наибольший уровень в крови IgA отмечался после введения животным АТФ, наименьший – в контроле; наибольший уровень IgM – после инъекции ПО и АТФ, наименьший – у контрольных крыс. Наиболее высокий уровень комплемента в сыворотке крови выявлялся у животных, которым вводили ПО ($83,33 \pm 2,45$ ед.), а наименьший – после введения АТФ ($15,40 \pm 1,35$ ед.). Наиболее высокое значение уровня циркулирующих иммунных комплексов (ЦИК) в сыворотке крови соответствовало его значению у крыс после введения водного раствора ПО.

Таким образом, водный раствор ПО наиболее активно влияет на такие показатели, как количество активных фагоцитов, фагоцитарный показатель, абсолютный фагоцитарный показатель, уровень комплемента и циркулирующих иммунных комплексов в сыворотке крови (таблица 2).

3.3 Влияние водных растворов полиоксидония в малых и сверхмалой дозах на лабораторных животных

После инъекции крысам ПО в малых (1×10^{-6} ; 1×10^{-9} мг/мл) и сверхмалой (1×10^{-14} мг/мл) дозах отмечается повышение содержания в крови общего белка от 8,9% до 15,6%, по сравнению с контролем, причем более высокий результат соответствует крысам, которым вводили СМД (таблица 3). Кроме того, в этой группе отмечался более высокий результат, характеризующий количество эритроцитов в крови, чем в группе с терапевтической дозой препарата (на 6,5%), но при этом снижался уровень гемоглобина. Количество лейкоцитов в крови у крыс после введения малых и сверхмалой доз превышало их число у контрольных крыс от 87,8% до 99,1%, но было на 27,3% - 34,9% меньше, чем у крыс, которым вводили терапевтическую дозу. При анализе лейкограммы было выявлено, что количество лимфоцитов в крови у крыс после введения малых и сверхмалой доз ПО, значительно превышало таковое у контрольных животных в среднем от 86,6% до 100,7%. Процентное соотношение в лейкограмме лимфоцитов у крыс подопытных групп, по сравнению с контролем, увеличивалось не более, чем на 3,2%. Во всех подопытных группах крыс, по сравнению с контролем, возрастала численность нейтрофилов от 73,2% до 120,5%, а по сравнению с группой, где вводили терапевтическую дозу, увеличение составляло от 4,8% до 33,3%. Численность других видов лейкоцитов и их соотношение в лейкограмме занимает незначительную часть. В подопытных группах процентное соотношение эозинофилов составляло от 0,47 до 0,91% при 2,04% у крыс в контроле. Базофилов в крови подопытных лабораторных животных нами не выявлено, а в контроле их насчитывалось $0,45 \pm 0,05\%$. Во всех подопытных группах с введением малых и сверхмалой дозы ПО в крови отмечалось увеличение численности моноцитов, по сравнению с контролем, и это увеличение по разным группам составляло от 45,0% до 215%. Наибольшее количество моноцитов в крови, потенциальных макрофагов после их выхода из сосудистого русла, отмечалось у крыс, которым вводили сверхмалую дозу ПО. Более высокое значение процентного отношения моноцитов соответствовало результату в группе, где вводили СМД раствора ПО. Изучение фагоцитарной активности фагоцитов у контрольных и подопытных крыс показало, что после введения различных доз ПО количество активных фагоцитов возрастает от 84,4% до 115,5%, а наиболее значимым результатом, по сравнению с контролем, является увеличение ФП на 21,0% в группе крыс после введения СМД ПО. В этой же группе крыс выявляется повышение ФЧ, по сравнению с контролем, на 42,7%, а с группой крыс, которым вводили терапевтическую дозу препарата – на 98,8%. АФП в крови у крыс, которым вводили СМД ПО, был на 124,0% выше, чем у животных контрольной группы. Во всех подопытных группах крыс, по сравнению с контролем, в сыворотке крови отмечалось повышение уровня IgA и IgG. Изменения IgM носили разнонаправленный характер. Так, при введении 1×10^{-6} мг/мл в крови отмечалось увеличение его значения на 78,6%, а в двух других подопытных группах лабораторных животных (1×10^{-9} и 1×10^{-14} мг/мл) соответственно снижение на 10,7% и 28,6%. Уровень комплемента в сыворотке крови крыс всех подопытных групп, по сравнению с контролем, имел более высокие выражения, а именно, увеличение по группам составляло от 15,5% до 58,3%. Такая же тенденция сохранилась и в отношении уровня циркулирующих иммунных комплексов в сыворотке крови, а значение этого показателя у подопытных лабораторных животных, по сравнению с контролем, было более высоким и возрастало от 20,0% до 165,0%.

Таблица 3 - Значения гематологических, биохимических и иммунологических показателей в крови крыс после введения в организм терапевтической, малых (I и II) и сверхмалой доз полиоксидония

| Показатель | Контроль | Группа животных | | | |
|------------------------------------|-------------|-----------------|--|---|--|
| | | терапевт. доза | малая доза I 1×10^{-6} мг/мл | малая доза II 1×10^{-9} мг/мл | сверхмалая доза 1×10^{-14} мг/мл |
| Общий белок, г/л | 52,20±1,23 | 56,27±1,74* | 7,07±0,43* | 56,40±0,85* | 60,37±0,68* |
| Эритроциты, 10^{12} /л | 5,49±0,14 | 6,20±0,40 | 4,20±0,49 | 6,85±0,14* | 6,60±0,32* |
| Гемоглобин, г/л | 147,60±5,70 | 155,30±4,80 | 52,20±4,30 | 141,30±2,90 | 136,08±3,40 |
| СОЭ, мм/час | 1,10±0,14 | 1,33±0,13 | 2,30±0,21* | 1,67±0,17* | 1,51±0,14* |
| Лейкоциты, 10^9 /л | 4,42±0,36 | 11,20±0,53* | 8,80±1,33* | 8,43±0,63* | 8,30±0,61* |
| Лимфоциты, 10^9 /л | 2,84±0,07 | 8,70±0,50* | 5,70±0,42* | 5,30±0,26* | 5,43±0,33* |
| Нейтрофилы, 10^9 /л | 1,27±0,21 | 2,10±0,27* | 2,60±0,61* | 2,80±0,38* | 2,20±0,33* |
| НЛЮ, индекс | 0,45±0,05 | 0,24±0,02 | 0,46±0,06 | 0,53±0,03* | 0,40±0,05 |
| Моноциты, 10^9 /л | 0,20±0,03 | 0,35±0,02* | 0,42±0,06* | 0,29±0,03* | 0,63±0,08* |
| НМО, индекс | 6,35±0,37 | 6,00±0,22 | 6,19±0,28 | 9,65±0,31* | 3,49±0,24 |
| Эозинофилы, 10^9 /л | 0,09±0,01 | 0,050±0,005 | 0,080±0,005 | 0,040±0,003 | 0,040±0,002 |
| Базофилы, 10^9 /л | 0,020±0,002 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| КАН, 10^9 /л | 0,90±0,11 | 1,83±0,14* | 1,66±0,09* | 1,82±0,15* | 1,94±0,16* |
| ФП, % | 73,00±1,02 | 87,00±1,73* | 72,00±1,53 | 65,00±2,77 | 88,33±1,92* |
| ФЧ, м.г. | 7,90±0,57 | 5,67±0,40 | 4,00±0,85 | 4,73±0,97 | 11,27±2,23 |
| АФП, ед./мкл | 7,11±0,53 | 27,98±1,61* | 8,78±2,23 | 12,79±1,66* | 15,93±2,07* |
| JgA, г/л | 0,05±0,01 | 0,39±0,03* | 0,45±0,12* | 0,19±0,03* | 0,07±0,02 |
| JgM, г/л | 0,56±0,07 | 1,80±0,08 | 1,00±0,12 | 0,50±0,10 | 0,40±0,04 |
| JgG, г/л | 3,78±0,21 | 12,95±0,24* | 12,79±0,45* | 12,10±0,56* | 11,43±0,15* |
| Уровень компле- мента, НЕ СН 50 | 56,00±1,54 | 83,33±2,45* | 88,67±3,94* | 77,33±5,38* | 64,67±0,15* |
| ЦИК, ед. | 0,020±0,002 | 0,066±0,004* | 0,024±0,006 | 0,027±0,005 | 0,053±0,001* |

* - $p < 0,05$

3.4 Влияние водных растворов димефосфона в малой и сверхмалой дозах на лабораторных животных

Исследование уровня общего белка в сыворотке крови контрольных и подопытных крыс показало, что как в группе с введением малой (2×10^{-2} мг/мл), так и сверхмалой (2×10^{-12} мг/мл) дозы ДФ отмечалось повышение его уровня соответственно на 11,7% и 26,0% (таблица 4). Количество эритроцитов и уровень гемоглобина в крови у крыс подопытных групп, по сравнению с контролем, изменялись разнонаправленно. Так, количество эритроцитов в группе крыс, где вводили малую дозу ДФ, уменьшилось на 17,8%, а СМД – увеличилось на 5,5%, при этом уровень гемоглобина в обеих группах, по сравнению с контролем, уменьшался соответственно на 10,5% и 2,5%. Количество эритроцитов в группах крыс с введением малой и сверхмалой доз ДФ было на 4,7% и 24,0%, а уровень гемоглобина – соответственно на 17,6% и 25,9% были выше, чем в группе крыс, где вводили терапевтическую дозу препарата. СОЭ в обеих подопытных группах повышалось соответственно на 36,4% и 9,1%, по сравнению с контролем, но в группе крыс с введением СМД происходило снижение СОЭ на 20,0%, по сравнению с группой крыс, где вводили терапевтическую дозу. Численность лейкоцитов у крыс в подопытных группах превышала таковую у контрольных животных соответственно на 25,1% и 24,0%. Анализ лейкограммы крови подопытных крыс показал, что у животных в обеих подопытных группах отмечалось увеличение количества нейтрофилов, по сравнению с контролем, соответственно на 14,2% и 61,4%, при этом при введении малой дозы ДФ происходило снижение процентного отношения клеток в лейкограмме на 9,6%, а сверхмалой – наоборот повышение на 30,2%. При сравнении в крови количества лимфоцитов, как наиболее массовых клеток среди лейкоцитов, следует отметить, что в обеих подопытных группах, по сравнению с контролем, отмечалось повышение их численности соответственно на 35,9% и 15,8%. Процентное отношение лимфоцитов в лейкограмме изменялось по разному, а именно, при введении крысам малой дозы ДФ повышалось на 8,6%, а СМД – снижалось на 7,0%, по сравнению с контролем. Значительные изменения в крови подопытных лабораторных животных происходили при подсчете количества моноцитов и их процентного отношения в лейкограмме. Так, количество моноцитов в крови, по сравнению с контролем, снижалось соответственно на 53,8% и 122,2%, что можно объяснить активной мобилизацией этих клеток и их выходом из сосудистого русла в окружающие ткани с превращением их в макрофаги. Такая же картина наблюдается и в отношении процентного отношения моноцитов в лейкограмме, где их значение у подопытных лабораторных животных, по сравнению с контролем, снижалось соответственно на 91,5% и 173,9%.

Среди лейкоцитов эозинофилы и базофилы занимают незначительную часть, на уровне 2%, при этом процентное содержание эозинофилов в крови контрольных крыс имело более высокое выражение, особенно по сравнению с крысами, которым вводили сверхмалую дозу ДФ (снижение на 126,7%). Что касается базофилов, то в крови подопытных животных этот вид лейкоцитов нами не выявлялся. При исследовании показателей клеточного и гуморального иммунитета у контрольных и подопытных лабораторных животных было выявлено, что количество активных фагоцитов в крови крыс подопытных групп изменялось разнопланово, при введении малых доз ДФ уменьшалось на 50,0%, а при введении сверхмалых –

Таблица 4 - Значения различных показателей крови у крыс после введения в организм терапевтической, малой и сверхмалой доз димефосфона

| Показатель | Контроль | Группа животных | | |
|-----------------------------------|-------------|-------------------|--|----------------------------------|
| | | терапевт. доза | малая доза 2×10^{-2} мг/мл | СМД 2×10^{-12} мг/мл |
| Общий белок, г/л | 52,20±1,23 | 45,56±1,97 | 58,30±2,04* | 65,80±2,45* |
| Эритроциты, 10^{12} /л | 5,49±0,14 | 4,45±0,29 | 4,66±0,23 | 5,52±0,41 |
| Гемоглобин, г/л | 147,60±5,70 | 114,40±7,40 | 133,50±3,37 | 144,00±4,48 |
| СОЭ, мм/час | 1,10±0,14 | 1,50±0,12* | 1,50±0,18* | 1,20±0,15 |
| Лейкоциты, 10^9 /л | 4,42±0,36 | 5,84±0,32* | 5,53±0,41* | 5,48±0,37* |
| Лимфоциты, 10^9 /л | 2,84±0,07 | 3,97±0,19* | 3,86±0,34* | 3,29±0,03* |
| Лимфоциты, % | 64,26±1,91 | 67,98±2,07* | 69,80±2,96* | 60,04±2,10 |
| Нейтрофилы, 10^9 /л | 1,27±0,21 | 1,63±0,20 | 1,45±0,27 | 2,05±0,24* |
| Нейтрофилы, % | 28,73±1,25 | 28,00±1,60 | 26,22±2,55 | 7,41±2,35* |
| НЛЮ, индекс | 0,45±0,05 | 0,41±0,03 | 0,37±0,04 | 0,62±0,05* |
| Моноциты, 10^9 /л | 0,20±0,03 | 0,18±0,03 | 0,13±0,02 | 0,09±0,02 |
| Моноциты, % | 4,52±0,05 | 3,00±0,22 | 2,36±0,31 | 1,65±0,17 |
| НМО, индекс | 6,35±0,37 | 9,06±0,43* | 11,15±1,03* | 2,78±1,09* |
| Эозинофилы, 10^9 /л | 0,09±0,01 | 0,06±0,01 | 0,09±0,01 | 0,50±0,003 |
| Эозинофилы, % | 2,04±0,22 | 1,02±0,12 | 1,62±0,25 | 0,90±0,14 |
| Базофилы, 10^9 /л | 0,020±0,002 | 0 | 0 | 0 |
| Базофилы, % | 0,45±0,05 | 0 | 0 | 0 |
| КАФ, 10^9 /л | 0,90 ± 0,11 | 0,60±0,05 | 0,60±0,08 | 1,63±0,19* |
| ФП, % | 73,00±1,02 | 69,80±2,14 | 79,50±2,22* | 73,80±3,52 |
| ФЧ, м.т. | 7,90±0,57 | 6,60±0,51 | 11,04±0,85* | 8,24±0,34 |
| АФП, ед./мкл | 7,11±0,53 | 3,71±0,49 | 6,72±0,74* | 14,39±1,15 |
| IgA, г/л | 0,05±0,01 | 2,15±0,16 | 0,02±0,01 | 0,02±0,01 |
| IgM, г/л | 0,56±0,07 | 1,50±0,14 | 0,45±0,13 | 0,24±0,08 |
| IgG, г/л | 3,78±0,21 | 12,91±0,17 | 10,45±0,46 | 10,24±0,74 |
| Уровень компле- мента, НЕ СН50 | 56,00±1,54 | 65,27±2,61 | 43,70±2,42 | 88,60±3,18 |
| ЦИК, ед. | 0,020±0,002 | 0,037±0,003 | 0,022±0,002 | 0,020±0,003 |

повышалось на 81,1%. ФП в группе крыс, которым вводили СМД ДФ, почти не изменялся, по сравнению с контролем ($>1,1\%$), но в группе крыс с введением малой дозы его значение было на 8,9% больше. ФЧ у подопытных животных также имело более высокие выражения, а именно, соответственно возросло на 39,7% и 4,3%. Изменения АФП было наиболее выраженным в крови в группе крыс, которым вводили СМД ДФ (повышение на 102,4%). При изучении содержания основных классов иммуноглобулинов в крови контрольных и подопытных животных было выяснено, что IgA и IgM в большем количестве содержались в крови контрольных крыс, а IgG имел более высокие значения этого показателя у подопытных крыс

соответственно в 2,8 и 2,7 раза. Уровень же комплемента в сыворотке крови подопытных животных, по сравнению с контролем, изменялся по-разному. После введения малой дозы ДФ он снижался на 28,1%, а СМД – повышался на 58,2%. В отношении содержания в сыворотке крови ЦИК следует отметить, что после введения малой дозы ДФ происходило повышение их уровня на 10,0%, а после введения СМД их значение у крыс соответствовало таковому в контроле ($p > 0,05$).

3.5 Влияние сочетанного применения водных растворов полиоксидония и димефосфона в малых дозах на лабораторных животных

Сочетанное введение малых доз ПО и ДФ показало, что уровень общего белка в крови у подопытных крыс, по сравнению с контролем, повышался на 11,8%. Количество эритроцитов в крови подопытных крыс превышало их численность у контрольных животных на 3,3%, а уровень содержания гемоглобина – на 3,4%. Показатель СОЭ у подопытных животных, по сравнению с контролем, снижался на 10,0%. У подопытных крыс в крови резко возрастало количество лейкоцитов. Так, по сравнению с контролем их количество увеличивалось в 2,3 раза. Анализ лейкограммы крови подопытных и контрольных крыс показал, что отдельные виды лейкоцитов в количественном и процентном отношении изменялись у животных этих групп разнопланово. Так, если количество лимфоцитов в крови подопытных крыс возрастало в 2,4 раза, то их процентное отношение только на 1,6%. Количество нейтрофилов в крови подопытных крыс также резко возрастало (в 2,2 раза), при этом их процентное отношение в лейкограмме уменьшалось на 7,2%. Количество моноцитов в крови у подопытных крыс также возрастало (в 2,3 раза), при этом их процентное отношение в лейкограмме почти не изменялось ($> 0,2\%$). У подопытных крыс после сочетанного введения ПО и ДФ в крови повышалось количество эозинофилов, а также их процентное содержание в лейкограмме (на 65,7%), по сравнению с контролем. Значения показателя КАФ были наиболее выражены у подопытных крыс, и его увеличение, по сравнению с контролем, составляло 65,5%. Уровень содержания IgA в сыворотке крови подопытных крыс превышал таковой у контрольных животных в 2,2 раза, при меньшем значении IgM на 16,6%. Что касается IgG, то его уровень содержания в сыворотке крови у подопытных крыс был на 21,4% выше, чем в контроле. Уровень комплемента в сыворотке крови у контрольных лабораторных животных превышал таковой у крыс подопытных групп на 11,3%, в то время как содержание ЦИК, наоборот, было более высоким у подопытных крыс в 2,3 раза.

3.6 Влияние сочетанного применения водных растворов полиоксидония и натрия аденозинтрифосфата в малых дозах на лабораторных животных

При изучении уровня общего белка в крови подопытных крыс установили, что его содержание, по сравнению с контролем, было более высоким на 7,7%. После сочетанного введения ПО и АТФ у подопытных крыс отмечалось снижение количества эритроцитов на 5,4%, при этом уровень гемоглобина и СОЭ соответственно повышались на 8,6% и 81,8%, по сравнению с контролем. Количество лейкоцитов в крови подопытных крыс превышало таковое в контроле на 24,4%, при незначительном уменьшении (3,3%) количества лимфоцитов, при этом процентное отношение этих клеток в лейкограмме, наоборот, возрастало на

2,7%, по сравнению с контролем, хотя эти изменения и не являлись достоверными ($p > 0,05$). Количество нейтрофилов в крови было на 44,1% больше, чем у контрольных крыс, при этом их процентное отношение в лейкограмме возрастало на 66,4%, по сравнению с контролем. В крови подопытных крыс, по сравнению с контролем, количество моноцитов возрастало на 60,0%, а эозинофилов в 6,6 раза, что было характерным и для процентного отношения этих лейкоцитов в лейкограмме, так как у эозинофилов, например, оно также повышалось на 47,0%. Исследование показателей клеточного иммунитета показало, что КАФ у подопытных крыс в крови, по сравнению с контролем, снижался на 45,2%, ФП – на 21,4%, ФЧ – на 145,3%, а АФП – в 4,38 раза. При изучении показателей, характеризующих гуморальный иммунитет в организме, было выявлено, что у подопытных крыс, по сравнению с контролем, уровень содержания в сыворотке крови IgA уменьшался на 25,0%, а IgM, наоборот, увеличивался на 116,1%. Что касается содержания в сыворотке крови IgG, то у подопытных крыс его уровень был более высоким, чем в контроле, и превышал таковой на 95,8%. Показатель уровня комплемента в сыворотке крови у подопытных крыс характеризовался меньшим (на 6,2%) значением, чем в контроле, при резком возрастании значения ЦИК (в 5,5 раз).

Таким образом, сочетанное введение ПО с АТФ негативно отражается на таких показателях крови подопытных крыс, как количество эозинофилов, вызывая значительное увеличение их численности, а также снижает значения показателей фагоцитарной активности нейтрофилов в крови.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

1. Значения отдельных показателей крови у крыс в подопытных группах с внутримышечным введением малых (1×10^{-6} и 1×10^{-9} мг) и сверхмалой (1×10^{-14} мг) доз водного раствора полиоксидония в объеме 1 мл, характеризуются более значимыми величинами ($p < 0,05$), по сравнению с контролем, свидетельствующими об эффективности применения этого препарата в экспериментальных дозах, установленных как оптимальные на основе физико-химических исследований, являясь при этом сопоставимыми величинами на фоне введения крысам терапевтической дозы. Так, например, повышение общего белка в крови крыс в группах с введением малых и сверхмалой доз препарата, по сравнению с терапевтической дозой, соответственно составляет 1,4%, 0,2 и 7,3%.

2. Внутримышечное введение лабораторным животным водных растворов ПО в малых дозах 1×10^{-6} мг и 1×10^{-9} мг в объеме 1 мл способствует повышению в крови общего белка, по сравнению с контролем, соответственно на 9,3% и 8,9%, количества лейкоцитов в этих группах на 99,1% и 90,7%, в том числе лимфоцитов – на 100,7% и 86,6%, нейтрофилов – на 104,7% и 120,5%. Возрастает в крови КАФ соответственно на 84,4% и 102,2%, значение АФП – на 23,5% и 79,9%, IgA – в 9 раз и в 3,8 раза, IgG в 3,4 и в 3,2 раза соответственно, при этом повышаются и уровни содержания комплемента в крови на 58,3% и 38,1%, а также циркулирующих иммунных комплексов соответственно на 20,0% и 35,0%.

3. Внутримышечное введение крысам водного раствора ПО в СМД 1×10^{-14} мг в объеме 1 мл приводит, по сравнению с контролем, к увеличению в крови общего белка на 15,6%, количества лейкоцитов на 87,8%, в том числе лимфоцитов и нейтрофилов соответственно на 91,2% и 73,2%, при этом значение показателя КАФ

увеличивается на 115,5%, ФП – на 21,0%. Уровень содержания IgA и IgG в сыворотке крови повышается соответственно на 40,0% и в 3,0 раза, а комплемента и ЦИК - на 15,5% и 165,0%.

4. Внутримышечное введение крысам водных растворов ДФ в малой 2×10^{-2} мг и сверхмалой 2×10^{-12} мг дозах в объеме 1 мл способствует, по сравнению с контролем, повышению в крови содержания общего белка на 11,7% и 26,0%, количества лейкоцитов - на 25,1% и 24,0%, в том числе лимфоцитов – на 35,9% и 15,8%, нейтрофилов – на 14,2% и 61,4%, при этом в крови отмечается снижение численности моноцитов соответственно на 53,8% и 122,2%. После введения крысам малой дозы ДФ количество активных фагоцитов в крови снижается на 50,0% и повышается на 81,1% в группе крыс с введением СМД, ФП повышается соответственно на 8,9% и 1,1%, а IgA в обеих группах снижается на 150,0%. Уровень IgG в зависимости от дозы повышается соответственно на 176,4% и 170,9%, при этом содержание комплемента после введения малой дозы снижается на 28,1% и повышается после СМД на 58,2%. Уровень ЦИК в крови крыс в подопытных группах не изменяется ($p > 0,05$), по сравнению с контролем.

5. Сочетанное внутримышечное введение крысам водных растворов ПО и ДФ в малых дозах 1×10^{-6} мг/мл и 2×10^{-2} мг/мл обеспечивает, по сравнению с контролем, повышение в крови содержания общего белка на 11,8%, количества лейкоцитов - в 2,3 раза, в том числе лимфоцитов – в 2,4 раза, нейтрофилов – в 2,2 раза, при этом КАФ в крови повышается на 65,5%, при снижении ФП на 6,3%. Уровни содержания IgA и IgG в сыворотке крови повышаются соответственно на 120,0% и 21,4%, уровень комплемента уменьшается на 11,3%, при возрастании значения показателя ЦИК в 2,3 раза, по сравнению с контролем.

6. Сочетанное внутримышечное введение крысам водных растворов ПО и АТФ в малых дозах 1×10^{-6} мг и 6×10^{-4} мг в объеме 1 мл обеспечивает, по сравнению с контролем, повышение содержания в крови общего белка на 7,7%, количества лейкоцитов на 24,4%, в том числе нейтрофилов на 44,1% и эозинофилов в 6,6 раза, но снижению численности лимфоцитов на 3,3%. Значения показателей клеточного и гуморального иммунитета в крови крыс характеризуются в основном снижением, по сравнению с контролем. Так, значения показателей КАФ и ФП снижаются в крови соответственно на 45,2% и 21,4%, IgA - на 25,0%, но повышается уровень содержания IgG на 95,8%. Содержание комплемента в сыворотке крови, по сравнению с контролем, характеризуется уменьшением на 6,2%, и более значительно на 81,8% снижается уровень ЦИК.

ПРАКТИЧЕСКИЕ ПРЕДЛОЖЕНИЯ

1. Для проведения в животноводстве научных исследований по апробации отдельных доз рекомендуются для полиоксидония, димефосфона и натрия аденозинтрифосфата следующие из них: ПО - в малых 1×10^{-6} мг/мл и 1×10^{-9} мг/мл, в СМД - 1×10^{-14} мг/мл; ДФ – в СМД 2×10^{-12} мг/мл, АТФ – в малой дозе 6×10^{-4} мг/мл.
2. Научные положения, выводы и рекомендации диссертационной работы предлагаются к использованию в учебном процессе высших учебных заведений биологического и ветеринарного профиля, а также при написании учебников и учебных пособий по нанофармакологии и влиянию сверхмалых доз биологически активных веществ на организм животных.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. Рыжкина, И.С. Высокоразбавленные растворы иммуномодулятора полиоксидония: самоорганизация и физико – химические свойства / И.С. Рыжкина, Л.И. Муртазина, **Д.Е. Дорджиева** [и др.] // Тезисы докладов Международной конференции «Структура воды: физические и биологические аспекты. – СПб., 2013. - С.52-53 . www.biophys.ru/archive/spb2013/proc-p52-1.pdf.
2. Usenko, V.I. Polyoxidonium immunomodulator nonassociative solutions optimal concentrations influence on the blood Indices of laboratory animal / V.I. Usenko, **Д.Е. Dordzhieva**, I.S. Ryzhkina [et al.] // Eastern European Scientific Journal. - 2014. – N 3. - С. 46-49. www.auris-verlag.de. DOI 10.12851/EESJ201406C01ART10.
3. Дорджиева, Д.Е. Влияние потенцированных растворов полиоксидония на иммунную систему организма животных / Д.Е. Дорджиева // Ученые записки КГАВМ. – 2015. – Т.224(4). – С. 49-53.*
4. Дорджиева, Д.Е. Влияние метаболически активных растворов препаратов на гематологические показатели у лабораторных животных / Д.Е. Дорджиева // Сб. матер. Всерос. научно – метод. конф. «Аграрная наука в условиях модернизации и инновационного развития АПК России». - Иваново, 2015. - Т.3. - С.21-24.
5. Дорджиева, Д.Е. Влияние на организм животных растворов наноассоциатов в низких концентрациях / Д.Е. Дорджиева, В.И. Усенко // Матер. Международной научно – практической конференции «Актуальные вопросы морфологии и биотехнологии в животноводстве»: Сб. науч. трудов. – Самара, 2015. – С.154-157.
6. Сергеева, С.Ю. Взаимосвязь самоорганизации, физико – химических свойств и биологической активности высококонцентрированных растворов иммуномодулятора полиоксидоний / С.Ю. Сергеева, И.С. Рыжкина, Ю.В. Киселева, Р.А. Сафиуллин, М.И. Кадиров, В.И. Усенко, **Д.Е. Дорджиева**, А.И. Коновалов // Матер. IV Всероссийской конференции с международным участием «Современные проблемы химической науки и фармации, посвященной 80-летию В.В. Базыльчика»: Сборник тезисов докладов. – Чебоксары, 2015. - С.128.
7. Дорджиева, Д.Е. Влияние растворов полиоксидония и димефосфона в терапевтической и малых дозах на морфологические показатели крови у крыс / Д.Е. Дорджиева, В.И. Усенко // XII Всерос. научно–практическая конференция молодых ученых, аспирантов и студентов «Молодежь и инновации» (Чебоксары, 6-7 апреля 2016). Сборник материалов конференции. – Чебоксары, 2016. - С. 126-129.
8. Дорджиева, Д.Е. Морфологические показатели крови животных и влияние на них димефосфона / Д.Е. Дорджиева, В.И. Усенко, М.Р. Бектемирова // Матер. Междунар. научно – практической конференции «Актуальные проблемы аграрной науки и пути решения». - Самара, 2016. - С. 217-220.
9. Дорджиева, Д.Е. Влияние полиоксидония и АТФ в различных дозах на морфофункциональное состояние крови животных / Д.Е. Дорджиева // Матер. Междунар. научной конф. студентов и аспирантов «Современные проблемы и тенденция развития агропромышленного комплекса». - Казань, 2016. - С. 36-39.
10. Усенко, В.И. Особенности влияния некоторых лекарственных средств на показатели клеточного и гуморального иммунитета крыс / В.И. Усенко, **Д.Е. Дорджиева**, М.Р. Бектемирова // Матер. Междунар. научно-практ. конф., посвящ. 70-летию Краснодарского научно-иссл. ветер. ин-та. – Краснодар, 2016. – С. 438-441.

11. Дорджиева, Д.Е. Влияние растворов димефосфона в разных концентрациях на показатели крови у крыс / Д.Е. Дорджиева // Матер. Междунар. научно – практической конференции «Фармакологические препараты в профилактике и лечении болезней животных», посвященной 110-летию со дня рождения академика ВАСХНИЛ И.Е. Мозгова. - Москва, 2016. - С. 48-51.

12. Усенко, В.И. Определение физико – химических свойств и биологической активности высокоразбавленных растворов полиоксидония и их влияние на показатели иммуногенеза / В.И. Усенко, И.С. Рыжкина, Д.Е. Дорджиева [и др.] // Ветеринарный врач. – Казань, 2016. - N5. - С. 21-26. *

* издания, рекомендованные ВАК РФ