

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение
высшего образования
«Чувашский государственный университет имени И. Н. Ульянова»

На правах рукописи

Мельникова Ольга Владимировна

**МОРФОЛОГИЧЕСКАЯ И ИММУНОГИСТОХИМИЧЕСКАЯ
ХАРАКТЕРИСТИКИ СЕЛЕЗЕНКИ КРЫС ПРИ УПОТРЕБЛЕНИИ
СОЕДИНЕНИЯ КАЛЬЦИЯ С ПИТЬЕВОЙ ВОДОЙ**

Специальность 03.03.04 – клеточная биология, цитология, гистология

Диссертация

на соискание ученой степени
кандидата медицинских наук

Научный руководитель:
доктор биологических наук, профессор,
заслуженный работник высшей школы
Российской Федерации
Сергеева Валентина Ефремовна

Чебоксары – 2016

СОДЕРЖАНИЕ

ВВЕДЕНИЕ	4
ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ	15
1.1. Современные представления о морфологических и функциональных особенностях селезенки.....	15
1.1.1. Антигенпрезентирующие клетки селезенки.....	21
1.1.2. Адренергическая иннервация и биоаминсодержащие структуры селезенки.....	26
1.2. Современные взгляды о роли и метаболизме кальция в организме.....	31
1.2.1. Регуляция обмена внутриклеточного кальция и его метаболизм	31
1.2.2. Биодоступность различных соединений кальция и применение хлорида кальция в медицинской практике.....	36
1.2.3. Физиологическая роль кальция.....	43
1.2.4. Иммунотропные механизмы воздействия кальция.....	46
ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ	49
2.1. Материал исследования.....	49
2.2. Методы исследования.....	53
ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ СОБСТВЕННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ	63
3.1. Общеморфологическая характеристика селезенки лабораторных крыс при употреблении соединения кальция с питьевой водой.....	63
3.2. Иммуногистохимическая характеристика селезенки лабораторных крыс при употреблении соединения кальция с питьевой водой.....	74
3.2.1. Клетки моноцитарно-макрофагальной системы (Iba-1-позитивные клетки).....	74
3.2.2. Антигенпрезентирующие (MHC II-позитивные) клетки.....	81
3.2.3. Внутриклеточный рецептор ионов кальция и кальмодулин-позитивные клетки.....	88

3.2.4. CD4-позитивные клетки.....	93
3.2.5. CD8-позитивные клетки.....	101
3.2.6. CD20-позитивные клетки.....	106
3.2.7. Анализ взаимоотношений компонентов Т- и В-клеточного звена иммунитета селезенки лабораторных крыс.....	112
3.3. Люминесцентно-гистохимическое исследование селезенки лабораторных крыс при употреблении соединения кальция с питьевой водой.....	117
3.3.1. Гистаминсодержащие структуры.....	117
3.3.2. Серотонинсодержащие структуры	124
3.3.3. Катехоламинсодержащие структуры.....	131
3.3.4. Анализ взаимоотношений обеспеченности биогенными аминами селезенки лабораторных крыс.....	135
3.4. Анализ концентрации общего кальция в сыворотке крови контрольных и опытных лабораторных крыс.....	142
3.4.1. Концентрация общего кальция в сыворотке крови.....	142
3.4.2. Корреляционные взаимосвязи концентрации общего кальция в сыворотке крови с морфологическими показателями селезенки.....	143
ГЛАВА 4. ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ ИССЛЕДОВАНИЯ.....	146
ЗАКЛЮЧЕНИЕ.....	181
ВЫВОДЫ.....	183
ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ.....	185
ПЕРСПЕКТИВЫ НАСТОЯЩЕГО ИССЛЕДОВАНИЯ.....	186
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ.....	188
СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ.....	189
СПИСОК ИЛЛЮСТРАТИВНОГО МАТЕРИАЛА.....	233

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность работы

В настоящее время известно, что функцию адаптивного иммунитета, определяющую клеточный и гуморальный гомеостаз организма, осуществляют органы иммунной системы. Ее морфологическую основу составляет лимфоидная ткань, организованная в функциональные образования, самым крупным из которых является селезенка (Рябикина А. И. с соавт., 2008; Волков В. П., 2015). Исследование структурно-функциональных особенностей селезенки является актуальной проблемой, поскольку иммунный аппарат селезенки, по мнению многих исследователей, имеет более сложное строение, чем другие периферические органы иммунной системы (Макалиш Т. П., 2013; Auerbach A., 2014). Она отличается множественной зональностью и высокой специфичностью каждой зоны, определяющейся уникальным взаимодействием лимфоидных клеток и клеток стромы, создающих особое микроокружение каждой зоны селезенки и обеспечивающих формирование адекватного иммунного ответа (Нестерова А. А. с соавт., 2006; Капитонова М. Ю. с соавт., 2007; Бережная Н. М. с соавт., 2009; Steiniger V. et al., 2001; Korkusuz P. et al., 2002). Экспериментально доказана высокая чувствительность селезенки к воздействию факторов различного генеза и способность одной из первых в организме реагировать адаптивными изменениями в морфологической организации (Боков Д. А. с соавт., 2014). Эти факты определяют возможность использования селезенки в качестве экспериментального объекта для оценки иммуномодулирующего воздействия внешних факторов.

Кальций является самым распространенным и эссенциальным макроэлементом в организме человека с ключевой ролью в поддержании нормальной жизнедеятельности всего организма, интеграции функций его систем, является кофактором активации многих ферментов, гормонов, витаминов и других биологически активных веществ (Коровина Н. А. с соавт., 2004; Кудрин А. В. с соавт., 1998, 2007; Оберлис Д. с соавт., 2008). Отмечена иммунологическая активность каль-

ция, которая заслуживает внимание с позиций иммунофизиологии и морфологии (Скальный А. В. с соавт., 2004; Студеникин В. М. с соавт., 2005; Кудрин А. В. с соавт., 1998, 2000, 2007). Кальций принимает участие в активации иммунной системы, контролирует антителообразование, обладает антагонистическим действием на процессы клеточной пролиферации и дифференциации (Аюшиева С. Ц. с соавт., 2010; Carafoli E. et al., 2007).

В структуре патологии элементного статуса у населения России недостаточность кальция занимает лидирующую позицию, наряду с распространенностью дефицита йода, магния, железа и цинка (Авцын А. П. с соавт., 1991; Агаджанян Н. А. с соавт., 2001; Жилиев Е. В. с соавт., 2011; Куприненко Н. Н., 2012). По результатам клинических исследований до 70% взрослого населения России и до 90% жителей Чувашской Республики испытывают дефицит кальция в крови, часто без внешних проявлений (Торопцова Н. В. с соавт., 2005; Воронкова О. В., 2010; Лесняк О. М. с соавт., 2012). Помимо этого в стране зафиксирован низкий уровень поступления в организм кальция с пищей, водой (МЗСР РФ, 2004; Торопцова Н. В. с соавт., 2005; Борзунова Е. А. с соавт., 2007; Валиев В. С., 2011; Куприненко Н. Н., 2012; Доклад «Об экологической ситуации в Чувашской Республике в 2014 году», 2015). Однако в большинстве субъектов Российской Федерации не используется возможность восполнения дефицита биоэлементов в организме за счет употребления физиологически полноценной питьевой воды (Рахманин Ю. А. с соавт., 2001; Морозова Е. В. с соавт., 2006).

Комплексное исследование влияния кальция на селезенку необходимо для избирательного, целенаправленного воздействия на нарушенные гистофизиологические процессы органа, что является обязательным условием успешной иммуномодуляции (Букина Е. Я. с соавт., 1997; Скальный А. В. с соавт., 2004; Агафонкина Т. В. с соавт., 2006; Кудрин А. В. с соавт., 2007; Оберлис Д. с соавт., 2008). В многочисленных исследованиях по оценке влияния иммуностропных препаратов на организм, как правило, используются клинические и иммунологические методы, поскольку в условиях клиники органы иммунной системы недоступны для

морфологического изучения механизмов лечебных мероприятий (Арсеньева Е. Н. с соавт., 2006; Хайдуков С. В. с соавт., 2011; Бобрышева И. В., 2013; Суменко В. В. с соавт., 2015; Vasciottini I. et al., 2004). При этом до настоящего времени не введены четкие морфометрические критерии оценки функциональной значимости изменений селезенки для выбора и целесообразности применения кальций содержащих препаратов (Дьячкова И. М. с соавт., 2014; Волков В. П., 2015).

Таким образом, научный интерес представляет изучение морфологических и иммуногистохимических особенностей селезенки лабораторных крыс при употреблении соединения кальция с питьевой водой, включая основные этапы иммунного ответа от моноцитарно-макрофагальных (Iba-1-позитивных) и антигенпрезентирующих (MHC II- позитивных) клеток до эффекторных и регуляторных иммунокомпетентных клеток гуморального ($CD20^+$) и клеточного ($CD4^+$, $CD8^+$) звеньев иммунитета органа, а также изменения внутриклеточного рецептора ионов кальция (кальмодулина) и биоаминсодержащих структур селезенки с определением концентрации общего кальция в крови.

Цель исследования – изучение морфологических и иммуногистохимических характеристик селезенки лабораторных крыс при длительном поступлении в организм соединения кальция с питьевой водой.

Задачи исследования:

1. Изучить морфологические особенности селезенки белых лабораторных крыс при употреблении хлорида кальция с питьевой водой в концентрации 235 мг/л (в пересчете на кальций) в течение 60 суток.

2. Исследовать качественные и количественные характеристики клеток моноцитарно-макрофагальной (Iba-1-позитивных клеток) системы и антигенпрезентирующих клеток с главным комплексом гистосовместимости второго класса (MHC II-позитивных клеток) селезенки крыс при воздействии водного раствора хлорида кальция.

3. Оценить воздействие хлорида кальция на состояние кальмодулин-позитивных клеток, содержащих внутриклеточный рецептор ионов кальция, селезенки крыс.

4. Изучить распределение компонентов клеточного ($CD4^+$, $CD8^+$) и гуморального ($CD20^+$) иммунного ответа селезенки, их взаимоотношения в структурах селезенки лабораторных крыс в ответ на длительное поступление хлорида кальция с питьевой водой.

5. Исследовать содержание биогенных аминов (гистамина, серотонина, катехоламинов) в люминесцирующих структурах селезенки лабораторных крыс в моделируемых условиях эксперимента.

6. Провести контроль биодоступности хлорида кальция, поступавшего с питьевой водой в течение 60 суток, с определением концентрации общего кальция в сыворотке крови и ее корреляционных взаимосвязей с морфологическими показателями селезенки лабораторных крыс.

Научная новизна

При комплексном исследовании впервые установлены морфологические и иммуногисто-химические изменения селезенки лабораторных крыс при поступлении в организм хлорида кальция с питьевой водой в течение 60 суток, сопровождающиеся увеличением площади белой пульпы селезенки на фоне повышения количества первичных лимфоидных узелков и площадей периартериолярных лимфоидных муфт, герминативных центров и маргинальных зон.

Доказано, что употребление соединения кальция повышает количество и площади клеток моноцитарно-макрофагальной системы (Iba-1-позитивных клеток) и антигенпрезентирующих (MHC II-позитивных) клеток селезенки лабораторных крыс.

Впервые установлено воздействие кальция на систему кальций-связывающих пептидов селезенки с усилением экспрессии внутриклеточного рецептора ионов

кальция, увеличением количества и сокращением площади кальмодулин-позитивных клеток.

Получены новые научные данные, что употребление хлорида кальция с питьевой водой сопровождается перераспределением компонентов клеточного и гуморального звеньев иммунного ответа селезенки: повышением количества $CD4^+$ клеток белой пульпы, $CD8^+$ клеток красной пульпы на фоне сокращения количества $CD20^+$ клеток во всех морфо-функциональных зонах, кроме герминативных центров.

Установлено, что употребление соединения кальция с питьевой водой вызывает однонаправленное снижение уровня люминесценции гистамина, серотонина и катехоламинов в клетках красной пульпы селезенки и разнонаправленное распределение исследуемых биогенных аминов в люминесцирующих гранулярных клетках белой пульпы: увеличение интенсивности люминесценции серотонина и катехоламинов и снижение в них – гистамина.

Впервые выявлены тесные прямые корреляционные взаимосвязи между концентрацией общего кальция в сыворотке крови и уровнями экспрессии пептида Iba-1, молекул МНС II класса, кальмодулина, $CD4$, $CD8$, $CD20$ и обратная зависимость с показателями люминесценции биогенных аминов (гистамина, серотонина, катехоламинов) в клетках селезенки крыс.

Доказано, что употребление хлорида кальция с питьевой водой в концентрации 235 мг/л (в пересчете на кальций) в течение 60 суток адекватно использовать в качестве моделирования экспериментальной гиперкальциемии у лабораторных крыс.

Теоретическая и практическая значимость работы

Результаты диссертационного исследования существенно расширяют представления о возможных механизмах иммуномодулирующего влияния кальция, дополняют современные данные о структурно-функциональном состоянии селезенки и ее иммунокомпетентных клеток при адаптации к воздействию водного

раствора хлорида кальция и экспериментальной гиперкальциемии. Научные положения и выводы диссертации позволяют выработать подходы к регуляции различных звеньев иммунной системы с помощью препаратов кальция и способу моделирования экспериментальной гиперкальциемии у лабораторных крыс с последующей оценкой морфологических изменений органов и тканей.

Полученные научные данные и практические рекомендации могут быть использованы в учебном процессе при проведении лекционных и практических занятий ВУЗов медико-биологического профиля при изучении дисциплин «Гистология», «Иммунология», «Фармакология», «Гигиена», при написании учебных пособий по клеточной биологии, цитологии, гистологии, иммунологии, фармакологии, биоэлементологии. Особый интерес эти данные представляют для морфологов, фармакологов, врачей терапевтов и иммунологов.

Реализация результатов исследования

Полученные научные и экспериментальные данные используются в учебном процессе при чтении лекций и проведении практических занятий и семинаров на кафедрах медицинской биологии с курсом микробиологии и вирусологии; общей и клинической морфологии и судебной медицины; дерматовенерологии с курсом гигиены ФГБОУ ВПО «Чувашский государственный университет имени И.Н. Ульянова». Результаты исследования отражены в опубликованных статьях и тезисах, актах внедрения результатов диссертации в практическую работу: разработаны рекомендации по оценке комплексного влияния соединения кальция на изменения селезенки и ее иммунокомпетентных клеток для врачей различных специальностей, использующих в своей практике препараты кальция (БУ «Республиканская клиническая больница» Министерства здравоохранения Чувашской Республики от 29.12.2015 г.); результаты настоящего исследования используются при проведении семинаров, подготовке лекционных циклов и плановой аттестации медицинских сотрудников учреждения, включающие: проблематику распространенного дефицита кальция в крови населения Чувашской Республики, меры его

профилактики и лечения, морфо-функциональные реакции селезенки на регулярное употребление препаратов кальция (ООО «МЕДТЕСТ» г. Чебоксары от 02.02.2015 г.); на основе результатов диссертационной работы проведена разработка рецептуры хлеба, обогащенного кальцием, направленного на профилактику и лечение распространенного дефицита кальция населения, выпуск пробной партии готовой продукции, изучение ее свойств и характеристик, сравнительный анализ разработанных ранее рецептур обогащенной хлебобулочной продукции, получена Декларация о соответствии с требованиями по ГОСТ 52961-2008, 51074-03р, СанПиН 2.3.2.1078-01 (ЗАО «Хлебокомбинат Петровский» от 02.11.2015 г.). В рамках реализации настоящего исследования оформлены два объекта интеллектуальной собственности – заявка на изобретение «Способ производства хлеба, обогащенного кальцием», рег. № RU2011147903А, опубликовано 27.05.2013 г., бюл. №15; результат интеллектуальной деятельности, выполненной по личной инициативе (ноу-хау) «Секрет производства хлеба, обогащенного кальцием» от 20.09.2011 г.

Методология и методы научного исследования

Методологическую основу настоящей диссертационной работы составляет экспериментальное исследование в рамках конкретных задач фундаментальной науки. Алгоритм исследования включал в себя: комплексный анализ отечественных и зарубежных научных литературных источников по теме диссертации с преимуществом выбора современных данных последних лет, системный подход к построению научных теорий и их доказательств, выявление проблемы и оценка ее актуальности, анализ полученных данных и синтез выводов. При проведении исследования использованы эмпирические методы: формирование экспериментальной модели употребления соединения кальция лабораторными животными, обработка полученного материала комплексом научно обоснованных методов: общегистологическими, иммуногистохимическими, люминесцентно-гистохимическими методами с применением цитоспектрофлуометрии, морфометрии и по-

следующей статистической обработки цифровых данных. Выбор методов исследования основан на поиске наиболее эффективных и специфичных подходов к решению поставленных задач исследования и экспериментальном опыте других ученых.

Научные положения, выносимые на защиту:

1. Употребление соединения кальция с питьевой водой сопровождается морфологическими изменениями селезенки лабораторных крыс: увеличением площади белой пульпы на фоне повышения количества первичных лимфоидных узелков и площадей периартериолярных лимфоидных муфт, герминативных центров и маргинальных зон. При этом происходит однонаправленное снижение интенсивности люминесценции гистамина, серотонина, катехоламинов в клетках красной пульпы и разнонаправленное распределение исследуемых биогенных аминов в клетках белой пульпы: увеличение интенсивности люминесценции серотонина и катехоламинов и снижение – гистамина.

2. При поступлении соединения кальция выявляются иммуногистохимические изменения селезенки лабораторных крыс: повышение количества и площади клеток моноцитарно-макрофагальной системы (Pbа-1-позитивных клеток) и антигенпрезентирующих (МНС II-позитивных) клеток, увеличение количества и сокращение площади кальмодулин-позитивных клеток. Происходит перераспределение компонентов клеточного и гуморального звеньев иммунного ответа селезенки: увеличение количества $CD4^+$ клеток белой пульпы, $CD8^+$ клеток красной пульпы на фоне сокращения количества $CD20^+$ клеток во всех морфофункциональных зонах, кроме герминативных центров.

Степень достоверности и апробация результатов

Достоверность результатов диссертационного исследования подтверждается достаточным количеством наблюдений, выбором современных методов исследования, которые соответствуют поставленным целям и задачам. Научные положе-

ния, выводы и рекомендации, сформулированные в диссертации, основаны на экспериментальных данных (гистологические препараты, цифровые данные), которые обработаны на сертифицированном оборудовании. Подготовка, статистический анализ и интерпретация полученных результатов проведены с использованием современных методов обработки информации и статистического анализа.

Основные научные положения, выводы и результаты работы доложены и обсуждены на: II съезде физиологов СНГ (Кишинев, Молдова, 29–31 октября 2008 г.), XIV, XV, XIX, XII Международных конгрессах по реабилитации в медицине и иммунореабилитации (Дубай, ОАЭ, 2009, 2010, 2013, 2016 гг.), XX Европейской студенческой конференции (20th European Students' Conference) (Берлин, Германия, 4–7 октября 2009 г.), Международной конференции «Актуальные проблемы частной медицины» (Киев, Украина, 4–6 ноября 2009 г.), V Общероссийской научной конференции «Современные проблемы науки и образования» (Москва, 16–18 февраля 2010 г.), VI Открытом конкурсе инновационных проектов по программе «Участник молодежного научно-инновационного конкурса» (УМНИК-2009) (Чебоксары, 12–13 апреля 2009 г.), XIV Международном конгрессе по реабилитации в медицине и иммунореабилитации (Тель-Авив, Израиль, 17–20 октября 2009 г.), III Международной студенческой научной конференции с участием молодых ученых "Клинические и теоретические аспекты современной медицины", посвященной 50-летию медицинского факультета РУДН (Москва, 6–8 апреля 2011 г.), III Всероссийском конкурсе программы «УМНИК на СТАРТ» (Рязань, 9–15 сентября 2012 г.), XXII Международной научной конференции «Инновационные медицинские технологии» (Москва, 13–15 ноября 2014 г.), I Международной научной конференции (1st International Scientific Conference) «European Applied Sciences: challenges and solutions» (Штутгарт, Германия, 9 марта 2015 г.), 89-й Всероссийской научно-практической конференции студентов и молодых ученых (Казань, 31 марта–2 апреля 2015 г.), XXI Всемирном конгрессе по реабилитации в медицине и иммунореабилитации (Сингапур, 26–29 апреля 2015 г.) и расширенном заседании кафедры медицинской биологии с курсом мик-

робиологии и вирусологии ФГБОУ ВО «Чувашский государственный университет имени И. Н. Ульянова» (Чебоксары, 12.05.2016 г.).

Сведения о публикациях

Основные положения диссертации отражены в 31 опубликованной научной работе, 10 из них (3 статьи, 7 публикаций с тезисами докладов) – в ведущих рецензируемых научных журналах и изданиях из перечня ВАК РФ, рекомендованных для публикации основных результатов диссертаций на соискание ученых степеней.

Структура и объем диссертации

Диссертация изложена на 240 страницах компьютерного исполнения и состоит из введения, глав: обзора литературы, описания материала и методов исследования, результатов собственного исследования, обсуждения результатов, заключения, выводов, практических рекомендаций, перспектив настоящего исследования, списков сокращений, использованной литературы и иллюстративного материала. Работа иллюстрирована 21 таблицей, 69 рисунками, включая 40 микрофотографий. Список литературы содержит 258 отечественных и 143 зарубежных источников.

Личное участие автора

Автором сделан обширный обзор и сравнительный анализ отечественных и зарубежных исследований по теме диссертации, отдавая предпочтение данным последних пяти лет, которые были использованы для постановки задач, написания литературного обзора и обсуждения результатов исследований. Все результаты гистологических экспериментов, представленные в диссертации, собраны, статистически обработаны параметрическими и непараметрическими методами и проанализированы лично автором. Автор организовал и провел циклы экспериментальных работ на лабораторных животных в течение десяти лет

(2006–2016 гг.), включающие: выбор экспериментальных животных, сроков и дозировки воздействия соединения кальция, забор органов, приготовление криостатных и депарафинированных срезов селезенки, забор периферической крови из бедренной вены для последующего определения концентрации общего кальция в сыворотке крови, окраску срезов гематоксилином и эозином, выбор иммуногистохимических маркеров, микроскопирование, фотографирование, морфометрический анализ структур селезенки, постановку люминесцентно-гистохимических реакций по методу Фалька-Хилларпа в модификации Е.М. Крохиной и методу Кросса, Эвена, Роста с последующей цитоспектрофлуориметрией и статистической обработкой полученных цифровых данных. Полученные результаты автором эмпирически подтвердили непосредственное влияние кальция на периферический орган иммунной системы – селезенку.

Автором сформулированы практические рекомендации по применению препаратов кальция населением и успешно внедрены в производство хлеба, обогащенного кальцием, активно поддерживая сотрудничество с предприятиями города Чебоксары. По итогам проведенных исследований автором оформлены научные публикации и другие объекты интеллектуальной собственности, отражающие актуальность и новизну полученных результатов.

Связь работы с базовыми научными программами

Работа поддержана двумя научными грантами Фонда содействия развитию малых форм предприятий в научно-технической сфере РФ: «Исследование морфофункциональных изменений биоаминсодержащих структур селезенки при водном воздействии кальция» (государственный контракт № 6975р/9584 от 04.09.2009 г.) (конкурс «УМНИК– 2009»); «Разработка оптимального состава хлеба, обогащенного кальцием, и исследование влияния продукта на показатели состояния здоровья обследуемых групп населения» (государственный контракт № 11306р/20545 от 14.01.2013 г.) (конкурс «УМНИК на СТАРТ– 2012»).

ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1. Современные представления о морфологических и функциональных особенностях селезенки

Селезенка является самым крупным лимфоидным органом. Она активно участвует в развитии и поддержании клеточного и гуморального иммунного ответа, врожденного и приобретенного иммунитета, количественного и качественного состава иммунных клеток крови, лимфы и других лимфоидных органов (Прасолова Л. А. с соавт., 2004; Нестерова А. А. с соавт., 2006; Шапкин Ю. Г., 2009; Рябикина А. И. с соавт., 2008; Быков В. Л., 2011; Slayton W. V. et al., 2002; Cesta M. F., 2006; Coico R. et al., 2015).

Обобщая литературные данные, можно выделить, по крайней мере, четыре основные функции селезенки. Во-первых, это орган иммунной системы, способствующий элиминации микроорганизмов и антигенов из периферической крови, а также генерации гуморального и клеточного иммунного ответа (Ройт А. с соавт., 2000; Труфакин В. А. с соавт., 2005, 2012; Хаитов Р. М., 2013; Ruddle N. H. et al., 2009; Coico R. et al., 2015). В селезенке происходят антигензависимая пролиферация, дифференцировка Т- и В-лимфоцитов и образование антител, а также выработка веществ, угнетающих эритропоэз в красном костном мозге (Сапин М. Р. с соавт., 1990, 2000, 2012; Афанасьев Ю. И. с соавт., 2012). Во-вторых, селезенка – мощный макрофагический орган, который участвует в фильтрации и удалении аномальных клеток крови, а продукты распада последних (железо, белки) вновь используются в организме (Гугушвили Н. Н. с соавт., 2001; Кузник Б. И. с соавт., 2007; Шапкин Ю. Г., 2009; Cochrane C. G. et al., 1996). В-третьих, сосудистая сеть селезенки играет определенную роль в регуляции кровотока. В ней депонированы 30 – 50% всех тромбоцитов и часть нейтрофилов, которые могут выбрасываться в периферическое русло при кровотечениях или в ответ на инфекцию (Кузник Б. И. с соавт., 2007; Maekawa T. et al., 2010). В-четвертых, хотя в норме у взрослых ме-

стом гемопоэза служит костный мозг, при некоторых патологических состояниях, связанных с замещением или сверхстимуляцией костного мозга, селезенка становится местом экстрамедуллярного гемопоэза (Бобова Л. П. с соавт., 2003; Воробьев А. И., 2005; Шапкин Ю. Г., 2009). Гугушвили Н. Н. с соавт. (2001) свидетельствуют, что селезенка у грызунов – универсальный орган кроветворения, где образуются клетки лимфоидного, эритроидного и гранулоцитарного ростков, а также важный орган лимфоцитобразования и иммунитета.

Известно, что селезенка крысы и человека имеет сходную гистологическую структуру (Молдавская А. А. с соавт., 2005; Кащенко С. А. с соавт., 2013; Mebius R. E. et al., 2005). Экспериментально доказано, что их селезенка относится к синусному защитному типу: запасает немного крови и имеет относительно небольшой объем красной пульпы. Отличие представляет селезенка кошки, мыши, лошади и коровы – несинусного запасящего типа, которая не имеет венозных синусов, и кровь из терминальных сосудов изливается в пульпу, а затем собирается в вены. Селезенки обоих типов имеют симпатическую иннервацию (Данилов Р. К., 2010, С. 401).

Закладка селезенки у крыс выявляется на 5-ой неделе внутриутробного развития (Молдавская А. А. с соавт., 2007). Исследования Мельниковой В. И. с соавт. (2006) доказали, что у крыс эмбрионального периода, в отличие от половозрелых животных, Т-лимфоциты, покидающие тимус, первично заселяют красную пульпу селезенки и только потом мигрируют в соответствующие зоны белой пульпы. В работе отмечено, что численность клеточных популяций селезенки в пренатальном периоде развития контролируется гипоталамо-гипофизарной системой. Известно, что к 10 суткам после рождения в белой пульпе появляются очертания маргинальной зоны, а к 15 суткам образуются единичные первичные лимфоидные узелки (Капитонова М. Ю. с соавт., 2001, 2007; Рябикина А. И. с соавт., 2008; Кащенко С. А. с соавт., 2013). Согласно исследованию последних лет, проведенному Кащенко С. А. с соавт. (2013), к 21 суткам постнатального периода происходит формирование зрелых вторичных лимфоидных узелков и зон периартериолляр-

ных лимфоидных муфт селезенки крыс, что является признаком наступления функциональной зрелости иммунного аппарата органа. Так, в период новорожденности во многих периферических иммунных органах уже имеются лимфоидные узелки, в том числе и с центрами размножения (Молдавская А. А. с соавт., 2007).

Снаружи селезенка покрыта фиброзной капсулой, от которой внутрь органа отходят соединительнотканые трабекулы. Между последними располагается белая и красная пульпа органа (Афанасьев Ю. И. с соавт., 2012; Гемонов В. В. с соавт., 2013; Kraus M. D., 2003; Cesta M. F., 2006). Имунокомпетентный компартамент селезенки представлен белой пульпой, в которой формируются две основные области локализации преимущественно В- и Т-лимфоцитов (Быков В. Л., 2011; Гемонов В. В. С соавт., 2013; Волков В. П., 2015; Ross M. H. et al., 2011). К ним относятся периартериолярные лимфоидные муфты (ПАЛМ) и лимфоидные узелки (ЛУ) (Бахмет А. А., 2004; Афанасьев Ю. И. с соавт., 2012; Stacey E. M., 2007; Terminologia Histologica, 2009).

Основной иммунной структурой селезенки следует считать периартериолярную лимфоидную муфту, которая окружает центральную артериолу и образована несколькими слоями клеток лимфоидного ряда, состоящих из малых и средних лимфоцитов, а также единичных больших лимфоцитов (Бобрышева И. В., 2013; Slayton W. B. et al., 2002; Auerbach A., 2014). В основном, это Т-лимфоциты, которые, в свою очередь, активно взаимодействуют с интердиггирующими макрофагами, передающими им информацию о состоянии микроокружения селезенки, стимулируя их бласттрансформацию и пролиферацию (Бережная Н. М. с соавт., 2009; Вишневская Т. Я. с соавт., 2011; Кузнецова Е. П. с соавт., 2013; Bulloch K. et al., 1998). Тем самым, ПАЛМ селезенки относят к Т-зависимой зоне, которая участвует преимущественно в регуляции клеточного иммунного ответа (Бибик Е. Ю. с соавт., 2011; Janeway Ch. et al., 2001; Gavin M. A. et al., 2002; Germain R. N., 2002; Swain S. L. et al., 2006; Ruddle N. H. et al., 2009).

Согласно исследованиям S. Sasou и T. Sugai (1992), периартериолярную лимфоидную муфту у крыс можно подразделить на три зоны: центральную, периферическую и соединительнотканые каналы, переходящие в маргинальную зону. Морфологически данные области отличаются концентрацией ретикулярных волокон и расположением малых лимфоцитов с темными ядрами, а также наличием макрофагов и плазматических клеток (Sasou S. et al., 1992; McEwen B. S. et al., 1998; Chun Y. S. et al., 2011).

Герминативные центры (ГЦ) хорошо выражены по сравнению с другими зонами лимфоидного узелка вследствие наличия в них крупных, светлых молодых форм лимфоцитов (Бобрышева И. В., 2013; Auerbach A., 2014). Центры размножения селезенки состоят из пролиферирующих В-лимфоцитов, которые дифференцируются в плазматические клетки и являются продуцентами иммуноглобулинов – главных компонентов гуморального иммунного ответа (Carrol M. S., 1998; Samitas K. et al., 2010). Важно отметить, что этот факт является функциональным признаком зрелости лимфоидного узелка селезенки (Cesta M. F., 2006). По данным Auerbach A. (2014) 2% от всего клеточного состава герминативного центра составляют бластные формы, а 0,7% – клетки с признаками митоза. Также здесь локализуются скопления макрофагов с фаготицированными лимфоцитами, ретикулярные и дендритные клетки (Вишневская Т. Я. с соавт., 2011).

Мантийная зона (МТЗ) окружает периартериолярную зону и герминативные центры лимфоидного узелка селезенки. В данной зоне находится много малых В-лимфоцитов и небольшое количество Т-лимфоцитов, плазмоцитов и макрофагов (Шаршимбеев Ж. А., 2004; Гербут А. О., 2007; Кузнецов С. Л. с соавт., 2007; Гемонов В. В. с соавт., 2013; Terminologia Histologica, 2009). Клетки мантийной зоны плотно прилегают друг к другу и расслаиваются циркулярно направленными толстыми ретикулярными волокнами (Кузнецова Е. П. с соавт., 2013; Schneider D. A., 2011). Отмечено, что количество ретикулярных клеток в этой зоне увеличивается с возрастом (Сапин М. Р. с соавт., 2000, 2012). Как считают Сапин

М. Р. и Амбарцумян Е. Ф. (1990), мантийная зона не участвует в процессах пролиферации иммунокомпетентных клеток.

Маргинальная зона (МГЗ) узелков селезенки представляет собой переходную область между белой и красной пульпой (Кузнецов С. Л. с соавт., 2007; Кузнецова Е. П. с соавт., 2013; Kraal G. et al., 2006). Она состоит из Т- и В-лимфоцитов, единичных макрофагов, ретикулярных клеток, моноцитов, эозинофилов и окружена маргинальными синусоидными сосудами с щелевидными порами в стенке (Кузнецова Е. П. с соавт., 2013; Steiniger B. et al., 2001; McGaha T. L. et al., 2011). По мнению зарубежных исследователей, именно маргинальная зона участвует в иммунном ответе, в удалении из кровотока инородных включений, являясь «местом захвата» измененных клеток крови и иммунных комплексов (Cesta M. F., 2006; Kraal G. et al., 2006; Kiss F. et al., 2010). Korkusuz P. et al. (2002) доказали, что число В-лимфоцитов здесь в 2–3 раза больше, чем в герминативных центрах лимфоидных узелков. Макрофаги маргинальной зоны способны переносить большее число антигенов, чем данный тип клеток красной пульпы. Также доказано присутствие здесь особой популяции макрофагов, мигрирующих в белую пульпу, в том числе и в центры размножения (McGaha T. L. et al., 2011).

Сложное строение лимфатических фолликулов селезенки, включающих тимусзависимые, тимуснезависимые и макрофагальные элементы, создает благоприятные условия в органе для кооперации клеток в иммунном ответе (Масляков В. В. с соавт., 2012; Бобрышева И. В., 2013; Гемонов В. В. с соавт., 2013; Kraus M. D., 2003; Auerbach A., 2014). Именно селезенка является главным источником антител, в которой раньше, чем в каком либо другом органе, в ответ на введение антигенных частиц начинается синтез Ig M. После появления антигенов в кровотоке уже на второй день происходит активация лимфоцитов в белой пульпе селезенки (Бахмет А. А., 2004; Стаценко Е. А., 2009; Макалиш Т. П., 2013). Гербут А. О. (2007) экспериментально доказала, что одноразовая антигенная стимуляция организма нормальным иммуноглобулином человека вызывает в течение месяца изменения плотности лимфоцитов, плазмочитов, макрофагов белой пульпы селе-

зенки белых крыс-самцов. Исследования Маслякова В. В. с соавт. (2012) показали, что удаление селезенки приводит к снижению продукции Th1- и Th2-лимфоцитов и, как следствие, к снижению показателей ИФН- γ и ИЛ-4 в организме исследуемых белых лабораторных крыс.

Красная пульпа занимает около 3/4 всего объема селезенки и состоит из ретикулоцитов и макрофагов, формирующими тяжи, в состав которых входят эритроциты, гранулярные и агранулярные лейкоциты, плазмоциты на разных стадиях созревания (Кузнецов С. Л. с соавт., 2007; Данилов Р. К., 2010; Вишневская Т. Я. с соавт., 2011). Точно не выяснено, как фагоциты различают стареющие и жизнеспособные клетки. По-видимому, имеет значение характер происходящих в этих клетках биохимических и биофизических изменений (Бобова Л. П. с соавт., 2003; Воробьев А. И., 20005; Korkusuz P. et al., 2002). Существует предположение, согласно которому селезенка очищает циркулирующую кровь от клеток с измененной мембраной (Воробьев А. И., 2005; Cesta M. F., 2006).

Согласно материалам Черненко Н. В. (2007) и Tomikawa M. et al. (2002) спленэктомия у крыс уже в первые сутки приводит к дистрофическим изменениям гепатоцитов печени. Кострова О. Ю. с соавт. (2015) выявили повышение количества АПУД-клеток надпочечников крыс при снижении площади мозгового вещества органа в ответ на спленэктомию.

В подтверждение тесных взаимосвязей лимфоидных органов Жданов В. В. с соавт. (2002) экспериментально доказали, что тимэктомия у мышей приводит к активации эритропоэза в селезенке, а у животных с врожденным отсутствием тимуса наблюдаются угнетение лимфоидного и эритроидного ростков кроветворения, активация костномозгового грануломоноцитопоэза и компенсаторное увеличение количества эритроидных клеток в селезенке.

Согласно данным Гугушвили Н. Н. с соавт. (2001) селезенка у грызунов является универсальным органом кроветворения, где образуются клетки лимфоидного, эритроидного и гранулоцитарного ростков, а также важным органом лимфоцитобразования и иммунного ответа. Таким образом, выбор селезенки в каче-

стве экспериментальной модели для оценки влияния макроэлементного воздействия обоснован тем, что она принимает участие практически во всех иммунных и гемопоэтических процессах, являясь центром антигензависимой пролиферации и дифференцировки компонентов как клеточного, так и гуморального иммунного ответа, его активации, а также продукции и секреции специфических иммуноглобулинов (Auerbach A., 2014).

1.1.1. Антигенпрезентирующие клетки селезенки

Антигенпрезентирующие клетки (АПК, antigen-presenting cell, APC) – иммунокомпетентные клетки, ответственные за переработку (процессинг) антигена путем эндоцитоза, расщепление его до пептидных фрагментов, связывание внутри клетки с молекулами МНС I или II класса и его последующую презентацию различным популяциям лимфоцитов (Попов Н. Н. с соавт., 2004; Van Rooijen N., 1990; Fung-Leung W. P. et al., 1996; Ross M. H., 2011). Специализированными АПК являются макрофаги (Lundahi J. et al., 1996), дендритные клетки (Banchereau J. et al., 1998), В-лимфоциты (Ingle G. S. et al., 2008; Nitschke L., 2009), интердигитирующие клетки (Franceschi C. et al., 1999; Eisenbarth G. S., 2011).

По результатам многих исследователей АПК идентифицированы и изучены в селезенке (Раковщик А. Л. с соавт., 2002; Бахмет А. А., 2004; Прасолова Л. А. с соавт., 2004; Шаршимбеев Ж. А., 2004; Капитонова М. Ю. с соавт., 2007; Моталов В. Г., 2008; Рябикина А. И. с соавт., 2008; Молдавская А. А. с соавт., 2007; Сизова Е. А. с соавт., 2010; Бобрышева И. В., 2013; Гордова В. С. с соавт., 2014; Korkusuz P. et al., 2002; Kraus M. D., 2003; Maekawa T. et al., 2010; Cao Q. et al., 2014). В периферической лимфоидной ткани имеются типы специализированных АПК, которые способны улавливать антиген и представлять его в иммунной форме на своей поверхности для распознавания (Труфакин В. А. с соавт., 2005; Нестерова А. А. с соавт., 2006; Van Rooijen N., 1990; Janeway Ch. et al., 2001; Rubtsov Y. P. et al., 2012). Функция этих клеток – представление антигенных пеп-

тидов в комплексе с молекулами МНС, придание проникшему антигену иммуностимулирующих свойств (Бибик Е. Ю. с соавт., 2011; Хаитов Р. М., 2013; Farber D. L. et al., 1995; Goldstein J. S. et al., 2000; Coico R. et al., 2015).

Антигены, попадающие непосредственно в кровоток, в том числе и из периферических тканей, захватываются АПК селезенки, и в белой пульпе лимфоидные клетки сенсibiliзируются (Мешкова Р. Я., 1998; Abbas A. K. et al., 2014). Так, первое взаимодействие примитивных Т-клеток с антигеном происходит в периферических лимфоидных органах: в лимфоузлы чужеродные агенты транспортируются с лимфой, в селезенку – с кровью (Мешкова Р. Я., 1998; Песнякевич А. Г., 2007; Cesta M. F., 2006; Owen J. et al., 2013). Далее антигены фиксируются на АПК маргинальной зоны, откуда транспортируются в белую пульпу и расположенные в ней центры размножения (Steiniger B. et al., 2001; Kraus M. D., 2003; Coico R. et al., 2015). Эти антигены индуцируют образование лимфобластов в тимусзависимой зоне лимфоидных узелков селезенки, а в тимуснезависимой зоне происходит пролиферация лимфоцитов и образование плазматических клеток (Труфакин В. А. с соавт., 2005; Бобрышева И. В., 2013; Janeway Ch. et al., 2001).

Определенные АПК играют центральную роль в индукции функциональной активности хелперных Т-клеток (Труфакин В. А. с соавт., 2005; Кветной И. М., 2002). CD4 идентифицирован на мембранах Т-лимфоцитов с помощью моноклональных антител как маркер Т-хелперов. CD4 локализуется на поверхности кортикальных тимоцитов (Бибик Е. Ю. с соавт., 2011; Ялалетдинова Л. Р. с соавт., 2013; Kamiński P. et al., 2000), части зрелых периферических Т-лимфоцитов (40–50% из них – Т-хелперы) (Попов Н. Н. с соавт., 2004; Reinhardt R. L. et al., 2001; Gavin M. A. et al., 2002; Swain S. L. et al., 2006). CD4-рецепторы обнаруживаются также на мембранах других клеток: моноцитах (Хаитов Р. М., 2013; Lundahi J. et al., 1996), макрофагах (Ярилин А. А., 2010; Korkusuz P. et al., 2002), эозинофилах, мегакариоцитах (Germain R. N., 2002), дендритных клетках (Лолор Г.-мл.с соавт., 2000; Kronin V. et al., 2001). Важно отметить, что не все CD4-позитивные клетки относятся к Т-хелперам. Функция CD4 обусловлена, в

первую очередь, способностью связываться с молекулами МНС класса II и участвовать в распознавании антигенных комплексов на поверхности АПК (Хаитов Р. М., 2013; Farber D. L. et al., 1995; Germain R. N., 2002; Coico R. et al., 2015). Различают два функциональных типа $CD4^+$ клеток с разными точками приложения: Th1 участвуют в активации макрофагов, содержащих внутри антигены, и Th2 – в активации В-лимфоцитов, вызывая их дифференцировку в плазматические клетки и секрецию специфических иммуноглобулинов (Мешкова Р. Я., 1998; Масляков В. В. с соавт., 2012; Germain R. N. et al., 2002; Abbas A. K. et al., 2014).

CD8 идентифицирован как маркер субпопуляции цитотоксических Т-лимфоцитов, а также на части натуральных киллеров (NK) (Лолор Г.-мл. с соавт., 2000; Mason D. Y. et al., 1992; Korkusuz P. et al., 2002; Svensson M. et al., 2002; Abbas A. K. et al., 2014; Coico R. et al., 2015). На зрелых Т-клетках экспрессируется либо CD8, либо CD4, на незрелых иммунокомпетентных клетках они коэкспрессируются (Попов Н. Н. с соавт., 2004; Бибик Е. Ю. с соавт., 2011; Kamiński P. et al., 2000). Роль CD8 при распознавании антигена состоит в обеспечении клеточной адгезии, повышении сродства комплекса CD3-TcR-CD8 к антигену, ассоциированному с антигеном МНС класса I, и передаче сигнала в клетку (Goldstein J. S. et al., 2000; Svensson M. et al., 2002).

CD20 экспрессирован у человека, мышей и крыс на В-лимфоцитах. Он встречается как на покоящихся, так и на активированных В-лимфоцитах, но отсутствует на плазматических клетках (Ройт А. с соавт., 2000; Samitas K. et al., 2010). CD20 начинает синтезироваться на ранних стадиях дифференцировки В-клеток – в пре-В-клетках – до появления тяжёлых цепей иммуноглобулинов в цитоплазме. Известно, что данный маркер исчезает только при финальной дифференцировке В-клетки в плазматическую клетку (Bourget I. et al., 1993; Chang C.-C. et al., 2004). CD20 также присутствует на поверхности злокачественных клеток при большинстве В-клеточных лимфопролиферативных заболеваний (Janas E. et al., 2005; Boross P. et al., 2012; Jain P. et al., 2013). CD20 принимает участие в В-клеточной активации и пролиферации (Ройт А. с соавт., 2000; Барсук А. В. с соавт., 2013), в

обеспечении оптимального В-лимфоцитарного иммунного ответа, в частности против Т-независимых антигенов (Gibson J. et al., 2010; Kuijpers T. W. et al., 2010).

Фолликулярные дендритные клетки (ФДК), презентующие антигены В-клеткам, содержатся в первичных и вторичных лимфоидных узелках В-клеточных областей селезенки (Макаренкова В. П. с соавт., 2002; Karasi Z. F. et al., 1993; Vanchereau J. et al., 1998). Прочно соединяясь десмосомами отростков и образуя стабильную сеть, они не мигрируют из мест своего расположения. ФДК не экспрессируют белки МНС класса II, но связывают антигены посредством рецепторов к компонентам комплемента (CD21 и CD35), ассоциированными в данном случае с иммунными комплексами (Carrol M. C., 1998; Ingle G. S. et al., 2008). Кроме того, ФДК экспрессируют рецепторы для Fc-иммуноглобулинов (Лолор Г.-мл. с соавт., 2000; Гугушвили Н. Н. с соавт., 2001; Abbas A. K. et al., 2014).

Другой вид АПК был обнаружен в центрах размножения внутри вторичных В-клеточных лимфоидных узелков – дендритные клетки центров размножения, в отличие от ФДК, экспрессируют белки МНС класса II и способны к миграции (Пальцев А. А. с соавт., 2003; Быков В. Л., 2011; Gibson J. et al., 2010; Ross M. H. et al., 2011).

Установлено, что моноциты, активированные *in vitro* гранулоцитарно-макрофагальным колониестимулирующим фактором и интерлейкином-4, теряют способность к фагоцитозу и превращаются в АПК, приобретая морфологию дендритных клеток, и начинают экспрессировать белки МНС класса II (Glimcher L. H. et al., 1992; Farber D. L. et al., 1994).

Классические В-клетки обильно экспрессируют молекулы МНС класса II (особенно после активации) и способны, следовательно, расщеплять и представлять специфические антигены активированным Т-клеткам (Karasi Z. F. et al., 1993; Coico R. et al., 2015).

Особую роль играют процессы меж- и внутриклеточной сигнальной трансдукции, которые регулируют процессы функциональной активности и апоптоза (Зинченко В. П. с соавт., 2003; Пальцев М. А. с соавт., 2003; Ткачук В. А. с соавт.,

2011; Carafoli E. et al., 2007; Schatten H., 2013). Для связывания ионов Ca^{2+} на мембранах, в цитоплазме и органоидах клеток существуют специфические белки различные по своей структуре.

Iba-1 – кальций-связывающий пептид, который является специфическим маркером всех макрофагов (дентритных, интердигитирующих). Данный белок расположен в цитоплазме и ядрах изученных клеток (Кирик О. В. с соавт., 2010). Белок Iba-1 кодируется геном AIF-1, который располагается в области главного комплекса гистосовместимости класса III (Kohler C., 2007). Этот белок участвует в регуляции процесса фагоцитоза у макрофагов и микроглиоцитов (Platten M., 2003; Ahmed Z. et al., 2007). В последние годы иммуноцитохимическую реакцию на белок Iba-1 успешно применяют для маркировки активированной микроглии в ЦНС (Кирик О. В. с соавт., 2010; Platten M., 2003). По данным зарубежных исследователей, пептид Iba-1 локализуется в типичных макрофагах маргинальной зоны и красной пульпы селезенки крыс (Kohler C., 2007; McGaha T. L. et al., 2011). Продолжая изучение органов иммунной системы, Дьячковой И. М. (2009) обнаружено влияние солей кальция и кремния на тимус лабораторных крыс с увеличением средней площади и количества Iba-1-позитивных клеток в мозговом веществе долек органа. Гордова В. С. с соавт. (2014), смоделировав диету с длительным поступлением соединения кремния, определила увеличение размеров Iba-1-позитивных клеток на границе коркового и мозгового вещества долек тимуса и уменьшение средних размеров данных клеток в маргинальной зоне белой пульпы и в красной пульпе селезенки крыс.

Кальмодулин (КМ) функционирует как многоцелевой внутриклеточный рецептор для ионов Ca^{2+} , участвующий в большинстве процессов, регулируемых ими (Colbran R. J., 2004; Domínguez D. C. et al., 2014). Он обнаружен почти во всех клетках животных и растений. Типичная животная клетка содержит более 107 молекул КМ, что соответствует почти 1% всего клеточного белка. Взаимодействуя с КМ, Ca^{2+} может изменять активность около 100 ферментов (Орлов С. Н., 1987; Авдонин П. В. с соавт., 1994; Зинченко В. П. с соавт., 2003; Kincaid R. L. et al.,

1993; Burgoyne R. D. et al., 2001; Bogeski I. et al., 2011; Prell T. et al., 2013; Ghosh A. et al., 2015). КМ относится к консервативным одиночным полипептидам (148 аминокислот), имеющим четыре высокоаффинных Ca^{2+} -связывающих центра: два участка высокого сродства и два – низкого (Alonso M. T. et al., 2011; Bogeski I. et al., 2011). Считается, что при действии на клетку нервных импульсов или некоторых гормонов концентрация кальция в цитоплазме повышается, в результате чего происходит связывание ионов Ca^{2+} с КМ (Mukunda L. et al., 2014).

1.1.2. Адренергическая иннервация и биоаминсодержащие структуры селезенки

Выявление нейромедиаторов в лимфоидных органах позволило обнаружить тесную функциональную взаимосвязь гистологических изменений и обеспеченностью биогенными аминами в регуляции органов иммунной системы (Гордон Д. С. с соавт., 1982; Смердова В. В. с соавт., 1983; Сысоева Л. А., 1983; Любовцева Л. А., 1993, 2011; Голубцова Н. Н. с соавт., 2000; Кветной И. М., 2002; Судаков К. В., 2002; Лавров О. В. с соавт., 2007; Стручко Г. Ю. с соавт., 2014; Гордова В. С. с соавт., 2014). Люминесцентно-гистохимические методы позволили определить биоаминсодержащую, адренергическую составляющую органов и тканей и произвести цитофотометрическую оценку их функционального состояния (Гордон Д. С. с соавт., 1982; Сысоева Л. А., 1983; Диндяев С. В. с соавт., 2007; Любовцева Л. А., 1993, 2011; Соколова И. В. с соавт., 2014; Стручко Г. Ю. с соавт., 2014). А внедрение в экспериментальную практику гистохимических методов выявления катехоламинов позволило дать морфологическую оценку нервного аппарата селезенки (Зеленова И. Г., 1971; Сысоева Л. А., 1983; Гуцин Г. В., 1993; Пуговкин А. П., 1993). Эти научные открытия позволили прямо пропорционально соотнести интенсивность люминесценции структурных элементов органа с содержанием биогенных аминов в них. Сочетание гистохимии, цитоспектрофотометрии и морфометрии позволяет проводить исследования в области интегриро-

вания физиологии и гистологии, оценивая изменения активности адаптационных механизмов в условиях фармакологических и иных воздействий (Гущин Г. В., 1993; Пуговкин А.П., 1993; Арцимович Н. Г. с соавт., 2001).

Адренергический компонент вегетативной нервной системы представлен в селезенке весьма богато. Капсула органа, как обнаружено Зеленовой И. Г. (1971), сплошь пронизана широкопетлистым трехмерным сплетением из тонких варикозных и лентовидных адренергических нервных волокон, ветви которых часто проникают из капсулы в паренхиму. В научных трудах Гущина Г. В. (1993) доказано, что экспериментальная десимпатизация селезенки сопровождается снижением колониобразования в ней. Прохождение адренергических нервных волокон в толще мышечного слоя селезеночных сосудов – важное гистологическое отличие сосудов селезенки от сосудов других органов (Гордон Д. С. с соавт., 1982). Изменения функциональной активности адренергического звена селезенки, которые регистрируются по изменениям содержания катехоламинов, считаются специфическими, поскольку они ориентированы непосредственно на клетки лимфоидного ряда (Пуговкин А. П., 1993).

Важное значение в аспекте настоящего исследования является заключение Лаврова О. В. с соавт. (2007) о том, что биогенные амины проявляют иммуномодулирующие свойства в форме непосредственного влияния на экспрессию CD-маркеров: адреналин снижает число CD8⁺ клеток, а серотонин и гистамин угнетают экспрессию CD3-, CD4-, CD8-маркеров. Доказано, что в присутствии адреналина и гистамина макрофаги уменьшают долю серотонинсодержащих клеток, а при наличии серотонина снимают его угнетающее влияние на содержание в гранулах ЛГК адреналина и гистамина (Лавров О. В. с соавт., 2007).

Хорошо изучены метаболизм, химическая структура и функциональная активность катехоламинов (КА) – веществ, синтез которых происходит из тирозина через образование 3,4-диоксифенилалнина (ДОФА). Конечным метаболитом является дофамин, норадреналин, а в последующем – адреналин. Функции КА зависят от локализации синтеза: КА, вырабатываемые нейронами, выполняют функ-

ции нейромедиатора, а вырабатываемые в надпочечниках – функции гормона (Гордон Д. С. с соавт., 1982; Арцимович Н. Г. с соавт., 2001; Mravec B., 2011).

Принято считать, что катехоламины являются стрессовыми медиаторами и оказывают исключительно подавляющий эффект на развитие иммунных реакций, путем снижения активности макрофагов, натуральных киллеров (Лавров О. В. с соавт., 2007; Репина В. П., 2008; Bartolomucci A. et al., 2003). Однако Elenkov I. J. et al. (2006) описал усиление активности клеток макрофагально-моноцитарного ряда и активацию Т-хелперов в результате повышенного влияния катехоламинов. Репина В. П. (2008) экспериментально определила, что дофамин и норадреналин стимулируют лимфопролиферацию с увеличением содержания в крови CD10⁺, а дофамин и адреналин повышают содержание активированных Т-лимфоцитов в крови. Работы Dobrodeeva L. et al. (2008) подтвердили, что КА сокращают период антителиобразования IgG и IgA, с компенсаторным увеличением концентраций IgE. Приведенные исследования свидетельствуют об иммуномодулирующей роли КА. Известны механизмы, через которые КА способны стимулировать клеточный и гуморальный иммунные ответы, влияя на содержание провоспалительных и противовоспалительных цитокинов в крови (Симбирцев А. С., 2007; Каплиева И. В., 2010; Janeway Ch. et al., 2001; Sanders V. M., 2006; Mravec B., 2011).

Сысоевой Л. А. (1983) была зарегистрирована зависимость катехоламинообеспеченности структур селезенки крыс от времени года – в зимние месяцы уровень КА ниже, чем летом. Этот факт объясняется активацией обменных процессов у грызунов в весенне-летний период (Замощина Т.А. с соавт., 2006).

Доказательством тесной функциональной взаимосвязи катехоламинов и ионов кальция является тот факт, что для выброса содержимого одного пузырька медиатора требуется четыре иона кальция (Арцимович Н. Г. с соавт., 2001; Лебедев А. В. с соавт., 2008; Bogeski I. et al., 2011). Балезиной О. П. (2013) впервые установлены кальций-зависимые ферменты в нервных окончаниях: протеинкиназа С, кальмодулинкиназы II, кальцинейрин, которые участвуют в выбросе медиаторов в синаптическую щель. Временное увеличение внутриклеточной кон-

центрации ионов Ca^{2+} стимулирует слияние мембраны синаптических пузырьков с плазматической мембраной и таким образом запускает процесс высвобождения их содержимого (Северин Е. С., 2013; Carafoli E. et al., 2007; Schatten H., 2013). Однако количество ионов кальция, непосредственно поступающих в протоплазму в результате прихода нервного импульса, очень невелико, и поэтому на нервных окончаниях действует механизм химического усиления – увеличения количества кальция, происходящего посредством медиаторов (Кветной И. М., 2002; Burgoyne R. D. et al., 2001). Под влиянием нервного импульса выделяется химический медиатор – норадреналин. Он запускает процессы, приводящие к появлению больших количеств кальция в иннервируемом органе (Арцимович Н. Г. с соавт., 2001; Панченко Л. Ф. с соавт., 2004). А в отсутствие ионов кальция высвобождения медиатора во внеклеточное пространство не происходит (Панченко Л. Ф. с соавт., 2004; Северин Е. С., 2013). Таким образом, доказана возможность модуляции нейрональной активности через кальций-опосредованные механизмы.

Другим очень важным биогенным амином, накапливающимся в больших количествах в клетках селезенки, тимуса, тучных клетках, тромбоцитах, хромоаффинных клетках, в нервных клетках, особенно в гипоталамусе, грызунов и человека, является серотонин (Гордон Д. С. с соавт., 1982; Сысоева Л. А., 1983; Сергеева В. Е. с соавт., 1992; Павлова О. В. с соавт., 2013; Соколова И. В. с соавт., 2014). Серотонин регулирует секрецию многих пептидных гормонов (Lauder J. M. et al., 1988), процессы морфогенеза (Ставинская О. А., 2010; Tekes K. et al., 2011), обладает ростостимулирующим действием (Lauder J. M. et al., 1988), перекрестно связываясь с очень большим разнообразием рецепторов (Tekes K. et al., 2011). Серотонин участвует в регуляции функций системы гипоталамус–гипофиз–кора надпочечников. Совместно с гистамином он влияет на активность нейронов симпатических ганглиев (Юрина Н. А. с соавт., 1990). В работах Гордон Д. С. с соавт. (1982) и Девойно Л. В. (1985) освещены антагонистические взаимоотношения между серотонином и КА.

Серотонин имеет большое значение для регуляции иммунных реакций, угнетая первичный иммунный ответ (Гордон Д. С. с соавт., 1982; Девойно Л. В., 1985; Ставинская О. А., 2010). Этот эффект обусловлен перераспределением иммунокомпетентных клеток, увеличением числа и активацией Т-супрессоров и В-лимфоцитов при участии простагландинов E_2 (Гордон Д. С. с соавт., 1982; Девойно Л. В., 1985). Также причиной может являться способность серотонина к деполяризации плазматической мембраны эффекторных клеток (Tekes K. et al., 2011). Серотонин играет определенную роль в механизме аллергии, высвобождаясь под влиянием комплекса антиген – антитело из тромбоцитов и тучных клеток (Тотолян А. А. с соавт., 2000; Ставинская О. А., 2010). Шестопалова Л. В. с соавт. (1992) обнаружила, что серотонин, является одним из эндогенных регуляторов зимней спячки, а серотонин-продуцирующие клетки представляют собой структурный элемент адаптивного механизма ее поддержания.

Доказательством тесной функциональной взаимосвязи биогенных аминов, медиаторов и иммунокомпетентных клеток служит исследование Ставинской О. А. с соавт. (2008). Установлено, что при низком уровне гистамина отмечается увеличение средней концентрации цитотоксических лимфоцитов ($CD8^+$) с формированием положительной корреляции с содержанием гистамина, а также что при дисбалансе гистамина в крови наблюдается сокращение фагоцитарных возможностей организма. Так, гистамин, изменяя химическую среду межклеточного пространства, оказывает влияние на все этапы развития лимфоцита (пролиферации, дифференцировки и апоптоза).

Гистамин обнаружен в тучных клетках, базофилах, эпителии кишечника, эндометрия животных и человека (Любовцева Л. А., 1993; Труфакин В. А. с соавт., 2005; Голубцова Н. Н. с соавт., 2000; Гугушвили Н. Н. с соавт., 2001; Диндяев С. В. с соавт., 2007; Ставинская О. А. с соавт., 2008; Гордова В. С. с соавт., 2014; Кроткова О. С. с соавт., 2014; Стручко Г. Ю. с соавт., 2014; Janeway Ch. et al., 2001; Theoharides T. C. et al., 2012).

Известно, что гистамин, как медиатор воспаления, иммуномодулятор и регулятор клеточного роста, усиливает функциональную активность макрофагов, оказывает митогенный, зависимый от концентрации, эффект на фибробласты (Юрина Н. А. с соавт., 1990; Лебединская О. В. с соавт., 2011; Сергеева В. Е. с соавт., 2013). Он вызывает спазм гладкой мускулатуры, расширение и повышение проницаемости капилляров, усиление секреции слюнных, бронхиальных, слезных желез, слизистой оболочки желудка и экзокринной части поджелудочной железы (Юрина Н. А. с соавт., 1990; Ставинская О. А. с соавт., 2008). Общеизвестна роль гистамина в формировании аллергических и воспалительных реакций (Ройт А. с соавт., 2000; Janeway Ch. et al., 2001; Eisenbarth G. S., 2011; Theoharides T. C. et al., 2012). Гистамин является нейромедиатором нейронов заднего гипоталамуса, и избыток первого нарушает сон и ведет к депрессии (Nakano K. et al., 2001).

Обобщая данные научной литературы по биоаминообеспеченности структур селезенки, необходимо отметить, что люминесцирующие гранулярные клетки (ЛГК) герминативного центра лимфоидных узелков селезенки являются аминок продуцентами, а ЛГК маргинального синуса – аминок поглотителями (Гордон Д. С. с соавт., 1982; Москвичев Е. В. с соавт., 2005). Тучные клетки способны не только накапливать и секретировать гистамин, серотонин и дофамин, но и поглощать их из микроокружения (Юрина Н.А. с соавт., 1990; Диндяев С. В. с соавт., 2007).

1.2. Современные взгляды о роли и метаболизме кальция в организме

1.2.1. Регуляция обмена внутриклеточного кальция и его метаболизм

Среди множества биоэлементов всего девять из них относятся к жизненно необходимым для организма человека и животных (Кудрин А. В. с соавт., 2000, 2007; Ребров В. Г. с соавт., 2008; Толмачева Н. В. с соавт., 2011; Pochet R., 2000). В формировании нарушений ведущих функциональных систем организма особое место отводится кальцию, который обеспечивает каталитическую активность многих ферментов, синтез гормонов и участие в обменных процессах клетки

(Букина Е. Я. с соавт., 1997; Кудрин А. В. с соавт., 2007; Маракушин Д. И. с соавт., 2013; Carafoli E. et al., 2007; Diamanti-Kandarakis E., 2011). Наглядным показателем роли ионов кальция для функционирования организма является поддержание постоянной концентрации ионов кальция в сыворотке крови: изменение ее лишь на 1% приводит в действие механизм, восстанавливающий необходимую концентрацию (Судаков К. В., 2000; Кухта В. К. с соавт., 2010). Уровень кальция сыворотки регулируется в пределах 2,2–2,8 ммоль/л для сохранения постоянства внеклеточной концентрации кальция и, таким образом, обеспечения нормальной нейромышечной и гормональной функции (Бородюк Н. Р., 2003; Кудрин А. В. с соавт., 2007; Жилиев Е. В. с соавт., 2011; Pochet R., 2000).

При лабораторной оценке биохимического анализа крови, определяющего концентрацию общего кальция в сыворотке крови, необходимо учитывать, что он включает в себя следующие фракции: свободный (ионизированный) кальций – около 50% от уровня общего кальция в крови; кальций, связанный с белками (в основном, с альбумином) – 40%; кальций, входящий в состав анионных комплексов, связанный с лактатом, цитратом, бикарбонатом, фосфатами – 10% (Долгов В. В. с соавт., 2002). Благодаря связыванию значительной части ионов кальция белками его концентрация в крови выше, чем в межтканевой жидкости. Замечено, что на фоне уменьшения концентрации белков в плазме крови увеличивается содержание ионизированного кальция (Pochet R., 2000; Klee C. V. et al., 2002; Carafoli E. et al., 2007; Bogeski I. et al., 2011).

Современные исследователи в области биохимии, фармакологии и морфологии работают над установлением конкретных механизмов регуляции вне- и внутриклеточной концентрации кальция в организме (Авдонин П. В. с соавт., 1994; Кудрин А. В. с соавт., 2007; Курилова Л. С. с соавт., 2008; Загускин С. Л., 2010; Berridge M. J. et al., 1998; Burgoyne R. D. et al., 2001; Carafoli E. et al., 2007; Boscia F. et al., 2009; Alonso M. T. et al., 2011; Domínguez D. C. et al., 2014). На данный момент установлено, в мембранах клеток функционируют Ca^{2+} -каналы, обеспечивающие вход ионов кальция в цитоплазму по градиенту концентрации. А также

существуют механизмы активного транспорта ионов кальция против градиента концентрации, использующие энергию АТФ (Ca^{2+} -насос), либо градиенты других ионов (например, Na/Ca-переносчик) (Кудрин А. В. с соавт., 2007; Alonso M. T. et al., 2011; Domínguez D. C. et al., 2014). Таким образом, функционирование систем пассивного и активного транспорта ионов кальция является основой внутриклеточного гомеостаза данного макроэлемента.

Экспериментальные исследования Boscia F. et al. (2009) свидетельствуют, что подавление натрий-кальциевого насоса клетки предотвращает повышение внутриклеточной концентрации ионов Ca^{2+} , а разжижение протоплазмы уменьшает концентрацию кальция, что радикально меняет интенсивность и даже направленность биохимических процессов (Загускин С. Л., 2010). Важно отметить, что свободные ионы, не способные проникать внутрь клеток, распределяются на их поверхности и регулируют чувствительность рецепторов к ионам кальция (Кудрин А. В., 1998; Кудрин А. В. с соавт., 2007). В работе Кудрина А. В. и его коллег (2007) доказано, что транспортная система ионов кальция в лимфоцитах и тимоцитах обладает высокой селективностью, и ионы других биоэлементов данной системой не транспортируются. Также данным авторами доказано различие концентраций внутриклеточных биоэлементов в клетках иммунной системы. Так, максимальный уровень цинка зарегистрирован внутри мононуклеарных клеток и макрофагов с минимальными показателями внутри гранулоцитов, что обосновано способностью к депонированию микроэлементов и синтезу внутриклеточных связывающих белков.

Ярилин А. А. (1999) дал описание двух Ca^{2+} -зависимых механизмов передачи гормонального сигнала внутри иммунокомпетентных клеток, в частности, макрофагов и лимфоцитов: первый – с помощью Ca^{2+} -каналов, которые блокируются ионами марганца, бария; второй – при активности фосфолипазы С и протеинкиназы С (Кудрин А. В. с соавт., 2007).

Внутри клеток имеются специальные компартменты – хранилища кальция, которые высвобождают его при передаче внутриклеточного сигнала (Гайдуков

А. Е., 2009), мышечном сокращении и других кальций-зависимых процессах (Котова П. Д. с соавт., 2013; Avdonin P. V. et al., 2000). В состоянии покоя, при отсутствии сигнала внутриклеточная концентрация ионизированного кальция составляет ~ 100 нМ, а в процессе прохождения сигнала, сокращения мышечных волокон и т.д. увеличивается в 10–100 раз (Чернин В. В., 2010; Громова О. А. с соавт., 2012). Эти внутриклеточные хранилища кальция необходимы для осуществления процессов сокращения всех типов мышечных клеток, секреции нейромедиаторов, поддержания разности потенциалов на мембранах нейронов (Громова О. А. с соавт., 2012; Котова П. Д. с соавт., 2013).

Концентрация ионов кальция в межклеточной жидкости примерно 10^{-3} М, а в цитоплазме клеток около 10^{-7} М (Кутина А. В. с соавт., 2005; Carafoli E. et al., 2007; Bogeski I. et al., 2011). Имеются многочисленные доказательства того, что внутриклеточная концентрация кальция регулируется митохондриями и такими белками, как кальмодулин и кальциневрин (Пермяков Е. А., 1993; Colbran R. J., 2004; Carafoli E. et al., 2007). Митохондрии располагают очень эффективным кальциевым насосом, а ингибиторы митохондриальной функции вызывают количественное увеличение незначительного потенциала концевой пластинки, что также свидетельствует об ингибировании поглощения кальция митохондриями (Alonso M. T. et al., 2011; Schatten H., 2013).

Постоянство концентрации ионов кальция в сыворотке крови поддерживается функциональной системой, которую можно назвать кальциевым гомеостатом (Судаков К. В., 2000; Курилова Л. С. с соавт., 2008; Мирная С. С. с соавт., 2010; Пигарова Е. А., 2011; Pochet R., 2000; Carafoli E. et al., 2007; Diamanti-Kandarakis E., 2011). В этой системе можно выделить центральную, сенсорно-регуляторную и эффекторную части. К центральному отделу кальциевого гомеостата относится ЦНС (Костюк П. Г., 2001; Волков М. М. с соавт., 2010). Сенсорно-регуляторный отдел кальциевого гомеостата представлен парашитовидными железами, секретирующими паратиреоидный гормон, и С-клетками щитовидной железы, секретирующими кальцитонин (Балаболкин М. И., 1998; Eisenbarth G. S., 2011).

Эффекторную часть составляют почки, желудочно-кишечный тракт и костная система. Следствием воздействия на эти составляющие является изменение концентрации ионов кальция в сыворотке крови (Баранов В. Л. с соавт., 2011; Панченко Л. Ф. с соавт., 2004; Пигарова Е. А., 2011).

Система регуляции гомеостаза кальция состоит из двух петель, работающих по принципу отрицательной обратной связи. Одна из этих петель может быть обозначена как внутренняя, а другая – как внешняя. Внутренняя петля регулирует поступление кальция из костной ткани в плазму. Она включает околощитовидные железы и кости. Любое снижение уровня ионизированного кальция (Ca^{2+}) в плазме крови стимулирует секрецию паратиреоидного гормона, под влиянием которого в костной ткани активизируются остеокласты, что приводит к усилению ее резорбции и, таким образом, к поступлению в кровь кальция (Волков М. М. с соавт., 2010; Lorentzon M. et al., 2001; Pigarova E. A. et al., 2012). Внешняя петля регуляции кальциевого гомеостаза включает околощитовидные железы, почки и кишечник (Пигарова Е. А., 2011; Heaney R. P. et al., 2001). Под влиянием паратиреоидного гормона, стимулированного снижением кальция в крови, с одной стороны, возрастает реабсорбция кальция в дистальных извитых канальцах, а с другой стороны, усиливается синтез $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ (кальцитриола) в проксимальных извитых канальцах почки. В результате снижается экскреция кальция с мочой, а под влиянием кальцитриола усиливается его абсорбция в кишечнике (Бородюк Н. Р., 2003; Пигарова Е. А., 2011; Heaney R. P. et al., 2001). Почки фильтруют приблизительно 8,6 г/сут, почти все количество его повторно абсорбируется и лишь от 100 до 200 мг экскретируется с мочой (Кутина А. В. с соавт., 2005). Всасывание кальция кишечником, реабсорбция почкой и обновление в кости непосредственно регулируется гормоном паращитовидной железы, кальцитонином и витамином D (Баранов В. Л. с соавт., 2011). Оба эффекта способствуют восстановлению уровня кальция в крови, усиливают костную резорбцию и, в некоторой степени, подавляют секрецию паратиреоидного гормона (Арсеньева Е. Н. с соавт., 2006).

1.2.2. Биодоступность различных соединений кальция и применение хлорида кальция в медицинской практике

Известно, что регулярное поступление кальция в организм с водой и/или пищевыми продуктами необходимо для поддержания нормального функционирования системы гомеостаза. Тем не менее, дефицит кальция является одним из самых распространенных и имеющих серьезные метаболические последствия нутриентных дефицитов. При этом начальные стадии его развития, как правило, диагностируются с опозданием, а мероприятия по коррекции дефицита кальция задерживаются на несколько лет (Воронкова О. В., 2010; Жилев Е. В. с соавт., 2011; Лесняк О. М. с соавт., 2012; ICSI, 2004; Straub D. A., 2007; Williams M. E., 2009).

Элементный состав организма зависит от геохимического окружения и таких социально-экологических факторов, как водно-пищевой рацион (Сусликов В. Л., 2002; Горбачев А. Л., 2006; Карманова Л. В. с соавт., 2011). По данным ряда исследователей все районы, входящие в Приволжский субрегион, располагаются в зоне эколого-биогеохимического кризиса, в пищевой цепи которой установлен выраженный недостаток кальция, фтора, марганца, цинка (Сусликов В. Л., 2000; Толмачева Н. В. с соавт., 2011). Физиолого-биохимические реакции практически здоровых жителей этой зоны отличаются резко сниженными показателями иммунной реактивности и предпатологическими сдвигами в фосфорно-кальциевом обмене (Сапожников С. П. с соавт., 2001; Сусликов В. Л. с соавт., 2002; Толмачева Н. В. с соавт., 2011). Между тем морфологические эквиваленты изменений изучены недостаточно. Логично предположить, что адаптивные и патологические изменения в первую очередь происходят в гомеостатических системах организма, включая иммунную.

Значительный вклад в суточную дозу минеральных элементов вносит питьевая вода, так как с ней человек может получить до 20% суточной дозы кальция, до 25% магния, до 50 – 80% фтора, до 50% йода (Ерофеев Ю. В. с соавт., 2006; Аюшиева С. Ц. с соавт., 2010; Бакуменко Л. П. с соавт., 2011). Основная роль

водного рациона состоит в поддержании функциональной активности организма и, в том числе, иммунной системы. Доказано, что биоэлементы, содержащиеся в питьевой воде, способны обладать модифицирующими свойствами в отношении клеточного и гуморального, а также неспецифического и нативного иммунитета (Мартынова Е. А. с соавт., 2001; Сусликов В. Л., 2002; Кудрин А. В. с соавт., 2007; Борзунова Е. А. с соавт., 2007). Также важно, что биологическая доступность кальция из питьевой воды гораздо выше, чем из твердой пищи (Голдовская-Перистая Л. Ф. с соавт., 2008; Толмачева Н. В. с соавт., 2011; Heaney R. P. et al., 2001; Vassiotini I. et al., 2004). Ионы кальция обуславливают жесткость воды и стоят на первом месте среди макрокатионов, входящих в состав пресных вод (Голдовская-Перистая Л. Ф. с соавт., 2008; Бакуменко Л. П. с соавт., 2011; Валиев В. С., 2011). Выявление влияния химического состава питьевой воды на организм являются важными факторами сохранения здоровья населения (Горбачев А. Л., 2006; Морозова Е. В. с соавт., 2006; Борзунова Е. А. с соавт., 2007; Бакуменко Л. П. с соавт., 2011). Однако обзор литературы выявил отсутствие научных исследований по оценке влияния питьевой воды, обогащенной кальцием, на структурно-функциональную характеристику селезенки, как периферического органа иммуногенеза.

При поступлении кальция в организм в количестве ниже установленной суточной потребности рано или поздно возникнет дефицит кальция (Ross A. C. et al., 2011; Chung M. et al., 2009). Эффективность коррекции кальциевого дефицита зависит от множества дополнительных факторов, включая конкретную форму кальция (Скальный А. В. с соавт., 2004; Садоян В. А., 2006; Воронкова О. В., 2010; Лесняк О. М. с соавт., 2012; Couzy F. et al., 1995; Ross A. C et al., 2011), питьевой и двигательный режимы, наличие вредных привычек (Борзунова Е. А. с соавт., 2007; Кульбачинский В. В., 2005; Heaney R. P. et al., 2001). Ранние симптомы дефицита кальция включают онемение в пальцах рук и ног, судороги и подергивания в мышцах, раздражительность, нарушение когнитивных способностей (Студеникин В. М. с соавт., 2010; Жиляев Е. В. с соавт., 2011; ICSI, 2004; Williams

М. Е., 2009). Оставаясь без компенсации в течение длительного времени, дефицит кальция приводит к обменным нарушениям, в том числе остеопении, остеопорозу, повышает риск переломов (Жиляев Е. В. с соавт., 2011; Heaney R. P. et al., 2001; Williams M. E., 2009). Стало известно, что дефицит кальция способствует ускорению развития атеросклероза (Сусликов В. Л., 2002; Жиляев Е. В. с соавт., 2011; Громова О. А. с соавт., 2012).

Кальций прочно связывается с карбоксильной группой альбумина, и эта связь зависит от pH: снижение pH уменьшает, повышение – усиливает эту связь (Баранов В. Л. с соавт., 2011; Horsey P. J., 2002). Именно поэтому кальций хуже усваивается из продуктов, богатых щавелевой кислотой (Лесняк О. М. с соавт., 2012; ICSI, 2004). Растворимость солей кальция увеличивается в кислой среде желудка, но растворенные ионы до некоторой степени повторно связываются и преципитируются в тощей и подвздошной кишке, где pH ближе к нейтральному (Fenton T. R. et al., 2008). В желудочно-кишечном тракте компоненты пищи (глюкоза, жирные кислоты, фосфор и оксалаты) связываются с кальцием, образуя комплексы (Аляутдин Р. Н., 2004; Diamanti-Kandarakis E., 2011). Желудочная кислотность оказывает небольшой эффект на абсорбционную способность кальция, применяемого с пищей. Вообще всасывание кальциевых добавок (особенно, менее растворимых) улучшается, если они принимаются вместе с пищей (Кульбачинский В. В., 2005; Толмачева Н. В. с соавт., 2011). Возможно, это происходит потому, что пища стимулирует желудочную секрецию и моторику, и пищевые источники кальция становятся более измельченными и растворимыми.

Кальциевые добавки применяются как в виде отдельных солей кальция, так и в форме комбинированных препаратов. Установлено содержание кальция в различных его соединениях (Рожинская Л. Я., 1998; Садоян В. А., 2006; Couzy F. et al., 1995; Straub D. A., 2007; Fenton T. R. et al., 2008), например: карбонат кальция – 400 мг кальция в 1 г соединения кальция, хлорид кальция – 270 мг, цитрат кальция – 211 мг, глицерофосфат кальция – 191 мг, лактат кальция – 130 мг, глюконат кальция – 90 мг. Таким образом, менее всего кальция содержится в широко рас-

пространенном в России глюконате кальция, а наибольшее содержание приходится на карбонат кальция. Карбонат кальция показан у пациентов с нормальной и повышенной желудочной секрецией. Препараты, содержащие цитрат кальция, наоборот, не требуют кислотности желудочного сока и предпочтительней и лиц гипо- и ацидными состояниями (Рожинская Л. Я., 1998).

Существуют установленные в результате многочисленных клинических и фармакокинетических исследований суточные потребности в эссенциальных микронутриентах (Кухаренко А. А. с соавт., 2008; Chung M. et al., 2009; Ross A. C. et al., 2011). Рекомендации Министерство здравоохранения РФ регламентируют суточную потребность взрослого организма в кальции в пределах 800–1200 мг, которая, как правило, покрывается за счет поступления пищи (МЗСР РФ, 2004; Реброва В. Г. с соавт., 2008; Лесняк О. М. с соавт., 2012; Маркова Т. Н. с соавт., 2012).

Для расчета суточного потребления кальция с пищей предложено использовать следующую формулу (Лесняк О. М. с соавт., 2012):

суточное потребление кальция (мг) = кальций молочных продуктов (мг) + 350 мг.

Наиболее богаты кальцием: кунжут (1474 мг кальция в 100 г продукта), твердые сорта сыра (900–1000 мг), семена подсолнечника (367 мг), миндаль (273 мг), петрушка (245 мг). Также хорошим источником кальция являются цельное молоко (120 мг) и молочные продукты: творог (150 мг), молоко сгущенное с сахаром (304 мг). Однако сливочное масло, сливки и мягкие сорта сыра бедны кальцием (Ребров В. Г. с соавт., 2008; Лесняк О. М. с соавт., 2012; Ross A. C. et al., 2011).

Назначение кальция в виде лекарственных препаратов рекомендуется в случае невозможности достичь необходимого потребления кальция с помощью пищевых продуктов (Лесняк О. М. с соавт., 2012).

Казалось бы, что компенсация недостаточности кальция наиболее просто и эффективно осуществляется именно за счет приема тех или иных видов пищи (Сердюк А. М. с соавт., 2010; Кухаренко А. А. с соавт., 2008; World Health Organization, 2003). Однако восполнение суточной потребности в кальции продуктами

питания имеет ряд существенных особенностей, в основе которых находится биодоступность соединений кальция в организме (Громова О. А. с соавт., 2012).

Зарубежными исследователями изучена биоусвояемость различных соединений кальция в эксперименте (Cotruvo J. et al., 2009, p. 99). Так, по данным Heaney R. P. et al. (2001), максимальное усвоение кальция из питьевой воды достигает 47,5%. Несколько схожие данные зарегистрировали Van Dokkum W. et al. (1996) и Wunckel A. et al. (1997), утверждая, что оптимального поступления кальция можно достичь при употреблении минеральной воды с высоким содержанием хлорида кальция. В этом случае, биодоступность кальция соответствует 37% и 34,1–37,0%, по данным авторов соответственно. Однако Couzy F. et al. (1995) выявил более низкую усвояемость кальция из воды (23,8%) даже при высоком содержании в ней сульфатов. Практически аналогичные показания были зафиксированы Vacciottini I. et al. (2004) при употреблении воды, обогащенной кальцием – около 22%.

Исследованы показатели биодоступности кальция из пищевых продуктов широкого потребления с высоким содержанием макроэлемента, в частности, из цельного молока. Все научные источники подтвердили высокую биодоступность кальция из молока: по данным Heaney R. P. et al. (2001) она соответствует 43,3%, Van Dokkum W. et al. (1996) – 37–42%, Couzy F. et al. (1995) – 25%, Vacciottini I. et al. (2004) – 23%.

Восполнение дефицита макро- и микроэлементов с помощью пищевых продуктов имеет ряд трудностей. Это обусловлено не только сезонной зависимостью потребления их количества, но и с возможностью проявления конкурирующих влияний элементов друг на друга (Коровина Н. А. с соавт., 2004; Скальный А. В. с соавт., 2004; Кудрин А. В. с соавт., 2007; Ребров В. Г. с соавт., 2008). Так, важно учитывать фармакодинамику и взаимодействия микронутриентов между собой, которые бывают как синергичные, так и по типу антагонизма (Букина Е. Я. с соавт., 1997; Скальный А. В. с соавт., 2004; Кудрин А. В. с соавт., 2007; Ребров В. Г. с соавт., 2008; Сердюк А. М. с соавт., 2010; Скальная М. Г., 2013; World Health

Organization, 2003; Carafoli E. et al., 2007; Chung M. et al., 2009; Ross A. et al., 2011). Например, известны антагонистические взаимодействия кальция, железа и магния, которые, попадая в организм одновременно, конкурируют за усвоение. Следовательно, для улучшения усвоения этих микроэлементов до 45 % их следует принимать раздельно (Сереброва С. Ю., 2010). Цинк и марганец также снижают абсорбцию кальция при их совместном приеме (Ребров В. Г. с соавт., 2008). Доказано, что на фоне дефицита марганца и магния, а также при стрессе, приеме диуретических, противоопухолевых лекарственных средств, кальций имеет значительно более низкую усвояемость (Кудрин А. В. с соавт., 2007).

Для повышения биодоступности кальция и его обменных процессов в тканях необходимо важное звено кальциевого гомеостата – витамин D₃ (холекальциферол) (Ребров В. Г. с соавт., 2008; Ершова О. Б. с соавт., 2011). В последние годы появились работы о том, что витамин D стимулирует образование Ca²⁺-АТФ-азной активности и щелочной фосфатазы в слизистой кишечника (Панченко Л. Ф. с соавт., 2004; Северин Е. С., 2013). Таким образом, витамин D оказывает влияние на пассивную диффузию ионов кальция путем изменения структуры и функциональной активности клеточных мембран (как липидного, так и белкового ее компонентов), повышает активный транспорт кальция в кишечнике преимущественно от слизистой к серозной оболочке (Жиляев Е. В. с соавт., 2011; Куприненко Н. Н., 2012). Другой важной особенностью витамина D является биосинтез новых молекул транспортных белков-ферментов, непосредственно участвующих в переносе кальция через мембраны слизистой кишечника (Сереброва С. Ю., 2010; Ершова О. Б. с соавт., 2011; Жиляев Е. В. с соавт., 2011; Куприненко Н. Н., 2012).

С увеличением возраста отмечается снижение уровня витамина D в сыворотке крови, обусловленное снижением функции почек, сокращением времени пребывания на солнце и уменьшением способности кожи к выработке витамина D (Лесняк О. М. с соавт., 2012). Также географические особенности расположения большей части Российской Федерации в северных широтах приводит к формиро-

ванию высокой степени риска развития у населения дефицита витамина D из-за недостаточной инсоляции в зимние месяцы (Маркова Т. Н. с соавт., 2012).

Известно, что приблизительно 25–40% поступившего кальция абсорбируются и поступают в обновляемый кальциевый пул. Этот пул состоит из небольшого количества кальция в биологических жидкостях и составляет 1% от общего количества кальция в организме (Скальный А. В. с соавт., 2004). Остальные 99% кальция находятся в костях и зубах. У взрослого человека внеклеточный пул кальция обновляется 20–30 раз в сутки, тогда как кость обновляет его каждые 5–6 лет (Carafoli E. et al., 2007).

Рационально, с точки зрения биоусвояемости, применение препаратов кальция, содержащих комбинации различных соединений (Скальный А. В. с соавт., 2004; Кудрин А. В. с соавт., 2007; Ребров В. Г. с соавт., 2008; Лесняк О. М. с соавт., 2012). Для проведения данного научного исследования выбор сделан в пользу хлорида кальция, учитывая его физические и химические свойства (хорошую растворимость, абсорбцию, экскрецию и др.) и опыт других исследователей (Ахполова В. О. с соавт., 2012; Хадарцева М. П. с соавт., 2012; Дьячкова И. М. с соавт., 2009, 2014).

Данный препарат широко распространен в медицинской практике и на российском фармацевтическом рынке. Основные показания к применению хлорида кальция (CaCl_2) (Аляутдин Р. Н., 2004; Энциклопедия лекарств. РЛС России, 2015): недостаточная функция паращитовидных желез, сопровождающейся тетанией или спазмофилией; усиленное выделение кальция из организма; как десенсибилизирующее средство; как средство, уменьшающее проницаемость сосудов; кожные заболевания (зуд, экзема, псориаз и др.); паренхиматозный гепатит, токсические поражения печени, нефрит; эклампсия; как средство для повышения свертываемости крови; как противоядие при отравлении солями магния, щавелевой кислотой и ее растворимыми солями, а также растворимыми солями фтористой кислоты; для стимулирования родовой деятельности в сочетании с другими методами и средствами; при приеме внутрь (8–10 г) оказывает диуретический

(мочегонный) эффект. Также хлорид кальция зарегистрирован в качестве пищевой добавки E509 (Панченко Л. Ф. с соавт., 2004).

Таким образом, важное значение для абсорбции кальция в организме имеет химический состав соединения, а также его взаимодействие с другими компонентами пищи, влияние кальцийрегулирующих гормонов и физиологического состояния организма.

1.2.3. Физиологическая роль кальция

Кальций относится к биогенным элементам, обладающим важными структурными, метаболическими и регуляторными функциями в организме (Скальный А. В. с соавт., 2004; Кудрин А. В. с соавт., 1998, 2000, 2007; Ребров В. Г. с соавт., 2008; Rochet R., 2000). Известно, что ионизированный кальций играет важную роль в жизнедеятельности организма. Помимо формирования костной ткани и участия в свертывающей системе крови (Воробьев А. И., 2005; Торопцова Н. В. с соавт., 2005), кальций посредством кальций-зависимого белка кальмодулина участвует в регуляции разнообразных биологических процессов: секреции инсулина, тиреоидных гормонов (Бородюк Н. Р., 2003; Арсеньева Е. Н. с соавт., 2006; Kincaid R. L. et al., 1992), гормонов надпочечников (Котова П. Д. с соавт., 2013), высвобождении нейромедиаторов (Лебедев А. В. с соавт., 2008; Гайдуков А. Е., 2009; Дьячкова И. М. с соавт., 2014; Dominguez D. C. et al., 2014), мышечной сократимости, кишечной секреции (Поветкина В. Н. с соавт., 2012), клеточной пролиферации, высвобождении лизосомных ферментов, синтезе простагландинов (Джандарова Т. И., 2002; Klee C. V. et al., 2002), распаде микротрубочек, лейкоцитарном фагоцитозе (Кудрин А. В. с соавт., 2000, 2007; Rochet R., 2000).

Ионы кальция имеют значение в сопряжении механизма возбуждение-сокращение в гладкомышечных клетках. При деполяризации мембраны ионизированный кальций поступает внутрь клетки через потенциалозависимые кальциевые каналы L-типа, что приводит к повышению концентрации цитоплазматиче-

ского кальция (Аляутдин Р. Н., 2004, с. 304). При повышении концентрации ионов Ca^{2+} в цитоплазме гладкомышечных клеток увеличивается скорость образования комплекса Ca^{2+} -кальмодулин, который активирует киназу легких цепей миозина и происходит сокращение гладких мышц (Аляутдин Р. Н., 2004, с. 57). При вхождении в клетку Ca^{2+} соединяется со своим внутриклеточным рецептором кальмодулином (КМ), активирует КМ-зависимую протеинкиназу, которая инициирует внутриклеточные процессы, приводящие к мобилизации функции клетки (Kincaid R. L. et al., 1992; Klee C. V. et al., 2002; Carafoli E. et al., 2007). Одновременно ионы Ca^{2+} участвуют в активации генетического аппарата клетки (Nemmi H. et al., 2000; Klee C. V. et al., 2002).

Согласно исследованиям Сашенкова С.Л. с соавт. (2011), блокада связывания кальция с кальмодулином с помощью препарата трифтазин (трифлуоперазин) повышает поверхностный заряд мембраны эритроцитов, что подтверждает участие ионов кальция в регуляции функционального состояния клеток периферической крови.

В последнее десятилетие в научной литературе большое внимание уделяется малоизученным функциям кальция в организме, таким как: формирование кратковременной памяти и обучающих навыков (Pochet R., 2000; Klee C. V. et al., 2002); активация апоптоза и транскрипции (Carafoli E. et al., 2007; Kohler C., 2007; Domínguez D. C. et al., 2014); регуляция продукции и высвобождения гормонов и нейропептидов (Студеникин В. М. с соавт., 2005; Krantic S. et al., 2000). Кальций занимает важнейшее место в функционировании центральных и периферических нейронов (Костюк П. Г., 2001; Оберлис Д. с соавт., 2008; Гайдуков А. Е., 2009; Berridge M. J. et al., 1998; Pochet R., 2000). Ионы кальция необходимы для мышечного сокращения и служат важнейшими посредниками во внутриклеточной передаче сигнала от рецепторов гормонов и факторов роста (Агаджанян Н. А. с соавт., 2001; Жилиев Е. В. с соавт., 2011; Лукьянчиков В. С., 2012).

Показано, что в результате пребывания на рационе без кальция уровень кальция в крови крыс снижается на 50%, а в ткани мозга на 20%. При последую-

шем введении кальция его уровень в крови повышается, и содержание в тканях мозга полностью восстанавливается. Тиропаратиреоэктомия подавляла этот эффект внутривенно введенного кальция (Балаболкин М. И., 1998; Бородюк Н. Р., 2003). Важность стабильной концентрации кальция для функционирования ЦНС подтверждается симптоматикой при отклонении от нормального содержания кальция в крови, при этом на первый план выступают симптомы поражения ЦНС: при гиперкальциемии – слабость, вялость, депрессия, возбуждение; при гипокальциемии – тетания, судороги, эпилепсия, обмороки (Жиляев Е. В. с соавт., 2011; ICSI, 2004; Williams M. E., 2009). Согласно работе Ключевой Н. З. с соавт. (2008), дефицит экзогенного кальция способствует развитию кальций-зависимой формы артериальной гипертензии. Исследования Джандаровой Т. И. с соавт. (2002) свидетельствуют, что гипо- и гиперпаратиреоз и вызванные ими гипо- и гиперкальциемия сопровождаются существенным изменением морфофункциональных показателей эпифиза, коркового и мозгового вещества надпочечников и их гормонов, тревожно-фобического статуса и поведения. При этом было установлено, что в условиях гипо- и гиперкальциемии циркадианные ритмы физиологических функций и поведения рассогласованы между собой и со световым режимом, что свидетельствует о дезадаптации и развитии патологических состояний в организме.

Введение в кровь животным с гипотермией динатриевой соли этилендиаминтетрауксусной кислоты, которая связывает часть ионов кальция крови (до 40–50%) и уменьшает концентрационный градиент по ионам кальция между цитозолем и межклеточной средой, способствует нормализации обмена ионов кальция и таким образом стимулирует дыхание и деятельность центра терморегуляции без отогревания (Слепчук Н. А. с соавт., 2001). Этот факт позволяет предполагать, что изменение концентрации в крови ионов кальция существенно влияет на развитие процесса угнетения физиологических функций. Однако у гипертензивных животных под влиянием ионов кальция наблюдающаяся более ранняя инициация сосудистой и метаболической реакций, а также усиление сосудистой

реакции на холод становятся еще более выраженными (Козырева Т. В. с соавт., 2009).

Известно, что поступление кальция в клетку зависит от следующих факторов: концентрации, времени экспозиции, способности связываться с поверхностными лигандами и рецепторами, типа соединения, в котором присутствует макроэлемент, лабильности цитоплазматической мембраны клетки, фазы клеточного цикла (Авцын А. П. с соавт., 1991; Скальный А. В., 2001; Панченко Л. Ф. с соавт., 2004).

По данным Короткова С. М. с соавт. (2006), кальций увеличивает проницаемость внутренней мембраны для ионов водорода и калия и частично снижает дыхание митохондрий. Тем самым заметно уменьшается энергозависимое накопление ионов кальция в матриксе, защищая митохондрии от кальциевой перегрузки.

Экспериментальная гиперкальциемия, создаваемая введением хлорида кальция, оказывает протекторное действие при развитии почечной патологии при интоксикациях (Ахполова В. О. с соавт, 2012).

1.2.4. Иммуотропные механизмы воздействия кальция

Дисбаланс химических элементов угнетает защитные механизмы. Запускается не только механизм прогрессирования соматических болезней, но и снижается способность к специфическому иммунологическому реагированию (Алексеев С. В. с соавт., 2001; Кудрин А. В. с соавт., 2000, 2007; Слюсаренко А. Е. с соавт., 2011). Кальций участвует в поддержании нормального функционирования системы гомеостаза, является кофактором активации многих ферментов и ферментных комплексов, участвует в интеграции функций организма (Коровина Н. А. с соавт., 2004). Он контролирует процессы антителообразования, обладает антагонистическим действием на процессы клеточной пролиферации и дифференциации (Аюшиева С. Ц. с соавт., 2010; Kvetnoy I. M. et al., 2003; Carafoli E. et al., 2007). Известно, что соли кальция обладают противовоспалительным и противоаллерги-

ческим действиями (Светлов А. В., 2013). В частности, ионы кальция участвуют в процессах активации лимфоцитов и других иммунокомпетентных клеток (Студеникин В. М. с соавт., 2005). Согласно исследованиям Кудрина А. В. с соавт. (2007) ионизированный кальций выступает в качестве негативного модулятора экспрессии адгезинов патогенных микроорганизмов, тем самым предотвращая их внедрение в клетки.

Экспериментально доказано, что интенсивность митотической активности в костном мозге и тимусе пропорциональна концентрации кальция в плазме (Судаков К. В., 2000; Панченко Л. Ф. с соавт., 2004; Campos M. S., 1998). При отсутствии кальция большое число стимулированных антигеном клеток не может вступить в фазу активного синтеза ДНК, в результате чего иммунный ответ угнетается (Судаков К. В., 2000; Avdonin P. V. et al., 2000). Удаление паращитовидных желез у крыс приводит к гипоплазии костного мозга, инволюции тимуса, снижению количества антителообразующих клеток (Пуговкин А. П., 1993; Жаворонков А. А. с соавт., 1997). После удаления паращитовидных желез организм становится неспособен к увеличению количества антителообразующих клеток и повышению титров циркулирующих антител (АТ), снижается пролиферация тимических лимфобластов, что приводит к атрофии тимуса. Эффект восстанавливается введением паратропного гормона или кальция (Судаков К. В., 2000; Пальцев М. А. с соавт., 2008; Баранов В. Л. с соавт., 2011; Carafoli E. et al., 2007).

В продолжение исследований по оценке влияния соединений кальция на тимус, Дьячковой И. М. с соавт. (2014) установлено, что дольки органа крыс активно реагируют на поступление хлорида кальция с питьевой водой увеличением площади коркового вещества, количества тимоцитов и МНС II-позитивных клеток тимуса на единицу площади.

Повышение концентрации кальция вызывает деление и бласттрансформацию лимфоцитов (Pochet R., 2000; Klee C. B. et al., 2002; Kvetnoy I. M. et al., 2003). В норме после нескольких циклов пролиферации лимфоцитов обычно происходит их дифференцировка, которая в целом рассматривается как процесс, альтернатив-

ный пролиферации (Жаворонков А. А. с соавт., 1997; Ярилин А. А., 1999; Кудрин А. В. с соавт., 2007; Liu J., 2001). Можно предположить, что при повышенной митотической активности клетки лимфоидной ткани могут не успевать проходить процесс дифференцировки и это также может быть причиной нарушений иммунного ответа.

Ионофоретическое введение в кожу ионов Ca^{2+} препятствует действию глубокого охлаждения на иммунный ответ. Разнонаправленная модуляция иммунного ответа под влиянием экзогенного Ca^{2+} и глубокого охлаждения дает основание полагать, что конкурентные отношения кальцийзависимых процессов могут служить одним из механизмов функциональных изменений в разных физиологических системах при формировании общей реакции организма на холод (Козырева Т. В. с соавт., 2009). Известно, что под действием интерферона-гамма макрофаги человека экспрессируют 1- α -гидроксилазу, которая может превращать неактивный циркулирующий 25-гидроксиколекальциферол в активный 1,25-дигидроксиолекальциферол (кальцитриол). Образование кальцитриола может быть настолько значительным, что из участка активации макрофагов он проникает в кровотоки, вызывая повышение содержания кальция в крови (Ройт А. с соавт., 2000).

Díaz et al. (1991) отметили, что гиперполяризация цитоплазматической мембраны макрофагов, обусловленная колебаниями содержания внеклеточных ионов кальция, индуцирует фагоцитоз. Но данный эффект был минимальным в среде с низким содержанием ионов кальция и магния. Nutt L. K. et al. (2002) экспериментально доказали, что для апоптоза характерно высвобождение кальция из эндоплазматического ретикулума, но его механизм и функциональное значение не вполне ясны. Возможно, этот процесс связан с повышением уровня ионов кальция в митохондриях.

Таким образом, приведенные научные факты подтверждают, что для нормального функционирования лимфоидной ткани необходима стабильная концентрация кальция в крови и его адекватная регуляция.

ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

2.1. Материал исследования

Работа выполнена в период с 2006 по 2016 гг. в научных лабораториях кафедр ФГБОУ ВО «Чувашский государственный университет имени И.Н. Ульянова»: медицинской биологии с курсом микробиологии и вирусологии; общей и клинической морфологии и судебной медицины согласно государственному плану научно-исследовательских работ по темам «Гистохимия биогенных аминов в морфофункциональном состоянии органов и тканей в норме и в эксперименте» (№ государственной регистрации 01200851887 от 10. 09. 2008 г.), «Нейроиммуногистохимия органов и тканей в норме и в эксперименте» (№ государственной регистрации 115041410191 от 14. 04. 2015 г.). Проведение исследования одобрено локальным этическим комитетом медицинского факультета ФГБОУ ВПО «Чувашский государственный университет имени И.Н. Ульянова» (протокол № 3/1 от 30. 11. 2015 г.).

Экспериментальные исследования проведены на 136 нелинейных лабораторных крысах-самцах в возрасте 3–4 месяцев, массой 150–200 г, содержащихся в обычных условиях вивария при естественном освещении и сбалансированном рационе питания. Уход за ними осуществлялся согласно правилам и нормам обращения с лабораторными животными («Санитарные правила по устройству, оборудованию и содержанию экспериментально-биологических клиник (вивариев)» от 06.04.1973 г.; Копаладзе Р. А., 1998; Большаков О. О. с соавт., 2002; Guide for the Care, 1996; International Guiding Principles, 2012).

Животные разделены на 2 группы: 1-я (контрольная) группа (n = 68) – крысы, получавшие по требованию чистую питьевую воду*; 2-я (опытная) группа (n = 68) – крысы, получавшие по требованию питьевую воду* с добавлением хлорида

* Питьевая вода, соответствующая требованиям ГОСТ Р 51309-99, ГОСТ Р 52109-2003, СанПиН 2.1.4.1116-02 и международных стандартов ИСО 11885-96.

кальция в концентрации 235 мг/л в пересчете на кальций. Ежедневно в течение двух месяцев опытные животные получали с питьевой водой в среднем 8,1–10,2 мг/кг кальция.

Свободный доступ лабораторных животных к питьевой воде основан на моделировании поступления кальция в организм в естественных условиях. Выбор хлорида кальция обусловлен его хорошей растворимостью, абсорбцией, широким применением в клинической практике и опытом его использования другими исследователями (Арокина Н. К. с соавт., 2007; Ахполова В. О. с соавт., 2012; Дьячкова И. М. с соавт., 2009, 2014; Гордова В. С., 2014; Хадарцева М. П. с соавт., 2012; Соколова И. В. с соавт., 2014).

Химический состав питьевой воды, употребляемой животными контрольной группы: общая минерализация – 223,6 мг/л; гидрокарбонаты – 150,0 мг/л; кальций – 35,0 мг/л; магний – 9,0 мг/л; калий – 5,0 мг/л; натрий, кремний – нет; фтор – 0,6 мг/л; сульфаты – 14,0 мг/л; фосфаты – < 0,01 мг/л; жесткость – 2,4 мг-экв/л.

Химический состав питьевой воды, употребляемой животными опытной группы: общая минерализация – 573,6 мг/л; гидрокарбонаты – 300,0 мг/л; кальций – 235,0 мг/л; магний – 9,0 мг/л; калий – 5,0 мг/л; натрий, кремний – нет; фтор – 0,6 мг/л; сульфаты – 14,0 мг/л; фосфаты – < 0,01 мг/л; жесткость – 12,46 мг-экв/л.

Имеются данные, что концентрации биологически активных веществ у лабораторных крыс подвержены суточным и сезонным колебаниям (Смердова В. В. с соавт., 1983; Сысоева Л. А., 1983; Сергеева В. Е., 1992; Смирнова Т. Л. с соавт., 2009; Труфакин В. А. с соавт., 2012; Сергеева В. Е. с соавт., 2013), также концентрации кальция в организме лабораторных животных зависит от циркадных ритмов (Джандарова Т. И., 2002), сезона года и режима освещенности (Замощина Т. А. с соавт., 2006), в связи с этим, экспериментальный материал получен в зимнее время с 16 до 18 часов.

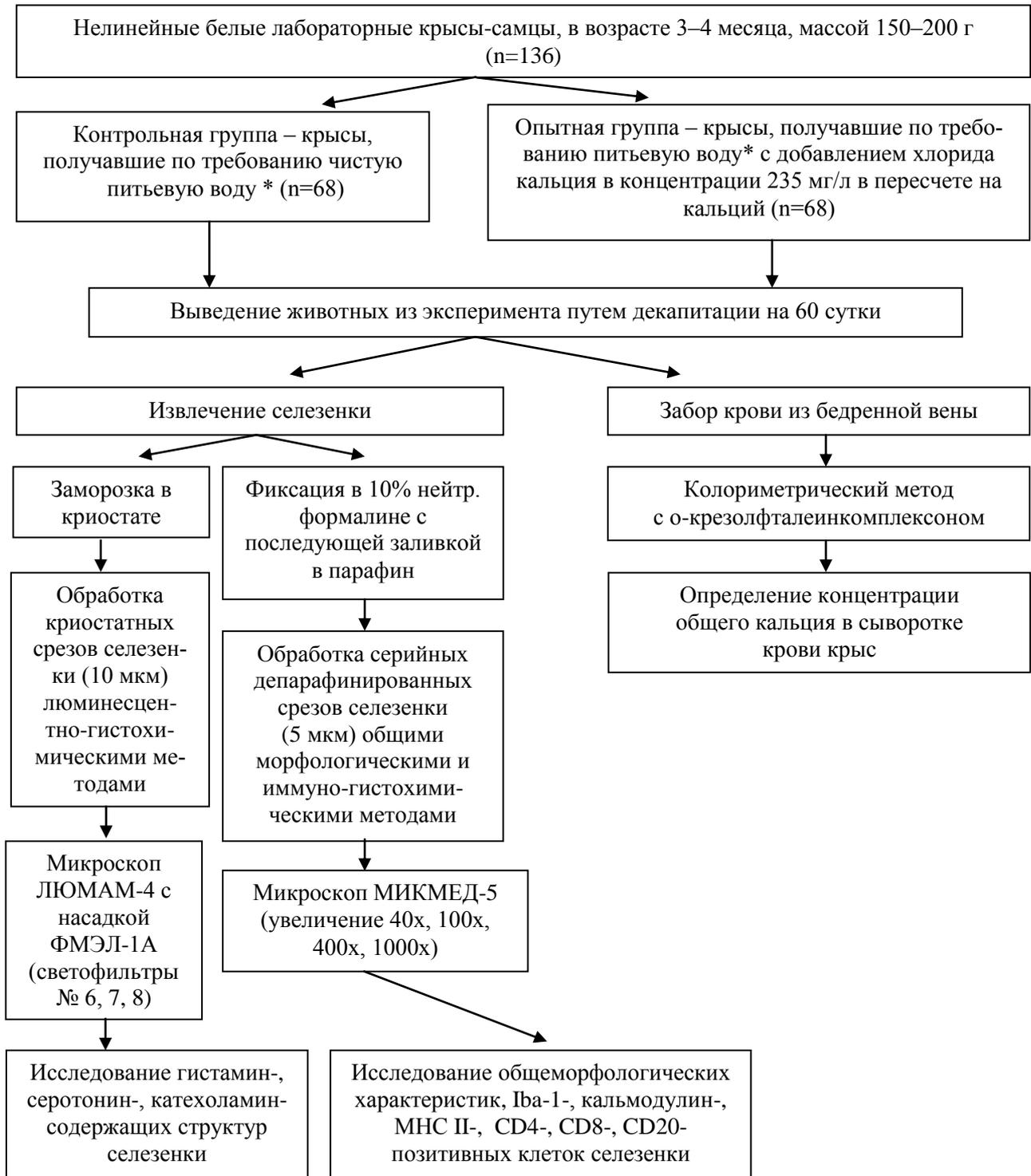
Выведение животных из эксперимента проводилось на 60 сутки путем декапитации с соблюдением требований гуманности согласно Правилам проведения

работ с использованием экспериментальных животных «О порядке проведения эвтаназии животного» (Приказ МЗ РФ № 708н от 23. 08. 2010 г.) (Каркищенко Н. Н. с соавт., 2010; Чадаев В. Е., 2012).

Все действия, предусматривающие контакты с экспериментальными животными, проводились согласно Правилам проведения работ с использованием экспериментальных животных (Приказ МЗ РФ № 708н от 23. 08. 2010 г.), требованиям Женевской конвенции «International Guiding Principles for Biomedical Research Involving Animals» (Женева, 2012), и в соответствии с Европейской конвенцией «О защите позвоночных животных, используемых для экспериментов или в иных научных целях» (от 18.12.1986 г., Страсбург) (Белоусов Ю. Б., 2005; Каркищенко Н. Н. с соавт., 2010; Чадаев В. Е., 2012; Council Directive, 1986; International Guiding Principles, 2012).

Извлекалась селезенка, часть которой использовалась для заморозки в криостате, другая часть фиксировалась в 10% нейтральном формалине для последующей заливки в парафин. Серийные парафинированные срезы селезенки в области ворот толщиной 5 мкм проводились на микротоме МПС-2 («Точмедприбор», Украина) и обрабатывались общими морфологическими и иммуногистохимическими методами (Сапожников А. Г. с соавт., 2000; Гугушвили Н. Н. с соавт., 2001; Коржевский Д. Э. с соавт., 2013). Криостатные срезы селезенки толщиной 10 мкм выполнены на микротом-криостате МК-25 (Московский экспериментальный завод «Технолог», Россия) при температурном режиме -20°C и обрабатывались люминесцентно-гистохимическими методами (Falk V. et al., 1962; Крохина Е. М. с соавт., 1969; Cross S. A. et al., 1971; Rost F. W. D., 1995). Для контроля биодоступности хлорида кальция, поступавшего с питьевой водой в течение 60 суток, проводился забор периферической крови из бедренной вены у всех лабораторных животных до начала и по окончании сроков эксперимента для определения концентрации общего кальция в сыворотке крови (Каркищенко Н. Н. с соавт., 2010).

Экспериментальные исследования проводились по следующей схеме:



* Питьевая вода, соответствующая требованиям ГОСТ Р 51309-99, ГОСТ Р 52109-2003, СанПиН 2.1.4.1116-02 и международных стандартов ИСО 11885-96.

2.2. Методы исследования

1. Окраска гематоксилином и эозином использовалась для общегистологической характеристики и проведения морфометрического анализа селезенки (Саркисов Д. С. с соавт., 1996; Артишевский А. А. с соавт., 1999; Коржевский Д. Э. с соавт., 2013; Златник Е. Ю. с соавт., 2014).

2. Иммуногистохимический метод непрямого иммуноферментного анализа с использованием поликлональных антител к белку Iba-1 и кальмодулину применялся для выявления Iba-1-позитивных клеток, имеющих моноцитарно-макрофагальное происхождение и клеток, содержащих внутриклеточный рецептор ионов кальция (кальмодулин), соответственно (Дьячкова И. М., 2009, 2014; Кирик О. В. с соавт., 2010; Гордова В. С., 2014; Лузикова Е. М. с соавт., 2014; Сергеева В. Е. с соавт., 2014; Kincaid R. L. et al., 1992; Airaksinen M. S. et al., 1997; Platten M., 2003; Colbran R. J., 2004; Smorodchenko A. et al., 2007; Ghosh A. et al., 2015).

Срезы обрабатывались по стандартному протоколу: инкубирование срезов с 10% козьей сывороткой и 0,05% тритоном X-100 проводилось для блокирования неспецифического связывания. В качестве первичных антител были применены поликлональные антитела анти-Iba-1(1:500; rabbit anti-Iba; Biozol, Германия) и анти-кальмодулин (1:1000; rabbit antiserum against calmodulin; Swan, Швейцария). Инкубация с первичными антителами проводилась в течение 18 часов при температуре 4°C. Визуализацию первичных антител проводили с помощью биотилинированных вторичных антител (1:250; goat anti-rabbit IgG и goat anti-mouse IgG; Invitrogen, США).

3. Иммуногистохимический метод непрямого иммуноферментного анализа с использованием моноклональных антител (МКАТ) к белкам главного комплекса гистосовместимости второго класса (МНС II) использовался для выявления антигенпрезентирующих клеток селезенки (Артемяева И. Л. с соавт., 2012; Гордова В. С., 2014; Chervonsky A. V. et al., 1994; Golovkina T. et al., 2001; Kumar G. L. et al., 2011). Срезы обрабатывались по стандартному протоколу: инкубирование срезов

в 3% растворе перекиси водорода в течение 30 минут с последующей трехкратной промывкой 0,1М фосфатным буфером для подавления эндогенной пероксидазной активности. Для блока неспецифического связывания проводилось последующее инкубирование срезов в 10% козьей сыворотке в течение 1 часа при комнатной температуре. В качестве первичных антител для выявления главного комплекса гистосовместимости второго класса были применены моноклональные (клон M5/114.15.2) антитела против белков МНС II класса (1:4; rat anti-rat RT1Bu, Class II polymorphic; Serotec, Германия). В качестве вторичных антител использовались антивидовые антииммуноглобулиновые биотинилированные антитела (1:250; goat anti-rat IgG; Vector Laboratories Ltd, Великобритания). Для выявления биотиновой метки срезы селезенки обрабатывались авидин-пероксидазным комплексом (ABC, Vector Laboratories Ltd, Великобритания). Инкубация с 3,3-диаминобензидин тетрагидрохлоридом (Sigma-Aldrich, США) придавала структурам селезенки, содержащим молекулы МНС II класса, специфическое коричневое окрашивание.

4. Иммуногистохимические реакции методом трехэтапного непрямого иммуноферментного анализа с использованием первичных моноклональных антител к антигенным маркерам CD4 (клон 1F6), CD8 (клон 4B11), CD20 (клон 7D1) (Novocastra Laboratories Ltd, Великобритания) использовались для идентификации CD4-, CD8-, CD20-позитивных клеток селезенки лабораторных крыс (Яглов В. В., 2010; Ялалетдинова Л. Р. с соавт., 2014; Kronin V. et al., 2001; Liu J., 2001; Wang Y. et al., 2002; Lorette J., 2003; Chang C.-C. et al., 2004; Boross P. et al., 2012; Jain P. et al., 2013).

После депарафинирования и регитратации в этаноле нисходящей концентрации срезы селезенки погружали в восстанавливающий цитратный буфер (рН 6,0). Затем проводили высокотемпературную обработку прогреванием на водяной бане при 90-95°C в течение 30 минут с целью демаскировки искомым антигенам в тканях. После ингибирования эндогенной пероксидазы 3%-ным раствором перекиси водорода на метаноле в течение 30 минут с последующей промывкой 0,1М фосфатным буфером проводили иммуногистохимическую реакцию методом трех-

этапного непрямого иммуноферментного анализа с использованием первичных моноклональных антител (МКАТ) к антигенным маркерам CD4, CD8, CD20 в разведении 1:100 согласно рекомендации фирмы-изготовителя (Dako, Дания). Визуализацию первичных МКАТ, связавшихся с антигенами, проводили стандартным биотин-стрептавидин-пероксидазным методом с использованием набора LSAB-2 (Labeled Streptavidin Biotin System Peroxidase Dako, Дания). Для блока неспецифического связывания срезы инкубировались в течение 1 часа в 10% козьей сыворотке, после чего к ним были добавлены первичные антитела к белкам CD4, CD8, CD20 на 18 часов при температуре 4°C. В качестве вторичных антител были использованы антивидовые антииммуноглобулиновые биотилированные антитела. С целью выявления биотиновой метки срезы обрабатывались авидин-пероксидазным комплексом. Метод основан на высоком сродстве авидина к биотину. Пероксидазную активность проявляли в инкубационной среде с диаминобензидином. В результате ферментативной реакции субстрат превращался в нерастворимый продукт коричневого цвета, совпадающий по локализации с местонахождением белков. На заключительном этапе срезы докрашивались гематоксилином и эозином.

В каждой серии иммуногистохимических реакций выполнялось контрольное исследование с инкубированием нескольких срезов в отсутствие первичных антител. Специфичность экспрессии искомого антигена в опытных срезах селезенки подтверждалась отсутствием ее в контрольных срезах, не обработанных первичными антителами.

Часть исследования, включающая иммуногистохимические методы непрямого иммуноферментного анализа, была проведена в лаборатории на базе патолого-анатомического отделения ГАУЗ «Республиканская клиническая больница» Министерства здравоохранения Республики Татарстан.

5. Люминесцентно-гистохимический метод Кросса, Эвена, Роста (Cross S. A. et al., 1971; Rost F. W. D., 1995) использовался для выявления гистаминсодержащих структур селезенки. В ходе каскада реакций между парами ортофталевого

альдегида и гистамином в тканях органа образуются флуоресцирующие производные имидазолилэтиламина. Под люминесцентным микроскопом образовавшийся комплексный продукт в срезах имеет различный характер свечения: при высоком содержании гистамина – лимонно-желтую, при среднем – зеленую, при низком – голубую люминесценцию (Смердова В. В. с соавт., 1983; Москвичев Е. В. с соавт., 2005; Любовцева Л. А., 1993, 2011; Сергеева В. Е. с соавт., 2013; Гордова В. С. с соавт., 2014; Храмов В. А., 2014).

Криостатные срезы селезенки обрабатывались парами ортофталевого альдегида («Лабтех», Россия) в предварительно разогретой камере в термостате при температуре 100°C в течение 10 секунд. Затем срезы помещались в камеру с парами воды при температуре 100°C на 2 минуты с последующим высушиванием в термостате при 70°C в течение 5 минут.

б. Люминесцентно-гистохимический метод Фалька-Хилларпа (Falk V. et al., 1962) в модификации Е. М. Крохиной (Крохина Е. М. с соавт., 1969) применялся для выявления серотонин- и катехоламинсодержащих структур селезенки. Срезы селезенки исследуемых групп животных инкубировались в камере с парами параформальдегида («Лабтех», Россия) при температуре 80°C в течение 60 минут.

Метод основан на реакции конденсации моноаминов с формальдегидом с образованием флуоресцирующих соединений, при котором происходит цепь химических реакций: сначала катехоламины превращаются в 6,7-диокси-1,2,3,4-тетраизогидрохинон и 4,6,7-триокси-1,2,3,4-тетрагидроизохинолин, которые в результате дегидрирования превращаются в 3,4-дигидроизохинолины (Axelsson S. et al., 1972; Bjorklund A. et al., 1972). Кето-таутомеры продуктов реакции образуют люминесцирующий комплекс, дающий изумрудно-зеленую флуоресценцию при облучении видимым сине-фиолетовым светом. 3,4-дигидро- β -карболин, который образуется из серотонина, дает желтое свечение (Гордон Д. С. с соавт., 1982; Сысоева Л. А., 1983; Сергеева В. Е. с соавт., 1992; Любовцева Л. А., 1993, 2011; Диндяев С. В. с соавт., 2007; Стручко Г. Ю. с соавт., 2014; Храмов В. А., 2014; Tekes K. et al., 2011).

Примененная нами люминесцентно-гистохимическая методика в модификации Е. М. Крохиной отличается от оригинальной прописи Фалька высушиванием срезов в воздушной среде, без использования лиофилизации (Крохина Е. М. с соавт., 1969). Ткани, обработанные таким образом, лишены деструкции, часто возникающей при лиофильном высушивании (Hokfelt T. et al., 1973). Полученные препараты рассматривались под люминесцентным микроскопом ЛЮМАМ-4 с длиной волны возбуждающего света 360 нм (Сысоева Л. А., 1983; Голубцова Н. Н. с соавт., 2000; Москвичев Е. В. с соавт., 2005; Павлова О. В. с соавт., 2013; Соколова И. В. с соавт., 2014; Стручко Г. Ю. с соавт., 2014).

7. Метод цитоспектрофлуориметрии использовался для количественного измерения интенсивности люминесценции серотонина, гистамина и катехоламинов в структурах селезенки. На люминесцентный микроскоп ЛЮМАМ-4 была установлена фотометрическая насадка ФМЭЛ-1А с диаметром зонда 0,5 мм и выходным напряжением 900 В. Для определения серотонина использовался светофильтр № 8 с длиной волны 525 нм, гистамина – светофильтр № 7 с длиной волны 515 нм, катехоламинов – светофильтр № 6 с длиной волны 480 нм (Гордон Д. С. с соавт., 1982; Сысоева Л. А., 1983; Любовцева Л. А., 1993, 2011; Голубцова Н. Н. с соавт., 2000; Карнаухов В. Н., 2002; Диндяев С. В. с соавт., 2007; Сергеева В. Е. с соавт., 2013; Гордова В. С., 2014; Соколова И. В. с соавт., 2014; Стручко Г. Ю. с соавт., 2014; Храмов В. А., 2014; Kozlov V. A. et al., 2003). Замер интенсивности люминесценции производился при увеличении люминесцентного микроскопа в 400 раз с табло регистрирующего прибора-усилителя У-5 в условных единицах (усл. ед.).

Для исследования степени преобладания серотонина или катехоламинов в каждой морфо-функциональной зоне селезенки лабораторных крыс определялся серотониновый индекс (I_s), который вычислялся по формуле: $I_s = \frac{[C]}{[КА]} / N$, где $[C]$ – концентрация серотонина в структуре, $[КА]$ – концентрация катехоламинов в структуре, N – количество исследуемых структур селезенки. Если $I_s > 1$, это свидетельствует о преобладании серотонина в данной клетке. При $I_s < 1$ интен-

сивность люминесценции катехоламинов превалирует над показателями серотонина и трактуется как снижение синтеза или усиленный распад последнего (Дьячкова И. М. с соавт., 2014).

8. Морфометрический анализ включал измерение площади первичных и вторичных лимфоидных узелков селезенки, их структурно-функциональных зон (периартериолярных лимфоидных муфт, герминативных центров, мантийной и маргинальной зон), красной пульпы по формуле: $S_{\text{кп}} = \frac{\sum S_{\text{среза}}}{\sum S_{\text{бп}}}$, где $S_{\text{кп}}$ – площадь красной пульпы, $S_{\text{бп}}$ – площадь белой пульпы на поверхности всего среза. Также определялись площади Iba-1-, MHC II-, кальмодулин-, CD4-, CD8-, CD20-позитивных клеток селезенки. Определение размеров клеток проводилось после фотографирования препаратов при увеличении в 400 раз светового микроскопа МИКМЕД-5 (ОАО Ломо, Россия).

Количество лимфоидных узелков, Iba-1-, MHC II-, кальмодулин-, CD4-, CD8-, CD20-позитивных клеток во всех морфо-функциональных зонах селезенки контрольных и опытных крыс проводилось с использованием окулярного винтового микрометра МОВ-1 при увеличении светового микрокопа в 400 раз в 50 полях зрения. За единицу площади, относительно которой проводилась сравнительная оценка изменений срезов селезенки, был принят 1 мм².

Замер интенсивности светопропускания (ИСП) клеток проводился для сравнительной оценки активности проводимых иммуногистохимических реакций (Зверев В. А. с соавт., 2009; Гордова В. С. с соавт., 2014). При одном и том же размере зонда устройства цитофотометрии и одинаковой толщине среза светопропускание увеличивается при снижении концентрации контрастируемых веществ в микроструктурах и уменьшается при его более плотном распределении в площади зонда (Загускин С. Л., 2010, С. 30; Дорогова В. Б. с соавт., 2013). Согласно закону Бера, оптическая плотность прямо пропорциональна концентрации вещества при постоянной толщине слоя (Дорогова В. Б. с соавт., 2013). Исходя из полученных данных, можно подвергать сравнению оптическую плотность контрастируемых веществ в клетках селезенки, которая имеет обратно пропорци-

ональную взаимосвязь с ИСП. Измерения ИСП клеток регистрировались в усл. ед. по сравнению с контрастом – плотностью предметного стекла, ИСП которого условно принималась за единицу (Ананьев Л. М. с соавт., 1996; Зверев В. А. с соавт., 2009; Дорогова В. Б. с соавт., 2013). Исследованию подвергались 100 полей зрения микроскопа МИКМЕД-5 при увеличении в 400 раз.

Определялся показатель экспрессии Iba-1, МНС класса II, кальмодулина, CD4, CD8, CD20, который представлял собой отношение Iba-1-, МНС II-, кальмодулин-, CD4-, CD8-, CD20-позитивных клеток к общему количеству клеток в 1 мм^2 , выраженный в процентах (Сокол А. В. с соавт., 2012; Lorette J., 2003; Kumar G. L. et. al., 2011).

Все морфометрические измерения, а также количественные измерения интенсивности иммуногистохимических реакций и распределения позитивных клеток в органе выполнены с применением программы «Sigma Scan Pro 5.0» (Поликарпов В. М. с соавт., 2006; Дьячкова И. М., 2009; Гребнев Д. Ю. с соавт., 2011; Хайдуков С. В. с соавт., 2011; Сапожников С. П. с соавт., 2013; Ялалетдинова Л. Р. с соавт., 2014).

Для обеспечения репрезентативности морфологические выборки производились случайным отбором, объем выборки для определения размеров клеток составлял 400 клеток, и количество клеточных элементов, подвергавшихся подсчету, от каждого животного, определялось с применением дисперсионного анализа (Автандилов Г. Г., 1996; Сыроешкин А. В. с соавт., 2002; Поликарпов В. М. с соавт., 2006; Болл Р. М. с соавт., 2007; Ватазин А. В. с соавт., 2009).

9. Для количественного определения содержания общего кальция в сыворотке крови контрольных и опытных животных использовался колориметрический метод с о-крезолфталеинкомплексом (Долгов В. В. с соавт., 2002; Вялов С. С., 2014).

Определение концентрации общего кальция в сыворотке крови проводился у лабораторных крыс контрольной и опытной групп до начала и по окончании сроков эксперимента на 60 сутки. Количественный анализ проводился с использова-

нием набора «Кальций-Витал» (№ ФСР 2010/07735 от 18.05.2010 г., ООО «Витал Диагностикс», Россия) на анализаторе биохимическом фотометрическом кинетическом АБхФк-02–«НПП-ТМ» (ТУ 9443-010-11254896-2002) («БиАн», Россия) с длиной волны 540–590 нм, длиной оптического пути 5 мм.

Ход определения. Сыворотка изготавливалась из крови, полученной из бедренной вены крыс методом пункции с соблюдением методов асептики. Венозная кровь, полученная без антикоагулянтов в центрифужную стеклянную пробирку, отстаивалась при комнатной температуре (15–20°C) в течение 30 минут до полного образования сгустка. Для отделения столбика сгустка от стенок пробирки осторожно проводили тонкой стеклянной палочкой по внутренним стенкам пробирки по окружности в верхнем слое крови. Сыворотку сливали в другую центрифужную пробирку, и проводили центрифугирование при относительной центробежной силе RCF от 1000 до 1200 xg в течение 10 минут.

Далее к реагентам № 1 (буферный раствор: боратный буфер и глицин, рН 10,7) и № 2 (хромоген: о-крезолфталеинкомплексон и 8-гидрокси-хинолин) из набора «Кальций-Витал», взятых по 1,0 мл, добавляли 0,05 мл исследуемой сыворотки крови, тщательно перемешивали и инкубировали 5 минут при 18-25 °С. Затем измерялась оптическая плотность опытной и калибровочной проб в кювете с длиной оптического пути 5 мм при длине волны 540–590 нм (зеленый светофильтр) против холостой пробы крезолфталеинкомплексона. Одновременно ставилась одна калибровочная проба (Sigma chemical company, США). Фотометрирование проводилось согласно протоколу производителя.

Метод основан на том, что кальций в щелочной среде образует красно-фиолетовый комплекс с о-крезолфталеинкомплексонам. В реакционную смесь добавляют 8-оксихинолин, который связывает металлы, мешающие определению, но образует с кальцием менее прочный комплекс, чем крезолфталеинкомплексон. Интенсивность окраски раствора при длине волны 540–590 нм прямо пропорциональна концентрации кальция в сыворотке.

10. Статистический анализ полученных цифровых данных проводился с использованием программы Microsoft Office® Excel 2010 и STATISTICA 10.0 (2008) (Горлач В. В. с соавт., 2006; Ананьева Н. Г., 2013). Рассчитывались среднее арифметическое значение (M), стандартная ошибка среднего значения (m) и стандартное отклонение (σ) количества и площадей первичных и вторичных лимфоидных узелков, их структурно-функциональных зон (периартериолярных лимфоидных муфт, герминативных центров, маргинальной зоны), Iba-1-, MHC II-, кальмодулин-, CD4-, CD8-, CD20-позитивных клеток селезенки органа как по каждому животному, так и в среднем в группах. Также определялись среднее арифметическое значение, стандартная ошибка среднего значения (m) и стандартное отклонение (σ) интенсивности люминесценции биогенных аминов: серотонина, гистамина, катехоламинов (по тридцать замеров для каждой исследуемой структуры по каждому животному), концентрации кальция в сыворотке крови по каждому животному в обеих группах. Среднее арифметическое значение рассчитывалось по формуле:

$$\bar{X} = \frac{x_1 + x_2 + \dots + x_n}{n}, \text{ где } x_i - \text{ варианты (значения признака); } n - \text{ объем выборки.}$$

Стандартная ошибка среднего значения рассчитывалась по формуле:

$$m_x = \pm \frac{\sigma}{\sqrt{n}}, \text{ а стандартное отклонение: } \sigma = \pm \sqrt{\frac{\sum (x_i - \bar{X})^2}{(n-1)}}.$$

В тексте средние величины (M) приводятся со стандартной ошибкой среднего значения (m).

Распределение размеров клеток на группы осуществлялось методом сигмальных отклонений. Размеры для каждого вида клеток принимались: $M \pm \sigma$ – средние, $> M + \sigma$ – большие, $< M - \sigma$ – малые (Сыроешкин А. В. с соавт., 2002; Поликарпов В. М. с соавт., 2006; Дьячкова И. М., 2009). При статистической обработке данных проведена проверка вариационных рядов на нормальность распределения между контрольной и опытной группой лабораторных животных.

Для оценки различий качественных признаков использовался доверительный интервал по t-критерию Стьюдента. Различия считались статистически значимыми при значениях $p \leq 0,05$. В случаях, когда гипотеза о нормальности распределения отвергалась, использовались непараметрические критерии Вилкоксона-Манна-Уитни (Леонов В. П. с соавт., 1997; Медик В. А. и соавт., 2000; Платонов А. Е., 2000; Реброва О. Ю., 2006; Горлач В. В. с соавт., 2006; Ананьева Н. Г., 2013; Bulinski A. et al., 2012).

11. Корреляционный анализ проводился для установления корреляционных взаимосвязей между морфометрическими показателями размеров функциональных зон селезенки, количеством CD4-, CD8-, CD20-позитивных клеток селезенки крыс обеих групп, интенсивности люминесценции биогенных аминов (серотонина, гистамина, катехоламинов) в каждой структуре селезенки, а также между уровнем концентрации общего кальция в крови крыс обеих групп и исследуемыми морфологическими показателями селезенки. Для каждого корреляционного индекса определялся уровень достоверности (p). Коэффициент корреляции вычислялся методом квадратов (метод Пирсона), так как полученные данные имеют только количественное выражение, и требуется точное установление силы связи между ними. Расчет коэффициента корреляции проводился по формуле: $r_{xy} = \frac{\sum (dx * dy)}{\sqrt{(\sum dx^2 * \sum dy^2)}}$ где d_x и d_y – стандартные отклонения каждого показателя от среднего значения своего вариационного ряда (Корреляционный анализ, 2011). Оценка силы связи между переменными определялась с учетом коэффициента корреляции: менее 0,3 – связь слабая или отсутствует; 0,3–0,7 – связь средняя; 0,7–1,0 – связь сильная или полная (Платонов А. Е., 2000; Корреляционный анализ, 2011). Положительный коэффициент корреляции означает одновременное изменение средних значений в исследуемой паре, отрицательный – разнонаправленные изменения со снижением средних значений в одном показателе пары при возрастании в другом (Медик В. А. и соавт., 2000; Платонов А. Е., 2000; Реброва О. Ю., 2006; Павлова О. В. с соавт., 2013).

ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ СОБСТВЕННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ

3.1. Общеморфологическая характеристика селезенки лабораторных крыс при употреблении соединения кальция с питьевой водой

При окраске срезов селезенки белых лабораторных крыс контрольной и опытной групп общегистологическими методами выявляются компоненты, представленные соединительнотканной капсулой, трабекулами, белой и красной пульпой. В составе белой пульпы определяются первичные и вторичные лимфоидные узелки (ЛУ) с выраженными структурно-функциональными зонами на различных стадиях развития: периартериолярные лимфоидные муфты (ПАЛМ), которые окружают эксцентрично расположенные центральные артериолы; герминативные центры (ГЦ), вокруг которых располагается плотный, визуально более темный, лимфоцитарный ободок (мантийная зона) (МТЗ). Маргинальная зона (МГЗ) белой пульпы, образованная крупными лимфоцитами и макрофагами, отделена маргинальным синусом, хорошо видимым в световой микроскоп. Красная пульпа (КП) состоит из ретикулярных клеток и форменных элементов крови и пронизана синусоидными капиллярами, просвет которых зияет в срезах.

В срезах селезенки животных контрольной группы лимфоидные узелки округлой или удлинённой формы, часто встречаются группами по 2–3 узелка (Рисунок 1 А). Как правило, лимфоидные узелки без герминативного центра располагаются на периферии срезов.

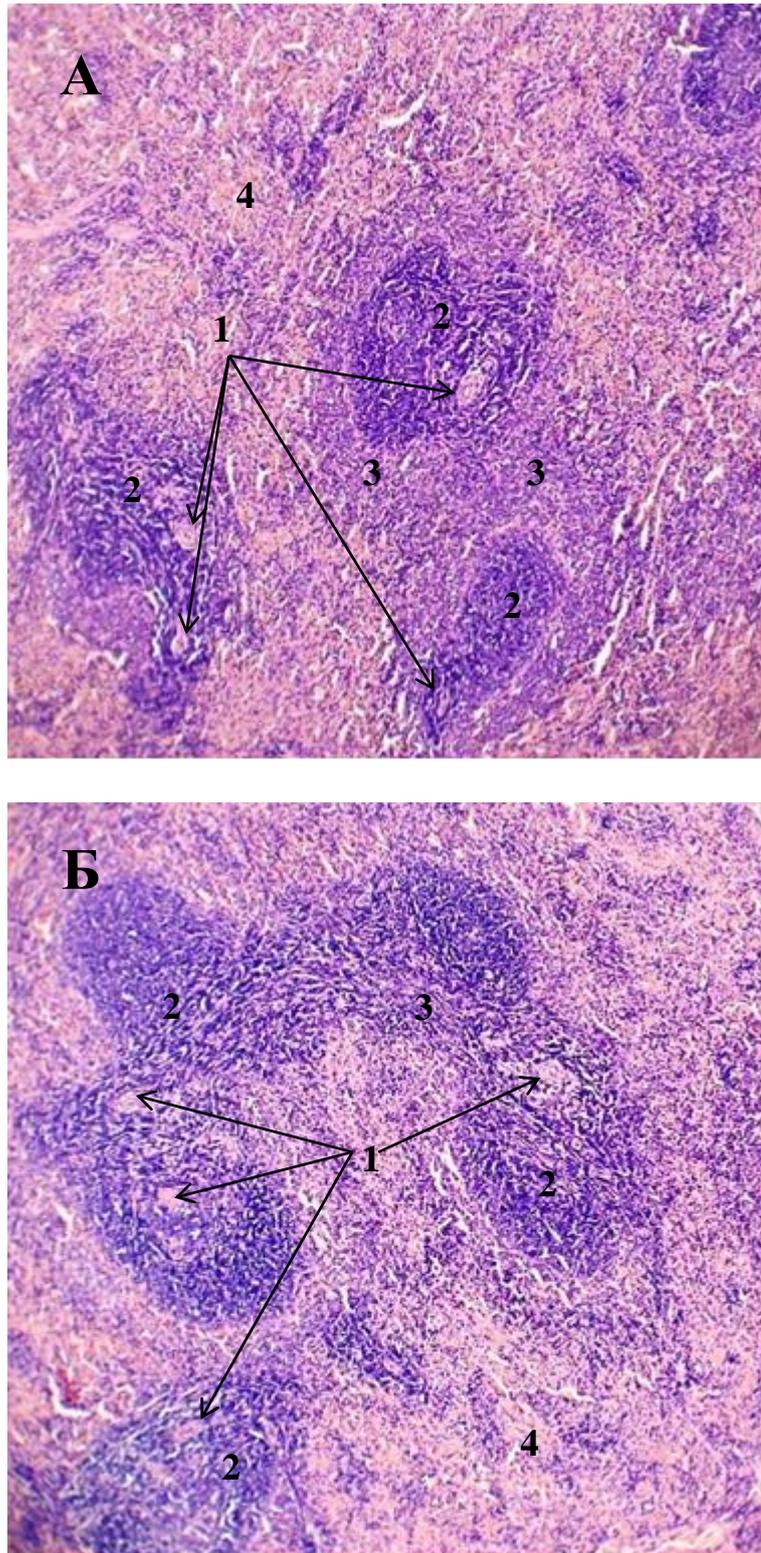


Рисунок 1. Селезенка лабораторных крыс. Окраска гематоксилином и эозином. Микроскоп МИКМЕД-5. Об. 10. Ок. 10. А – контрольная группа. Б – опытная группа.

1 – центральная артериола, 2 – лимфоидный узелок,
3 – маргинальная зона лимфоидного узелка, 4 – красная пульпа.

Количественные различия лимфоидных узелков по степени зрелости селезенки крыс контрольной группы и после употребления соединения кальция

Группы лимфоидных узелков селезенки	Контрольная группа		Опытная группа	
	шт./мм ² (M ± m)	% от общего количества лимфоидных узелков	шт./мм ² (M ± m)	% от общего количества лимфоидных узелков
Первичные	0,38 ± 0,06	46,6%	0,6 ± 0,11 *	66,6%
Вторичные	0,44 ± 0,07	53,4%	0,37 ± 0,03 **	33,4%
в том числе:				
- с незрелым герминативным центром	0,27 ± 0,04	32,9%	0,27 ± 0,03 *	22,3%
- со зрелым герминативным центром	0,17 ± 0,04	20,5%	0,1 ± 0,02 *	11,1%
Общее количество лимфоидных узелков	0,82 ± 0,13		0,9 ± 0,13 **	

Различия с контрольной группой статистически значимы: * – $p < 0,01$, ** – $p < 0,04$.

За основу морфологических критериев зрелости герминативного центра были приняты 4 стадии развития ЛУ (Афанасьев Ю. И. с соавт., 2012): I – III стадии представляют незрелый центр размножения с большим числом малодифференцированных и митотически делящихся клеток лимфоцитопоэтического ряда; в конечной IV стадии развития в центре ЛУ формируется светлый участок с единичными макрофагами и фигурами митозов, вокруг которого расположена более темная «корона» мантийной зоны из малых лимфоцитов, преимущественно В-клеток памяти.

В селезенке контрольных крыс относительно равное количество составляют первичные (46,6%) и вторичные (53,4%) составляющие компоненты белой пульпы. Однако среди лимфоидных узелков с наличием герминативного центра преобладают структуры с незрелым герминативным центром (32,9%) (Таблица 1).

После поступления кальция в срезах селезенки лабораторных крыс внимание акцентируется на значительно укрупненных лимфоидных узелках за счет объединения и слияния нескольких соседних. В результате этого лимфоидные узелки приобретают полиморфную форму. Отличительной характеристикой микроструктур селезенки опытной группы является визуально более выраженная маргинальная зона, отграничивающая лимфоидные узелки от красной пульпы (Рисунок 1 Б).

Реакция белой пульпы селезенки крыс на длительное дозированное воздействие соединения кальция, поступавшего с питьевой водой, заключается в количественном преобладании первичных лимфоидных узелков (66,6%) над вторичными ($p < 0,01$). Следует отметить, что в селезенке опытных животных первичные лимфоидные узелки располагаются не только на периферии, но в равных количествах локализуются на всей поверхности срезов. Число структурных компонентов белой пульпы селезенки с центром размножения сокращается на 20%, в составе которых большая часть представлена лимфоидными узелками с неразвитым герминативным центром (22,3%) ($p < 0,04$). На фоне модулируемых условий эксперимента происходит сокращение количества лимфоидных узелков со зрелым герминативным центром на 9,4% ($p < 0,05$) (Таблица 1).

Общее количество ЛУ селезенки контрольных животных составило $0,82 \pm 0,13$ шт./мм². На фоне смены макроэлементного рациона количество лимфоидных узелков увеличивается на $8,89 \pm 0,38\%$ до $0,9 \pm 0,13$ шт./мм² ($p < 0,04$) (Таблица 1).

При визуальной оценке, подтвержденной морфометрическими исследованиями, обращает внимание тот факт, что основную массу белой пульпы обеих групп животных составляют лимфоидные узелки средних размеров. На фоне употребления водного раствора хлорида кальция происходит укрупнение лимфоидных компонентов селезенки. Так, при снижении числа средних ЛУ количество крупных лимфоидных узелков возрастает: первичные – на 8,6%, вторичные – на 12,7% ($p < 0,05$) (Рисунок 2).



Морфометрические границы для первичных ЛУ: малые – $0,54 - 0,88 \cdot 10^3$ мкм², средние – $0,89 - 20,72 \cdot 10^3$ мкм², крупные – $20,73 - 62,01 \cdot 10^3$ мкм².

Морфометрические границы для вторичных ЛУ: малые – $24,09 - 53,37 \cdot 10^3$ мкм², средние – $53,38 - 212,65 \cdot 10^3$ мкм², крупные – $212,66 - 501,6 \cdot 10^3$ мкм².

Различия с контрольной группой статистически значимы: * – $p < 0,001$, ** – $p < 0,05$.

Рисунок 2. Распределение по площади лимфоидных узелков селезенки крыс контрольной группы и после употребления соединения кальция

По результатам морфометрического и морфологического исследований обнаружено, что максимального развития в первичных ЛУ обеих групп животных достигли маргинальная зона и область периартериолярной лимфоидной муфты. Мантийная зона находится в начальной стадии формирования (Таблица 2). Реактивным изменениям на фоне употребления водного раствора хлорида кальция подвержены все функциональные зоны первичных ЛУ: наблюдается увеличение площади ПАЛМ в 1,55 раз, мантийной зоны – в 1,36 раз, маргинальной зоны – в 1,92 раза ($p < 0,03$) (Рисунок 3).

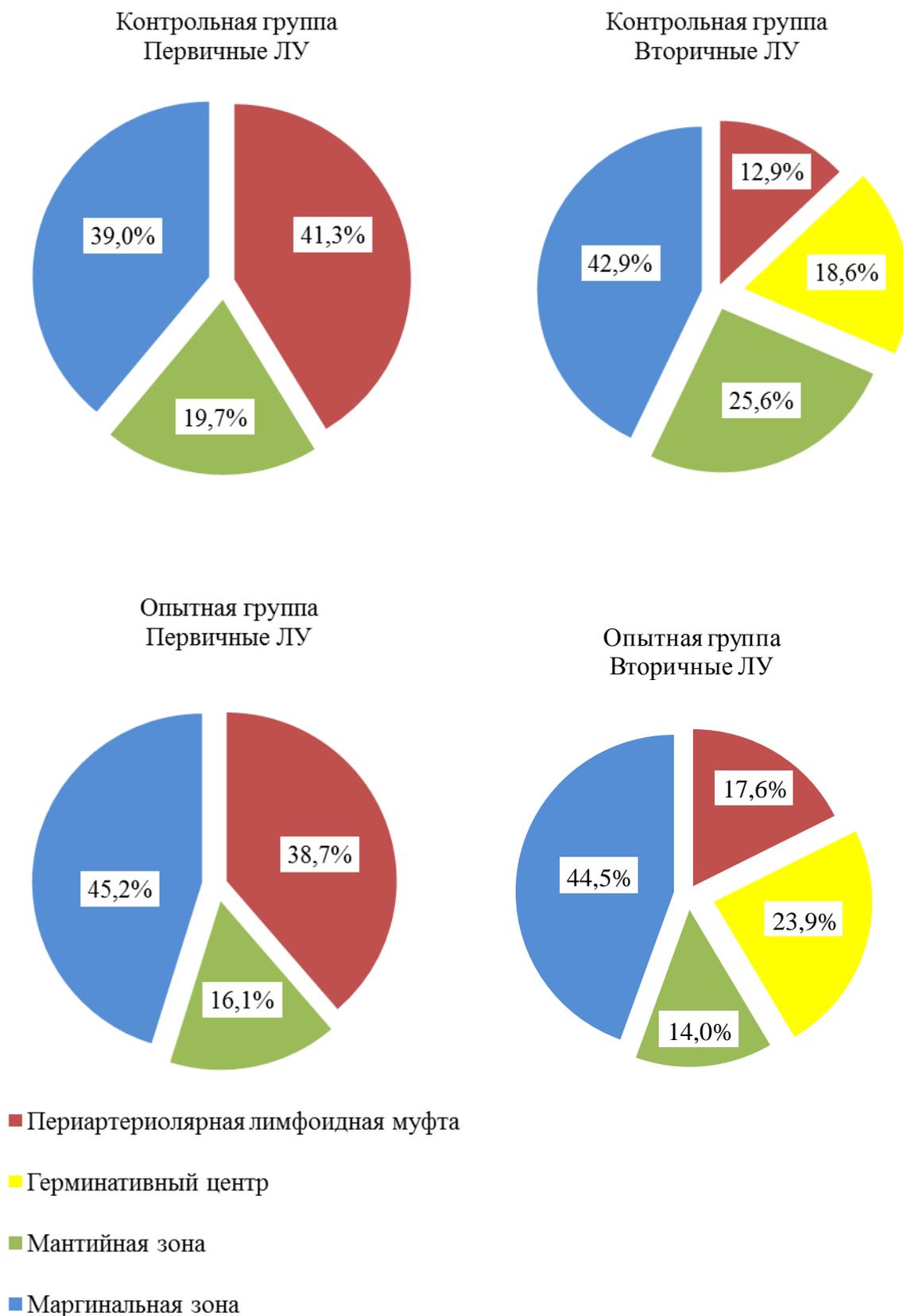


Рисунок 3. Соотношения площадей морфо-функциональных зон лимфоидных узелков

селезенки крыс контрольной группы и после употребления соединения кальция

Таблица 2

Морфометрические показатели площади структурно-функциональных зон лимфоидных узелков селезенки лабораторных крыс ($M \pm m$)

Микроструктуры селезенки, $\cdot 10^3$ мкм ²	Первичные лимфоидные узелки		Вторичные лимфоидные узелки	
	Контрольная группа	Опытная группа	Контрольная группа	Опытная группа
Периартериолярная лимфоидная муфта	3,46 ± 0,34	5,37 ± 0,46 **	19,33 ± 1,55	25,36 ± 1,97 **
Герминативный центр	–	–	27,81 ± 1,67	34,51 ± 1,94 **
Мантийная зона	1,65 ± 0,16	2,24 ± 0,23 **	38,23 ± 2,14	20,16 ± 1,29 **
Маргинальная зона	3,24 ± 0,83	6,26 ± 0,75 *	63,71 ± 2,27	73,55 ± 3,15 **
Лимфоидный узелок	8,46 ± 0,34	12,34 ± 0,59 *	123,16 ± 4,58	143,95 ± 7,75 *

Различия с контрольной группой статистически значимы: * – $p < 0,001$, ** – $p < 0,03$.

Наблюдаются реактивные изменения во всех структурно-функциональных зонах вторичных лимфоидных узелков селезенки крыс опытной группы (Таблица 2). Происходит увеличение площадей периартериолярной лимфоидной муфты – в 1,31 раз, герминативного центра – в 1,24 раза, маргинальной зоны – в 1,15 раза на фоне сокращения размеров мантийной зоны в 1,89 раз ($p < 0,03$) (Рисунок 3).

В результате сравнительной морфометрии отмечается, что площадь маргинальной зоны лимфоидных узелков в контрольной группе занимает почти половину общей площади ЛУ (в первичных ЛУ – 39,0%, во вторичных ЛУ – 42,9%), и на фоне обогащения рациона кальцием этот показатель достоверно увеличивается (в первичных ЛУ – 45,2%, во вторичных ЛУ – 44,5%) ($p < 0,05$) (Рисунок 3).

Выявлена структурная закономерность в процессе созревания лимфоидных узелков селезенки крыс. В начальной стадии развития зона ПАЛМ занимает зна-

чительную площадь ЛУ как в контрольной группе (41,3%), так и в опытной группе (38,7%) ($p < 0,02$). Но в процессе формирования герминативного центра ее размер претерпевает значительные морфологические изменения, и к моменту завершения созревания становится равен лишь 12,9% – 17,6% от всей площади лимфоидного узелка ($p < 0,03$) (Рисунок 3).

Таблица 3

Морфометрические показатели структурно-функциональных зон белой и красной пульпы селезенки крыс контрольной группы и после употребления соединения кальция ($M \pm m$)

Микроструктуры селезенки, *10 ³ мкм ²	Контрольная группа	Опытная группа	Степень и направленность изменений	Достоверность
Площадь первичных ЛУ	8,46 ± 0,34	12,34 ± 0,59	+ 31,5%	$p < 0,01$
Площадь вторичных ЛУ	123,16 ± 4,58	143,95 ± 7,75	+ 14,5%	$p < 0,04$
Общая площадь белой пульпы	2547,88 ± 49,19	2915,88 ± 32,58	+ 12,7%	$p < 0,03$
Площадь красной пульпы	11353,09 ± 2194,54	8472,9 ± 1079,4	- 25,4%	$p < 0,02$
Соотношение площади белой и красной пульпы	1:4,71 ± 0,38	1:3,11 ± 0,42	+ 34,0%	$p < 0,01$

После обогащения питьевого рациона хлоридом кальция в течение 60 суток наблюдаются гиперпластические изменения со стороны белой пульпы селезенки. Площадь, занимаемая как первичными, так и вторичными лимфоидными узелками, увеличивается на 31,5% и 14,5% соответственно ($p < 0,05$). Компенсаторно площадь красной пульпы опытных животных сокращается на четверть (25,4%) ($p < 0,02$) (Таблица 3).

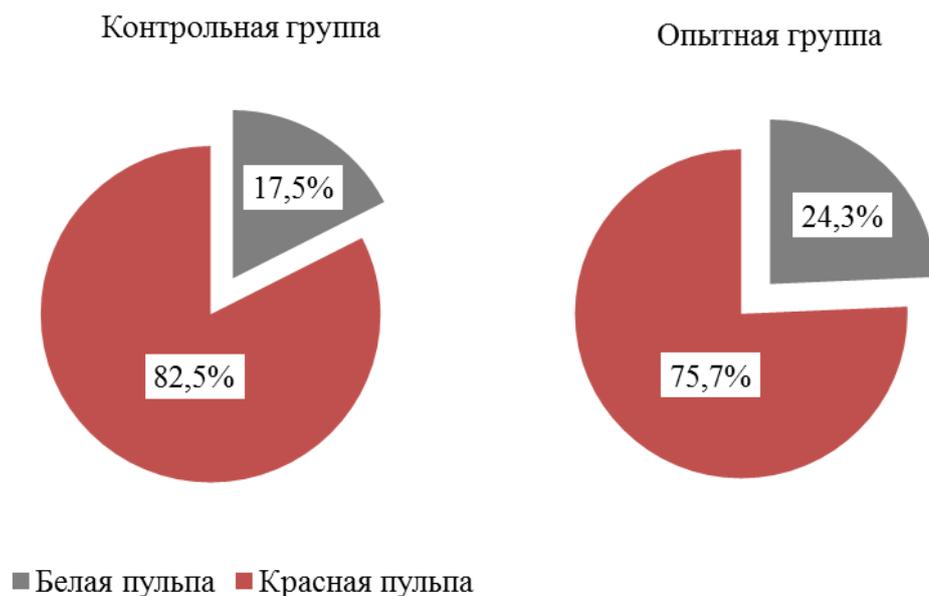


Рисунок 4. Соотношение белой и красной пульпы селезенки крыс контрольной группы и после употребления соединения кальция

В целом эти изменения хорошо прослеживаются в виде оценки соотношения белой к красной пульпе. В селезенке контрольных крыс данный показатель варьирует от 1:3,09 до 1:6,48, что в среднем составляет $1:4,71 \pm 0,38$. Установлено, что обогащение питьевой воды кальцием у опытных животных сопровождается изменением соотношения функциональных зон селезенки – увеличением общей площади белой пульпы и, соответственно, снижением площади красной пульпы. Данный показатель находится в пределах от 1:1,4 до 1:5,75, в среднем равен $1:3,11 \pm 0,42$ ($p < 0,05$) (Рисунок 4).

Согласно литературным данным (Макалиш Т. П., 2013), селезенка лабораторных крыс обеих групп относится к метаболическому (депонирующему) типу, в связи с преобладанием красной пульпы. Однако на фоне обогащения рациона кальцием наблюдается тенденция к функциональной перестройке органа с преобладанием иммунных процессов, что можно расценивать как субстрат для активации иммунного ответа, протекающего в селезенке.

Таблица 4

Корреляционный анализ морфометрических показателей площади морфо-функциональных зон селезенки крыс контрольной группы (г)

Микроструктуры селезенки	ПАЛМ	ГЦ	МТЗ	МГЗ	КП
ПАЛМ	–	0,25 *	0,44 *	0,22 **	- 0,1 *
ГЦ	0,25 *	–	0,38 *	0,17 **	- 0,19 **
МТЗ	0,44 *	0,38 *	–	0,29 *	- 0,29 *
МГЗ	0,22 **	0,17 **	0,29 *	–	- 0,2 **
КП	- 0,1 *	- 0,19 **	- 0,29 *	- 0,2 **	–

Корреляционный индекс статистически достоверен: * – $p < 0,01$; ** – $p < 0,04$.

Таблица 5

Корреляционный анализ морфометрических показателей площади морфо-функциональных зон селезенки крыс опытной группы (г)

Микроструктуры селезенки	ПАЛМ	ГЦ	МТЗ	МГЗ	КП
ПАЛМ	–	0,5 *	0,29 *	0,32 *	- 0,12 *
ГЦ	0,5 *	–	0,11 *	0,48 **	- 0,04 **
МТЗ	0,29 *	0,11 *	–	0,25 *	- 0,2 *
МГЗ	0,32 *	0,48 **	0,25 *	–	- 0,16 **
КП	- 0,12 *	- 0,04 **	- 0,2 *	- 0,16 **	–

Корреляционный индекс статистически достоверен: * – $p < 0,01$; ** – $p < 0,03$.

Выявлена положительная корреляционная связь слабой или средней интенсивности между размерами всех структурных зон белой пульпы селезенки контрольных и опытных крыс, что свидетельствует о тесной функциональной взаимосвязи компонентов лимфоидных узелков между собой и одновременным изменением средних показателей площади (Таблица 4, 5).

Закономерным представляется отрицательная корреляция между структурами белой и красной пульпы обеих групп животных. Так, при увеличении площади

той или иной функциональной зоны лимфоидных узелков наблюдается разнонаправленное изменение площади красной пульпы с сокращением ее площади.

Сильная взаимосвязь между микроструктурами селезенки крыс не была выявлена. Наиболее тесные корреляционные отношения зарегистрированы в парах мантийная зона – ПАЛМ ($r = 0,44$) ($p < 0,01$) и мантийная зона – герминативный центр ($r = 0,38$) ($p < 0,01$) контрольной группы, которые на фоне экспериментальной гиперкальцемии снижаются до корреляционной связи слабой силы (Таблица 8). Однако в опытной группе корреляция средней силы выявляется между ПАЛМ и герминативным центром ($r = 0,5$) ($p < 0,01$), ПАЛМ и маргинальной зоной ($r = 0,32$) ($p < 0,01$), а также в паре герминативный центр – маргинальная зона ($r = 0,48$) ($p < 0,03$) (Таблица 5).

Так, мантийная зона контрольных крыс относится к более функционально зависимой от изменений в окружающих микроструктурах селезенки. В то время как после обогащения рациона кальцием на первый план по тесной взаимосвязи между различными компонентами органа выходят периартериолярная лимфоидная муфта и маргинальная зона.

Таким образом, на фоне длительного употребления соединения кальция с питьевой водой происходят изменения в морфо-функциональных зонах селезенки лабораторных крыс с тенденцией к слиянию и укрупнению размеров площади лимфоидного аппарата селезенки опытных крыс с гиперплазией всех компонентов белой пульпы, кроме мантийной зоны. Выявлена корреляционная взаимосвязь реактивных изменений между структурами лимфоидных узелков и красной пульпы. Данные морфологические изменения характеризуют компенсаторно-адаптивную реакцию периферического органа иммуногенеза на смену макроэлементного рациона.

3.2. Иммуногистохимическая характеристика селезенки лабораторных крыс при употреблении соединения кальция с питьевой водой

3.2.1. Клетки моноцитарно-макрофагальной системы (Iba-1-позитивные клетки)

Для исследования клеток моноцитарно-макрофагальной системы селезенки крыс использован иммуногистохимический метод непрямого иммуноферментного анализа с поликлональными антителами к белку Iba-1. При постановке данной реакции в срезах селезенки контрольной и экспериментальной групп животных просматривается коричневый фон срезов (красная пульпа селезенки), в котором четко контурируются лимфоидные узелки более светлого оттенка (Рисунок 5).

Клетки моноцитарно-макрофагального происхождения выявляются во всех структурно-функциональных зонах селезенки и имеют темно-коричневый цвет, неправильную, часто звездчатую форму с множественными отростками и неоднородное расположение белка Iba-1 в клетках. Часто обнаруживаются Iba-1-позитивные клетки с ядрами бобовидной формы. Визуально внимание акцентируется на максимальном количестве клеток с экспрессией Iba-1 в красной пульпе селезенки, где располагаются моноциты, дифференцирующиеся впоследствии в макрофаги, которые принимают участие в деструкции форменных элементов крови (Рисунок 7). Отличительной характеристикой Iba-1-позитивных микроструктур селезенки является четко выраженный маргинальный синус, отграничивающий лимфоидные узелки от красной пульпы, за счет сконцентрированных, строго упорядоченных в один ряд макрофагов и моноцитов (Рисунок 5). На периферии маргинальной зоны макрофаги с пептидом Iba-1 встречаются редко, за счет чего лимфоидные узелки выглядят четко контурированными белесоватым ободком, свободным от Iba-1-реактивных структур.

Под большим увеличением микроскопа (400 х) обнаруживается, что продукт реакции расположен неоднородно и имеет внутриклеточную цитоплазматическую локализацию (Рисунок 6).

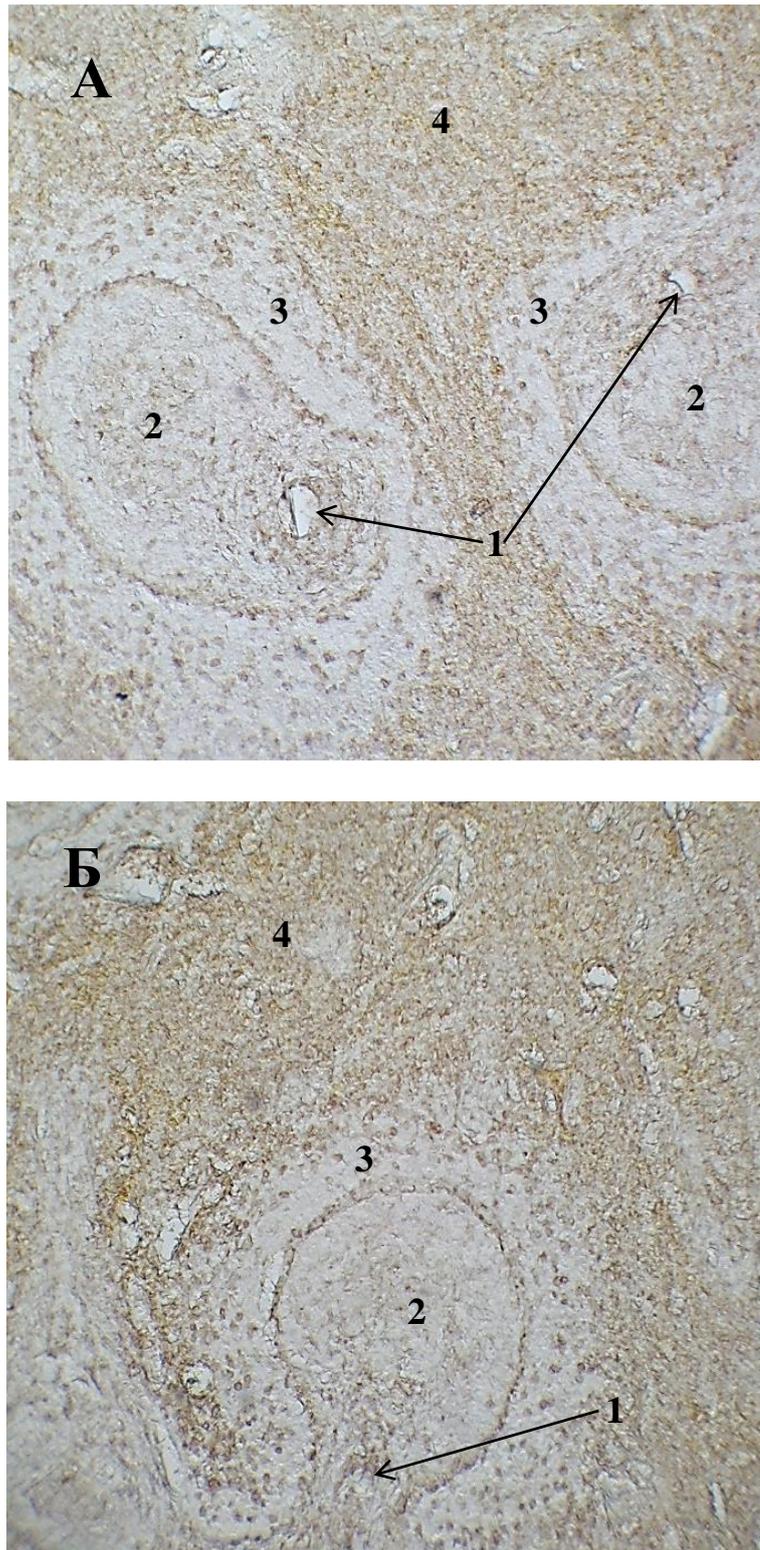


Рисунок 5. Селезенка лабораторных крыс. Иммуногистохимический метод с антителами к Iga-1. Микроскоп МИКМЕД-5. Об. 10. Ок. 10. А – контрольная группа. Б – опытная группа.

1 – центральная артериола, 2 – вторичный лимфоидный узелок,
3 – маргинальная зона лимфоидных узелков, 4 – красная пульпа.

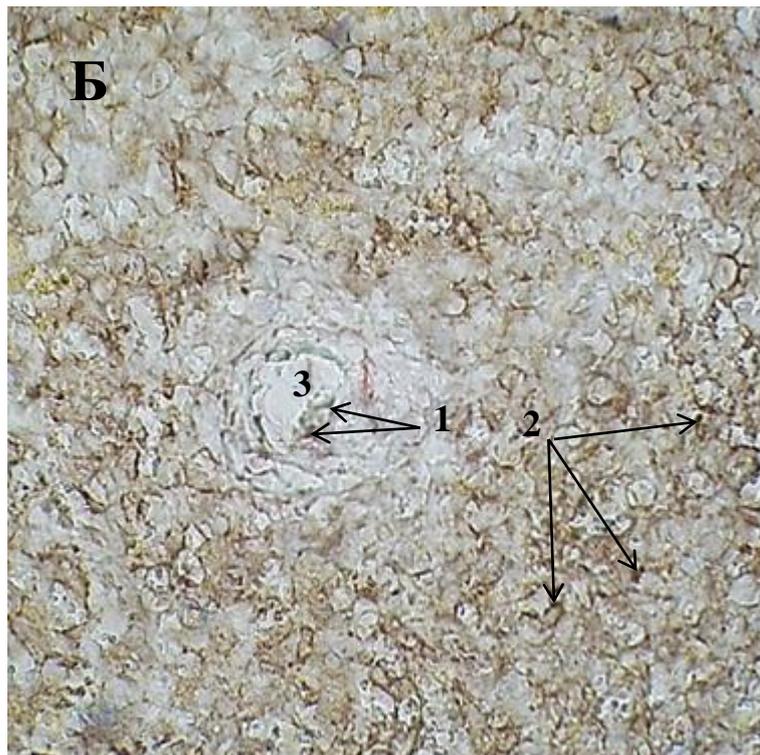
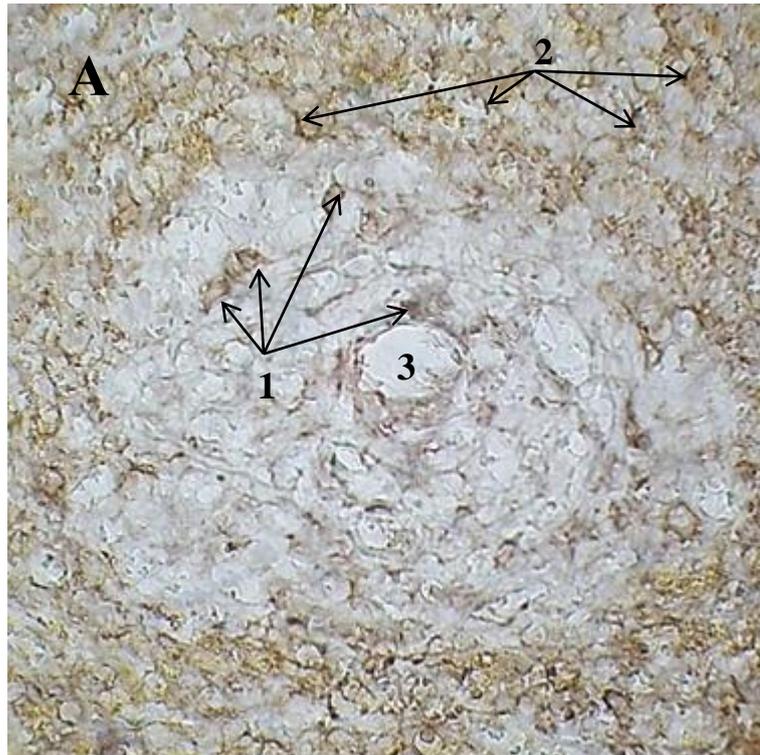


Рисунок 6. Первичные лимфоидные узелки селезенки лабораторных крыс.
 Иммуногистохимический метод с антителами к Iba-1. Микроскоп МИКМЕД-5.
 Об. 40. Ок. 10. А – контрольная группа. Б – опытная группа.
 1 – Iba-1-позитивные клетки белой пульпы, 2 – Iba-1-позитивные клетки красной пульпы,
 3 – центральная артериола

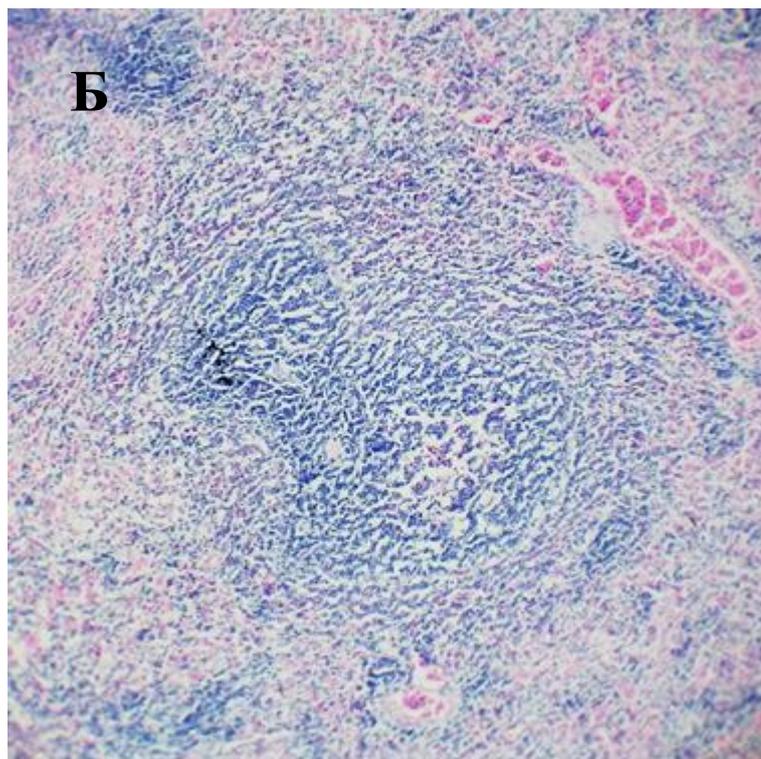
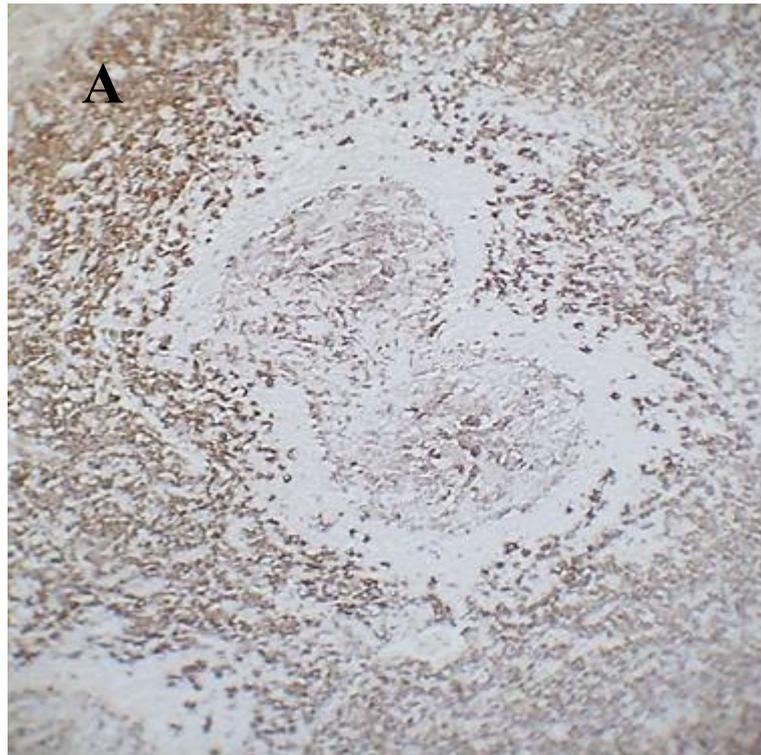


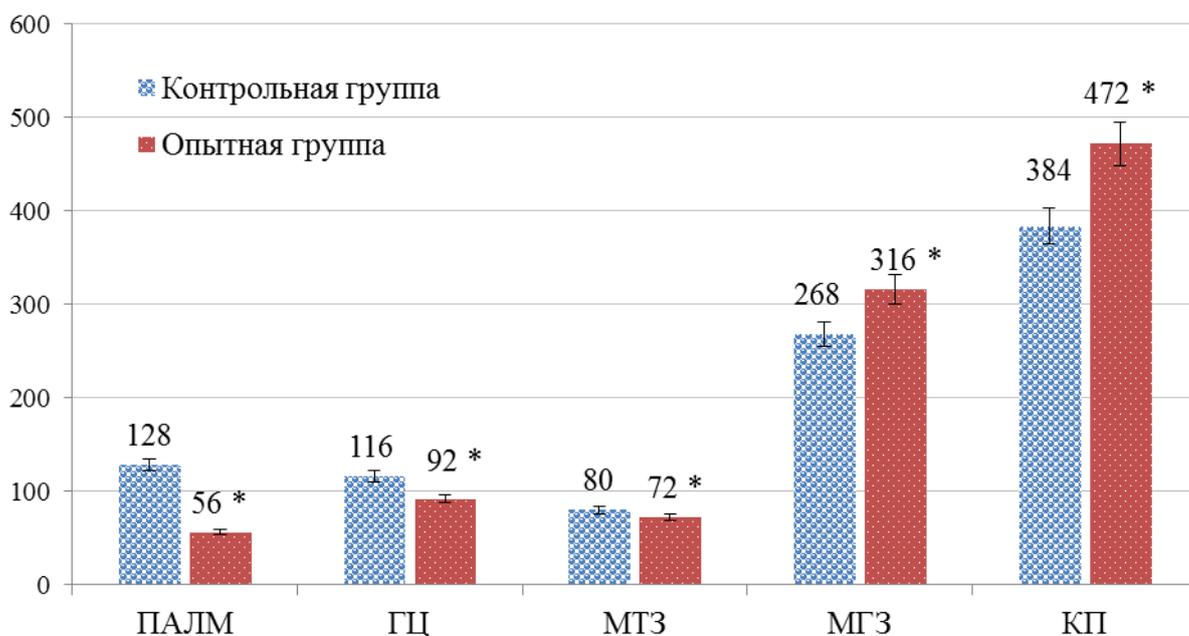
Рисунок 7. Морфологическая параллель. Селезенка крыс контрольной группы.

Микроскоп МИКМЕД-5. Об. 10. Ок. 10.

А – иммуногистохимический метод с антителами к Iba-1.

Б – окраска гематоксилином и эозином.

Уровень экспрессии Iba-1 на мембранах клеток селезенки контрольных белых крыс составил $12,63 \pm 0,22\%$, на фоне приема водного раствора хлорида кальция показатель увеличивается на $25,8 \pm 1,78\%$ до $17,11 \pm 0,27\%$ ($p < 0,05$).



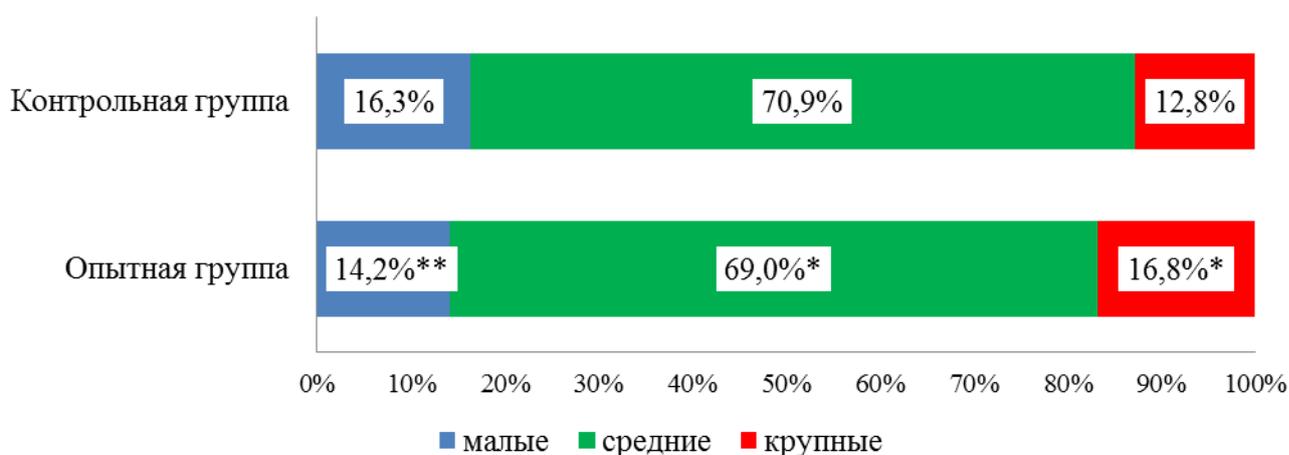
* Различия с контрольной группой статистически значимы: $p < 0,05$

Рисунок 8. Количество клеток моноцитарно-макрофагальной системы в морфо-функциональных зонах селезенки на единицу площади ($M \pm m$), шт./мм²

После морфометрических исследований было зарегистрировано распределение по количеству Iba-1-позитивных клеток селезенки контрольной группы с максимальной концентрацией в красной пульпе (39,4% всех идентифицированных Iba-1-позитивных клеток) и маргинальной зоне белой пульпы (27,4%) (Рисунок 8). Внутри остальных функциональных зон белой пульпы исследуемые клетки обнаруживаются в относительно равных пропорциях: в периартериолярных лимфоидных муфтах – 13,1%, в герминативных центрах и мантийных зонах – по 11,9% и 8,2% ($p < 0,05$).

Употребление водного раствора хлорида кальция приводит к количественному перераспределению моноцитов и макрофагов между белой и красной пульпой

селезенки: количество Iba-1-позитивных клеток на единицу площади красной пульпы (на 7,4%) и маргинальной зоны (на 3,9%) увеличивается, а в остальных зонах белой пульпы сокращается (на 1,1–7,6%) ($p < 0,05$). Однако преобладающее количество клеток моноцитарно-макрофагальной системы расположены так: же как и в контрольных срезах в красной пульпе (46,8%), вдоль синуса маргинальной зоны (31,3%) и крайне редко в области периартериолярной лимфоидной муфты белой пульпы (5,5%) ($p < 0,05$) (Рисунок 5, 6, 7, 8).



Морфометрические границы площади Iba-1-позитивных клеток селезенки:
 малые – 17,6 – 51,7 мкм², средние – 51,8 – 150,5 мкм², крупные – 150,6 – 366,1 мкм².

Различия с контрольной группой статистически значимы: * – $p < 0,01$, ** – $p < 0,02$.

Рисунок 9. Распределение по площади Iba-1-позитивных клеток селезенки крыс контрольной группы и после употребления соединения кальция

Результаты морфометрии показали, что на фоне употребления питьевой воды, обогащенной кальцием, происходит укрупнение клеток моноцитарно-макрофагальной системы. Средняя площадь Iba-1-реактивных клеток селезенки увеличивается на $7,07 \pm 0,5\%$: контрольная группа – $97,76 \pm 3,01$ мкм², опытная группа – $104,5 \pm 3,23$ мкм² ($p < 0,05$). Количество исследуемых клеток крупного размера возрастает на 4,0% за счет сокращения числа малых на 2,1% и средних макрофагов на 1,9% ($p < 0,02$) (Рисунок 9). В общей картине наблюдается тенден-

ция к стимуляции моноцитарно-макрофагального звена иммунной системы в селезенке на фоне модулируемых условий эксперимента.

Таблица 6

Сравнительная характеристика интенсивности светопропускания Iba-1-позитивных клеток в морфо-функциональных зонах селезенки крыс контрольной группы и после употребления соединения кальция ($M \pm m$), усл. ед.

Локализация клеток	Контрольная группа	Опытная группа	Достоверность
Периартериолярная лимфоидная муфта	$0,82 \pm 0,02$	$0,88 \pm 0,02$	$p < 0,04$
Герминативный центр	$0,76 \pm 0,03$	$0,94 \pm 0,01$	$p < 0,04$
Мантийная зона	$0,80 \pm 0,02$	$0,91 \pm 0,02$	$p < 0,006$
Маргинальная зона	$0,73 \pm 0,02$	$0,92 \pm 0,01$	$p < 0,01$
Красная пульпа	$0,77 \pm 0,03$	$0,92 \pm 0,01$	$p < 0,007$

Интенсивность светопропускания (ИСП) идентифицированных Iba-1-позитивных клеток контрольной группы, в среднем, составила $0,77 \pm 0,01$ усл. ед. В опытной группе крыс, употреблявших питьевую воду с повышенным содержанием кальция, наблюдается достоверное увеличение ИСП данного мембранного белка на $14,19 \pm 1,79\%$ до $0,91 \pm 0,008$ усл. ед. Рассматривая каждую функциональную зону отдельно, можно определить, что ИСП возрастает с различной выраженностью во всех микроструктурах селезенки на фоне изменения макроэлементного баланса (Таблица 6). Тем самым, можно утверждать, что оптическая плотность и концентрация кальций связывающего пептида Iba-1 в клетках моноцитарно-макрофагальной системы снижается на фоне употребления хлорида кальция.

Таким образом, экспериментально доказано моноцитарно-макрофагальная система селезенки реагирует на употребление питьевой воды, обогащенной кальцием с повышением экспрессии пептида Iba-1 (на $25,8 \pm 1,78\%$) и средней площади Iba-1-позитивных клеток (на $7,07 \pm 0,5\%$), а также увеличением их количества в маргинальной зоне и красной пульпе селезенки ($p < 0,05$).

3.2.2. Антигенпрезентирующие (МНС II-позитивные) клетки

При постановке специфической иммуногистохимической реакции с МКАТ к МНС II класса антигенпрезентирующие клетки селезенки, несущие на своей поверхности главный комплекс гистосовместимости II класса, определяются коричневого цвета различной интенсивности. Характерным морфологическим признаком является их локализация вдоль маргинальных синусов и соединительнотканых трабекул органа (Рисунок 10). Визуально отмечается практически полное отсутствие МНС II-экспрессирующих клеток внутри лимфоидных узелков. В красной пульпе идентифицируемые клетки обнаруживаются с диффузным расположением, а также цепочкой вдоль трабекул стромы.

При большом увеличении микроскопа детально определяются морфологические компоненты клеток с экспрессией МНС II класса. Данные клетки имеют овальную или округлую форму, часто с небольшими выростами, выпячиваниями цитоплазматической мембраны. Также встречаются клетки звездчатой формы (Рисунок 11, 12). МНС II-положительные клетки имеют различную плотность субстрата иммуногистохимической реакции на своей поверхности, в результате чего имеют неоднородную окраску от бежевого до темно-коричневого цвета. Ядра клеточных элементов остаются не окрашенными. Размеры клеток селезенки, экспрессирующие антигены МНС класса II, при визуальной оценке варьируют, что дает основу для их подробного морфометрического исследования.

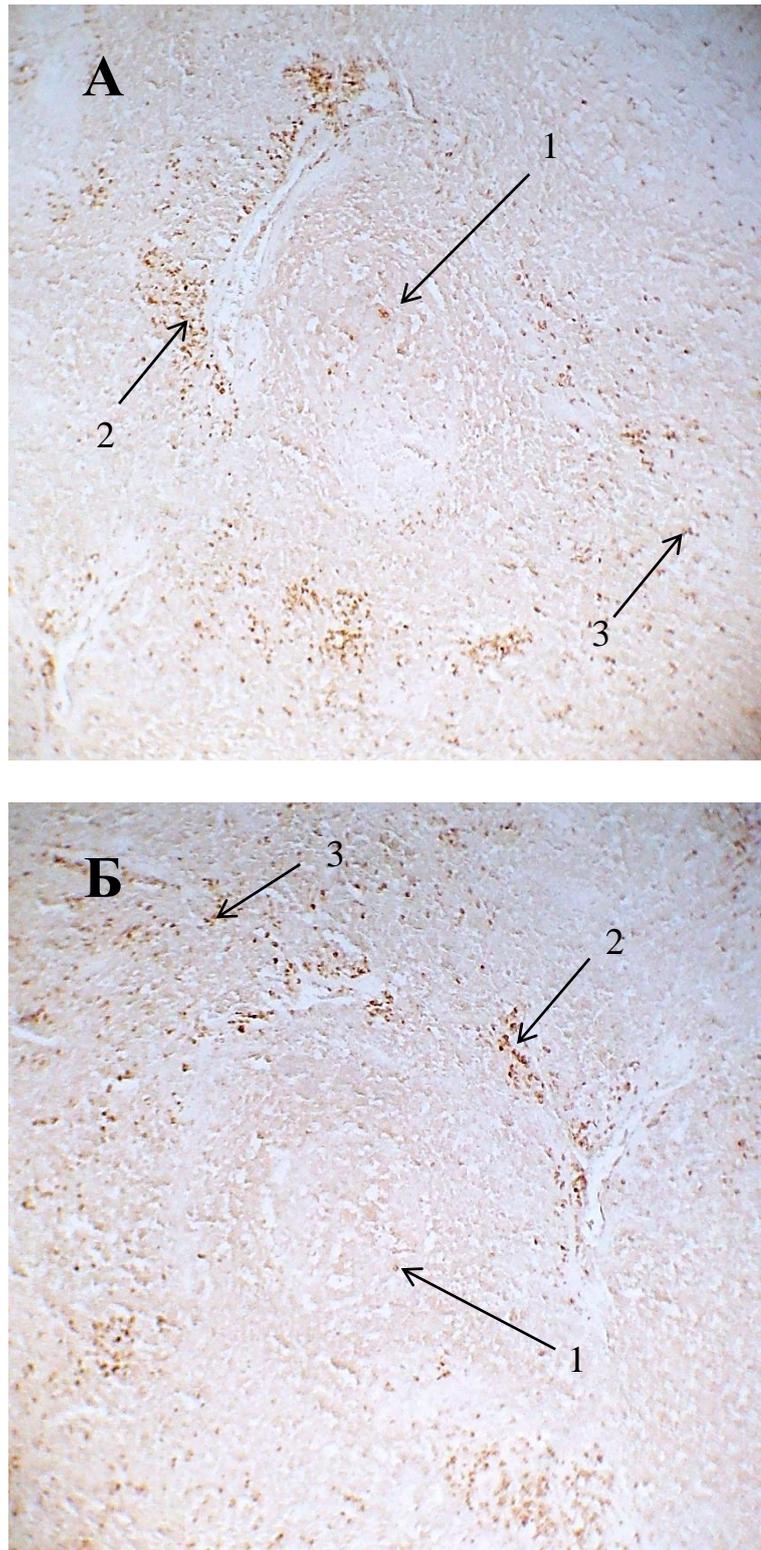


Рисунок 10. Селезенка лабораторных крыс. Иммуногистохимический метод с антителами к МНС II класса. Микроскоп МИКМЕД-5. Об. 10. Ок. 10.

А – контрольная группа. Б – опытная группа.

МНС II-позитивные клетки: 1 – герминативного центра, 2 – маргинальной зоны, 3 – красной пульпы.

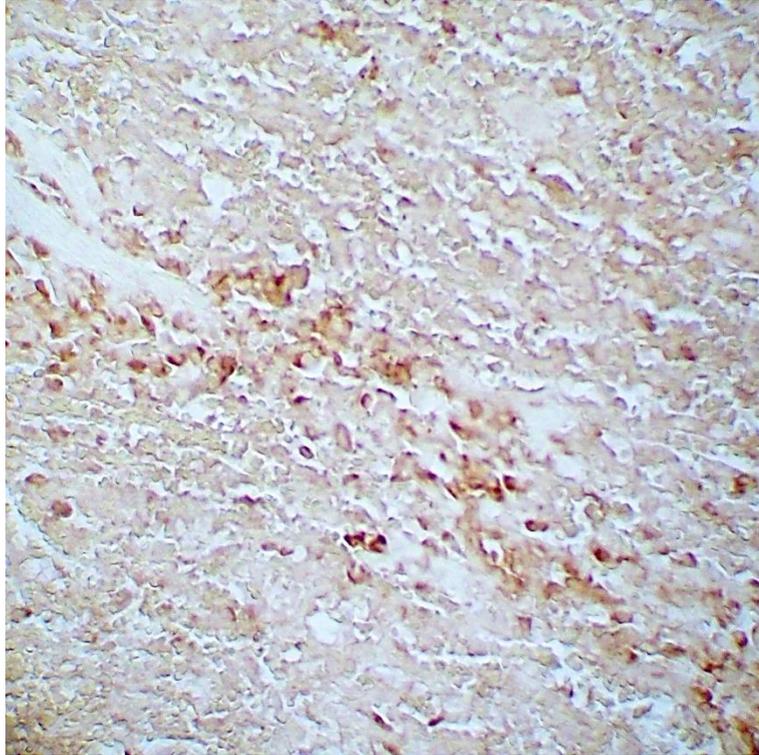


Рисунок 11. МНС II-позитивные клетки вдоль маргинального синуса селезенки лабораторных крыс опытной группы. Микроскоп МИКМЕД-5. Об. 40. Ок. 10.

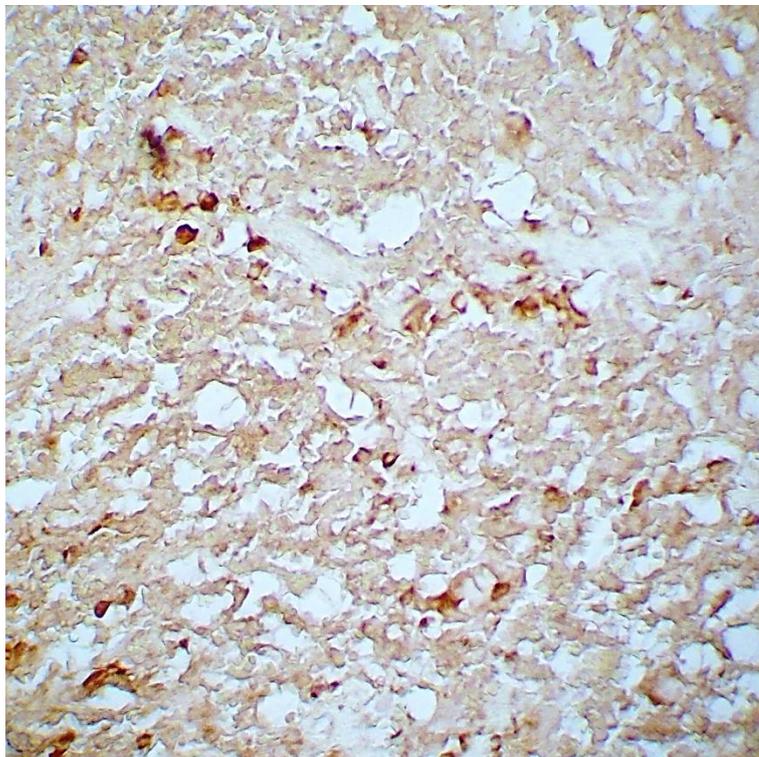


Рисунок 12. МНС II-позитивные клетки красной пульпы селезенки лабораторных крыс опытной группы. Микроскоп МИКМЕД-5. Об. 40. Ок. 10.

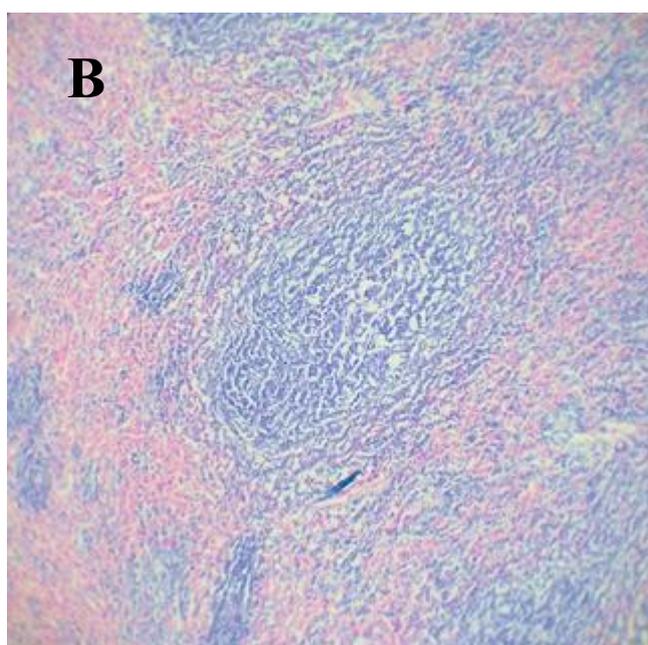
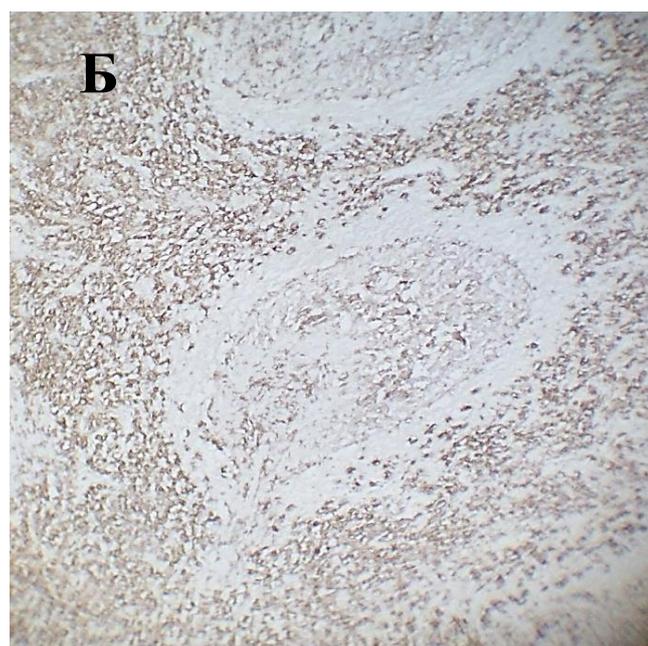
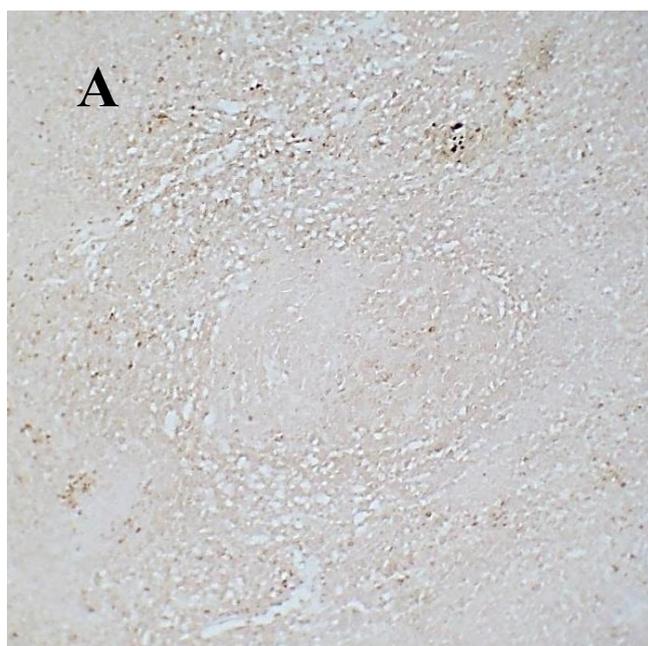


Рисунок 13. Морфологическая параллель.

Селезенка крыс контрольной группы.

Микроскоп МИКМЕД-5. Об. 10. Ок. 10.

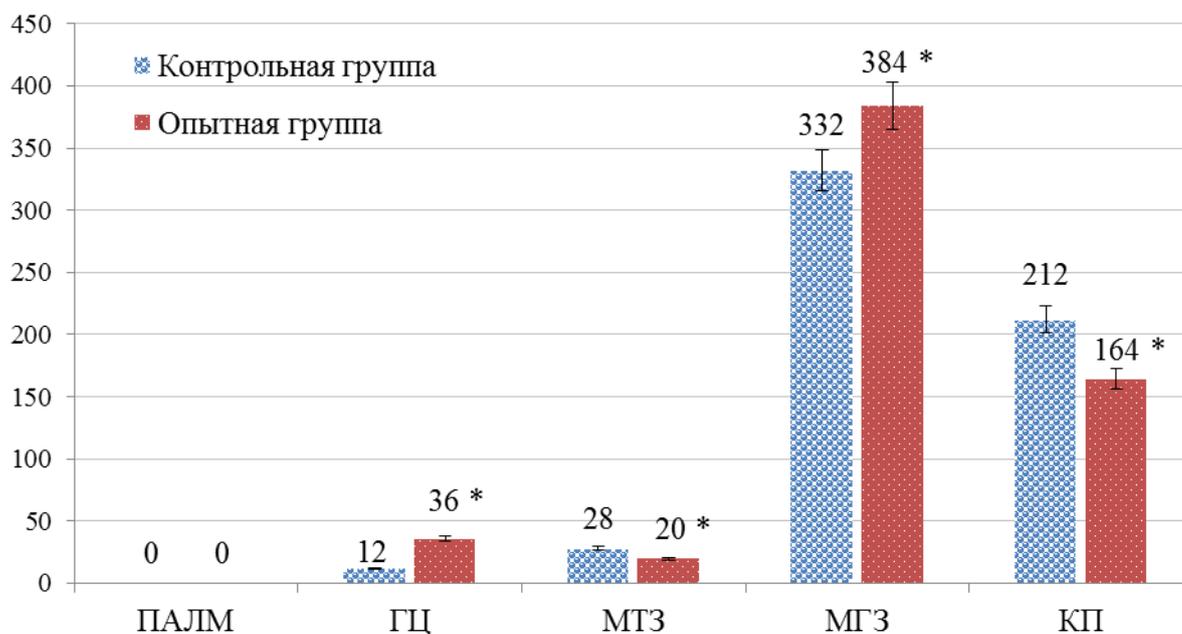
А – иммуногистохимический метод
с антителами к МНС II класса.

Б – иммуногистохимический метод
с антителами к Iba-1.

В – окраска гематоксилином и эозином.

Проведя морфологическую параллель в комплексе с морфометрическим исследованием между Iba-1- и МНС II-реактивными структурами селезенки белых крыс было выявлено, что среди клеток моноцитарно-макрофагальной системы только $16,11 \pm 1,39\%$ являются антигенпрезентирующими с экспрессией МНС класса II на мембране ($p < 0,008$) (Рисунок 13).

После употребления опытными крысами воды с добавлением хлорида кальция отмечается повышение уровня экспрессии МНС II класса в клетках селезенки на $4,24 \pm 0,34\%$: контрольная группа – $10,85 \pm 0,23\%$, опытная группа – $14,33 \pm 0,18\%$ ($p < 0,02$).



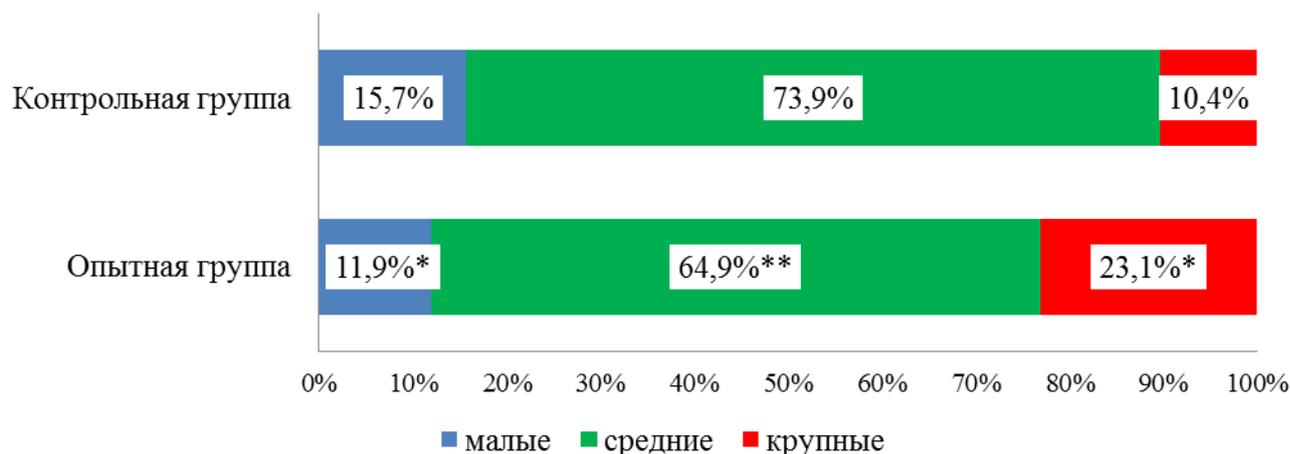
* Различия с контрольной группой статистически значимы: $p < 0,05$

Рисунок 14. Количество МНС II-позитивных клеток в морфо-функциональных зонах селезенки на единицу площади ($M \pm m$), шт./мм²

Визуальные данные подтвердились после морфометрической оценки срезов селезенки. Так, максимальное количество клеток, участвующих в антигенной презентации для $CD4^+$ с помощью молекул МНС II класса, выявляется в маргинальной зоне, проходящей вдоль одноименных синусов селезенки, которые опоясывают лимфоидные узелки (контрольная группа – 56,9% всех МНС II-положительных клеток, опытная группа – 63,7%) (Рисунок 14). Также клетки с молекулами МНС II часто располагаются в красной пульпе, в том числе концентрируясь группами около соединительнотканых трабекул органа (контрольная группа

– 36,3%, опытная группа – 27,1%). Внутри остальных морфо-функциональных зон данные клетки единичны или отсутствуют.

После поступления соли кальция с питьевой водой происходит смена локализации МНС II-позитивных клеток: в красной пульпе частота встречаемости снижается на 9,2%, а в маргинальной зоне – возрастает на 6,8% (Рисунок 14).



Морфометрические границы площади МНС II-позитивных клеток селезенки: малые – 13,2 – 75,7 мкм², средние – 75,8 – 260,5 мкм², крупные – 260,6 – 394,1 мкм².

Различия с контрольной группой статистически значимы: * – $p < 0,02$, ** – $p < 0,03$.

Рисунок 15. Распределение по площади МНС II-позитивных клеток селезенки крыс контрольной группы и после употребления соединения кальция

Средняя площадь антигенпрезентирующих клеток данного типа у контрольных крыс составила $152,98 \pm 6,86$ мкм², у крыс после регулярного употребления соединения кальция увеличилась на $6,63 \pm 0,82\%$ – $183,6 \pm 8,01$ мкм² ($p < 0,05$).

Проводимые измерения выявили направленность к укрупнению размеров клеток селезенки с антигенами МНС класса II после кальций обогатенной диеты. Так, заметно преобладание крупных клеток (на 12,7%) при параллельном снижении числа малых и средних размеров – на 3,8% и 9,0% соответственно ($p < 0,03$) (Рисунок 15).

Сравнительная характеристика интенсивности светопропускания МНС II-позитивных клеток в морфо-функциональных зонах селезенки лабораторных крыс ($M \pm m$), усл. ед.

Локализация клеток	Контрольная группа	Опытная группа	Значимость различий
Периартериолярная лимфоидная муфта	$0,73 \pm 0,01$	$0,54 \pm 0,009$	$p < 0,01$
Герминативный центр	$0,77 \pm 0,01$	$0,57 \pm 0,009$	$p < 0,03$
Мантийная зона	$0,80 \pm 0,01$	$0,57 \pm 0,008$	$p < 0,03$
Маргинальная зона	$0,81 \pm 0,01$	$0,60 \pm 0,02$	$p < 0,01$
Красная пульпа	$0,73 \pm 0,01$	$0,55 \pm 0,009$	$p < 0,006$

Интенсивность светопропускания значительно снижается во всех функциональных структурах селезенки после добавления соединения кальция в питьевую воду: различия с контрольной группой составляют от 24,7% в красной пульпе до 28,8% мантийной зоне лимфоидных узелков. Интересно отметить, что ИСП МНС II-реактивных клеток белой пульпы контрольных крыс постепенно нарастает от периартериолярной лимфоидной муфты к периферии лимфоидного узелка (Таблица 7).

В среднем, клетки селезенки с молекулами МНС II класса имеют ИСП $0,77 \pm 0,008$ усл. ед. у животных, употреблявших чистую питьевую воду. Однако после добавления в нее хлорида кальция ИСП МНС II-положительных структур снижается до $0,56 \pm 0,006$ усл. ед. Следовательно, имея обратно пропорциональную зависимость, плотность субстрата иммуногистохимической реакции с антителами к МНС II класса увеличивается на $36,95 \pm 2,9\%$.

Таким образом, антигенпрезентирующие клетки реагируют повышением уровня экспрессии, площади и перераспределением МНС II-позитивных клеток в морфо-функциональных зонах селезенки крыс при употреблении соединения кальция с питьевой водой.

3.2.3. Внутриклеточный рецептор ионов кальция и кальмодулин-позитивные клетки

При постановке иммуногистохимической реакции с поликлональными антителами к кальмодулину (КМ) срезы селезенки лабораторных крыс принимают коричневый цвет, на фоне которого четко контурируются более светлые лимфоидные узелки округлой или овальной формы, ограниченные беловатыми маргинальными синусами. Клетки, содержащие внутриклеточный рецептор ионов кальция, селезенки лабораторных крыс обеих экспериментальных групп преимущественно располагаются в красной пульпе, маргинальной зоне белой пульпы и значительно реже в мантийной зоне лимфоидных узелков (Рисунок 16).

Кальмодулин-содержащие клетки селезенки крыс имеют округлую форму с неровными краями и небольшими выпячиваниями, темно-коричневый цвет продукта иммуногистохимической реакции и неокрашенное светлое ядро, как правило, расположенное эксцентрично. Нами отмечено, что кальмодулин концентрируется внутри клеток в виде гранул, которые неоднородно насыщены исследуемым веществом (Рисунок 17).

Показатель экспрессии кальмодулина в клетках селезенки контрольной группы составил $10,23 \pm 0,23\%$, после употребления соли кальция с питьевой водой увеличился на $42,0 \pm 1,39\%$, достигая $17,7 \pm 0,27\%$ ($p < 0,05$).

В структуре белой пульпы обеих групп животных обнаружена морфологическая картина с единичными КМ-позитивными клетками внутри герминативных центров, а после употребления макроэлемента они встречаются реже в данной локализации: контрольная группа – $6,7\%$, опытная группа – $2,0\%$. Нами зафиксировано отсутствие клеток с кальмодулином на мембранах в зоне периартериолярной лимфоидной муфты селезенки у всех исследуемых животных (Рисунок 18).

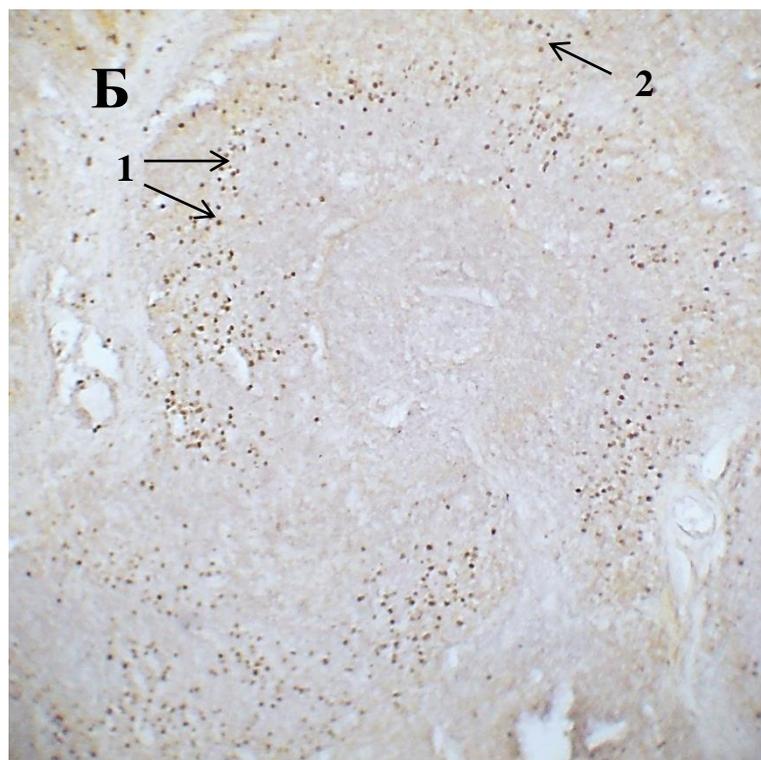
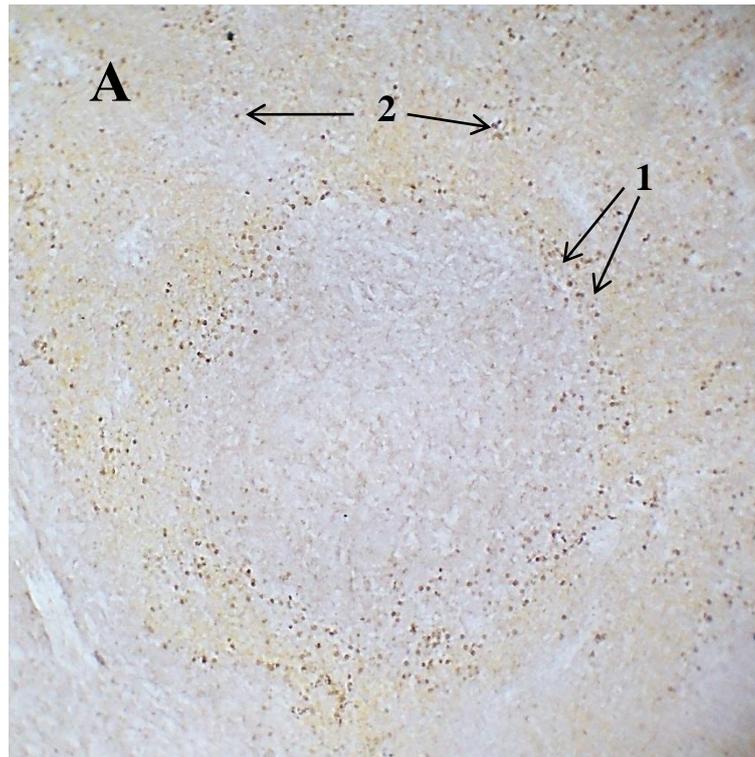


Рисунок 16. Селезенка лабораторных крыс. Иммуногистохимический метод с антителами к кальмодулину. Микроскоп МИКМЕД-5. Об. 10. Ок. 10.

А – контрольная группа. Б – опытная группа.

Кальмодулин-позитивные клетки: 1 – маргинальной зоны лимфоидных узелков,
2 – красной пульпы.

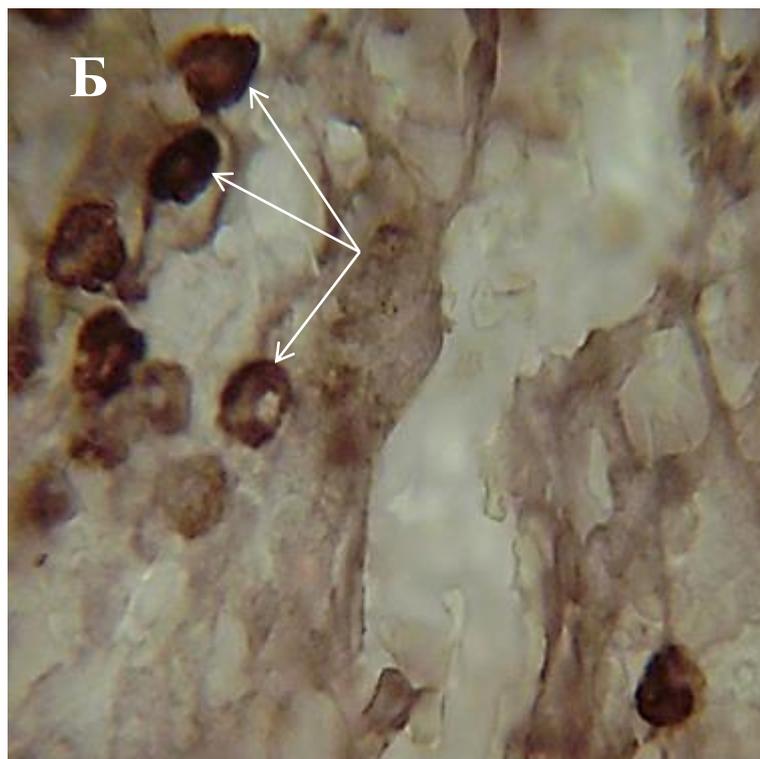
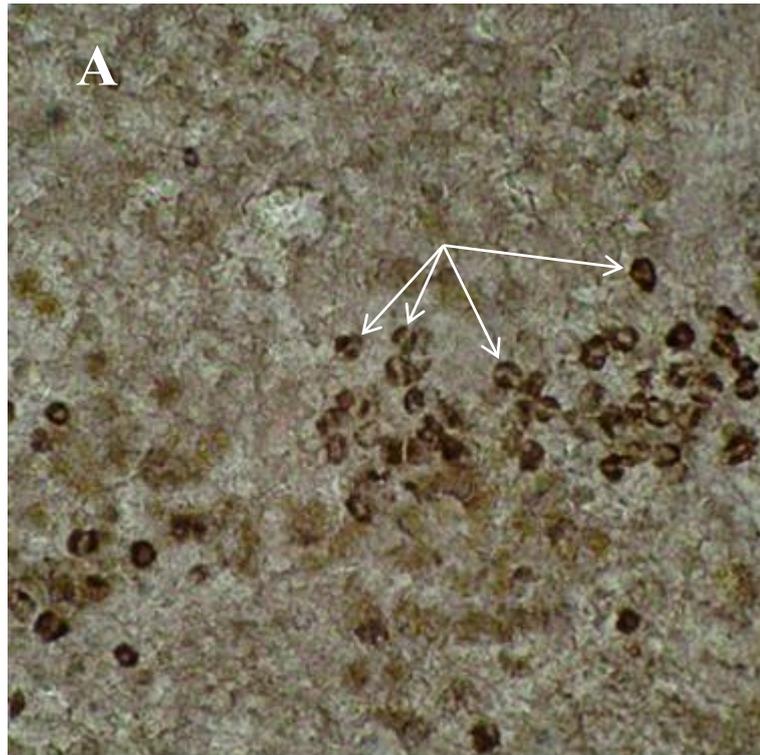
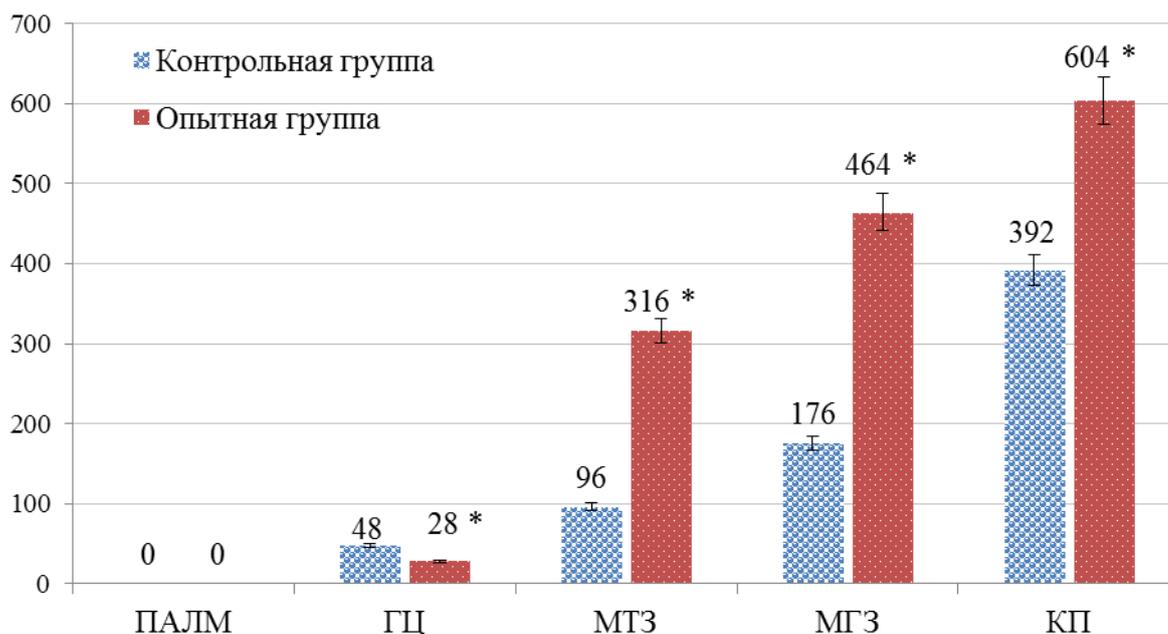


Рисунок 17. Кальмодулин-позитивные клетки красной пульпы селезенки крыс опытной группы. Иммуногистохимический метод с антителами к кальмодулину.

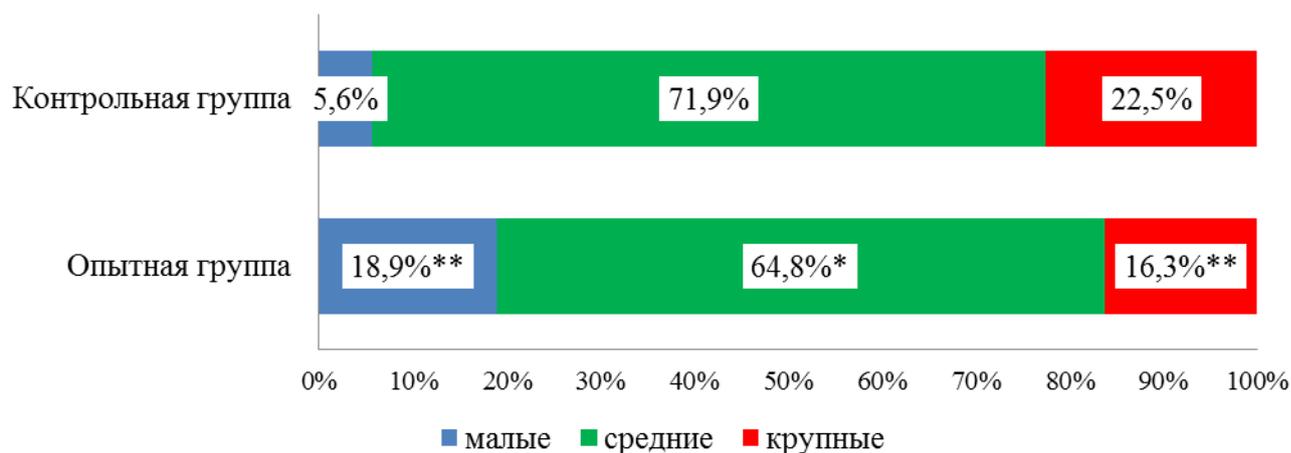
Микроскоп МИКМЕД-5. А – Об. 40. Ок. 10. Б – Об. 100. Ок. 10.



* Различия с контрольной группой статистически значимы: $p < 0,05$

Рисунок 18. Количество кальмодулин-позитивных клеток в морфо-функциональных зонах селезенки на единицу площади ($M \pm m$), шт./мм²

При количественном анализе обнаружено, что клетки с рецепторами к ионам кальция в большинстве расположены в красной пульпе (контрольная группа – 55,1% всех идентифицированных КМ-позитивных клеток, опытная группа – 42,7%) и вдоль маргинальных синусов селезенки (контрольная группа – 24,7%, опытная группа – 32,9%) обеих групп животных. Внутри герминативных центров и периартериолярной лимфоидной муфты практически все клетки КМ-негативны (Рисунок 18).



Морфометрические границы площади кальмодулин-позитивных клеток селезенки: малые – 6,41 – 35,9 мкм², средние – 36,0 – 185,0 мкм², крупные – 185,1 – 328,4 мкм².

Различия с контрольной группой статистически значимы: * – $p < 0,001$, ** – $p < 0,01$.

Рисунок 19. Распределение по площади кальмодулин-позитивных клеток селезенки контрольных лабораторных крыс и после употребления кальция

В ходе морфометрических измерений была зарегистрирована тенденция к уменьшению размеров клеток, содержащих кальмодулин: заметно преобладание малых размеров клеток (на 6,2%) ($p < 0,01$). Средняя площадь изучаемых клеток также сокращается на $28,64 \pm 1,31\%$: у контрольных животных – $124,92 \pm 5,32$ мкм², после поступления хлорида кальция – $103,64 \pm 4,0$ мкм² ($p < 0,05$). Данные компенсаторные изменения в ответ на повышенное употребление кальция с питьевой водой происходят на фоне снижения количества средних размеров на 7,1% и крупных КМ-позитивных клеток – на 6,2% ($p < 0,01$) (Рисунок 19).

Интенсивность светопропускания всех КМ-позитивных клеток селезенки контрольной группы, в среднем, составила $0,66 \pm 0,01$ усл. ед. В экспериментальной группе крыс после поступления повышенных доз кальция происходит снижение ИСП до $0,57 \pm 0,009$ усл. ед. Адаптивные изменения на смену макроэлементного рациона наблюдаются во всех функциональных структурах селезенки в виде уменьшения ИСП на 15,2 – 23,5%. Исключение составляет центр размножения, где значимые различия отсутствуют (Таблица 8).

Сравнительная характеристика интенсивности светопропускания кальмодулин-позитивных клеток в морфо-функциональных зонах селезенки лабораторных крыс ($M \pm m$), усл. ед.

Локализация клеток	Контрольная группа	Опытная группа	Значимость различий
Периартериолярная лимфоидная муфта	$0,69 \pm 0,04$	$0,54 \pm 0,02$	$p < 0,05$
Герминативный центр	$0,60 \pm 0,03$	$0,62 \pm 0,02$	$p < 0,05$
Мантийная зона	$0,72 \pm 0,02$	$0,55 \pm 0,02$	$p < 0,03$
Маргинальная зона	$0,66 \pm 0,02$	$0,56 \pm 0,01$	$p < 0,04$
Красная пульпа	$0,65 \pm 0,02$	$0,55 \pm 0,01$	$p < 0,04$

Следовательно, плотность продукта иммуногистохимической реакции с внутриклеточным рецепторным белком кальмодулином в селезенке белых крыс активно изменяется после употребления водного раствора хлорида кальция с тенденцией к увеличению концентрации данного пептида.

Таким образом, отмечаются выраженные реактивные изменения КМ-положительных клеток селезенки опытных крыс с увеличением их общего количества, сокращением площади и повышением плотности рецепторного пептида ионов кальция в морфо-функциональных структурах органа.

3.2.4. CD4-позитивные клетки

Имуногистохимический метод трехэтапного непрямого иммуоферментного анализа с использованием первичных моноклональных антител к антигенным маркерам CD4 позволил идентифицировать CD4-позитивные клетки селезенки. Они принимают неоднородную коричневую окраску на фоне голубой лимфоидной ткани селезенки лабораторных крыс (Рисунок 20).

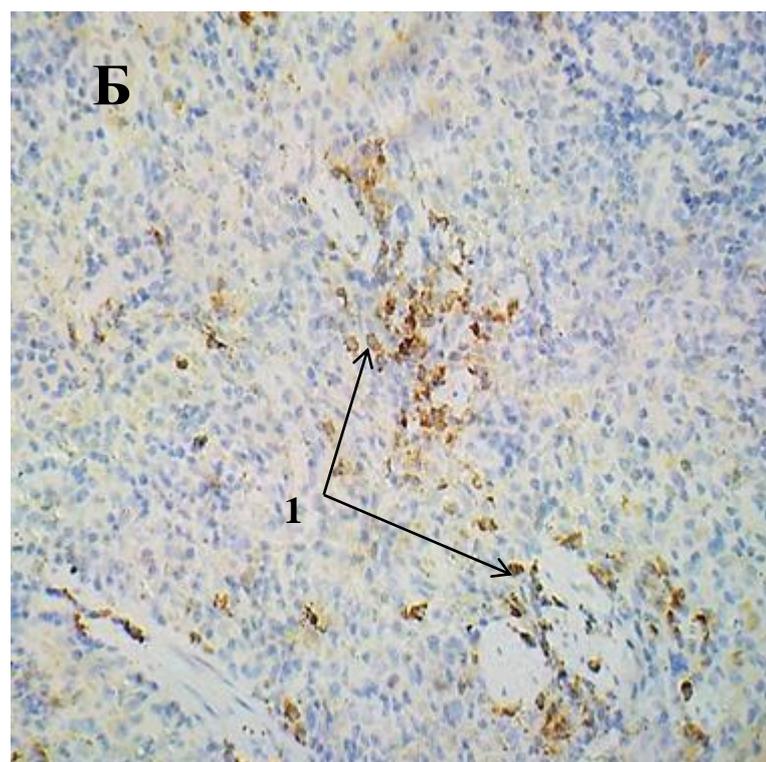
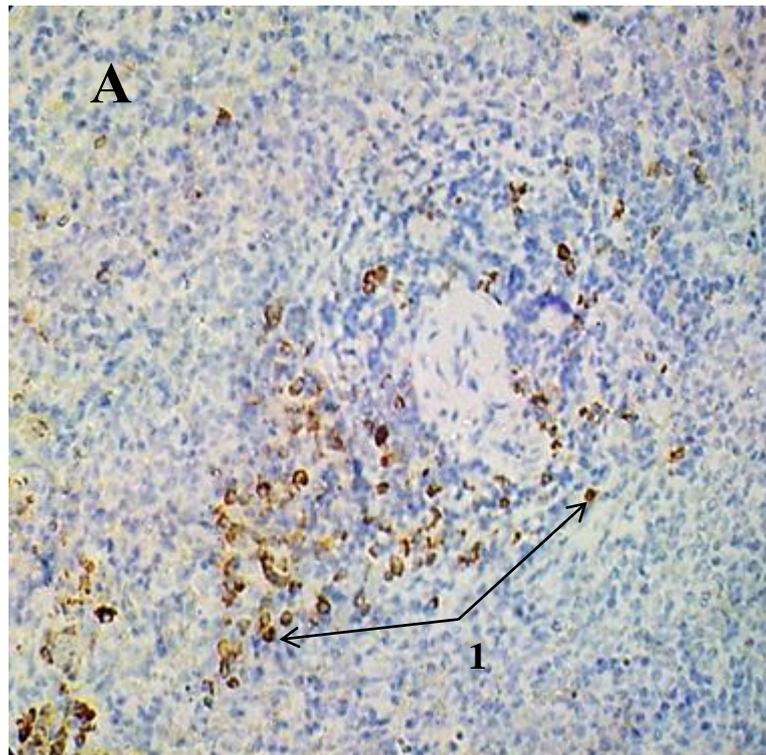


Рисунок 20. Селезенка лабораторных крыс. Иммуногистохимический метод с антителами к CD4. Микроскоп МИКМЕД-5. Об. 40. Ок. 10. А – контрольная группа. Б – опытная группа.

1 – CD4-позитивные клетки.

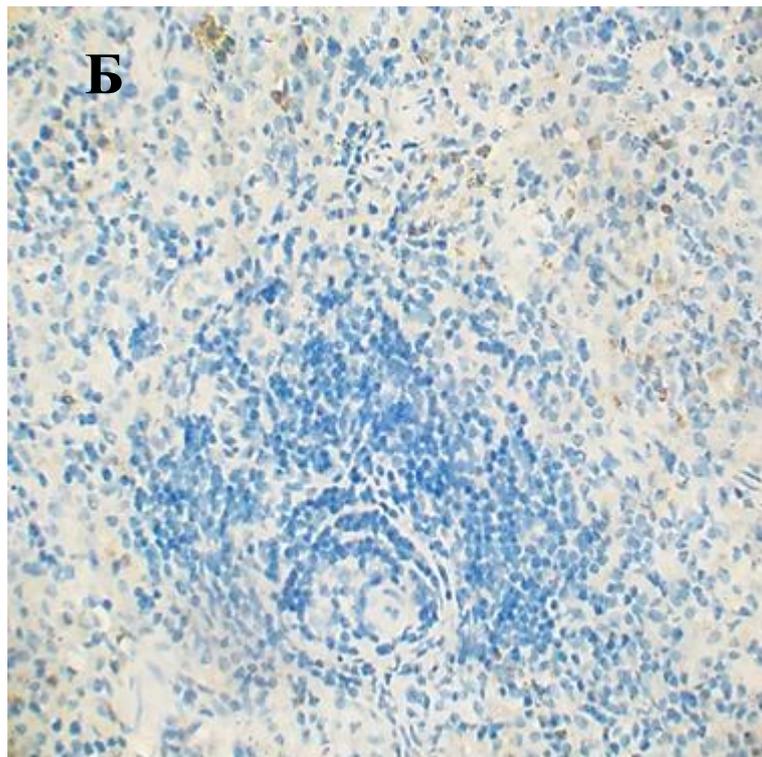
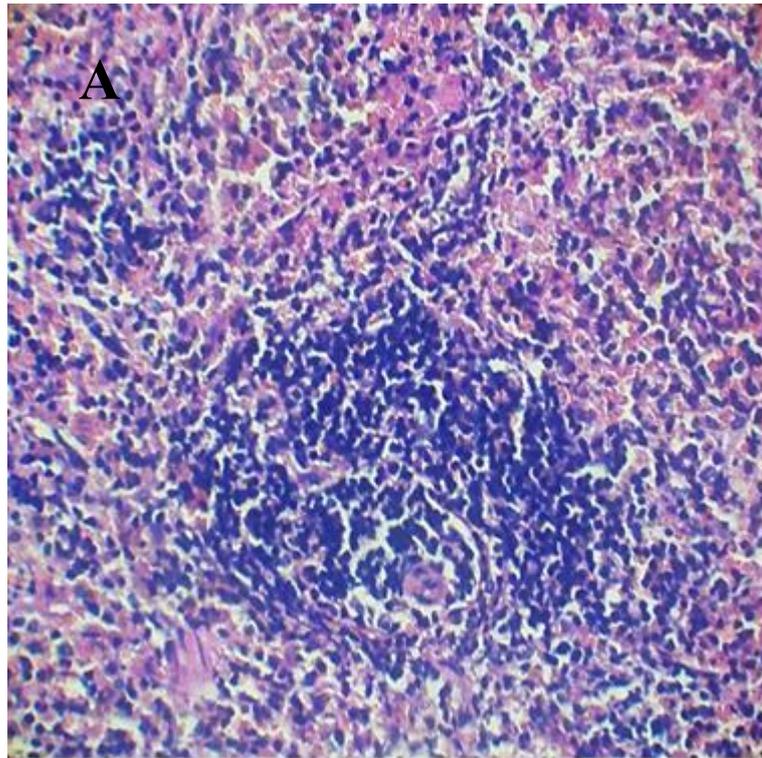


Рисунок 21. Морфологическая параллель. Селезенка крыс контрольной группы.

Микроскоп МИКМЕД-5. Об. 40. Ок. 10.

А – окраска гематоксилином и эозином.

Б – иммуногистохимический метод с антителами к CD4.

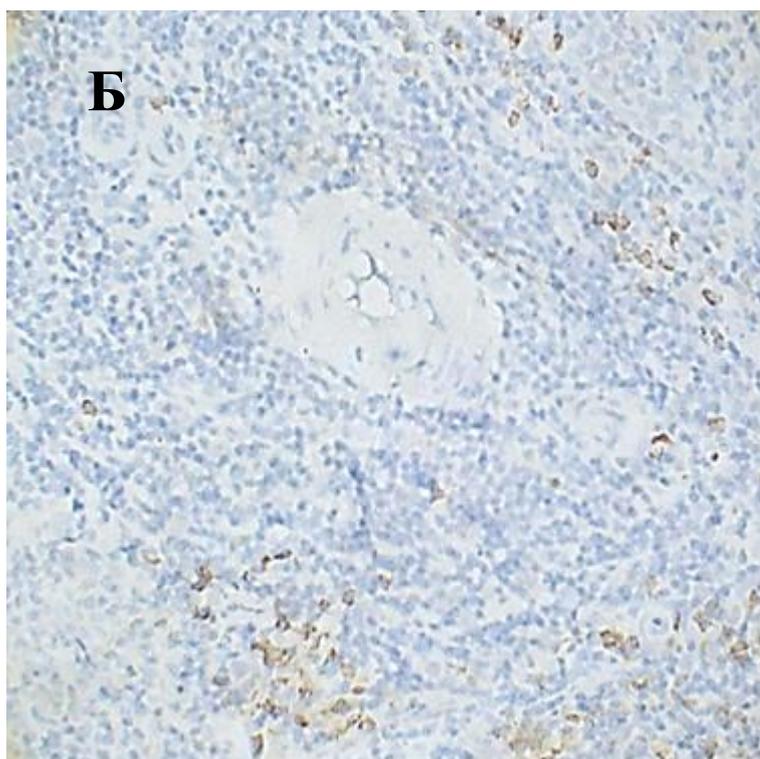
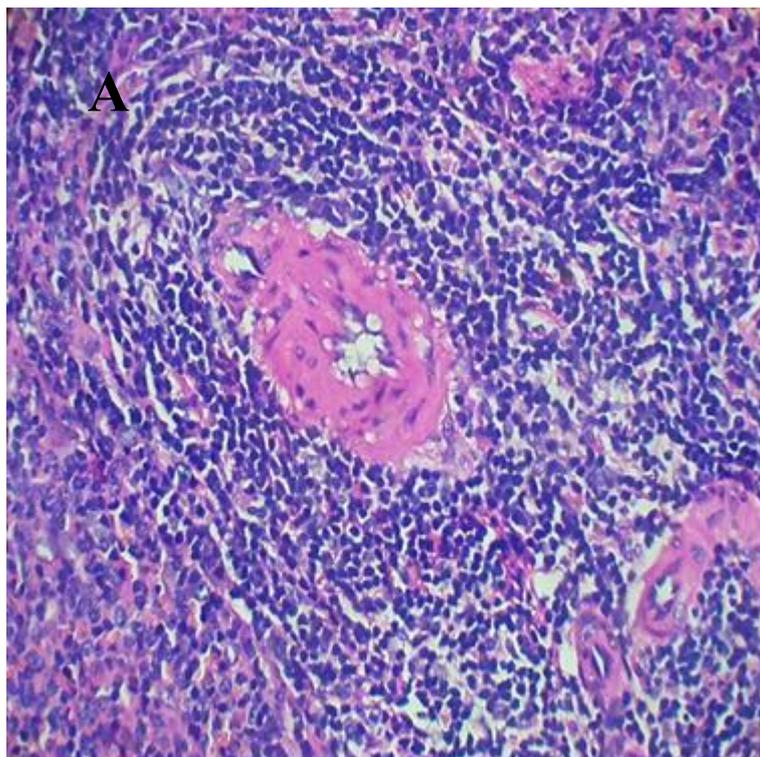


Рисунок 22. Морфологическая параллель. Селезенка крыс опытной группы.

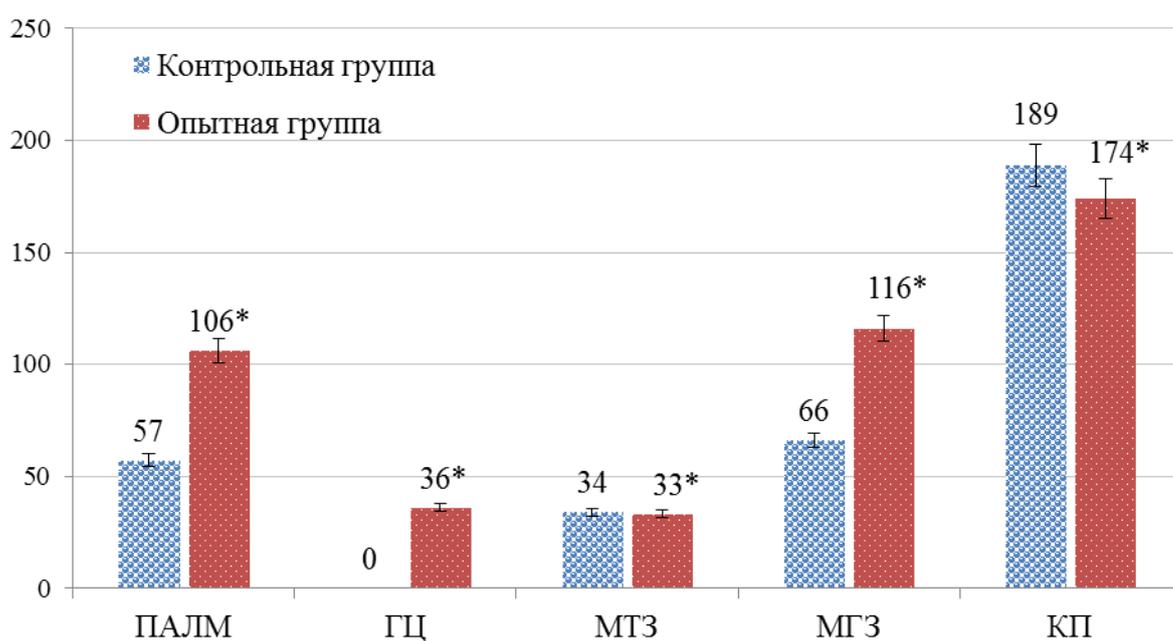
Микроскоп МИКМЕД-5. Об. 40. Ок. 10.

А – окраска гематоксилином и эозином.

Б – иммуногистохимический метод с антителами к CD4.

CD4-положительные клетки обнаруживаются во всех структурно-функциональных зонах как белой, так и красной пульпы органа. Однако в красной пульпе они встречаются значительно чаще (Рисунок 20).

Уровень экспрессии CD4 в клетках селезенки крыс, употреблявших чистую питьевую воду, равен $12,53 \pm 0,57\%$. После воздействия водного раствора хлорида кальция у опытных животных экспрессия маркеров Т-хелперов увеличилась на $4,69 \pm 1,11\%$ и составила $15,93 \pm 0,36\%$ ($p < 0,04$).



* Различия с контрольной группой статистически значимы: $p < 0,05$

Рисунок 23. Количество CD4-положительных клеток в морфо-функциональных зонах селезенки крыс на единицу площади ($M \pm m$), шт./мм²

Анализ морфологических параллелей позволил выявить локализацию CD4-положительных клеток селезенки экспериментальных животных относительно их расположения в структурно-функциональных зонах селезенки (Рисунок 21, 22). Так, количество CD4-положительных клеток варьирует в морфо-функциональных зонах органа: от полного отсутствия в герминативных центрах лимфоидных узелков контрольных животных до $189,45 \pm 7,35$ клеток/мм² в красной пульпе этой же

группы ($p < 0,05$) (Рисунок 23). Более половины изучаемых клеток зафиксировано в красной пульпе органа обеих исследуемых групп: контрольная группа – 54,6%, опытная группа – 37,4% ($p < 0,02$). Значительное количество клеток с Т-хелперной активностью выявляется в области периаартериолярной лимфоидной муфты (16,2%), которая функционально относится в Т-зависимой зоне, и вдоль маргинальных синусов (19,0%) селезенки контрольных животных (Рисунок 23).

В ответ на употребление соединения кальция с питьевой водой наблюдается увеличение количества CD4-позитивных клеток в белой пульпе селезенки: вокруг центральной артериолы (Т-зависимая зона) – на 6,5%, в маргинальной зоне – на 5,9% ($p < 0,05$). Отличительной особенностью срезов селезенки опытных крыс является наличие клеток с экспрессией CD4 в герминативных центрах (7,8%) ($p < 0,005$) при их отсутствии в контрольной группе. Происходит уменьшение количества CD4-реактивных клеток в красной пульпе органа опытных животных на 17,2% ($p < 0,02$) (Рисунок 23).

Таблица 9

Корреляционный анализ количества CD4-позитивных клеток в морфо-функциональных зонах селезенки крыс контрольной группы (r)

Микроструктуры селезенки	ПАЛМ	ГЦ	МТЗ	МГЗ	КП
ПАЛМ	–	0	0,14 **	0,19 **	0,39 **
ГЦ	0	–	0	0	0
МТЗ	0,14 **	0	–	0,05 **	- 0,24 *
МГЗ	0,19 **	0	0,05 **	–	- 0,14 **
КП	0,39 **	0	- 0,24 *	- 0,14 **	–

Обозначения. Жирным шрифтом выделены корреляционные связи средней силы ($r = 0,3–0,7$).

Корреляционный индекс статистически достоверен: * – $p < 0,01$; ** – $p < 0,04$.

Корреляционный анализ количественного распределения Т-хелперов в морфо-функциональных зонах селезенки контрольной группы выявил наибольшую взаимосвязь с одновременными изменениями между числом CD4-положительных

клеток в красной пульпе и зоне периартериолярной лимфоидной муфты ($r = 0,39$) (Таблица 9).

Таблица 10

Корреляционный анализ количества CD4-позитивных клеток в морфо-функциональных зонах селезенки крыс опытной группы (r)

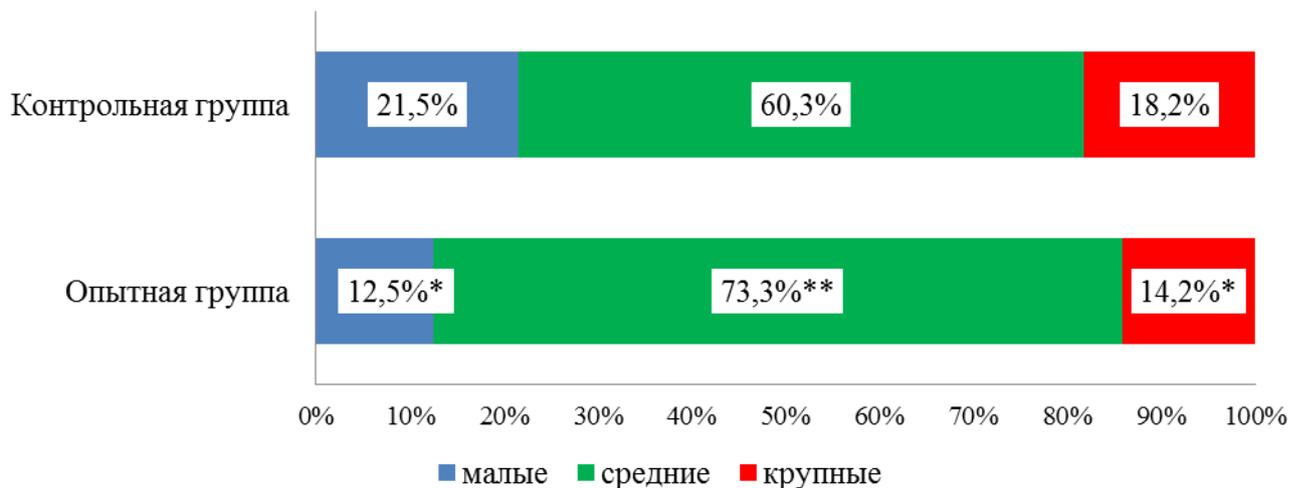
Микроструктуры селезенки	ПАЛМ	ГЦ	МТЗ	МГЗ	КП
ПАЛМ	–	0,41 **	0,01 **	0,5 *	- 0,1 **
ГЦ	0,41 **	–	- 0,27 *	0,41 **	- 0,02 **
МТЗ	0,01 **	- 0,27 *	–	- 0,32 *	0,35 *
МГЗ	0,5 *	0,41 **	- 0,32 *	–	- 0,26 *
КП	- 0,1 **	- 0,02 **	0,35 *	- 0,26 *	–

Обозначения. Жирным шрифтом выделены корреляционные связи средней силы ($r = 0,3-0,7$).

Корреляционный индекс статистически достоверен: * – $p < 0,01$; ** – $p < 0,04$.

После употребления питьевой воды, насыщенной хлоридом кальция, обнаруживаются тесные однонаправленные взаимосвязи клеточного состава маргинальной зоны с: ПАЛМ ($r = 0,5$), герминативным центром ($r = 0,41$), а также герминативного центра и ПАЛМ ($r = 0,41$), мантийной зоны и красной пульпы ($r = 0,35$). Выявлены разнонаправленные количественные изменения CD4-позитивных клеток в мантийной и маргинальной зонах селезенки опытных крыс ($r = - 0,35$) (Таблица 10).

Средняя площадь CD4-иммунореактивных клеток селезенки контрольных крыс равна $76,9 \pm 3,52$ мкм². У крыс после регулярного употребления соединения кальция средние показатели размеров изучаемых клеток остаются стабильны – $78,0 \pm 2,09$ мкм² ($p < 0,05$).



Морфометрические границы площади CD4-позитивных клеток селезенки: малые – 10,2 – 44,5 мкм², средние – 44,6 – 110,3 мкм², крупные – 110,4 – 199,2 мкм².

Различия с контрольной группой статистически значимы: * – $p < 0,01$, ** – $p < 0,04$.

Рисунок 24. Распределение по площади CD4-позитивных клеток селезенки контрольных лабораторных крыс и после употребления соединения кальция

Большая доля клеток селезенки контрольной группы, экспрессирующих CD4, имеют средние размеры (44,6 – 110,3 мкм²) (Рисунок 24). На фоне обогащения питьевой воды кальцием этот показатель увеличивается на 13,0% ($p < 0,04$) при сокращении числа малых и крупных клеток с Т-хелперной активностью на 9,0% и 4,0% соответственно ($p < 0,01$).

Таким образом, хлорид кальция оказывает иммуномодулирующее действие на CD4-позитивную популяцию лимфоцитов селезенки с преимущественно Т-хелперной активностью. Отмечается увеличение концентрации CD4-позитивных клеток селезенки в функциональных зонах белой пульпы: вокруг центральной артериолы и маргинальной зоне, а также преобладание клеток с экспрессией CD4 в средних морфометрических пределах.

3.2.5. CD8-позитивные клетки

Для морфологического исследования клеток селезенки лабораторных крыс, экспрессирующих на своей мембране маркер цитотоксических Т-лимфоцитов, проведена иммуногистохимическая реакция с моноклональными антителами к CD8. В результате этого CD8-позитивные клетки селезенки приобретают коричневую окраску цитоплазматических мембран, которые хорошо контрастируются на голубом негативном фоне (Рисунок 25). Обращает на себя внимание, что клетки селезенки крыс, экспрессирующие CD8, имеют различную морфологию. При большом увеличении микроскопа выявляется неоднородное расположение продукта иммуногистохимической реакции в иммунокомпетентных клетках от светло до темно-коричневого цвета.

CD8-положительные клетки селезенки лабораторных крыс располагаются большими группами по 20–40 штук, концентрируясь вокруг пульпарных артерий, маргинальных синусов и соединительнотканых трабекул с одноименными сосудами. Обобщая локализацию цитотоксических Т-лимфоцитов обеих экспериментальных групп, можно ее определить, как сопровождающую всю богатую сосудистую сеть органа, кроме центральных артериол внутри лимфоидных узелков. Внутри компонентов белой пульпы CD8⁺ клетки встречаются единично, однако в маргинальной зоне исследуемые клетки плотно располагаются вдоль маргинального синуса.

Уровень экспрессии CD8 на мембранах клеток селезенки крыс контрольной группы составил $10,44 \pm 0,48\%$. После воздействия водного раствора хлорида кальция у опытных животных экспрессия маркеров цитотоксических Т-лимфоцитов увеличилась на $1,63 \pm 0,57\%$ и равна $11,4 \pm 0,22\%$ ($p < 0,007$).

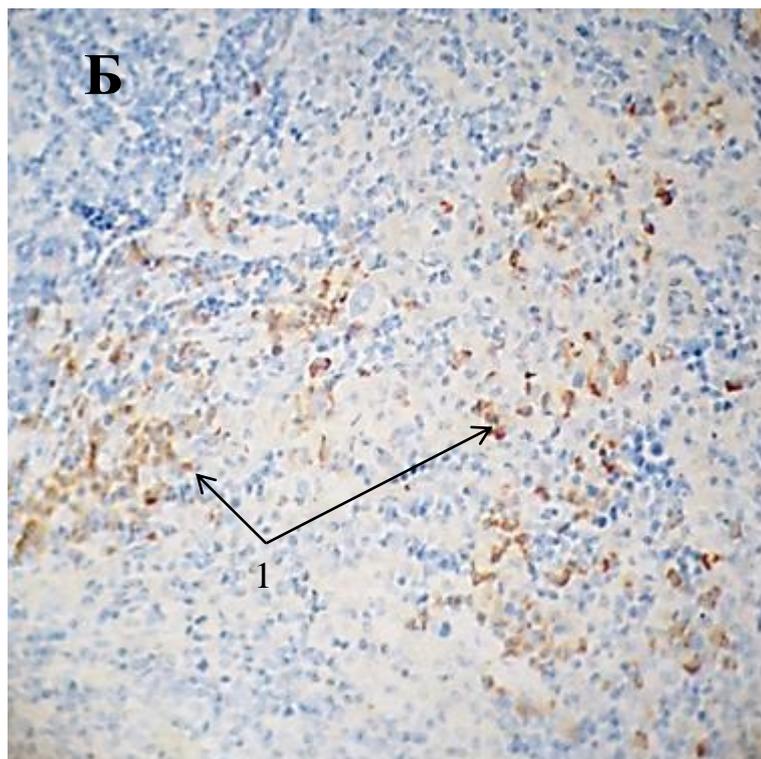
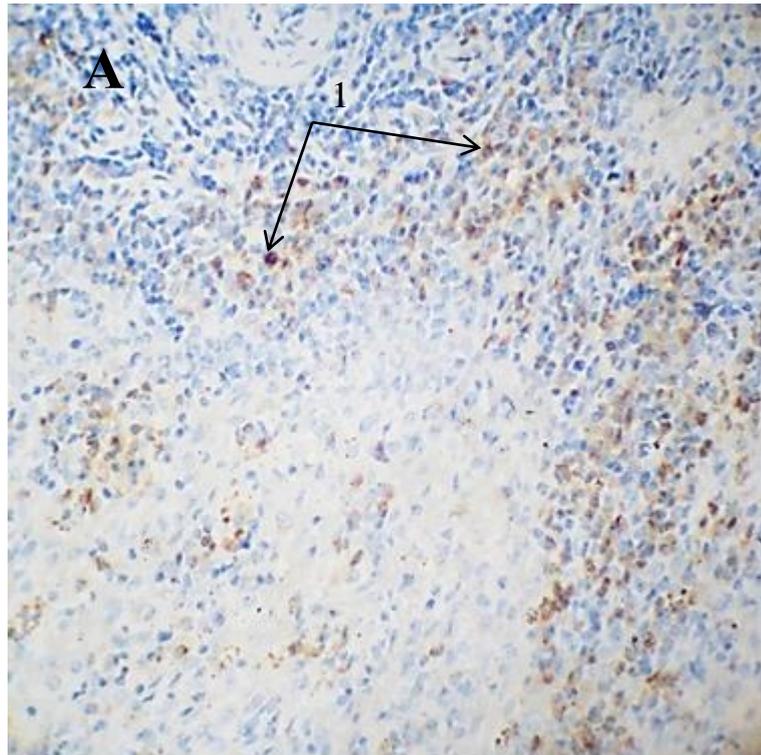
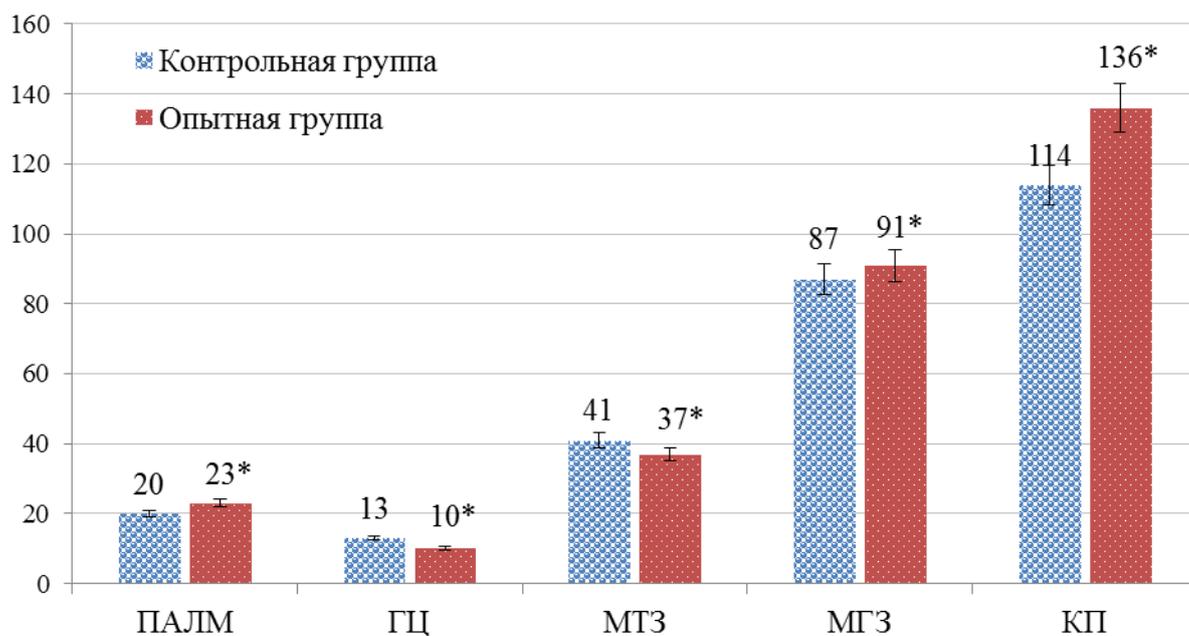


Рисунок 25. Селезенка лабораторных крыс. Иммуногистохимический метод с антителами к CD8. Микроскоп МИКМЕД-5. Об. 40. Ок. 10. А – контрольная группа. Б – опытная группа.

1 – CD8-позитивные клетки.

Количество цитотоксических Т-лимфоцитов находится в пределах от $20,0 \pm 1,52$ клеток/мм² до $136,95 \pm 4,0$ клеток/мм² в зависимости от их локализации в морфо-функциональных зонах селезенки обеих групп животных ($p < 0,05$) (Рисунок 26).



* Различия с контрольной группой статистически значимы: $p < 0,05$

Рисунок 26. Количество CD8-позитивных клеток в морфо-функциональных зонах селезенки крыс на единицу площади ($M \pm m$), шт./мм².

В результате морфометрического анализа выявлена основная локализация CD8-положительных клеток в красной пульпе селезенки крыс. Так, практически половина всех выявленных цитотоксических Т-лимфоцитов располагается в данной функциональной зоне: в контрольной группе – 41,3%, в опытной группе – 45,9% ($p < 0,004$). Т-лимфоциты с цитотоксической активностью часто располагаются в маргинальной зоне лимфоидных узелков, вдоль одноименных синусов селезенки: в контрольной группе – 31,7%, в опытной группе – 30,6% от всех выявленных клеток с CD8 на поверхности ($p < 0,04$) (Рисунок 26).

После употребления питьевой воды, обогащенной кальцием, наблюдаются незначительные количественные вариации в морфо-функциональных зонах селезенки с преимущественным увеличением количества изучаемых клеток в красной пульпе (на 4,6%) и сокращением их числа в мантийной зоне (на 2,6%) ($p < 0,05$) (Рисунок 26).

Таблица 11

Корреляционный анализ количества CD8-позитивных клеток в морфо-функциональных зонах селезенки крыс контрольной группы (r)

Микроструктуры селезенки	ПАЛМ	ГЦ	МТЗ	МГЗ	КП
ПАЛМ	–	0,26 *	- 0,28 *	- 0,14 **	0,28 *
ГЦ	0,26 *	–	0,29 *	0,08 **	0,6 *
МТЗ	- 0,28 *	0,29 *	–	- 0,06 **	0,03 **
МГЗ	- 0,14 **	0,08 **	- 0,06 **	–	- 0,07 **
КП	0,28 *	0,6 *	0,03 **	- 0,07 **	–

Обозначения. Жирным шрифтом выделены корреляционные связи средней силы ($r = 0,3-0,7$).

Корреляционный индекс статистически достоверен: * – $p < 0,01$; ** – $p < 0,04$.

Таблица 12

Корреляционный анализ количества CD8-позитивных клеток в морфо-функциональных зонах селезенки крыс опытной группы (r)

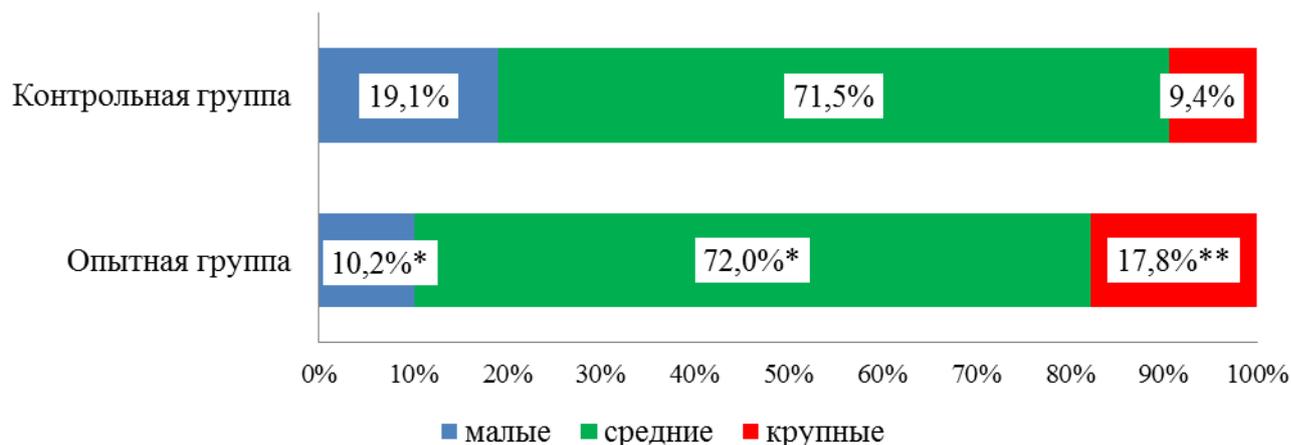
Микроструктуры селезенки	ПАЛМ	ГЦ	МТЗ	МГЗ	КП
ПАЛМ	–	- 0,23 *	- 0,3 *	0,13 **	- 0,32 *
ГЦ	- 0,23 *	–	0,05 **	0,03 **	- 0,34 *
МТЗ	- 0,3 *	0,05 **	–	0,06 **	- 0,04 **
МГЗ	0,13 **	0,03 **	0,06 **	–	- 0,35 *
КП	- 0,32 *	- 0,34 *	- 0,04 **	- 0,35 *	–

Обозначения. Жирным шрифтом выделены корреляционные связи средней силы ($r = 0,3-0,7$).

Корреляционный индекс статистически достоверен: * – $p < 0,01$; ** – $p < 0,03$.

Анализ корреляционных индексов выявил слабую взаимосвязь количества CD8-позитивных клеток между всеми структурами селезенки контрольной группы (Таблица 11). Исключение составляет корреляционная пара герминативный центр – красная пульпа, в которой присутствует средняя положительная взаимосвязь прироста средних показателей количества цитотоксических Т-лимфоцитов ($r = 0,6$).

На фоне употребления соединения кальция с питьевой водой наблюдается разрыв существующих взаимосвязей, в результате чего корреляционные индексы сменяют направленность на противоположную (Таблица 12). Выявляется отрицательная корреляция средней интенсивности количества CD8-позитивных клеток красной пульпы с функциональными зонами белой пульпы: периартериолярной лимфоидной муфтой ($r = - 0,32$), герминативным центром ($r = - 0,34$), маргинальной зоной ($r = - 0,35$), а также внутри лимфоидного узелка в паре ПАЛМ – мантейная зона ($r = - 0,3$). Эти показатели отражают разнонаправленные изменения количества цитотоксических Т-лимфоцитов внутри структурных зон селезенки опытных крыс.



Морфометрические границы площади CD8-позитивных клеток селезенки: малые – 13,0 – 35,7 мкм², средние – 35,8 – 99,5 мкм², крупные – 99,6 – 201,2 мкм².

Различия с контрольной группой статистически значимы: * – $p < 0,01$, ** – $p < 0,02$.

Рисунок 27. Распределение по площади CD8-позитивных клеток селезенки контрольных лабораторных крыс и после употребления соединения кальция

Морфометрический анализ выявил увеличение средней площади клеток селезенки, экспрессирующих маркер CD8, на $15,43 \pm 0,81\%$: контрольная группа – $61,37 \pm 2,15 \text{ мкм}^2$, опытная группа после длительного употребления хлорида кальция – $74,02 \pm 2,22 \text{ мкм}^2$ ($p < 0,03$). Отмечается повышение доли CD8-позитивных клеток селезенки с крупными размерами на $8,4\%$ ($p < 0,02$) (Рисунок 27). Однако практически $\frac{3}{4}$ доли всех идентифицированных CD8-иммунореактивных клеток обеих групп животных имеют средние размеры ($35,8 - 99,5 \text{ мкм}^2$) ($p < 0,01$).

Таким образом, выявлено, что клетки, экспрессирующие CD8, селезенки крыс реагируют на повышение концентрации кальция в периферической крови увеличением площади и количества в морфо-функциональных зонах органа, с преимущественной локализацией вокруг пульпарных артерий и маргинальных синусов. Данные изменения наблюдаются на фоне разрыва существующих корреляционных взаимосвязей количества исследуемых клеток со сменой корреляционных индексов на противоположные.

3.2.6. CD20-позитивные клетки

Для анализа состояния гуморального звена иммунитета и последующего выявления В-лимфоцитов селезенки в гистологических структурах органа обеих групп крыс проведена иммуногистохимическая реакция трехэтапного непрямого иммуноферментного анализа с использованием первичных моноклональных антител к антигенным маркерам CD20. Данный метод позволил идентифицировать В-лимфоциты, экспрессирующие CD20, которые приобретают коричневое окрашивание (Рисунок 28). Продукт иммуногистохимической реакции имеет мембранную локализацию и расположен неоднородно с участками окраски различной интенсивности от светло-коричневого до темно-коричневого оттенка. CD20-негативные структуры имеют голубой цвет и, тем самым, создают контрастный фон.

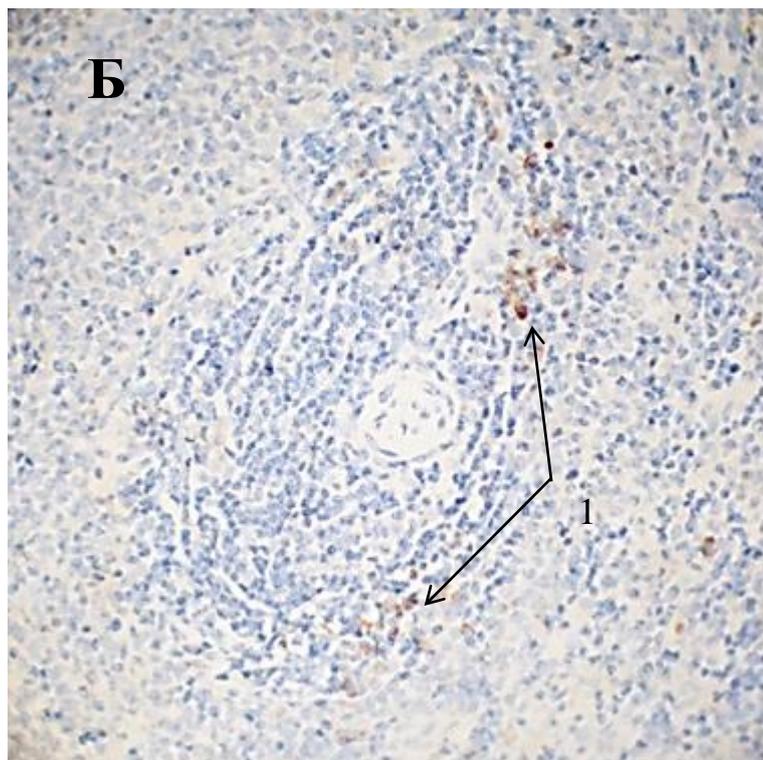
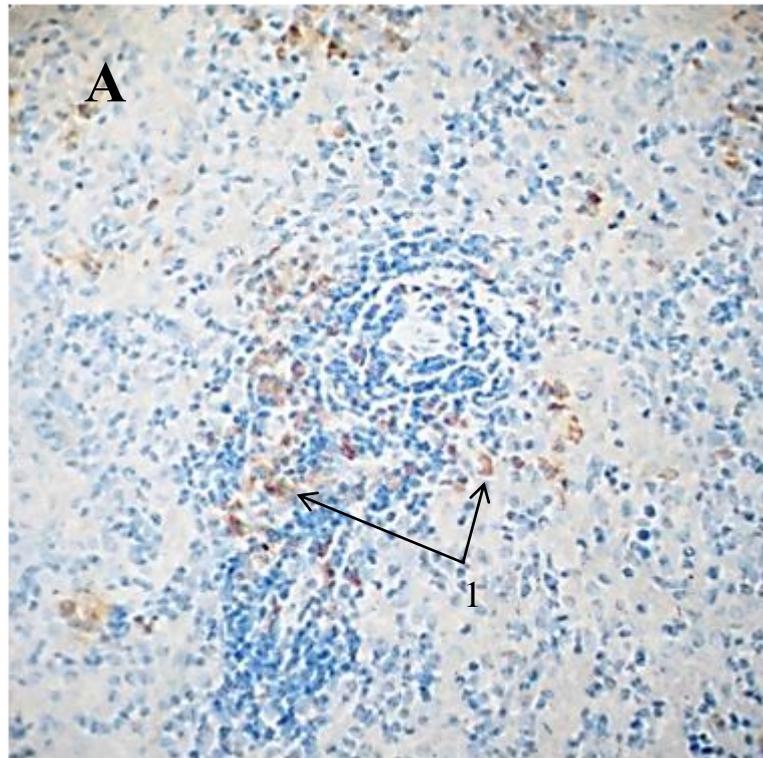


Рисунок 28. Селезенка лабораторных крыс. Иммуногистохимический метод с антителами к CD20. Микроскоп МИКМЕД-5. Об. 40. Ок. 10. А – контрольная группа. Б – опытная группа.

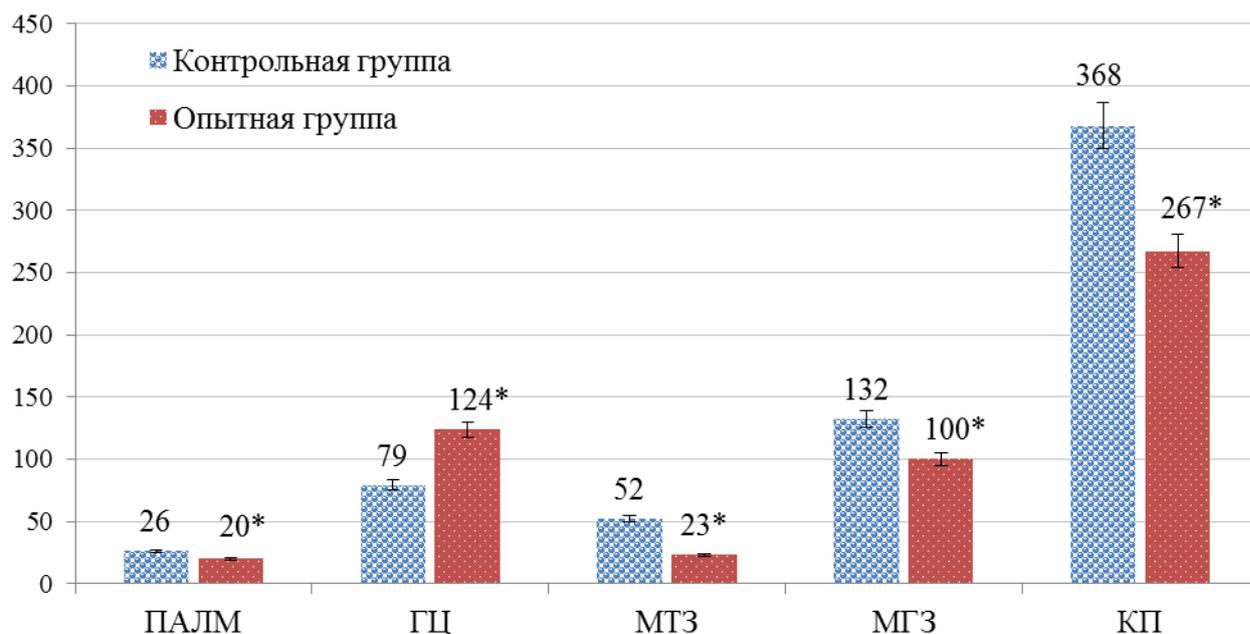
1 – CD20-позитивные клетки

В-лимфоциты располагаются крупными скоплениями по 20–50 клеток и обнаруживаются во всех морфо-функциональных зонах органа. При морфологическом анализе CD20-положительных клеток селезенки крыс выявляется гетерогенность популяции. Максимальная экспрессия CD20 наблюдается на мембранах клеток красной пульпы селезенки – вдоль пульпарных артерий и эллипсоидных капилляров, а также в белой пульпе вдоль маргинальных синусов. В отличие от CD4- и CD8-положительных клеток, В-лимфоциты часто обнаруживаются в герминативных центрах лимфоидных узелков обеих групп животных. Маркер CD20 экспрессируют клетки центра размножения, находящиеся как на периферии, на границе с мантийной зоной, так и с диффузным расположением внутри данной структуры.

В первичных лимфоидных узелках CD20-положительные В-лимфоциты располагаются в мантийной и маргинальной зонах и крайне редко в периартериолярных лимфоидных муфтах. Обращают на себя внимание В-лимфоцитарные скопления вокруг первичных ЛУ селезенки крыс опытной группы, в отличие от животных, употреблявших чистую питьевую воду (Рисунок 28).

В срезах селезенки крыс, употреблявших чистую питьевую воду, $24,36 \pm 1,26\%$ клеток экспрессируют на своей поверхности маркер В-лимфоцитов. На фоне повышения концентрации кальция в периферической крови происходит сокращение данного показателя на $19,29 \pm 4,93\%$ и составляет $18,93 \pm 0,83\%$ ($p < 0,005$).

Около половины всех выявленных В-лимфоцитов селезенки располагаются в красной пульпе, преимущественно вокруг просветов ее богатой сосудистой сети: в контрольной группе – $56,2\%$, в опытной группе – $49,9\%$ ($p < 0,05$). При употреблении хлорида кальция с питьевой водой происходит количественное перераспределение CD20-позитивных клеток с увеличением их количества в герминативных центрах на $10,9\%$ ($p < 0,05$) и сокращением на $0,4–6,3\%$ – в остальных функциональных зонах селезенки ($p < 0,05$) (Рисунок 29).



* Различия с контрольной группой статистически значимы: $p < 0,05$

Рисунок 29. Количество CD20-позитивных клеток в морфо-функциональных зонах селезенки крыс на единицу площади ($M \pm m$), шт./мм².

Таблица 13

Корреляционный анализ количества CD20-позитивных клеток в морфо-функциональных зонах селезенки крыс контрольной группы (r)

Микроструктуры селезенки	ПАЛМ	ГЦ	МТЗ	МГЗ	КП
ПАЛМ	–	- 0,35 **	- 0,07 **	0,48 *	0,05 **
ГЦ	- 0,35 **	–	- 0,24 *	- 0,15 **	0,35 *
МТЗ	- 0,07 **	- 0,24 *	–	0,28 *	- 0,09 **
МГЗ	0,48 *	- 0,15 **	0,28 *	–	0,16 **
КП	0,05 **	0,35 *	- 0,09 **	0,16 **	–

Обозначения. Жирным шрифтом выделены корреляционные связи средней силы ($r = 0,3–0,7$).

Корреляционный индекс статистически достоверен: * – $p < 0,01$; ** – $p < 0,04$.

В результате корреляционного анализа количественного распределения CD20-позитивных клеток селезенки крыс контрольной группы выявлены тесные корреляционные взаимосвязи положительной направленности между ПАЛМ и маргинальной зоной ($r = 0,48$) и герминативным центром и красной пульпой органа ($r = 0,35$) (Таблица 13). Отмечаются разнонаправленные изменения количества В-лимфоцитов в герминативном центре и периартериолярной лимфоидной муфте ($r = - 0,35$).

Таблица 14

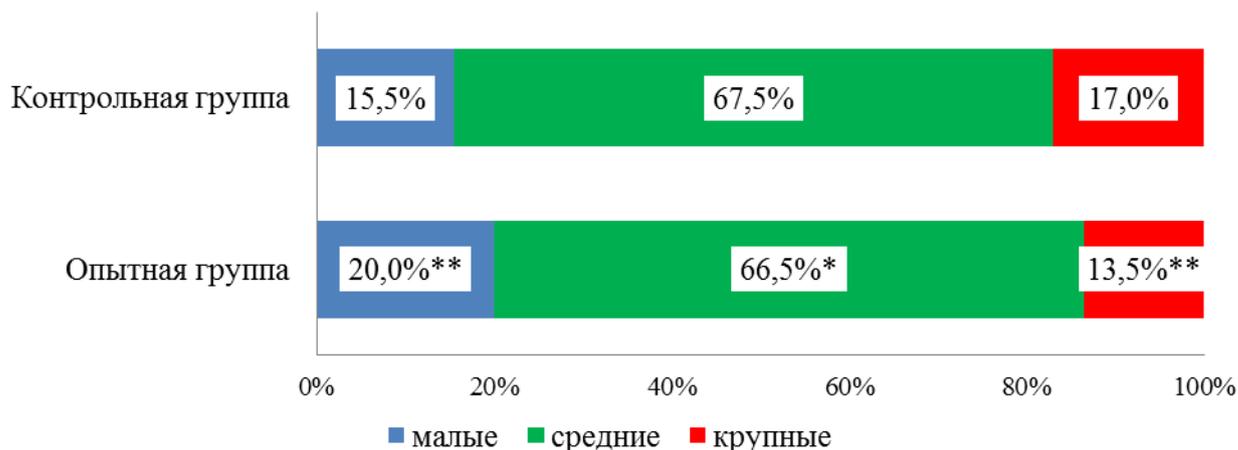
Корреляционный анализ количества CD20-позитивных клеток в морфо-функциональных зонах селезенки крыс опытной группы (r)

Микроструктуры селезенки	ПАЛМ	ГЦ	МТЗ	МГЗ	КП
ПАЛМ	–	- 0,15 **	0,28 *	- 0,09 **	- 0,26 *
ГЦ	- 0,15 **	–	- 0,2 *	0,14 **	- 0,35 *
МТЗ	0,28 *	- 0,2 *	–	- 0,17 **	- 0,03 **
МГЗ	- 0,09 **	0,14 **	- 0,17 **	–	- 0,02 **
КП	- 0,26 *	- 0,35 *	- 0,03 **	- 0,02 **	–

Обозначения. Жирным шрифтом выделены корреляционные связи средней силы ($r = 0,3-0,7$).

Корреляционный индекс статистически достоверен: * – $p < 0,01$; ** – $p < 0,04$.

После обогащения питьевого рациона кальцием практически во всех корреляционных парах функциональных зон селезенки происходит изменение направленности и разрыв существующих взаимосвязей изменения количества В-лимфоцитов (Таблица 14). Все корреляционные взаимоотношения либо отсутствуют, либо имеют слабую силу. Исключение составляет пара герминативный центр – красная пульпа с взаимосвязью количества CD20-положительных клеток в этих структурах средней силы, как и в контрольной группе, однако на фоне эксперимента происходит смена направленности индекса корреляции с прямого на обратный ($r = - 0,35$).



Морфометрические границы площади CD20-позитивных клеток селезенки: малые – $11,5 - 40,2 \text{ мкм}^2$, средние – $40,3 - 99,5 \text{ мкм}^2$, крупные – $99,6 - 176,2 \text{ мкм}^2$.

Различия с контрольной группой статистически значимы: * – $p < 0,01$, ** – $p < 0,04$.

Рисунок 30. Распределение по площади CD20-позитивных клеток селезенки контрольных лабораторных крыс и после употребления соединения кальция

По результатам морфометрии площади CD20-положительных клеток селезенки отмечается уменьшение опытных показателей на $4,89 \pm 0,6\%$. Так средняя площадь клеток селезенки, экспрессирующих CD20, контрольных животных составила $72,86 \pm 2,1 \text{ мкм}^2$, а на фоне употребления соединения кальция с питьевой водой данный показатель равен $67,04 \pm 2,06 \text{ мкм}^2$ ($p < 0,04$).

Качественная конформация CD20-реактивных клеток в ответ на повышение концентрации общего кальция в крови проявляется небольшими отклонениями от контрольных значений (Рисунок 30). Так, наблюдается увеличение количества малых размеров исследуемых клеток на $4,5\%$ в опытной группе ($p < 0,04$). Наибольшее количество CD20-положительных клеток селезенки крыс обеих групп имеют среднюю площадь ($p < 0,01$).

Таким образом, выявлены морфологические различия популяций В-лимфоцитов среди животных контрольной и опытной групп. При употреблении соединения кальция с питьевой водой пул CD20-иммунореактивных клеток селезенки отвечают количественным сокращением и перераспределением цитоархи-

тектоники с увеличением числа В-лимфоцитов в герминативных центрах лимфоидных узелков. Площадь большинства исследуемых клеток находится в средних морфометрических пределах и слабо реагирует на условия эксперимента.

3.2.7. Взаимоотношения компонентов Т- и В-клеточного звена иммунитета селезенки лабораторных крыс

Ведущее значение в оценке состояния иммунитета имеет соотношение Т-хелперов, цитотоксических Т-лимфоцитов и В-лимфоцитов в периферической крови (Хаитов Р. М., 2013; Abbas A. K. et al., 2014; Coico R. et al., 2015). Однако для анализа антигензависимой пролиферации, дифференцировки Т- и В-лимфоцитов и процессов иммуногенеза организма в целом необходимо исследовать взаимоотношения клеток селезенки, экспрессирующих маркеры клеточного и гуморального звеньев иммунитета, так как от этого зависит активность иммунного ответа органа.

Иммунорегуляторный индекс (ИРИ) – количественное соотношение Т-хелперов и Т-цитотоксических клеток (CD4/CD8) (Germain R. N., 2002; Owen J. et al., 2013; Abbas A. K. et al., 2014; Coico R. et al., 2015). Исследованию подвергнуты клетки селезенки, экспрессирующие на мембране CD4 и CD8, в обеих группах животных.

Таблица 15

Уровни экспрессии CD4, CD8, CD20 и иммунорегуляторный индекс (ИРИ) селезенки контрольных лабораторных крыс и после употребления соединения кальция ($M \pm m$)

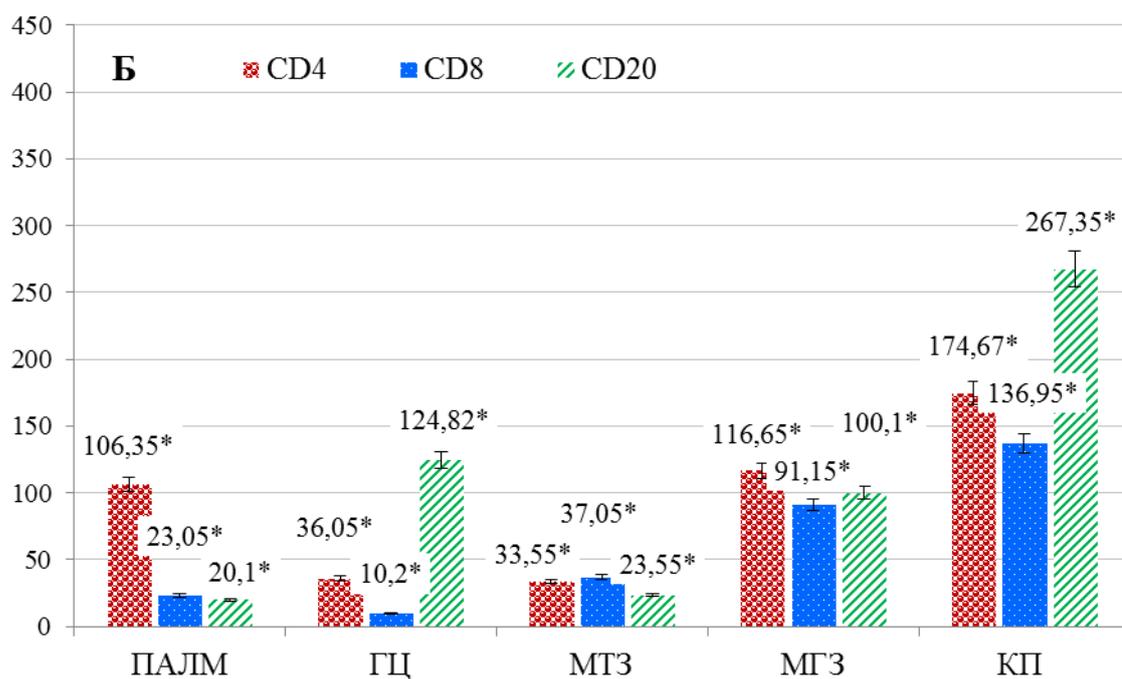
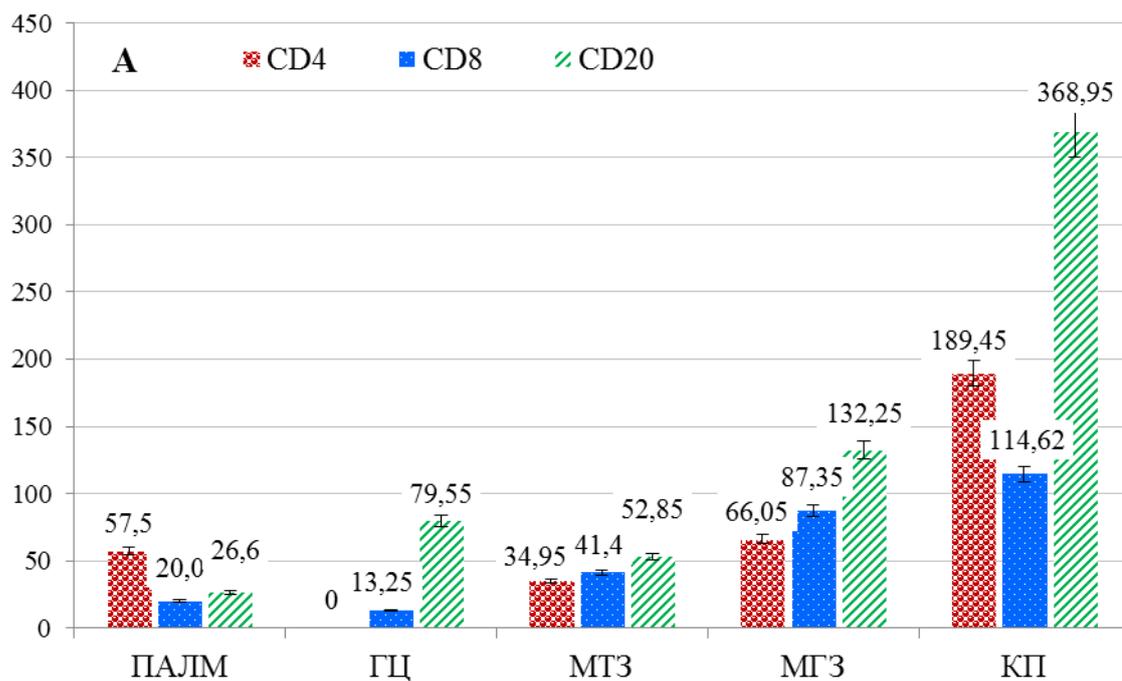
Показатели	Контрольная группа	Опытная группа	Степень и направленность изменений
Уровень экспрессии CD4	12,53 ± 0,57%	15,93 ± 0,36% ***	+ 4,69 ± 1,11%
Уровень экспрессии CD8	10,44 ± 0,48%	11,4 ± 0,22% *	+ 1,63 ± 0,57%
ИРИ (CD4/CD8)	1,28 ± 0,03	1,43 ± 0,06 **	+ 10,46 ± 4,27%
Уровень экспрессии CD20	24,36 ± 1,26%	18,93 ± 0,83%***	- 19,29 ± 4,93%

Различия с контрольной группой статистически значимы: * – $p < 0,007$, ** – $p < 0,03$, *** – $p < 0,04$.

Уровень экспрессии маркеров Т-хелперов более активно отвечает на экспериментальные условия с увеличением уровня экспрессии CD4-позитивных клеток селезенки на $4,69 \pm 1,11\%$ ($p < 0,04$). Цитотоксические Т-лимфоциты органа под влиянием соединения кальция увеличивают экспрессию в пределах $1,63 \pm 0,57\%$ ($p < 0,007$) (Таблица 15). Как следствие, на фоне употребления соединения кальция происходит индукция клеточного иммунитета селезенки с повышением иммунорегуляторного индекса на $10,46 \pm 4,27\%$ ($p < 0,03$).

Сравнительный анализ количества клеток с экспрессией маркеров клеточного ($CD4^+$, $CD8^+$) и гуморального ($CD20^+$) звеньев иммунитета выявил, что практически во всех функциональных зонах селезенки крыс контрольной группы преобладает число В-лимфоцитов с максимальной их локализацией в красной пульпе органа (Рисунок 31, 33). Исключение составляет периартериолярная лимфоидная муфта, где локализуется наибольшее количество лимфоцитов с Т-хелперной активностью, которые более чем в два раза превышают число В-лимфоцитов в данной зоне. В герминативном центре наблюдается противоположная картина с преимущественно В-лимфоцитарной локализацией. Маргинальная зона, особенно вокруг одноименного синуса, имеет богатую лимфоцитарную обеспеченность с преобладанием гуморальных CD20-позитивных компонентов. В мантийной зоне локализуются относительно равное количество клеток гуморального и клеточного звена иммунного ответа.

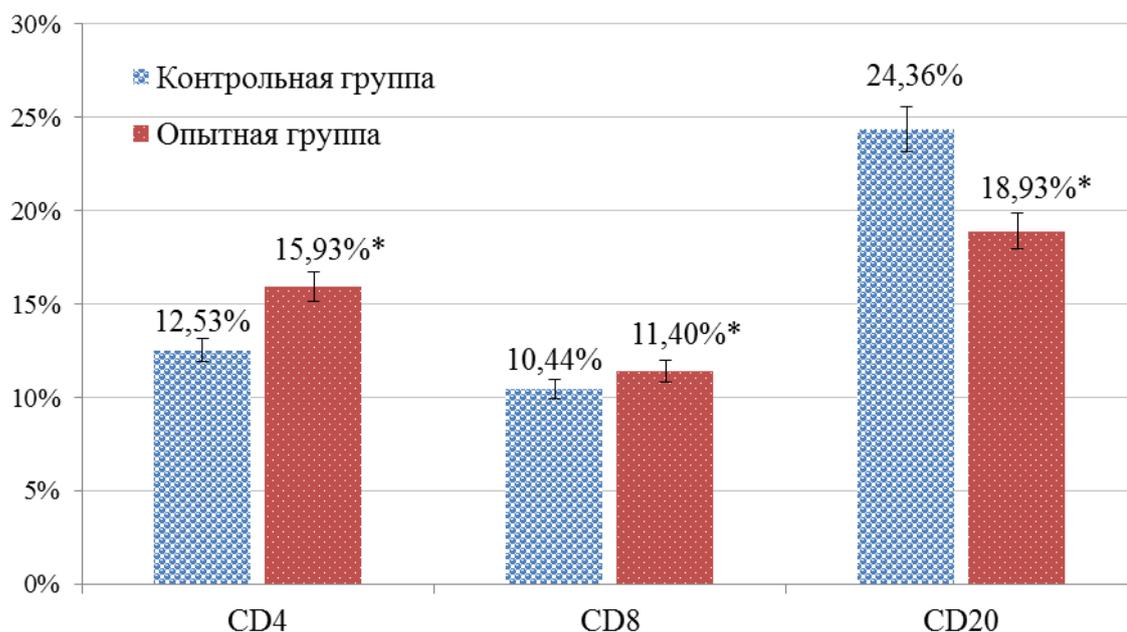
Употребление хлорида кальция с питьевой водой сопровождается количественными изменениями иммунокомпетентных клеток селезенки (Рисунок 31). В периартериолярной лимфоидной муфте лимфоидных узелков наблюдается увеличение количества Т-хелперов в 1,84 раза при относительно стабильном количестве цитотоксических Т-лимфоцитов и В-лимфоцитов. Также отмечается превышение числа Т-хелперов в 2,16 раз в данной зоне контрольных животных, относительно В-лимфоцитарного пула, а на фоне эксперимента эти различия достигают 5,28 раз ($p < 0,05$).



* Различия с контрольной группой статистически значимы: $p < 0,05$

Рисунок 31. Соотношение количества CD4-, CD8-, CD20-позитивных клеток селезенки в морфо-функциональных зонах селезенки лабораторных крыс на единицу площади ($M \pm m$), шт./мм². А – контрольная группа. Б – опытная группа.

В герминативных центрах лимфоидных узлов селезенки наблюдается увеличение числа CD20-позитивных клеток в 1,54 раза ($p < 0,05$), а в мантийной зоне – их сокращение в 2,24 раза ($p < 0,05$).



* Различия с контрольной группой статистически значимы: $p < 0,05$

Рисунок 32. Соотношение показателей уровня экспрессии компонентов клеточного (CD4, CD8) и гуморального (CD20) звеньев иммунного ответа в функциональных зонах селезенки контрольных лабораторных крыс и после употребления соединения кальция ($M \pm m$), %

В структурах селезенки обеих групп животных преобладает экспрессия CD20 – маркера В-лимфоцитов, однако на фоне употребления соединения кальция с питьевой водой происходит ее снижение на $19,29 \pm 4,93\%$ ($p < 0,05$) (Рисунок 32). А компоненты клеточного звена иммунитета реагируют повышением показателей экспрессии на мембранах CD4- и CD8-позитивных клеток селезенки опытных крыс.

При сравнительном морфологическом анализе иммунореактивных структур селезенки крыс обращает на себя внимание CD4-, CD8-, CD20- позитивные клет-

ки имеют тесную связь локализации с богатой сосудистой сетью органа, располагаясь вдоль маргинальных синусов лимфоидных узелков, эллипсоидных капилляров и пульпарных артерий. При большем увеличении микроскопа отмечается, что данные кластеры дифференцировки лимфоцитов несут на своей мембране различные клетки селезенки и не обнаруживаются их коэкспрессия на поверхности одной клетки.

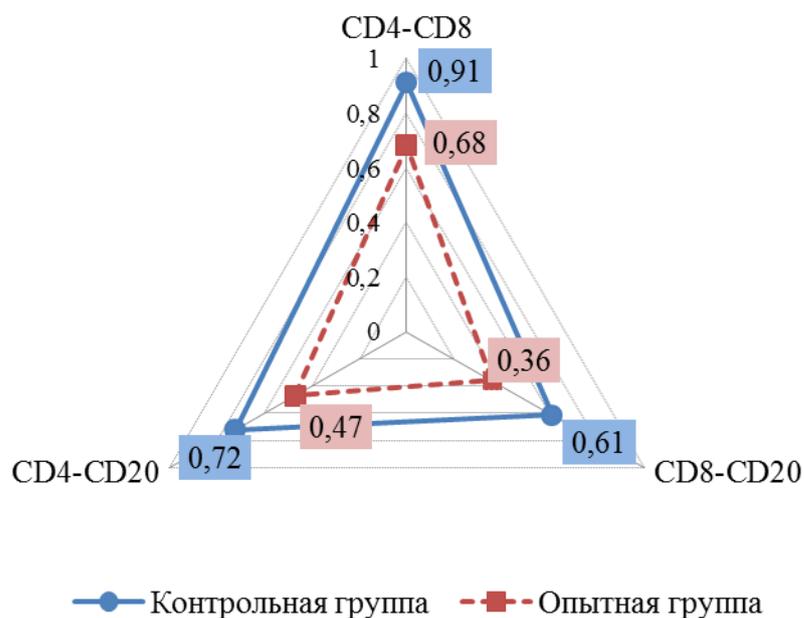


Рисунок 33. Корреляционные связи уровней экспрессии компонентов клеточного ($CD4^+$, $CD8^+$) и гуморального ($CD20^+$) звеньев иммунитета селезенки контрольных лабораторных крыс и после употребления соединения кальция

При анализе корреляционных индексов уровней экспрессии компонентов клеточного и гуморального звеньев иммунитета селезенки крыс выявлены положительные средние и сильные взаимосвязи между всеми исследуемыми иммунокомпетентными клетками (Рисунок 33). Определяются однонаправленные, с практически полной корреляционной взаимосвязью изменения экспрессии между эффекторными клетками Т-звена селезенки контрольных животных ($r = 0,91$). Также сильные взаимоотношения выявлены между экспрессией Т-хелперов и

В-лимфоцитов ($r = 0,72$) на мембранах клеток селезенки контрольных крыс. Минимальный корреляционный индекс в контрольных показателях зарегистрирован в паре CD8–CD20 ($r = 0,61$).

При обогащении водного рациона соединением кальция наблюдается уменьшение силы корреляционных связей во всех парах иммунокомпетентных клеток селезенки (Рисунок 33). Однако наибольшее взаимодействие средней силы положительной направленности обнаруживается между уровнем экспрессии CD4 и CD8 в клетках органа, как и в контрольных значениях ($r = 0,68$).

Таким образом, при употреблении хлорида кальция с питьевой водой иммунокомпетентные клетки селезенки крыс реагируют цитоархитектонической перестройкой количественного распределения в функциональных зонах. Определены преобладающие популяции лимфоцитов в различных зонах органа, которые подвержены изменениям уровней экспрессии на мембранах клеток селезенки.

3.3. Люминесцентно-гистохимическое исследование селезенки лабораторных крыс при употреблении соединения кальция с питьевой водой

3.3.1. Гистаминсодержащие структуры

Для выявления клеток селезенки, содержащих гистамин, использован люминесцентно-гистохимический метод Кросса, Эвена, Роста (Cross S. A. et al., 1971). Люминесцентная микроскопия в сочетании с цитоспектрофлуориметрией позволили оценить обеспеченность гистамином структур селезенки, а также определить интенсивность его люминесценции.

Гистаминсодержащие люминесцирующие гранулярные клетки (ЛГК) селезенки крыс обеих групп имеют округлую и полигональную форму и неравномерное свечение с присутствием ярких гранул и определяются как в белой, так в красной пульпе. ЛГК внутри лимфоидных узелков расположены в периартериолярных лимфоидных муфтах, герминативных центрах (Рисунок 36), а также вдоль маргинального синуса (Рисунок 34).

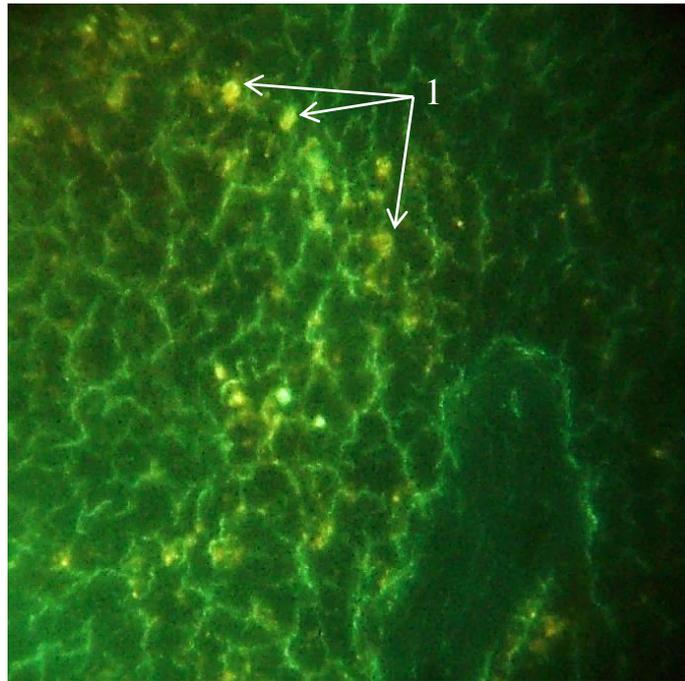


Рисунок 34. Люминесцирующие гранулярные клетки маргинальной зоны лимфоидного узелка селезенки крыс контрольной группы. Метод Кросса, Эвена, Роста. Микроскоп ЛЮМАМ-4А. Об. 20. Ок. 10. 1 – люминесцирующие гранулярные клетки.

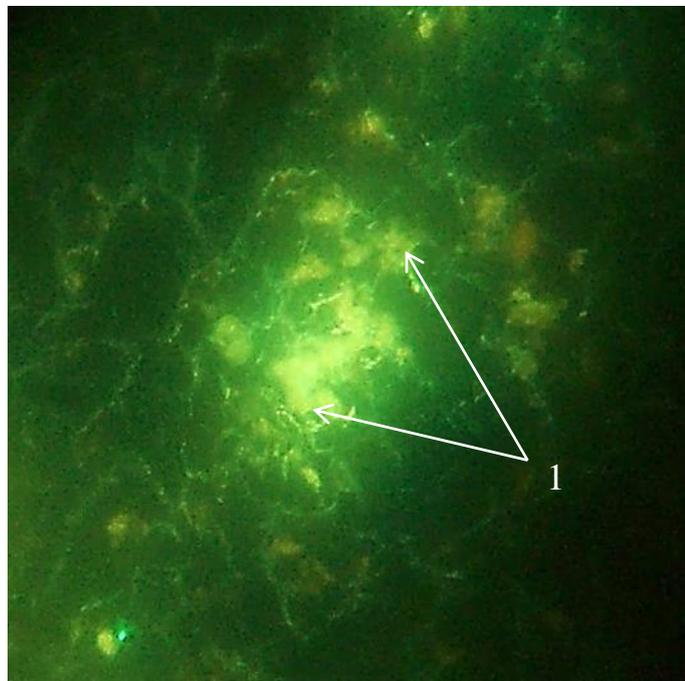


Рисунок 35. Люминесцирующие гранулярные клетки красной пульпы селезенки крыс контрольной группы. Метод Кросса, Эвена, Роста. Микроскоп ЛЮМАМ-4А. Об. 40. Ок. 10. 1 – люминесцирующие гранулярные клетки.

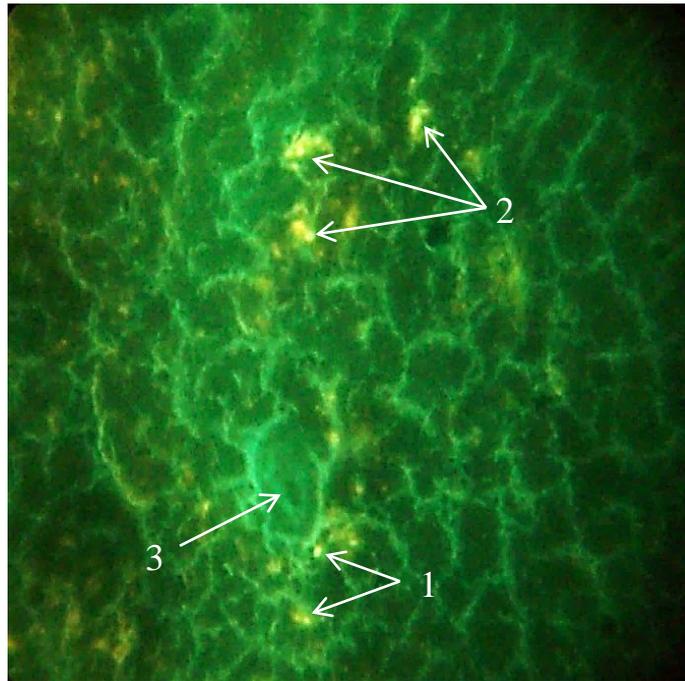


Рисунок 36. Люминесцирующие гранулярные клетки лимфоидного узелка селезенки крыс опытной группы. Метод Кросса, Эвена, Роста. Микроскоп ЛЮМАМ-4А. Об. 20. Ок. 10.

1 – ЛГК периартериолярной лимфоидной муфты, 2 – ЛГК герминативного центра,
3 – центральная артериола.

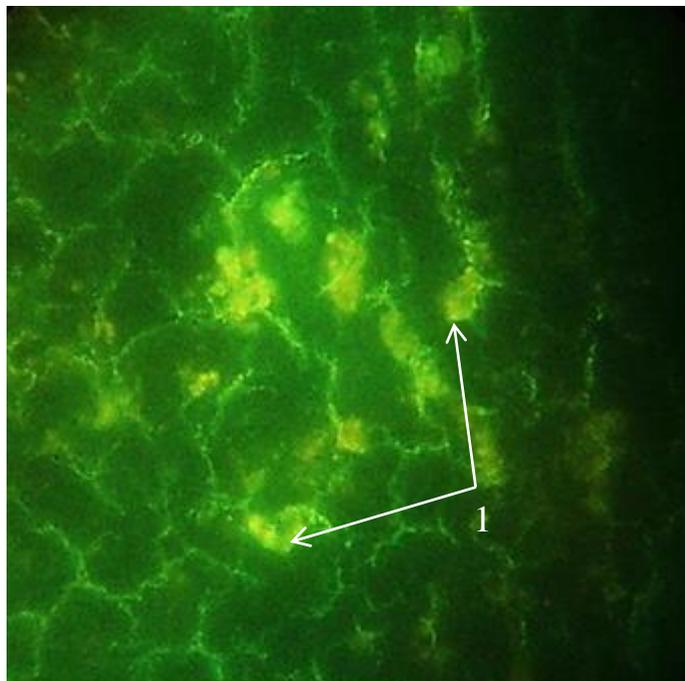


Рисунок 37. Люминесцирующие гранулярные клетки красной пульпы селезенки крыс опытной группы. Метод Кросса, Эвена, Роста. Микроскоп ЛЮМАМ-4А. Об. 40. Ок. 10.

1 – люминесцирующие гранулярные клетки.

Вдоль маргинального синуса расположено значительное число гистаминсодержащих ЛГК, которые опоясывают лимфоидный узелок плотным кольцом (Рисунок 34). Единичные люминесцирующие клетки встречаются в герминативных центрах и ПАЛМ селезенки. ЛГК красной пульпы органа концентрируются небольшими группами (Рисунок 35, 37).

Отмечается, что ЛГК различных структурно-функциональных зон селезенки имеют разную морфологию и характер люминесценции гистамина. Так, ЛГК герминативных центров визуально имеют наибольший размер, относительно ЛГК иных зон, и яркое, беловато-зеленое свечение. ЛГК, расположенные в красной пульпе, имеют мелкие размеры и люминесценцию оранжевого оттенка, которая хорошо контрастируется на однородном изумрудно-зеленом лимфоцитарном фоне. ЛГК периартериолярных лимфоидных муфт самые мелкие, с беловато-зеленой люминесценцией, а гистаминсодержащие ЛГК маргинального синуса – с менее ярким, оранжево-желтым свечением (Рисунок 34–37).

Таблица 16

Интенсивность люминесценции гистамина в морфо-функциональных зонах селезенки контрольных лабораторных крыс и после употребления соединения кальция ($M \pm m$), усл. ед.

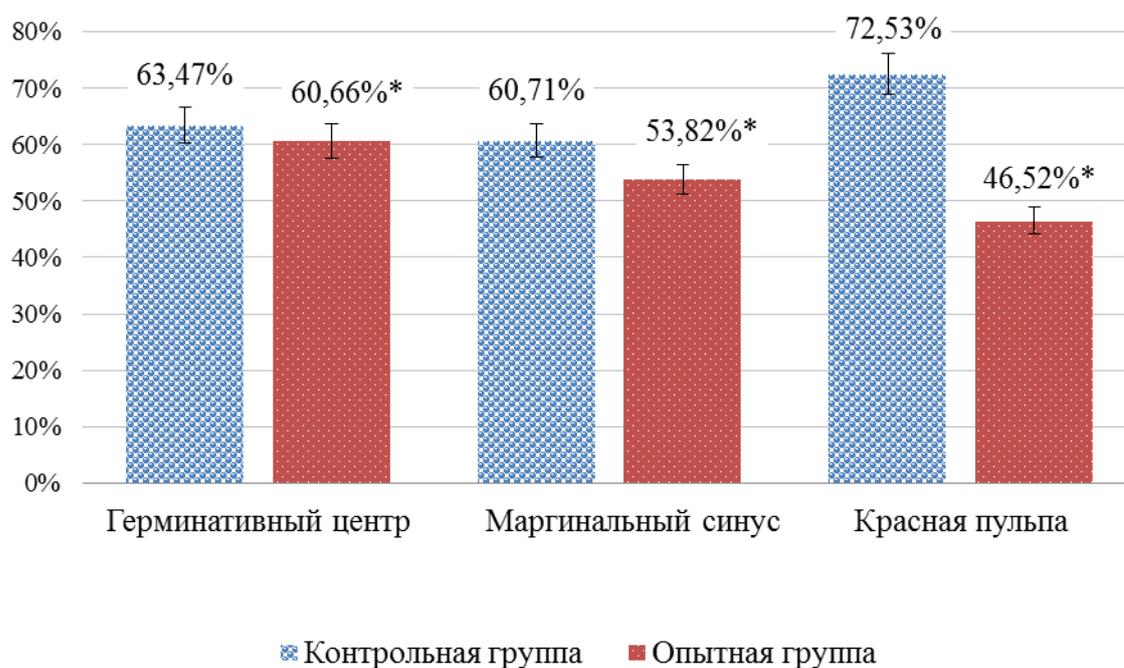
Микроструктуры селезенки	Контрольная группа	Опытная группа	Достоверность
Периартериолярная лимфоидная муфта	12,74 ± 0,15	12,0 ± 1,2	p < 0,01
ЛГК герминативного центра	14,51 ± 1,14	11,21 ± 0,25	p < 0,04
Микроокружение ЛГК герминативного центра	9,21 ± 0,89	6,8 ± 0,17	p < 0,01
ЛГК маргинального синуса	20,53 ± 1,03	16,61 ± 0,65	p < 0,05
Микроокружение ЛГК маргинального синуса	13,57 ± 0,85	8,94 ± 0,56	p < 0,003
ЛГК красной пульпы	14,89 ± 0,98	14,53 ± 0,36	p < 0,01
Микроокружение ЛГК красной пульпы	9,04 ± 0,67	6,76 ± 0,19	p < 0,02

При цитоспектрофлуометрическом анализе максимальная интенсивность люминесценции гистамина зарегистрирована в ЛГК маргинального синуса обеих групп животных (Таблица 16). ЛГК герминативного центра и красной пульпы

контрольной группы имеют сравнительно одинаковую интенсивность свечения гистамина. На фоне употребления соединения кальция с питьевой водой у животных наблюдается снижение уровней люминесценции данного диамина в ЛГК всех морфо-функциональных зон селезенки и их микроокружении. Так, интенсивность свечения гистамина в ЛГК маргинального синуса селезенки опытных крыс ниже в 1,23 раза ($p < 0,003$), а в гистаминсодержащих клетках герминативных центров – в 1,29 раза ($p < 0,04$). ЛГК красной пульпы селезенки практически не изменяют интенсивность свечения диамина на фоне употребления хлорида кальция с питьевой водой ($p < 0,01$).

Общая интенсивность люминесценции в гистаминсодержащих структурах селезенки контрольных крыс равна $13,39 \pm 0,39$ усл. ед., при употреблении хлорида кальция с питьевой водой данный показатель снижается на $17,26 \pm 0,78\%$ до $11,08 \pm 0,19$ усл. ед. ($p < 0,05$).

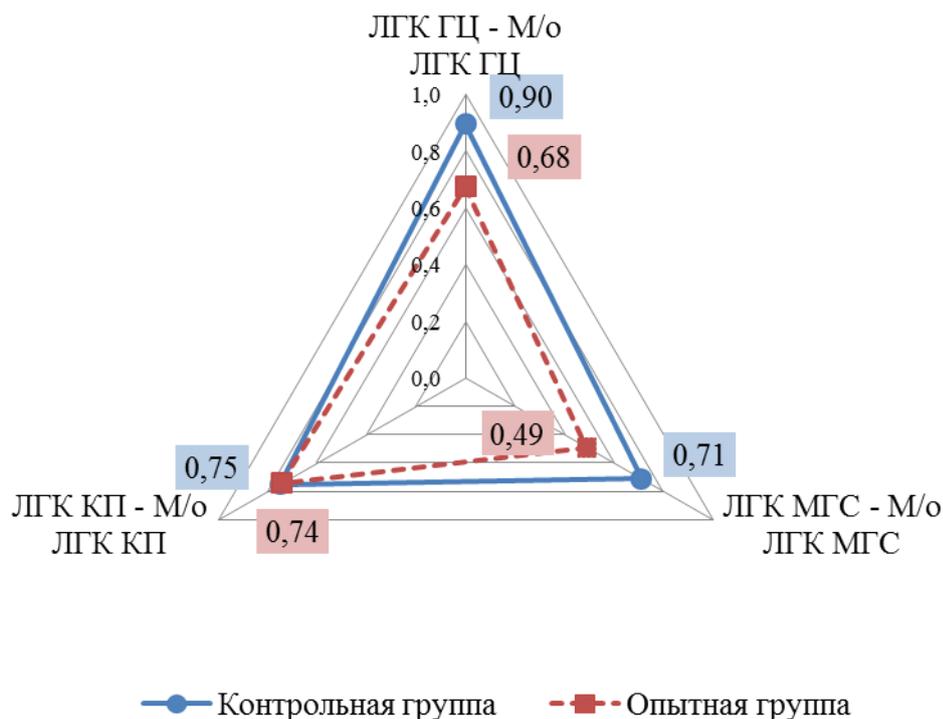
Основываясь на факте, что биоаминсодержащие клетки могут быть как аминопродуцентами, так и аминоклопотителями (Гордон Д. С. с соавт., 1982; Диндяев С. В. с соавт., 2007; Nakano K. et al., 2001), для оценки направленности изменений уровня гистамина в структурах селезенки определены соотношения показателей люминесценции между ЛГК и их микроокружением (Рисунок 38). Интересно отметить, что параллельно с данными изменениями происходит и сокращение уровня люминесценции гистамина в микроокружении структур селезенки опытных животных.



* Различия с контрольной группой статистически значимы: $p < 0,05$

Рисунок 38. Соотношение показателей люминесценции гистамина в люминесцирующих гранулярных клетках селезенки и их микроокружении ($M \pm m$), %

В результате анализа выявлено, что при употреблении соединения кальция происходит сокращение выброса гистамина из ЛГК в микроокружение во всех структурах селезенки крыс. Наибольшим изменениям подвержены гистаминсодержащие клетки красной пульпы опытных животных, где соотношение уровней люминесценции диамина снижается на 26,01% ($p < 0,05$) (Рисунок 38). Из ЛГК маргинального синуса выход гистамина в микроокружение сокращается на 6,89%, в структурах герминативного центра селезенки опытных крыс данные изменения минимальны ($p < 0,05$).



Обозначения. ЛГК ГЦ – М/о ЛГК ГЦ – корреляционные связи между люминесцирующими гранулярными клетками герминативного центра и их микроокружением, ЛГК МГС – М/о ЛГК МГС – корреляционные связи между люминесцирующими гранулярными клетками маргинального синуса и их микроокружением, ЛГК КП – М/о ЛГК КП – корреляционные связи между люминесцирующими гранулярными клетками красной пульпы и их микроокружением.

Рисунок 39. Корреляционные связи между показателями обеспеченности гистамином люминесцирующих гранулярных клеток селезенки и их микроокружения

При корреляционном анализе гистаминообеспеченности во всех парах ЛГК – микроокружение выявлены сильные положительные взаимосвязи ($r > 0,7$) с одновременными изменениями интенсивности люминесценции диамина в данных структурах (Рисунок 39). При употреблении хлорида кальция с питьевой водой наблюдается снижение корреляционных индексов с сохранением положительной направленности в гистаминсодержащих ЛГК герминативного центра – микроокружение: контрольная группа – $r = 0,9$, опытная группа – $r = 0,68$. Аналогичные изменения взаимосвязи интенсивности свечения гистамина происходят в паре ЛГК маргинального синуса – микроокружение: контрольная группа – $r = 0,71$,

опытная группа – $r = 0,49$. Гистаминсодержащие люминесцирующие клетки красной пульпы селезенки крыс не изменяют сильную однонаправленную корреляционную связь в ответ на обогащение питьевой воды кальцием.

Таким образом, поступление хлорида кальция с питьевой водой вызывает сокращение выброса гистамина из люминесцирующих гранулярных клеток в микроокружение с наиболее выраженными изменениями в гистаминсодержащих клетках красной пульпы селезенки опытной группы крыс. Клетки селезенки, содержащие данный диамин, реагируют на условия эксперимента снижением количества и люминесценции как в ЛГК, так и в микроокружении люминесцирующих структур органа. Экспериментально доказано, что гистаминсодержащие клетки герминативных центров и маргинальных синусов селезенки крыс реагируют на изменение макроэлементного баланса снижением корреляционных связей между ЛГК и их микроокружением.

3.3.2. Серотонинсодержащие структуры

Для выявления структур селезенки, содержащих серотонин, у крыс контрольной и опытной групп использован люминесцентно-гистохимический метод Фалька-Хилларпа в модификации Е. М. Крохиной (Falk В. et al., 1962; Крохина Е. М. с соавт., 1969).

Люминесцирующие серотонинсодержащие клетки селезенки крыс обеих групп неправильной, полиморфной формы, имеют яркие гранулы от белого до кирпично-оранжевого оттенка (Рисунки 40–43). ЛГК определяются во всех структурно-функциональных зонах органа, кроме периартериолярной лимфоидной муфты, где определяется лишь диффузное зеленое свечение фона.

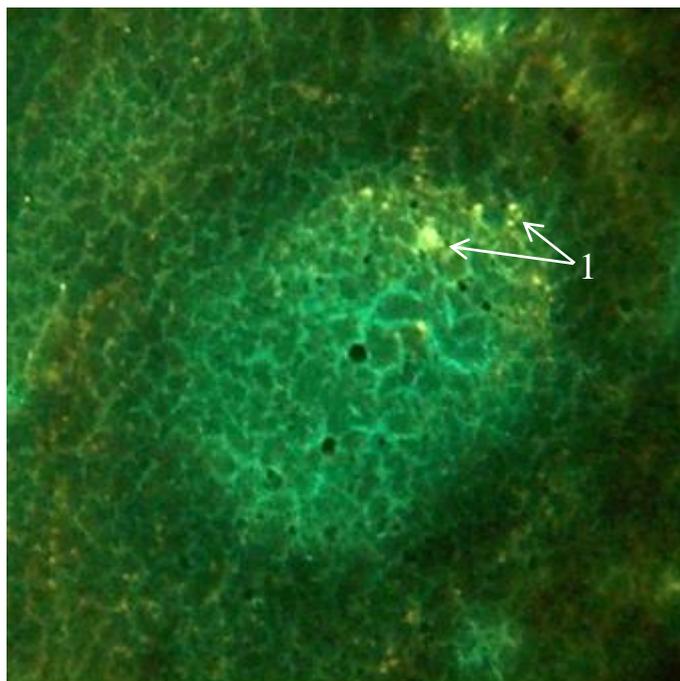


Рисунок 40. Люминесцирующие гранулярные клетки лимфоидного узелка селезенки крыс контрольной группы. Метод Фалька-Хилларпа в модификации Е. М. Крохиной. Микроскоп ЛЮМАМ-4А. Об. 20. Ок. 10. 1 – люминесцирующие гранулярные клетки.

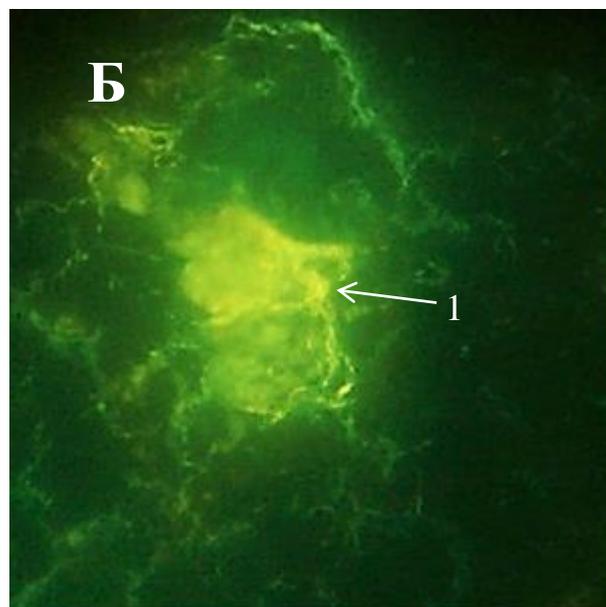
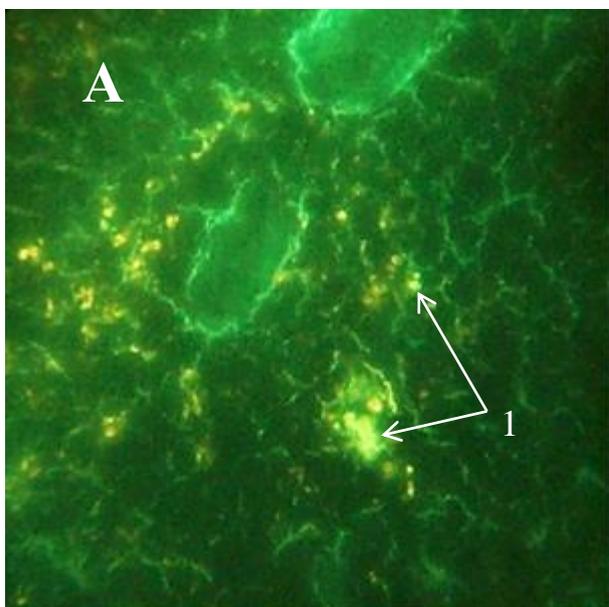


Рисунок 41. Люминесцирующие гранулярные клетки красной пульпы селезенки крыс контрольной группы. Метод Фалька-Хилларпа в модификации Е. М. Крохиной. Микроскоп ЛЮМАМ-4А. А – Об. 20. Ок. 10. Б – Об. 100. Ок. 10.

1 – люминесцирующие гранулярные клетки.

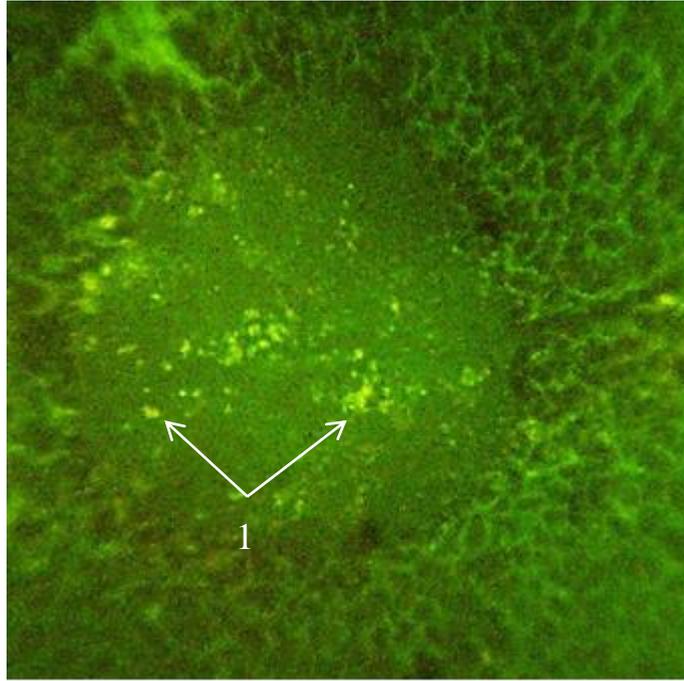


Рисунок 42. Люминесцирующие гранулярные клетки лимфоидного узелка селезенки крыс опытной группы. Метод Фалька-Хилларпа в модификации Е. М. Крохиной. Микроскоп ЛЮМАМ-4А. Об. 20. Ок. 10. 1 – люминесцирующие гранулярные клетки.

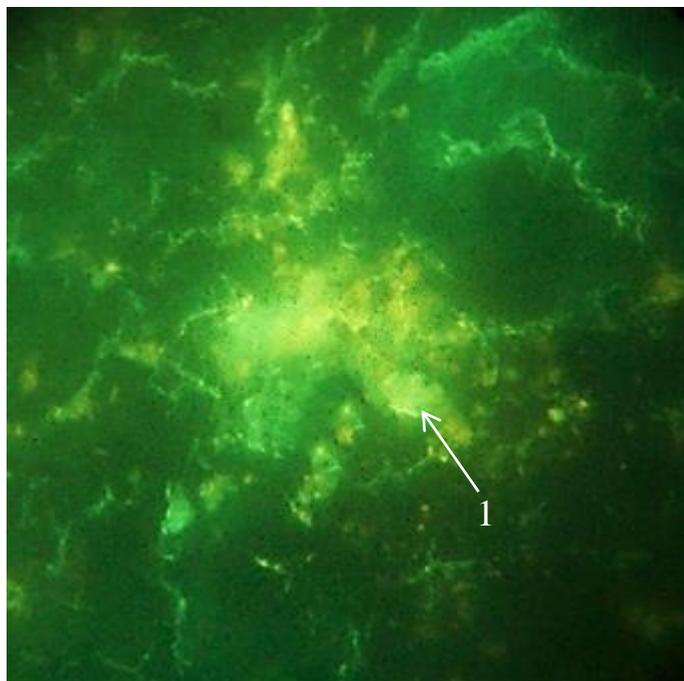


Рисунок 43. Люминесцирующие гранулярные клетки красной пульпы селезенки крыс опытной группы. Метод Фалька-Хилларпа в модификации Е. М. Крохиной. Микроскоп ЛЮМАМ-4А. Об. 40. Ок. 10. 1 – люминесцирующие гранулярные клетки.

Люминесцирующие гранулярные клетки имеют морфологические различия в зависимости от их локализации в селезенке: в герминативном центре – крупные, с беловато-желтым свечением (Рисунок 40, 42); вдоль маргинального синуса – меньших размеров, с люминесценцией желтого цвета; в красной пульпе – различной величины, с кирпично-оранжевым свечением, могут быть включения (Рисунок 41, 43). Отмечается, что при употреблении соединения кальция с питьевой водой ЛГК всех структур органа визуальнo укрупнены и имеют более яркую люминесценцию серотонина.

Серотонинсодержащие клетки селезенки обеих групп животных расположены в срезах неравномерно с наибольшим количеством в красной пульпе, где они встречаются крупными скоплениями по 10–20 клеток. Внутри герминативных центров селезенки контрольной группы определяются единичные ЛГК, преимущественно на их периферии (Рисунок 40).

После употребления хлорида кальция количество ЛГК белой пульпы селезенки визуальнo увеличивается, которые в центрах размножения часто локализуются диффузно (Рисунок 42). Серотонинсодержащие клетки маргинальных синусов обеих групп крыс располагаются цепочкой в 1–2 ряда вокруг лимфоидных узелков и отделяют их от красной пульпы.

Цитоспектрофлуометрия позволила выявить обеспеченность серотонином микроструктур селезенки крыс обеих групп. Общий уровень люминесценции серотонина в структурах селезенки контрольной группы крыс составил $11,96 \pm 0,35$ усл. ед., при употреблении соединения кальция с питьевой водой повысился на $3,16 \pm 0,23\%$ до $12,35 \pm 0,52$ усл. ед. ($p < 0,05$). Максимальный уровень люминесценции моноамина зарегистрирован в ЛГК герминативных центров лимфоидных узелков обеих групп и варьирует в пределах $26,95 \pm 1,23$ усл. ед. и $28,34 \pm 1,97$ усл. ед. соответственно ($p < 0,01$) (Таблица 17). Серотонинсодержащие клетки красной пульпы селезенки контрольных животных имеют относительно высокую интенсивность люминесценции – $16,73 \pm 0,95$ усл. ед., которая сокращается в 2,23

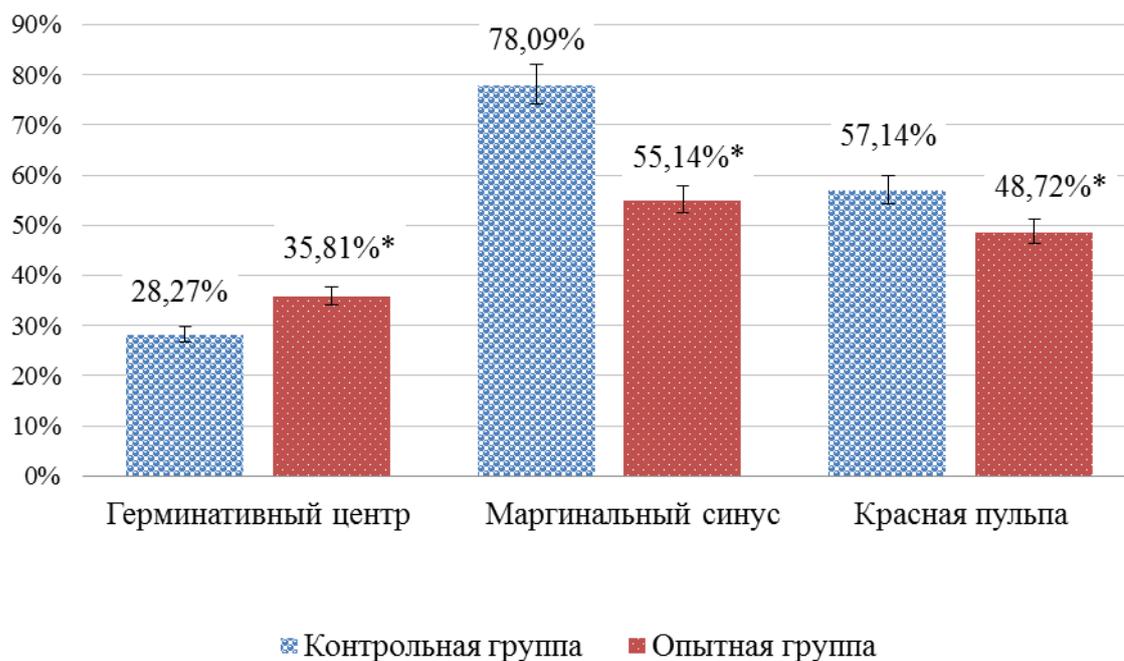
раза после употребления соединения кальция – $7,47 \pm 0,45$ усл. ед. ($p < 0,02$). ЛГК маргинального синуса контрольной группы обладают относительно слабой люминесценцией моноамина – $8,4 \pm 0,45$ усл. ед., однако более $\frac{3}{4}$ данной доли серотонина выявляется в микроокружении. На фоне употребления соединения кальция с питьевой водой происходит увеличение свечения исследуемого биогенного амина в ЛГК маргинальных синусов в 2,31 раза – до $19,42 \pm 1,64$ усл. ед. ($p < 0,006$), но его поступление в микроокружение сокращается до 55,14% ($p < 0,05$) (Рисунок 44).

Таблица 17

Интенсивность люминесценции серотонина в морфо-функциональных зонах селезенки контрольных лабораторных крыс и после употребления соединения кальция ($M \pm m$), усл. ед.

Микроструктуры селезенки	Контрольная группа	Опытная группа	Достоверность
Периартериолярная лимфоидная муфта	$7,89 \pm 0,24$	$6,75 \pm 0,38$	$p < 0,04$
ЛГК герминативного центра	$26,95 \pm 1,23$	$28,34 \pm 1,97$	$p < 0,01$
Микроокружение ЛГК герминативного центра	$7,62 \pm 0,34$	$10,15 \pm 0,81$	$p < 0,02$
ЛГК маргинального синуса	$8,4 \pm 0,45$	$19,42 \pm 1,64$	$p < 0,006$
Микроокружение ЛГК маргинального синуса	$6,56 \pm 0,35$	$10,71 \pm 1,14$	$p < 0,03$
ЛГК красной пульпы	$16,73 \pm 0,95$	$7,47 \pm 0,45$	$p < 0,02$
Микроокружение ЛГК красной пульпы	$9,56 \pm 0,59$	$3,64 \pm 0,25$	$p < 0,01$

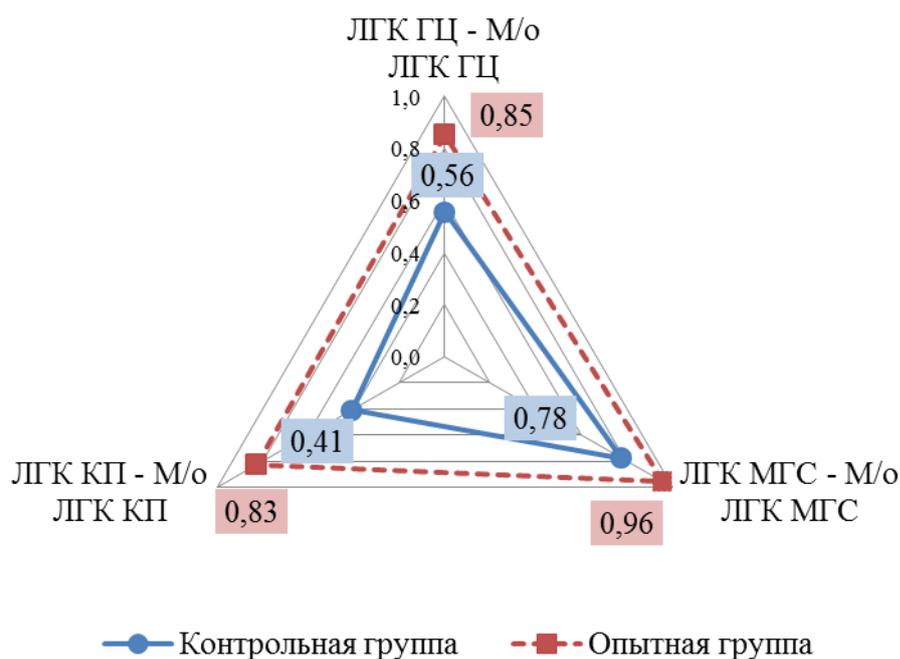
Таким образом, ЛГК белой и красной пульпы селезенки различно реагируют на поступление соединения кальция с питьевой водой: в ЛГК герминативных центров и маргинальных синусов интенсивность люминесценции серотонина возрастает, а в ЛГК красной пульпы и их микроокружении снижается.



* Различия с контрольной группой статистически значимы: $p < 0,05$

Рисунок 44. Соотношение показателей люминесценции серотонина в люминесцирующих гранулярных клетках селезенки и их микроокружении ($M \pm m$), %

Относительные показатели выброса моноамина в микроокружение тканей селезенки отразили интенсивные реактивные изменения серотонинообеспеченности в маргинальном синусе белой пульпы: происходит сокращение выхода биоамина на 22,95% после употребления хлорида кальция с питьевой водой ($p < 0,05$). Также наблюдается снижение показателей соотношения интенсивности свечения серотонина между ЛГК красной пульпы опытных крыс и микроокружением на 8,42% ($p < 0,05$) (Рисунок 44). Однако в ЛГК герминативных центров лимфоидных узелков селезенки на фоне условий эксперимента увеличивается выброс моноамина на 7,54% в окружающие структуры ($p < 0,05$).



Обозначения. ЛГК ГЦ – М/о ЛГК ГЦ – корреляционные связи между люминесцирующими гранулярными клетками герминативного центра и их микроокружением, ЛГК МГС – М/о ЛГК МГС – корреляционные связи между люминесцирующими гранулярными клетками маргинального синуса и их микроокружением, ЛГК КП – М/о ЛГК КП – корреляционные связи между люминесцирующими гранулярными клетками красной пульпы и их микроокружением.

Рисунок 45. Корреляционные связи между показателями обеспеченности серотонином люминесцирующих гранулярных клеток селезенки и их микроокружения

По результатам корреляционного анализа интенсивности люминесценции серотонина между ЛГК и их микроокружением в контрольной группе животных выявлены сильные положительные взаимосвязи во всех исследуемых парах ($r > 0,7$) (Рисунок 45). При обогащении водного рациона соединением кальция происходит снижение существующих корреляционных связей. Так, интенсивность люминесценции серотонина в ЛГК маргинального синуса и микроокружении имеет полную положительную взаимосвязь в контрольной группе ($r = 0,96$), в опытной группе корреляционный индекс остается сильным, но снижается до 0,78. Взаимоотношения между обеспеченностью серотонином ЛГК герминативного

центра и красной пульпы и их микроокружениями в условиях эксперимента сокращаются до средней силы – $r = 0,56$ и $r = 0,41$ соответственно.

Таким образом, в модулируемых условиях опыта происходит увеличение серотонинообеспеченности люминесцирующих гранулярных клеток герминативного центра в 1,05 раз, а выхода моноамина в микроокружение – на 7,54%. В ЛГК маргинального синуса опытной группы наблюдаются разнонаправленные изменения: абсолютные значения люминесценции серотонина возрастают в 2,31 раз, а соотношение ЛГК/микроокружение сокращается на 22,95%. В ЛГК красной пульпы опытных животных уровень серотонина сокращается в 2,23 раза, а выход данного биоамина в микроокружение – на 8,42%. Происходит снижение существующих сильных положительных корреляционных взаимосвязей в парах серотонинсодержащие ЛГК – микроокружение до средних значений.

3.3.3. Катехоламинсодержащие структуры

Люминесцентно-гистохимический метод Фалька-Хилларпа в модификации Е. М. Крохиной с цитоспектрофлуометрией позволили выявить и проанализировать обеспеченность катехоламинами (КА) структур селезенки крыс контрольной и опытной групп. Определение уровней люминесценции серотонина и катехоламинов проводилось в одних и тех же клетках при использовании светофильтров с разной длиной волны. Поэтому микрофотографии серотонин- и катехоламинсодержащих структур селезенки представлены на одном изображении.

ЛГК, содержащие катехоламины, локализуются во всех структурах селезенки крыс обеих групп, кроме области периаартериолярной лимфоидной муфты, где определяется только диффузный фон микроокружения. ЛГК красной пульпы имеют кирпично-оранжевое свечение и расположены крупными группами (Рисунок 41, 43). Катехоламинсодержащие клетки маргинального синуса окружают лимфоидный узелок селезенки обеих групп животных и выявляются цепочкой с желтой люминесценцией гранул. ЛГК герминативных центров имеют самую

яркую интенсивность свечения данного биоamina с беловато-желтым оттенком (Рисунок 40, 42). Между ярко люминесцирующими гранулярными клетками селезенки наблюдается диффузное, однородное зеленое свечение, которое представляет собой микроокружение катехоламинсодержащих клеток.

Таблица 18

Интенсивность люминесценции катехоламинов в морфо-функциональных зонах селезенки контрольных лабораторных крыс и после употребления соединения кальция ($M \pm m$), усл. ед.

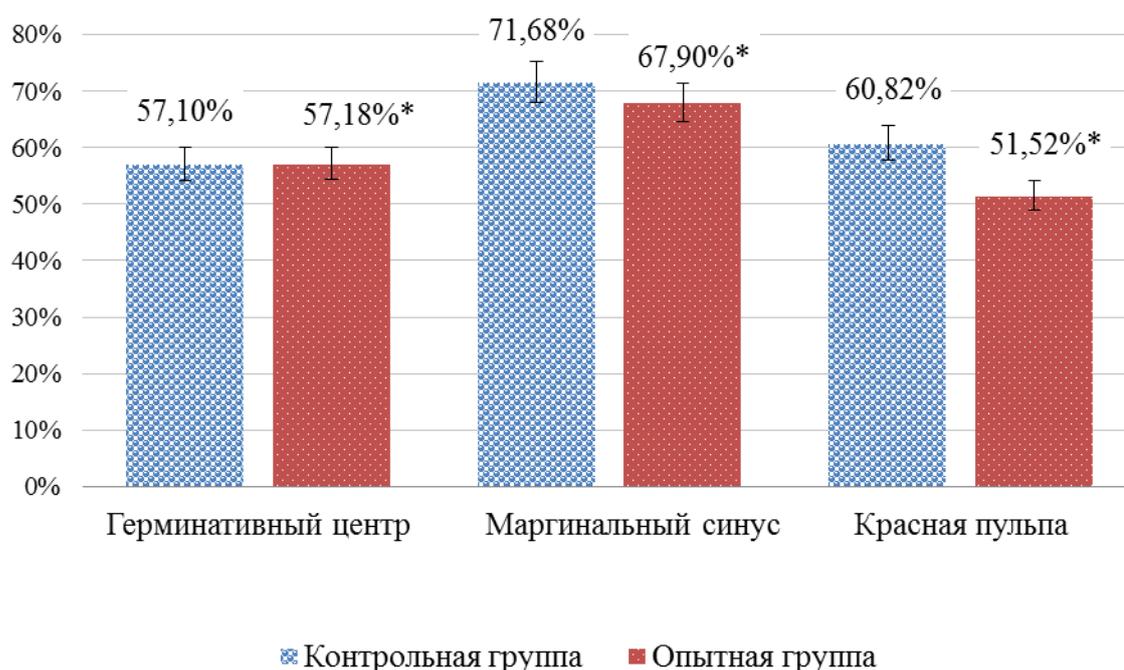
Микроструктуры селезенки	Контрольная группа	Опытная группа	Достоверность
Периартериолярная лимфоидная муфта	12,49 ± 0,26	12,52 ± 0,82	p < 0,03
ЛГК герминативного центра	23,71 ± 2,47	29,92 ± 1,7	p < 0,01
Микроокружение ЛГК герминативного центра	13,54 ± 0,86	17,11 ± 1,42	p < 0,007
ЛГК маргинального синуса	12,29 ± 0,68	20,47 ± 1,94	p < 0,008
Микроокружение ЛГК маргинального синуса	8,81 ± 0,63	13,9 ± 1,53	p < 0,02
ЛГК красной пульпы	17,46 ± 1,62	9,16 ± 0,5	p < 0,01
Микроокружение ЛГК красной пульпы	10,62 ± 0,73	4,72 ± 0,27	p < 0,04

Цитоспектрофлуометрический анализ выявил наибольшую интенсивность люминесценции катехоламинов в ЛГК герминативных центров – 23,71 ± 2,47 усл. ед. и 29,92 ± 1,7 усл. ед. в контрольной и опытной группах животных соответственно (p < 0,01) (Таблица 18). Экспериментально доказано, что употребление соединения кальция с питьевой водой оказывает влияние на обеспечение катехоламинами селезенки с увеличением их люминесценции во всех структурах органа, кроме красной пульпы, в которой отмечается снижение интенсивности свечения как в ЛГК, так и в их микроокружении в 1,9 раза и в 2,25 раза соответственно (p < 0,04).

Клетки красной пульпы селезенки контрольных крыс обладают более высокой интенсивностью люминесценции КА в 1,42 раза, чем ЛГК маргинального синуса, однако на фоне моделируемых условий эксперимента данное соотношение

меняется на противоположное и различия составляют в 2,23 раза ($p < 0,05$) (Таблица 18).

Общий уровень люминесценции катехоламинов в структурах селезенки контрольной группы составил $14,13 \pm 0,49$ усл. ед., при употреблении соединения кальция с питьевой водой увеличился на $8,25 \pm 0,94\%$ до $15,4 \pm 0,57$ усл. ед. ($p < 0,05$).



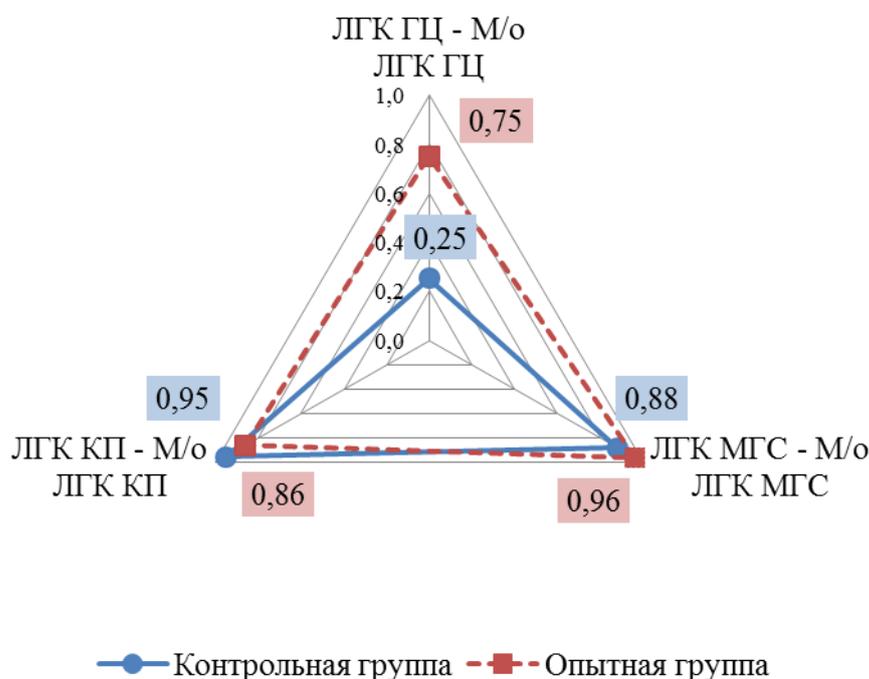
* Различия с контрольной группой статистически значимы: $p < 0,05$

Рисунок 46. Соотношение показателей люминесценции катехоламинов в люминесцирующих гранулярных клетках селезенки и их микроокружении ($M \pm m$), %

Определение соотношений показателей люминесценции катехоламинов между ЛГК структур селезенки и их микроокружением выявило максимальный выход КА в окружающие ткани маргинальной зоны органа: в контрольной группе – 71,68%, при употреблении соединения кальция с питьевой водой снижается до 67,9% ($p < 0,05$) (Рисунок 46).

Баланс между уровнем люминесценции КА в ЛГК герминативных центров лимфоидных узелков и микроокружением остается стабильным и не смещается

при обогащении водного рациона кальцием ($p < 0,05$). Люминесцирующие клетки красной пульпы напротив активно отвечают на условия эксперимента и выброс катехоламинов в микроокружение сокращается на 9,3% ($p < 0,05$) (Рисунок 46).



Обозначения. ЛГК ГЦ – М/о ЛГК ГЦ – корреляционные связи между люминесцирующими гранулярными клетками герминативного центра и их микроокружением, ЛГК МГС – М/о ЛГК МГС – корреляционные связи между люминесцирующими гранулярными клетками маргинального синуса и их микроокружением, ЛГК КП – М/о ЛГК КП – корреляционные связи между люминесцирующими гранулярными клетками красной пульпы и их микроокружением.

Рисунок 47. Корреляционные связи между показателями обеспеченности катехоламинами люминесцирующих гранулярных клеток селезенки и их микроокружения

Корреляционный анализ выявил сильную положительную связь ($r > 0,7$) между обеспеченностью катехоламинами внутри всех ЛГК и их микроокружением (Рисунок 47). Исключение составляет пара ЛГК герминативного центра – микроокружение, где на фоне употребления хлорида кальция с питьевой водой однонаправленная сильная связь ($r = 0,75$) изменяется на слабую связь той же направленности ($r = 0,25$). В остальных люминесцирующих структурах определяются

тесные взаимоотношения интенсивности свечения катехоламинов, которые в опытной группе изменяются незначительно, что свидетельствует о параллельном повышении средних значений люминесценции катехоламинов как в ЛГК, так и в окружающих их тканях.

Таким образом, доказано, что употребление соединения кальция с питьевой водой оказывает влияние на обеспеченность катехоламинами селезенки с разнонаправленными изменениями в ее морфо-функциональных зонах: увеличением интенсивности люминесценции КА в белой пульпе и снижением – в красной пульпе.

3.3.4. Анализ взаимоотношений обеспеченности биогенными аминами селезенки лабораторных крыс

Исследование морфологических параллелей серийных срезов селезенки крыс с люминесцентно-гистохимической обработкой по методу Кросса, Эвена, Роста и методу Фалька-Хилларпа в модификации Е. М. Крохиной дало возможность провести оценку принадлежности одних и тех же люминесцирующих структур органа к гистамин-, серотонин- и катехоламинсодержащим клеткам. Сравнительный анализ выявил, что используемые люминесцентно-гистохимические методы выявляют различные клеточные структуры, которые отличны по локализации в функциональных зонах селезенки крыс, по морфологическому строению со специфичными интенсивностью и цветом люминесценции биоаминов, расположением и количеством гранул (Рисунок 48).

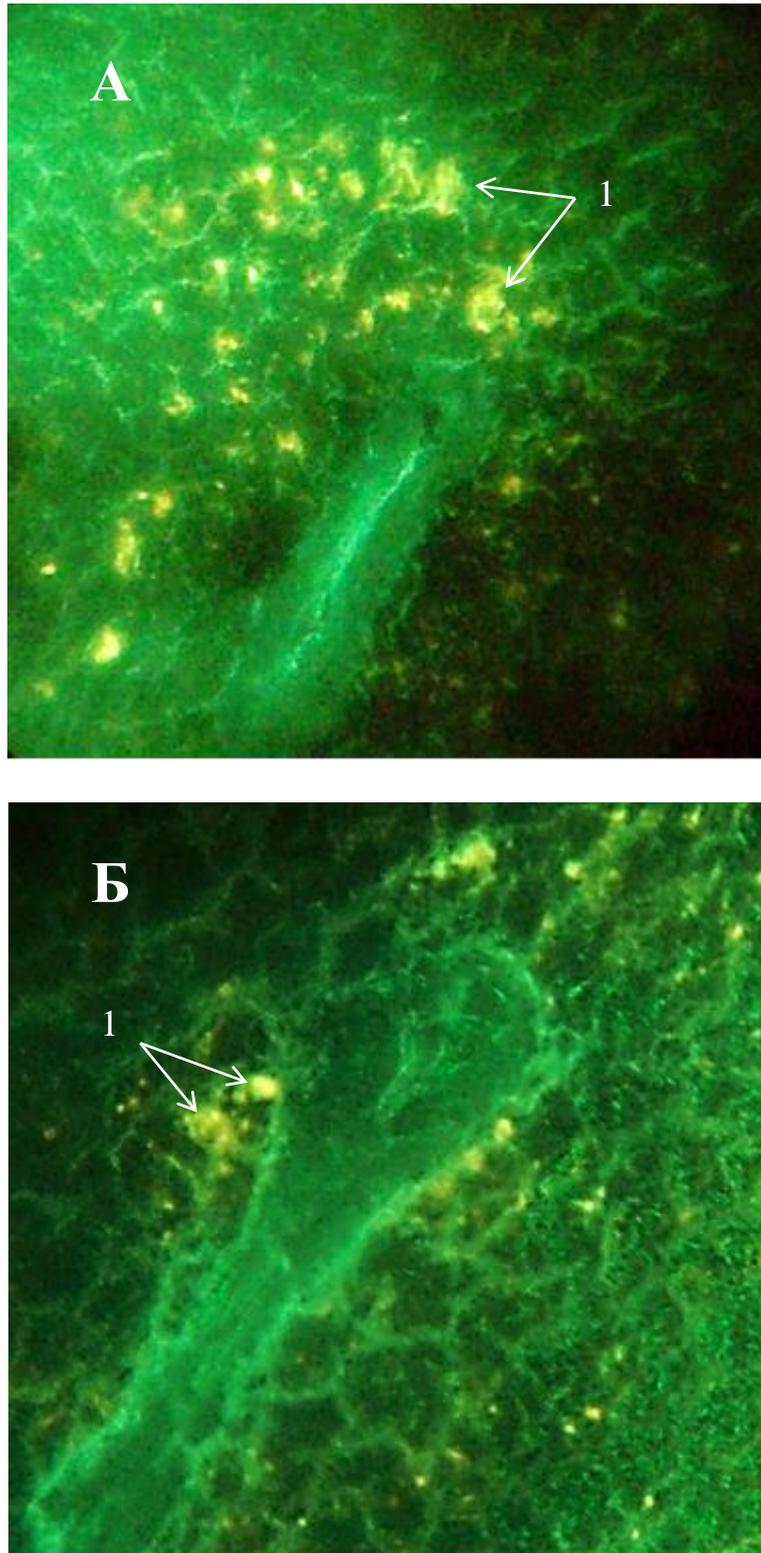
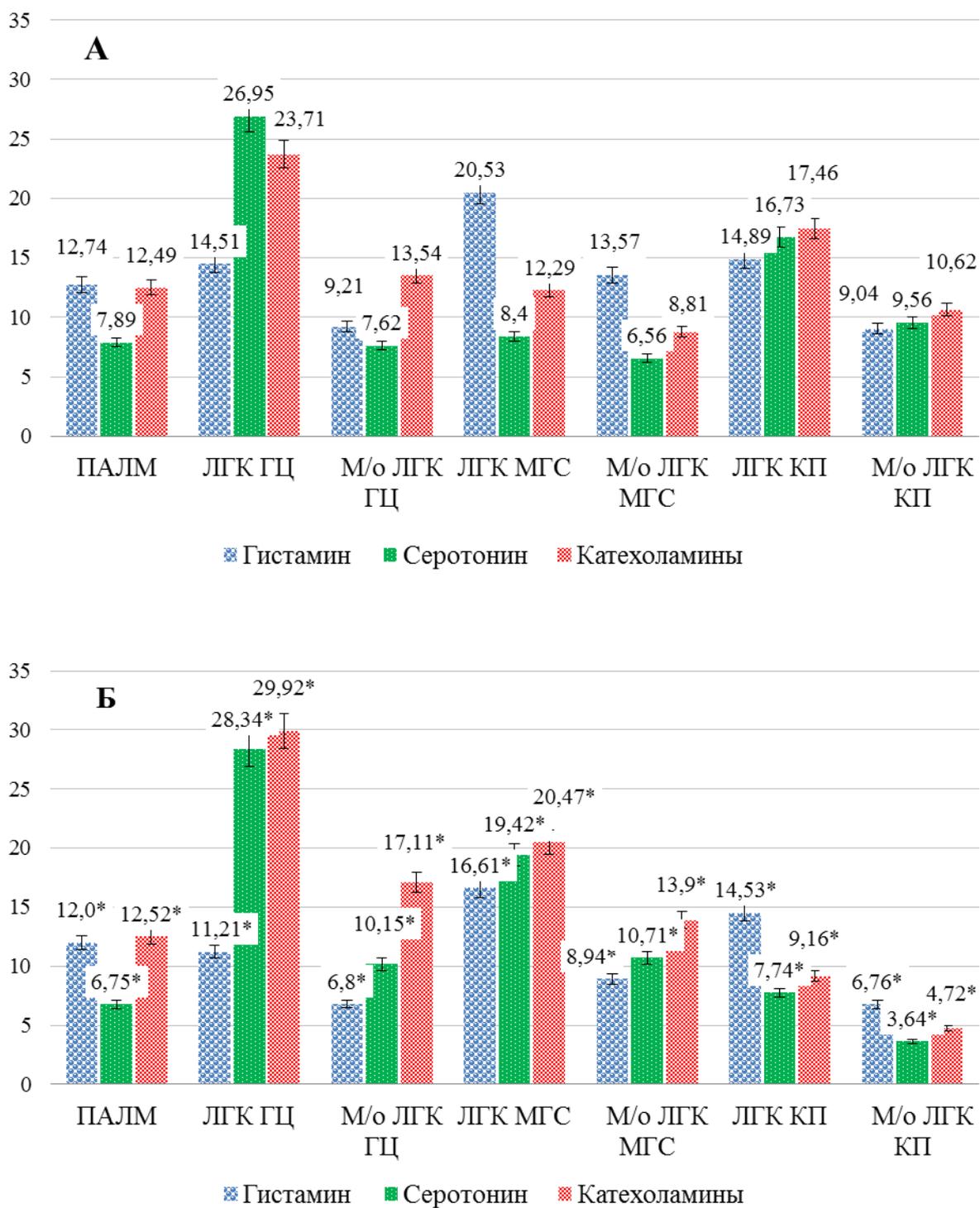


Рисунок 48. Морфологическая параллель. Люминесцирующие гранулярные клетки красной пульпы селезенки крыс контрольной группы. Микроскоп ЛЮМАМ-4А.

А – метод Кросса, Эвена, Роста. Об. 20. Ок. 10.

Б – метод Фалька-Хилларпа в модификации Е. М. Крохиной. Об. 40. Ок. 10.

1 – люминесцирующие гранулярные клетки.



* Различия с контрольной группой статистически значимы: $p < 0,05$

Рисунок 49. Соотношение интенсивности люминесценции биогенных аминов (гистамина, серотонина, катехоламинов) в различных морфо-функциональных зонах селезенки контрольных лабораторных крыс и после употребления соединения кальция ($M \pm m$), усл. ед. А – контрольная группа. Б – опытная группа.

Определение взаимоотношений биогенных аминов в структурах селезенки контрольных животных выявило тесную взаимосвязь ведущего биоamina в люминесцирующих гранулярных клетках и в окружающих их тканях (Рисунок 49). Так, в гранулярных клетках маргинального синуса и их микроокружении уровень люминесценции гистамина преобладает над показателями других биоаминов. А в ЛГК красной пульпы и микроокружении превалирует интенсивность свечения катехоламинов. Однако наибольший уровень люминесценции серотонина и КА зарегистрирован в ЛГК центров размножения лимфоидных узелков, где их средние показатели составляют $26,95 \pm 1,23$ усл. ед. и $23,71 \pm 2,47$ усл. ед. соответственно. В зоне периартериолярной лимфоидной муфты выявляются относительно равные уровни свечения гистамина ($12,74 \pm 1,2$ усл. ед.) и катехоламинов ($12,49 \pm 0,26$ усл. ед.). Отмечается, что в микроокружении гранулярных клеток уровни свечения исследуемых биоаминов всегда достоверно ниже, чем внутри люминесцирующих структур.

При употреблении питьевой воды, обогащенной кальцием, происходят изменения в интенсивности люминесценции биогенных аминов как в ЛГК, так и в их микроокружении (Рисунок 49). Так, в красной пульпе зарегистрирована смена ведущего биоamina: в контрольной группе отмечается высокий уровень люминесценции КА как в ЛГК, так и в микроокружении, в опытной группе в данных структурах преобладает уровень свечения гистамина – $14,53 \pm 0,36$ усл. ед. и $6,76 \pm 0,19$ усл. ед. соответственно.

В маргинальной зоне селезенки контрольных животных выявляются значительные количественные различия в уровнях исследуемых биогенных аминов, в то время как при употреблении соединения кальция их показатели становятся практически равны. ЛГК герминативных центров селезенки опытных крыс, также как и в контрольной группе, имеют наибольший уровень люминесценции биоаминов, однако при употреблении хлорида кальция на первый план выходит показатель свечения катехоламинов ($29,92 \pm 1,7$ усл. ед.), а не серотонина, как в кон-

трольных значениях. В области периаартериолярной лимфоидной муфты опытной группы сохраняются конкурирующие взаимоотношения между интенсивностью люминесценции гистамина и КА – $12,0 \pm 0,15$ усл. ед. и $12,52 \pm 0,82$ усл. ед. соответственно (Рисунок 49).

Для выявления соотношения уровней люминесценции серотонина к аналогичному показателю катехоламинов в одной структуре органа лабораторных крыс определен серотониновый индекс (Is) (Дьячкова И. М. с соавт., 2014).

Анализ серотонинового индекса выявил преобладание уровня люминесценции катехоламинов над показателями серотонина во всех исследуемых структурах селезенки обеих групп животных ($Is < 1$), кроме ЛГК герминативного центра контрольных крыс, где наблюдается накопление серотонина ($Is = 1,13$) (Таблица 19). Отмечаются практически равные уровни свечения серотонина и КА в структурах красной пульпы контрольной группы, о чем свидетельствует серотониновый индекс, стремящийся к единице: в ЛГК – $Is = 0,95$, в их микроокружении – $Is = 0,9$.

Таблица 19

Показатели серотонинового индекса в морфо-функциональных зонах селезенки контрольных лабораторных крыс и после употребления соединения кальция

Микроструктуры селезенки	Контрольная группа	Опытная группа
Периаартериолярная лимфоидная муфта	0,63	0,53
ЛГК герминативного центра	1,13	0,94
Микроокружение ЛГК герминативного центра	0,56	0,59
ЛГК маргинального синуса	0,68	0,94
Микроокружение ЛГК маргинального синуса	0,74	0,77
ЛГК красной пульпы	0,95	0,81
Микроокружение ЛГК красной пульпы	0,9	0,77

При длительном употреблении соединения кальция с питьевой водой изменяются соотношения биогенных аминов в структурах селезенки крыс со смеще-

нием серотонинового индекса. Так, в ЛГК маргинального синуса и их микроокружении происходит накопление, либо повышение синтеза серотонина с повышением с $I_s = 0,68$ до $I_s = 0,94$ и с $I_s = 0,74$ до $I_s = 0,77$. Противоположная картина со снижением серотонинового индекса на фоне приема хлорида кальция наблюдается в ЛГК герминативных центров, ЛГК красной пульпы, а также в микроокружениях периартериолярной лимфоидной муфты и пульпарных люминесцирующих клеток (Таблица 19). Этот факт дает основу для заключения о снижении синтеза или накопления серотонина в данных структурах органа при смене макроэлементного рациона.

Отмечается, что микроокружения люминесцирующих клеток селезенки, содержащих биоамины, слабее отвечают изменением серотонинового индекса в ответ на употребление хлорида кальция.

Корреляционный анализ между интенсивностью свечения биогенных аминов, представленный в таблице 20, выявил наибольшую взаимосвязь показателей люминесценции серотонина и катехоламинов во всех исследуемых структурах селезенки обеих групп животных, где определяются средние и сильные положительные корреляционные связи. А при употреблении соединения кальция данные взаимосвязи усиливаются в каждой структуре органа, достигая практически полной связи средних показателей люминесценции в ЛГК маргинального синуса ($r = 0,95$) и их микроокружении ($r = 0,98$).

Оценивая корреляционные индексы между показателями люминесценции серотонина и гистамина контрольных значений, определяется более разноправленная картина (Таблица 20). Так, в ЛГК маргинального синуса и их микроокружении данные биогенные амины изменяются однонаправленно со средней силой – $r = 0,46$ и $r = 0,36$ соответственно. Однако в красной пульпе серотонин и гистамин имеют обратную зависимость: в ЛГК – $r = - 0,59$, в микроокружении – $r = - 0,24$. Внутри герминативного центра лимфоидных узелков селезенки контрольной группы выявляются разнонаправленные взаимодействия: внутри люминесцирующих клеток серотонин и гистамин изменяются взаимосвязанно с одно-

временным повышением или понижением средних значений ($r = 0,61$), а в микроокружении имеется обратная связь ($r = - 0,22$). При повышении концентрации кальция в периферической крови наблюдается ослабление всех существующих корреляционных связей со склонностью к разнонаправленным, отрицательным взаимоотношениям интенсивности люминесценции серотонина и гистамина.

Таблица 20

Корреляционный анализ показателей обеспеченности биогенными аминами селезенки контрольных лабораторных крыс и после употребления соединения кальция

Микроструктуры селезенки	Корреляционные пары					
	С/Г		С/КА		Г/КА	
	Контроль	Опыт	Кон- троль	Опыт	Кон- троль	Опыт
Микроокружение периартериолярной лимфоидной муфты	- 0,21	- 0,35	0,7	0,82	- 0,34	- 0,41
ЛГК герминативного центра	0,61	0,39	0,66	0,67	0,71	0,24
Микроокружение ЛГК герминативного центра	- 0,22	- 0,29	0,78	0,94	- 0,17	- 0,36
ЛГК маргинального синуса	0,46	0,2	0,87	0,95	0,62	0,21
Микроокружение ЛГК маргинального синуса	0,36	- 0,27	0,87	0,98	0,32	- 0,27
ЛГК красной пульпы	- 0,59	- 0,61	0,71	0,84	- 0,82	- 0,38
Микроокружение ЛГК красной пульпы	- 0,24	- 0,27	0,29	0,64	- 0,47	- 0,59

Обозначения. С/Г – корреляционные связи между интенсивностью люминесценции серотонина и гистамина, С/КА – корреляционные связи между интенсивностью люминесценции серотонина и катехоламинов, Г/КА – корреляционные связи между интенсивностью люминесценции гистамина и катехоламинов.

Жирным шрифтом выделены сильные корреляционные связи ($r \geq 0,7$).

Корреляционные связи в паре «гистамин–катехоламины» имеют сходные взаимосвязи с изменениями уровней свечения серотонина и гистамина в структурах селезенки крыс обеих групп. Таким образом, показатели люминесценции гистамина однонаправленно коррелируют как с серотонином, так и с катехоламинами (Таблица 20). Корреляционный индекс между показателями гистамина и катехоламинов имеет наибольшую силу внутри ЛГК, чем в микроокружении. Так, в биоаминсодержащих клетках герминативного центра определяется сильная положительная связь ($r = 0,71$), а в ЛГК маргинального синуса положительная связь средней силы ($r = 0,62$). В пульпарных люминесцирующих гранулярных клетках также выявляется сильная взаимосвязь изменений уровней гистамина и КА, однако она имеет разнонаправленный характер ($r = - 0,82$).

Таким образом, наблюдаются противоположные изменения в содержании биогенных аминов в люминесцирующих гранулярных клетках белой и красной пульпы селезенки при употреблении соединения кальция с питьевой водой, а также разнонаправленные изменения в интенсивности люминесценции биогенных аминов: между гистамином с одной стороны и серотонином с катехоламинами – с другой стороны.

3.4. Анализ концентрации общего кальция в сыворотке крови контрольных и опытных лабораторных крыс

3.4.1. Концентрация общего кальция в сыворотке крови

Основой адекватного воздействия соединения кальция на организм и оценки сопутствующих морфологических изменений в селезенке лабораторных крыс является достоверное повышение концентрации общего кальция в периферической крови (Мирошников С. А. с соавт., 2009; Джигоев И. Г. с соавт., 2013). Для лабораторного подтверждения эффективности употребления и абсорбции хлорида кальция с питьевой водой в течение 60 суток в дозе 235 мг/л в пересчете на кальций нами проведены биохимические анализы с определением концентрации общего

кальция в сыворотке крови лабораторных крыс контрольной и опытной групп до начала и по окончании эксперимента на 60 сутки.

До начала эксперимента концентрация общего кальция в сыворотке крови лабораторных крыс контрольной группы составляла 2,24 – 2,52 ммоль/л ($2,43 \pm 0,007$ ммоль/л). Исходный показатель уровня общего кальция крови крыс, выбранных для прохождения эксперимента в составе опытной группы, находился в пределах от 2,22 ммоль/л до 2,56 ммоль/л и в среднем равен $2,42 \pm 0,009$ ммоль/л.

По окончании сроков эксперимента (на 60 сутки) у всех лабораторных животных обеих групп были повторно проведены биохимические анализы. У крыс, употреблявших чистую питьевую воду, и находившихся на стандартном сбалансированном рационе питания вивария, уровень общего кальция крови не имел значительных вариаций относительно исходных показателей и сохранился на уровне 2,22 – 2,61 ммоль/л ($2,41 \pm 0,01$ ммоль/л).

При употреблении питьевой воды с добавлением хлорида кальция в течение 60 суток у крыс опытной группы концентрация общего кальция варьирует от 2,51 ммоль/л до 3,16 ммоль/л ($2,86 \pm 0,02$ ммоль/л). Таким образом, в модулируемых условиях эксперимента в периферической крови опытной группы лабораторных крыс происходит статистически значимое повышение концентрации общего кальция в крови на $0,41 \pm 0,01$ ммоль/л, что составляет $14,39 \pm 0,69\%$ от исходных значений ($p < 0,008$).

3.4.2. Корреляционные взаимосвязи концентрации общего кальция в сыворотке крови с исследуемыми морфологическими показателями селезенки

Для оценки взаимосвязей между концентрацией общего кальция в крови и представленными в работе морфологическими и иммуногистохимическими изменениями селезенки лабораторных крыс проведено исследование корреляционных связей (Таблица 21). Так, у контрольных животных выявлена прямая сильная кор-

реляционная связь между концентрацией общего кальция в крови и уровнями экспрессии CD4 ($r = 0,78$) и CD20 ($r = 0,72$) на мембранах иммунокомпетентных клеток селезенки. Прямая корреляция средней силы обнаружена между уровнем общего кальция в сыворотке крови и площадью белой пульпы селезенки ($r = 0,37$), уровнями экспрессии пептида Iba-1 ($r = 0,55$), молекул МНС II класса ($r = 0,61$) и CD8 ($r = 0,61$) на мембранах клеток органа. Уровень интенсивности люминесценции биогенных аминов (гистамина, серотонина, катехоламинов) имеет обратную взаимосвязь средней силы с концентрацией общего кальция в крови контрольных животных, что свидетельствует о разнонаправленном изменении средних значений.

Таблица 21

Корреляционные связи между концентрацией общего кальция в крови и морфологическими и иммуногистохимическими показателями селезенки крыс контрольных лабораторных крыс и после употребления соединения кальция

Показатели	Контрольная группа	Опытная группа *
Площадь белой пульпы селезенки	0,37	0,47
Уровень экспрессии Iba-1	0,55	0,79
Уровень экспрессии кальмодулина	0,74	0,91
Уровень экспрессии молекул МНС II класса	0,61	0,76
Уровень экспрессии CD4	0,78	0,83
Уровень экспрессии CD8	0,61	0,63
Уровень экспрессии CD20	0,72	0,78
Уровень люминесценции гистамина	- 0,34	- 0,14
Уровень люминесценции серотонина	- 0,47	- 0,22
Уровень люминесценции катехоламинов	- 0,51	- 0,34

Обозначения. Жирным шрифтом выделены сильные корреляционные связи ($r > 0,7$).

Корреляционные связи статистически значимы: * – $p < 0,05$.

Интересно отметить, прямую сильную корреляционную связь между уровнем кальция в крови и экспрессией внутриклеточного рецептора ионов кальция в

клетках селезенки контрольных крыс ($r = 0,74$), которая достигает практически полной взаимосвязи ($r = 0,91$) в опытной группе, употреблявшей питьевую воду, обогащенную данным макроэлементом.

На фоне моделируемых условий эксперимента происходит увеличение корреляционных взаимосвязей всех исследуемых показателей с уровнем общего кальция в крови: контрольные значения корреляционных индексов с обратной связью снижают силу, а существующие однонаправленные связи становятся более сильными (Таблица 21). Так, уровень экспрессии маркера клеток селезенки моноцитарно-макрофагальной системы (Pba-1) на мембранах в контрольной группе имеет среднюю однонаправленную взаимосвязь с концентрацией общего кальция ($r = 0,55$), которая усиливается на фоне употребления хлорида кальция ($r = 0,79$). Количество антигенпрезентирующих клеток селезенки, экспрессирующих МНС класса II, также имеют прямую корреляционную связь средней силы с уровнем кальция крови ($r = 0,61$), которая на фоне гиперкальциемии становится сильной ($r = 0,76$). Сходные между собой изменения при гиперкальциемии выявляются между экспрессией CD4, CD8, CD20 на клетках органа, где выявлена прямая взаимосвязь с уровнем кальция крови, увеличивающая силу при употреблении макроэлемента с питьевой водой. Отрицательный корреляционный индекс сохраняется лишь в люминесцирующих биоаминсодержащих структурах селезенки крыс опытной группы, однако, следует отметить, что он имеет слабую силу.

Таким образом, подтверждена адекватность моделирования экспериментальной гиперкальциемии у крыс с помощью длительного употребления водного раствора хлорида кальция для последующей морфологической и иммуногистохимической оценки структурных и цитологических изменений селезенки.

ГЛАВА 4. ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ ИССЛЕДОВАНИЯ

Современные исследования доказали, что биоэлементы, ежедневно поступающие в организм с пищей и водой, активно модулируют факторы транскрипции, активацию протоонкогенов и вхождение в клеточный цикл, а также изменяют экспрессии генов цитокинов и иммуноглобулинов и регуляцию апоптоза (Кудрин А. В. с соавт., 2000, 2007; Мартынова Е. А. с соавт., 2001; Оберлис Д. с соавт., 2008; Толмачева Н. В. с соавт., 2011; Klee C. V. et al., 2002; Carafoli E. et al., 2007). Многими отечественными и зарубежными исследователями неоднократно подчеркивалась иммунологические свойства кальция (Скальный А. В. с соавт., 2004; Студеникин В. М. с соавт., 2005; Кудрин А. В. с соавт., 2000, 2007; Ребров В. Г. с соавт., 2008; Дьячкова И. М. с соавт., 2014; Rochet R., 2000; Klee C. V. et al., 2002; Bogeski I. et al., 2011). Известно, что модулирующее действие ионов кальция реализуется на субклеточном, клеточном и межклеточном уровнях взаимодействия. Именно на уровне рецепторов и их сигнальных путей реализуется его влияние на клетки иммунной системы, что в дальнейшем проявляется на уровне межклеточных взаимодействий и на развитии иммунного ответа в целом (Мартынова Е. А. с соавт., 2001; Зинченко В. П. с соавт., 2003). Таким образом, выявление и оценка морфологических, иммуногистохимических изменений органов иммуногенеза и их регуляторных клеток при употреблении соединений кальция – перспективное направление современной клинической медицины.

Практическим значением настоящей работы является исследование важной иммуномодулирующей роли кальция в организме, сопровождающейся адаптационными структурно-функциональными изменениями в селезенке, на примере экспериментальной гиперкальциемии, поскольку на форсированной модели можно выявить изменения в более короткие сроки и с большей наглядностью. По результатам настоящего исследования впервые доказан иммуностропный эффект хлорида кальция, сопровождающийся морфо-функциональной перестройкой селезенки и цитоархитектоники ее иммунокомпетентных клеток. Данное воздействие наблю-

дается параллельно с ранее доказанными клиническими эффектами соединений кальция (Скальный А. В., 2001; Ершова О. Б. с соавт., 2011; Жилиев Е. В. с соавт., 2011; Pochet R., 2000).

Многочисленные экспериментальные исследования доказали, что селезенка активно реагирует адаптивными изменениями в цитологическом строении, морфологической организации и цитоархитектонике при биоэлементных воздействиях: поступлению кремния (Сапожников С. П. с соавт., 2013; Сергеева В. Е. с соавт., 2013; Гордова В. С. с соавт., 2014), хрома (Михайлова И. В. с соавт., 2015), наночастиц меди (Сизова Е. А. с соавт., 2010), золота (Злобина О. В. с соавт., 2011), цинка и железа (Златник Е. Ю. с соавт., 2014).

По результатам данного исследования при поступлении кальция с питьевой водой в срезах селезенки лабораторных крыс наблюдаются реактивные структурные изменения: происходит слияние и объединение соседних лимфоидных узелков, в результате они приобретают полиморфную форму. Реакция белой пульпы селезенки крыс на длительное дозированное воздействие соединения кальция, поступавшего с питьевой водой, заключается в количественном преобладании первичных лимфоидных узелков (66,6%) над вторичными (33,4%), в сравнении с контрольными показателями, где их количество практически равно ($p < 0,04$). Согласно исследованиям Златник Е. Ю. с соавт (2014) в селезенке контрольных мышей также наблюдается равное соотношение лимфоидных узелков с наличием и отсутствием герминативного центра, что не обнаруживает видовых различий у лабораторных животных в данном показателе. Исследования Лебединской О. В. с соавт. (2011) при введении поликомпонентной вакцины Имуновак, в качестве иммуномодулятора бактериального происхождения, обнаружили сходные морфологические изменения со слиянием компонентов белой пульпы селезенки лабораторных крыс.

В ходе настоящего морфологического исследования компоненты белой пульпы без центров размножения выявлены не только на периферии, но в равных количествах локализуются на всей поверхности срезов селезенки опытных жи-

вотных. Согласно данным Григоренко Д. Е. с соавт. (2005) и Мороз Г. А. с соавт. (2010) увеличение количества первичных лимфоидных узелков селезенки свидетельствует о высоком уровне процессов лимфоцитопоэза и бласттрансформации клеток органа. А клинические исследования Суменко В. В. с соавт. (2015) выявили прямую взаимосвязь иммунодефицитного состояния с гиперплазией селезенки. Оценивая данные изменения можно сделать разнонаправленные выводы: либо данные факты свидетельствуют об увеличении пролиферативной активности с развитием первичных лимфоидных узелков, которые часто рассматривают как «резервные» (Cesta M. F., 2006; Ross M. H. et al., 2011; Auerbach A., 2014), либо присутствует обратная тенденция с прекращением развития лимфоидных узелков селезенки на начальных этапах дифференцировки.

Для уточнения направленности изменений проведено морфометрическое исследование структурных компонентов селезенки крыс, которое выявило укрупнение площади лимфоидного аппарата селезенки, а также всех его морфофункциональных структур, за исключением мантийной зоны. Так, площадь, занимаемая первичными и вторичными лимфоидными узелками, увеличивается на 31,5% и 14,5% соответственно ($p < 0,05$). Стаценко Е. А. (2009), отметив подобные морфометрические изменения селезенки лабораторных животных при введении бисфосфоната, оценила их как проявления гиперфункции данного органа.

Нами определено соотношение белой к красной пульпе. При употреблении соединения кальция площадь красной пульпы в срезе снижается на 25,4% ($p < 0,002$) и соотношение возрастает до $1:3,11 \pm 0,42$, в сравнении с контрольными значениями $1:4,71 \pm 0,38$ ($p < 0,05$). В работе Шевцова А. Р. с соавт. (2006) зарегистрирован показатель контрольных соотношений белой и красной пульпы крыс равный 1:1,87, а при синдроме длительного сдавливания его сокращение в 6,3 раза до 1:11,78. Гиперплазия белой пульпы селезенки крыс также отмечается при других воздействиях: при гиперчувствительности замедленного типа, проявляющейся хроническим иммунным воспалением (Макалиш Т. П., 2013), а также при иммуностимуляции тимическими гормонами (Бобрышева И. В., 2013). При

тяжелой патологии внутренних органов обнаружена противоположная реакция с уменьшением площади белой пульпы при увеличении доли красной пульпы (Макалиш Т. П., 2013). Нами обнаружено увеличение средней площади герминативных центров селезенки крыс в ответ на длительное употребление соединения кальция в 1,24 раза ($p < 0,03$). На основании научных данных, полученных другими исследователями, сходными изменениями селезенка крыс реагирует на употребление иммуномодуляторов (гистаната в дозе 0,15 г), индометацина, левамизола и тимических гормонов, сопровождающиеся гиперплазией В-зависимых зон (Макалиш Т. П., 2013). Представленные данные подтверждают, что селезенка активно реагирует структурными изменениями на экзогенные факторы. В нашем исследовании и в работе Шевцова А. Р. с соавт (2006) выявлена отрицательная корреляция между площадью белой и красной пульпы в норме и при экспериментальных воздействиях, которая объясняется необходимостью поддержания гомеостаза между данными гистологическими структурами.

Согласно литературным данным (Макалиш Т. П., 2013), селезенка лабораторных крыс обеих групп относится к метаболическому (депонирующему) типу, в связи с преобладанием красной пульпы. Однако на фоне обогащения рациона кальцием наблюдается тенденция к функциональной перестройке органа с преобладанием иммунных процессов, что можно расценивать как субстрат для активации иммунного ответа, протекающего в селезенке. Учитывая, что у грызунов миелопролиферативная функция селезенки сохраняется на протяжении всей жизни (Боков Д. А. с соавт., 2014), можно предположить снижение процессов кроветворения как реакция на экспериментальную гиперкальциемию.

Полученные морфологические изменения белой пульпы селезенки свидетельствуют о активации процессов миграции, пролиферации и дифференцировки иммунокомпетентных клеток органа при употреблении хлорида кальция с питьевой водой.

Отличительной характеристикой микроструктур селезенки опытной группы является визуально и морфометрически более выраженная маргинальная зона

лимфоидных узелков, которая занимает практически половину общей площади лимфоидного узелка. Сходные морфологические реакции маргинальной зоны селезенки крыс отмечены Злобиной О. В. с соавт. (2011) при введении наночастиц золота на 15-е сутки, Гербут А. О. (2007) при однократной антигенной стимуляции на 30-е сутки эксперимента, Сизовой Е. А. с соавт. (2010) при введении наночастиц меди. Стежка В. А. с соавт. (2004) в своих работах дали описание увеличения площади маргинальной зоны селезенки крыс после воздействия катионов свинца и отсутствие иммунологической реакции селезенки на введение кадмия. Известно, что маргинальная зона совместно с одноименным синусом, отделяющим ее от мантийной зоны, обеспечивает кооперативные взаимодействия Т- и В-лимфоцитов (Бобрышева И. В., 2013), их антегензависимую дифференцировку и антигенную презентацию на поверхность специализированных макрофагов (Кузнецова Е. П. с соавт., 2013; Meda V. A. et al., 2003; Kraal G. et al., 2006). Таким образом, исследования последних лет доказывают способность биоэлементов оказывать иммуностропное влияние на селезенку, в том числе на процессы активации макрофагов маргинальной зоны органа. А увеличение площадей маргинальной зоны и периартериолярной лимфоидной муфты селезенки свидетельствует об активации миграции рециркулирующего пула Т- и В-лимфоцитов, что обеспечивает стабильность иммунологического состояния организма (Мороз Г. А. с соавт., 2010).

Одной из наиболее значимых систем, определяющих уровень неспецифической резистентности организма, является макрофагальная система. Клетки моноцитарно-макрофагальной системы являются ключевым компонентом иммунного ответа, первыми вступая во взаимодействие с антигеном (Моталов В. Г. с соавт., 2008; Пальцев М. А. с соавт., 2008; Сергеева В. Е. с соавт., 2014; Utans U. et al, 1995; Nakano K. et al., 2001; Kohler C., 2007). В отличие от нейтрофилов, инициирующих только деструктивные процессы, макрофаги многофункциональны: они осуществляют процессинг и презентацию антигенов, регулируют иммунный ответ, оказывая стимулирующий или супрессорный эффект на иммуногенез, в за-

висимости от состояния гомеостаза (Золоедов В. И. с соавт., 2001; Van Rooijen N., 1990; Janeway Ch. et al., 2001; Owen J. et al., 2013). Макрофаги относятся к секреторным клеткам, синтезируя и выделяя более 40 ферментов, монокинов и биологически активных веществ, регулирующих образование других иммунокомпетентных клеток (Dawicki W. et al., 2010; Coico R., 2015). Противоположную направленность синтетической функции фагоцитов составляют деструкция, киллинг и переваривание собственных поврежденных, дефектных, старых клеток, а также клеток, несущих на себе генетически чужеродную информацию (опухолевые клетки и иные мутагены) (Лолор Г.-мл. с соавт., 2000; Песнякевич А. Г., 2008; Хаитов Р. М., 2013; Cochrane C. G. et al., 1996; Coico R., 2015). Так, система моноцитов и макрофагов участвует как в естественном, так и в приобретенном иммунном ответе (Попов Н. Н. с соавт., 2004; Хаитов Р. М., 2013; Abbas A. K. et al., 2014).

В современной работе Волкова В. П. (2015), посвященной разработке нового алгоритма морфометрической оценки иммунного состояния селезенки, предложено определение площади периартериолярной лимфоидной муфты, которая объективно отражает степень выраженности клеточного звена иммунного ответа. Так, в ходе данного исследования зона ПАЛМ селезенки контрольной группы крыс составила 12,9 % от общей площади вторичного лимфоидного узелка. При длительном употреблении хлорида кальция с питьевой водой отмечено увеличение площади, занимаемой ПАЛМ, до 17,6% от общего показателя ЛУ ($p < 0,05$). Известно, что в данной зоне селезенки дендритные клетки способны адсорбировать антигены и передавать Т-лимфоцитам информацию о состоянии микроокружения, стимулируя их бласттрансформацию и пролиферацию. Активированные Т-лимфоциты задерживаются в периартериальной зоне в течение 2–3 суток, где они размножаются, а затем мигрируют в синусы краевой зоны через гемокапилляры (Кузнецова Е. П. с соавт., 2013).

Научный интерес для морфологов имеет факт о превышении тканевого пула клеток моноцитарно-макрофагальной системы в 25 раз их количества в кровенос-

ном русле (Platten M., 2003; Abbas A. K. et al., 2014). А по мнению ряда исследователей, селезенка занимает третье место по количественному содержанию макрофагов – около 15%, наибольшие показатели зарегистрированы лишь в печени (56,4%) и легких (14,9%) (Чеснокова Н. П. с соавт., 2006). Тканевым макрофагам селезенки отводится ведущая роль в переработке антигена, образовании высокоиммуногенных фракций антигена, индукции иммунного ответа (Чеснокова Н. П. с соавт., 2006; Хаитов Р. М., 2013; Owen J. et al., 2013). Для комплексной оценки клеток моноцитарно-макрофагального происхождения селезенки крыс в норме и при экспериментальной гиперкальциемии проведено иммуногистохимическое исследование с антителами к белку Iba-1, который является маркером клеток данного типа (Кирик О. В. с соавт., 2010; Дьячкова И. М. с соавт., 2014; Ahmed Z. et al., 2007; Langhi L. G. et al., 2015; Meyerholz D. K. et al., 2015). Важно отметить, что Iba-1 рассматривают в качестве кальций-связывающего пептида, который участвует в регуляции процесса фагоцитоза у макрофагов и микроглиоцитов (Platten M., 2003; Ahmed Z. et al., 2007). Поэтому научный интерес представляет изучение реакции Iba-1-позитивных структур селезенки при употреблении соединения кальция.

Ранее иммуноцитохимическую реакцию для выявления белка Iba-1 применяли для маркировки активированной микроглии в ЦНС (Кирик О. В. с соавт., 2010; Platten M., 2003). Однако в течение последних двух лет данный маркер идентифицирован Дьячковой И. М. с соавт. (2014) и Langhi L. G. et al. (2015) в тимусе, Meyerholz D. K. et al. (2015) – в легких, а Norden D. M. et al. (2015) – в печени и почках экспериментальных животных. Зарубежные исследователи также идентифицировали Iba-1 в макрофагах маргинальной зоны и красной пульпы селезенки крыс (McGaha T. L. et al., 2011).

По результатам наших исследований экспрессия Iba-1 выявлена в клетках всех структурно-функциональных зон селезенки контрольных лабораторных животных и после употребления соединения кальция с питьевой водой. Максимальная концентрация Iba-1-позитивных клеток зарегистрирована: в красной пульпе –

39,4% и 46,8% от всех идентифицированных клеток с Iba-1 в органе в контрольных и опытных значениях; и вдоль маргинального синуса со сконцентрированными вокруг него макрофагами и моноцитами – 27,4% и 31,3% соответственно. Согласно литературным данным, именно данные зоны селезенки богаты макрофагами, которые различны по своей функции (Раковщик А. Л. с соавт., 2002; Korkusuz P. et al., 2002; Cesta M. F., 2006; Ruddle N. H. et al., 2009). Так, моноциты красной пульпы, дифференцирующиеся впоследствии в макрофаги, принимают участие в деструкции форменных элементов крови (Алексеев Л. П. с соавт., 2010; Mebius R. E. et al., 2005; Randall T. D. et al., 2008). Сходные иммуногистохимические результаты обнаружены Pashenkov M. et al. (2000) с преимущественной локализацией Iba-1-реактивных клеток в красной пульпе селезенки и минимальным их количеством в других структурах органа. Макрофаги маргинальной зоны лимфоидных узелков селезенки являются специализированными антигенпрезентирующими клетками, принимающие участие в опсонизации антигенных комплексов и регуляции иммунного ответа (Раковщик А. Л. с соавт., 2002; Meda V. A. et al., 2003; Kraal G. et al., 2006; McGaha T. L. et al., 2011). А благодаря узкому магимальному синусу и низкой скорости кровотока в нем, данная зона является «живым фильтром», где происходит контроль над обменом форменных элементов крови между белой и красной пульпой, а также накопленными в маргинальном синусе поврежденными клетками и антигенами крови (Данилов Р. К., 2010). Следовательно, происходит повышение активности моноцитарно-макрофагальной системы органа, антигенной презентации и контроля за состоянием форменных элементов крови в данных структурах при экспериментальной гиперкальциемии.

Внутри остальных функциональных зон белой пульпы контрольных животных исследуемые клетки обнаруживаются в относительно равных пропорциях: в периартериолярных лимфоидных муфтах, герминативных центрах и мантийной зоне – по 13,1%, 11,9% и 8,2% от всех идентифицированных клеток с Iba-1 в органе соответственно. При употреблении соединения кальция с питьевой водой макрофаги исследуемых структур отвечают сокращением численности на 1,1% – 7,6%

($p < 0,05$). Установленные нами изменения можно трактовать как снижение их участия в регуляции иммунного ответа, поскольку моноцитарно-макрофагальное звено вышеуказанных зон органа играют в нем важную роль. Так, отростки макрофагов периартериолярных муфт способны вытягиваться на значительное расстояние между окружающими их лимфоцитами и плотно контактировать с ними, передавая информацию о состоянии микроокружения и стимулируя их деление (Кузнецова Е. П. с соавт., 2013; Cesta M. F., 2006). Известно также, что в герминативном центре и мантийной зоне селезенки нередко можно обнаружить скопления макрофагов с фагоцитированными лимфоцитами (Кузнецова Е. П. с соавт., 2013; Maekawa T. et al., 2010; Auerbach A., 2014).

Интересно, что параллельно с количественными изменениями происходит увеличение площади Iba-1-положительных клеток селезенки опытных крыс на $7,07 \pm 0,5\%$: с $97,76 \pm 3,01 \text{ мкм}^2$ до $104,5 \pm 3,23 \text{ мкм}^2$ ($p < 0,05$). Согласно морфометрическим данным последних лет Огородниковой Т. Л. с соавт. (2014) средняя площадь макрофагов в норме составляет $96,2 \pm 4,9 \text{ мкм}^2$, что подтверждает полученные нами данные. Таким образом, при сравнительном анализе отмечается реактивность макрофагальной системы органа с изменением цитоархитектоники, увеличением уровня экспрессии и площади Iba-1-позитивных клеток в ответ на гиперкальциемию.

Современная морфология и иммунология рассматривает в качестве основы прогнозирования течения и исхода физиологических и патологических процессов математическое моделирование, которое позволяет с большой объективностью и информативностью выявить общие закономерности иммунного ответа, включая его динамику, интенсивность и направленность. Одной из последних математических моделей функционирования иммунной системы предложена Стручко Г. Ю. с соавт. (2002), где в качестве меры взаимной зависимости двух величин авторами использовался коэффициент корреляции. В ходе настоящего исследования выявлена сильная прямая корреляционная связь уровней экспрессии маркера клеток макрофагального звена Iba-1 и концентрацией общего кальция в периферической

крови. Полученный факт имеет подтверждение научными литературными данными о рассмотрении молекулы Iba-1 в качестве кальций-связывающего пептида (Ohsawa K. et al., 2000; Platten M., 2003; Ahmed Z. et al., 2007). На фоне употребления питьевой воды, обогащенной кальцием, происходит достоверное повышение уровня экспрессии маркера моноцитарно-макрофагальной системы селезенки крыс на $25,8 \pm 1,78\%$ и достигает $17,11 \pm 0,27\%$ через 60 суток эксперимента ($p < 0,05$) при усилении ее прямой корреляционной взаимосвязи с концентрацией общего кальция в крови с $r = 0,55$ до $r = 0,79$.

При постановке иммуногистохимической реакции с поликлональными антителами к Iba-1 нами выявлено неоднородное коричневое окрашивание цитоплазмы позитивных структур селезенки, что подтверждает литературные данные о внутриклеточной, цитоплазматической локализации рецепторов к Iba-1 (Федорова Е. А. с соавт., 2008; Meyerholz D. K. et al., 2015). Iba-1-положительные клетки селезенки обеих групп экспериментальных животных имеют длинные отростки, которые расположены в узких межклеточных пространствах. Характерная морфология исследуемых структур подтверждает литературные данные о присутствии рецепторов к пептиду Iba-1 на клетках моноцитарно-макрофагальной системы (Кирик О. В. с соавт., 2010; Langhi L. G. et al., 2015; Meyerholz D. K. et al., 2015; Norden D. M. et al., 2015).

При иммуногистохимическом исследовании в сочетании с морфометрическим и статистическим анализом установлено, что на фоне употребления питьевой воды, обогащенной кальцием, происходит усиление активности клеток селезенки крыс моноцитарно-макрофагальной системы. Ученые по оценке влияния водного рациона на иммунную систему Григоренко Д. Е. с соавт. (2005) выявили сходные изменения в органе при употреблении питьевой воды, очищенной от дейтерия.

Известно, что макрофаги играют существенную роль в адаптивных процессах при многих состояниях. Так, макрофаги фенотипа M1 являются эффекторными клетками иммунного ответа Т-хелперов 1-го типа, способными разрушать

микробы и опухолевые клетки и продуцировать провоспалительные цитокины (Ellmeier W. et al., 1999; Abbas A. K. et al., 2014; Coico R. et al., 2015). Макрофаги фенотипа M2, ассоциированные с Т-хелперами 2-го типа, напротив, ограничивают воспалительную реакцию (Сахаров В. Н. с соавт., 2015; Utans U. et al., 1995; Germain R. N. et al., 2002). Современные исследования Сахарова В. Н. с соавт. (2015) свидетельствуют, что повышение активности макрофагальной системы способствует как усилению защитных механизмов с последующей реконвалесценцией, так и неблагоприятному течению заболевания с хронизацией и усилению воспалительного процесса. Поэтому конкретные функции макрофагов зависят от тканевого микроокружения, следовательно, требуется комплексная оценка многокомпонентного каскада цитологических изменений селезенки при поступлении соединения кальция с питьевой водой.

В настоящее время различные аспекты функционирования фагоцитарной системы интенсивно изучаются. Особое внимание уделяется молекулярным механизмам активации макрофагальной системы. Научные данные свидетельствуют об антигенной презентации макрофагов на ранней стадии иммунного ответа с помощью образования комплекса с молекулой МНС II класса (Chervonsky A. V. et al., 1994; Golovkina T. et al., 2001; Owen J. et al., 2013), который, в свою очередь, взаимодействует с CD4⁺ клетками для распознавания антигенной структуры (Farber D. L. et al., 1995; Reinhardt R. L. et al., 2001; Swain S. L. et al., 2006). Экспериментальные исследования позволили также идентифицировать данные белки на мембранах всех антигенпрезентирующих клеток: Т-, В-лимфоцитов, моноцитов и дендритных клеток (Golovkina T. et al., 2001; Owen J. et al., 2013). Для выявления доли клеток макрофагальной системы селезенки, экспрессирующих на поверхности молекулы МНС класса II, которые участвуют в антигенной презентации нами проведено параллельное морфогическое иммуногистохимическое исследование серийных срезов органа крыс. Полученные результаты свидетельствуют, что $16,11 \pm 1,39\%$ всех Iba-1-позитивных клеток селезенки имеют на мембране рецепторы к МНС II класса.

Для комплексной оценки антигенпрезентирующих клеток селезенки крыс в норме и при реакции на экспериментальную гиперкальциемию проведено исследование клеток, содержащими молекулы главного комплекса гистосовместимости II класса на мембране. Уровень экспрессии МНС II на клетках селезенки крыс контрольной группы составил $10,85 \pm 0,23\%$, а после употребления экспериментальными крысами воды, обогащенной кальцием увеличился до $14,33 \pm 0,18\%$ ($p < 0,02$). Согласно литературным данным, в селезенке МНС II класса способны экспрессировать моноциты, макрофаги, дендритные клетки, интердигитирующие клетки, а также В-лимфоциты при взаимодействии с Т-хелперами (Тотолян А. А. с соавт., 2000; Гордова В. С. с соавт., 2014). Современные исследования зарубежных ученых Kleiman E. et al. (2015) установили контрольные значения уровня экспрессии МНС II класса в структурах селезенки лабораторных крыс в пределах $8,05 - 19,44\%$. Полученные нами данные показатели находятся в установленных пределах и подтверждают зарубежные источники. Отечественными исследователями на настоящий момент не уточняются конкретные цифровые данные по экспрессии МНС II класса в органах иммунной системы. Однако в клетках головного мозга этот показатель определен и достигает максимальных значений по мере увеличения степени зрелости органа – $0,72 \pm 6,02\%$ (Любич Л. Д. с соавт., 2010).

Важно отметить, что более половины всех идентифицированных МНС II-положительных клеток селезенки крыс выявлено вдоль маргинальных синусов, опоясывающих лимфоидные узелки: контрольная группа – $56,9\%$, опытная группа – $63,7\%$. Около трети всех клеток селезенки с молекулами МНС II расположены в красной пульпе, часто концентрируясь группами около соединительнотканых трабекул органа: контрольная группа – $36,3\%$, опытная группа – $27,1\%$. Внутри остальных морфо-функциональных зон данные клетки единичны или отсутствуют. Известно, что хорошо развитая макрофагальная система маргинальной зоны лимфоидных узелков селезенки является специализированной областью антигенной презентации, в которой также происходит антигензависимая дифференцировка иммунокомпетентных клеток (Раковщик А. Л. с соавт., 2002; Meda B. A. et al.,

2003; Kraal G. et al., 2006; McGaha T. L. et al., 2011). Полученные нами данные о преимущественной локализации клеток селезенки, экспрессирующих МНС II класса на мембране, обоснованы функциональными особенностями и сложной зональностью данного органа иммуногенеза (Нестерова А. А. с соавт., 2006; Рябикина А. И. с соавт., 2008; Златник Е. Ю. с соавт., 2014; Cesta M. F., 2006; Auerbach A., 2014).

Современные исследователи в области биоэлементологии установили, что кальций не способен выступать в качестве полноценного антигена, однако при взаимодействии с белками и нуклеиновыми кислотами способствует усилению многоточечности контакта антигена с МНС II класса на клетках моноцитарно-макрофагального ряда (Кудрин А. В. с соавт., 2007; Carafoli E. et al., 2007; Alonso M. T. et al., 2011).

На фоне употребления соединения кальция происходит перераспределение МНС II-реактивных клеток селезенки с увеличением их количества в маргинальной зоне, повышением уровня экспрессии МНС II класса и укрупнением средней площади антигенпрезентирующих клеток на $6,63 \pm 0,82\%$ ($p < 0,05$). Полученные морфологические и морфометрические изменения можно трактовать, как усиление активности антигенной презентации на мембранах специализированных клеток (макрофагов, дендритных клеток, В-лимфоцитов), что является субстратом для индукции иммунного ответа на антигены крови. Данное заключение основано на важнейшей функции молекул главного комплекса гистосовместимости II класса, связанной с обеспечением взаимодействия между Т-лимфоцитами и антигенпрезентирующими клетками в процессе иммунного ответа. Поскольку Т-хелперы распознают чужеродный антиген лишь после его переработки макрофагами, соединения с антигенами МНС класса II и появления данного комплекса на поверхности АПК (Ноздрачев А. Д. с соавт., 2002; Fung-Leung W. P. et al., 1996; Gavin M. A. et al., 2002; Coico R., 2015).

Исследования Гордовой В. С. с соавт. (2014) подтверждают, что антигенпрезентирующие клетки селезенки активно реагируют на изменение биоэлементного

баланса организма увеличением количества при поступлении водного раствора метасиликата натрия. Дьячковой И. М. с соавт. (2014) было установлено увеличение количества и сокращение площади клеток, экспрессирующих МНС II класса, в кортикомедулярной зоне долек тимуса крыс в аналогичных экспериментальных условиях – при употреблении хлорида кальция с питьевой водой. Экспериментальное моделирование Артемьевой И. Л. с соавт. (2012) дефицита мужских половых гормонов у крыс выявило увеличение количества МНС II-позитивных клеток тимуса. Полученные результаты были интерпретированы исследователями как признак активации иммунных процессов.

Таким образом, доказано, что антигенпрезентирующие клетки селезенки могут рассматриваться в качестве морфологической основы адаптационных физиологических реакций. И по результатам наших исследований изменение их морфофункциональных характеристик находится в прямой корреляционной зависимости от концентрации кальция в сыворотке крови, которая усиливается после обогащения рациона кальцием: контрольная группа – $r = 0,61$, опытная группа – $r = 0,76$.

Многочисленные современные исследования посвящены изучению внутриклеточных (эндогенных) регуляторных пептидов, принимающих участие практически во всех цитологических взаимодействиях и обменных процессах с активацией ферментных систем (Гомазков О. А., 1999; Сокол А. В. с соавт., 2012; Goldstein J. S. et al., 2000). На настоящий момент доказаны два их основных свойства: 1) регуляторный эффект, который обусловлен присоединением пептидов к рецепторам клеточных мембран и служит сигналом к инициации или прекращению биохимической реакции; 2) тропность к определенному органу, ткани или типу клеток (Krantic S., 2000; Golovkina T. et al., 2001). Электронная микроскопия в сочетании с иммуногистохимическими исследованиями позволила определить локализации внутриклеточных регуляторных пептидов: мембранную, ядерную и цитоплазматическую (Krantic S., 2000). Проанализировав научные источники, были установлены внутриклеточные локализации изучаемых в нашей работе ре-

гуляторных пептидов. Так, маркер макрофагов и микроглии пептид Iba-1 (Федорова Е. А. с соавт., 2008; Langhi L. G. et al., 2015; Meyerholz D. K. et al., 2015; Norden D. M. et al., 2015) и внутриклеточный регулятор ионов кальция (кальмодулину) расположены внутри цитоплазмы позитивных клеток (Пермяков Е. А., 1993; Colbran R. J., 2004; Mukunda L. et al., 2014). Молекулы МНС класса II имеют мембранную локализацию (Goldstein J. S. et al., 2000; Farber D. L. et al., 1995; Golovkina T. et al., 2001).

Современные зарубежные исследования свидетельствуют, что ионы кальция способны проявлять свои внутриклеточные функции через ассоциацию с различными кальций-связывающими белками (Airaksinen M. S. et al., 1997; Burgoyne R. D. et al., 2001; Murray G. et al., 2001; Carafoli E. et al., 2007; Alonso M. T. et al., 2011; Prell T. et al., 2013; Mukunda L. et al., 2014). На настоящий момент известно, что по мере дифференцировки в клетках образуется набор кальций-связывающих белков, в состав которых входят кальмодулин, фодрин, кальдесмон (Murray G. et al., 2001), легкие цепи миозина, тропонин С, парвальбумины, пептиды Iba-1 и S-100 (Пермяков Е. А., 1993; Burgoyne R. D. et al., 2001; Klee C. V. et al., 2002; Alonso M. T. et al., 2011; Domínguez D. C. et al., 2014). Американскими учеными Murray G. et al. (2001) кальмодулин идентифицирован в эпителиальных клетках тонкого и толстого кишечника крыс. В продолжение данного исследования Покровским В. М. с соавт. (2011) сформулировано утверждение об индукции синтеза кальций-связывающего белка в стенке кишечника кальцитриолом (активной формой витамина D₃), что способствует обратному всасыванию кальция в эпителиальные клетки органа и развитию гиперкальциемии. Нами зарегистрированы активные изменения плотности продукта иммуногистохимической реакции с антителами к кальмодулину в селезенке крыс на фоне экспериментальной гиперкальциемии, что свидетельствует об увеличении концентрации данного кальций-связывающего пептида.

Кальмодулин рассматривают как необходимый медиатор действия ионов кальция в Ca²⁺-зависимых внутриклеточных процессах: при повышении концен-

трации кальция КМ связывает их, что вызывает конформационное изменение молекулы КМ (Colbran R. J. et al., 2004). В основе регуляторного действия кальмодулина лежит сбалансированное изменение внутриклеточной концентрации катиона кальция, являющееся результатом функционирования сложной сети мембранных и транспортирующих систем (Carafoli E. et al., 2007; Bogeski I. et al., 2011). Ohsawa K. et al. (2000) в своей работе по установлению молекулярных путей поступления ионов кальция в клетку, экспериментально доказали, что оба регуляторных пептида, исследуемых в нашей работе – Iba-1 и кальмодулин (КМ) – активно участвуют во внутриклеточном транспорте кальция. Причем Iba-1 является кальций-связывающей адапторной молекулой, а кальмодулин рассматривается как внутриклеточный рецептор ионов кальция. Наблюдения данных авторов также выявили, что комплексное участие двух данных регуляторных белков в транспорте макроэлемента в клетку имеют большую аффинность и сродство с ионами кальция, чем каждый по отдельности.

Изучение роли кальция и кальций-связывающих белков в регуляции иммуноопосредованных механизмов селезенки на фоне обогащения водного рациона кальцием необходимо для понимания молекулярных основ функционирования регулирующих систем макроэлементного баланса, согласно современным представлениям. Для проведения полной оценки изменений пептидов, участвующих во внутриклеточном транспорте кальция, проведено иммуногистохимическое исследование с использованием моноклональных антител к кальмодулину.

В ходе нашей работы экспериментально установлено, что $10,23 \pm 0,23\%$ клеток селезенки контрольных лабораторных крыс используют в качестве внутриклеточной транспортной системы ионов кальция пептид кальмодулин. А при употреблении питьевой воды, обогащенной данным макроэлементом, и формирования гиперкальциемии происходит достоверное повышение уровня экспрессии кальмодулина на $42,0 \pm 1,39\%$, достигая $17,7 \pm 0,27\%$ ($p < 0,05$).

Обнаружено, что около половины всех идентифицированных клеток, содержащих внутриклеточный рецептор ионов кальция, располагаются в красной

пульпе селезенки контрольных (55,1%) и опытных (42,7%) крыс. Третья часть КМ-позитивных клеток выявлена в маргинальной зоне органа (24,7% и 32,9% в контрольной и опытной группе соответственно). В мантийной зоне лимфоидных узелков количество клеток с данным пептидом значительно меньше (13,5% и 22,4%). Единичными КМ-позитивные клетки локализуются внутри герминативных центров белой пульпы контрольных крыс (6,7%), а после употребления соединения кальция они встречаются более реже (2,0%) ($p < 0,05$). Таким образом, преимущественно клетки красной пульпы и маргинальной зоны белой пульпы селезенки крыс имеют внутриклеточные рецепторы ионов кальция в форме белка кальмодулина, как молекулярный субстрат регуляции уровня макроэлемента внутри клеток. Зафиксировано, что клетки селезенки реагируют на экспериментальную гиперкальциемию перераспределением КМ-позитивных клеток в структурах органа в пределах 4,7–12,4%.

По результатам исследования установлено, что клетки периартериолярной лимфоидной муфты селезенки всех исследуемых животных не содержат данный белок и являются кальмодулин-негативными. Следовательно, внутриклеточный транспорт ионов кальция в данной зоне селезенки происходит иными путями: с помощью Ca^{2+} -каналов, либо при участии других представителей суперсемейства кальций-связывающих пептидов (Alonso M. T. et al., 2011; Bogeski I. et al., 2011; Mukunda L. et al., 2014). Одним из возможных механизмов, лежащих в основе эффективного функционирования комплекса кальций-связывающих пептидов, может быть различное их сродство к ионам кальция, позволяющее регулировать определенные белки-мишени в различных диапазонах цитоплазматической концентрации кальция, либо посредством различных участков связывания (Зерний Е. Ю. с соавт., 2011).

Доказано, что кальмодулин высоко чувствителен даже к небольшим колебаниям уровня кальция в клетках (Ohsawa K. et al., 2000; Pei X. et al., 2014; Ghosh A. et al., 2015). Результаты, проведенного нами, корреляционного анализа подтвердили данный факт, выявив тесную прямую взаимосвязь уровня экспрессии каль-

модулина в клетках селезенки крыс с концентрацией общего кальция крови ($r = 0,74$), усиливающуюся практически до полной связи на фоне употребления кальция с питьевой водой ($r = 0,91$).

Сложное строение структурных компонентов селезенки, включающие периартериоллярные лимфоидные муфты, являющиеся тимусзависимыми образованиями, и лимфоидные узелки с наличием как Т-, так и В-зон, создает благоприятные условия для оценки кооперации клеток при иммунном ответе (Кашенко С. А. соавт., 2013; Korkusuz P. et al., 2002; Kraus M. D. et al., 2003; Mebius R. E. et al., 2005; Auerbach A., 2014). Выявленная нами в ходе эксперимента морфологическая перестройка белой пульпы селезенки крыс свидетельствует об активации процессов миграции и дифференцировки иммунокомпетентных клеток. Однако для окончательного представления иммуногенеза в селезенке необходимо исследовать изменения популяций Т- и В-лимфоцитов в этом органе. Комплексная оценка клеточного и гуморального звеньев иммунитета при параллельном морфологическом исследовании позволяет оценить изменения активности иммунного ответа селезенки при употреблении соединения кальция и имеет важное практическое значение.

Большой интерес представляет тот факт, что CD4 клеток мышей, крыс, кроликов имеют аналогичное строение и высокую гомологию с CD4 клеток человека (более 50%), особенно в цитоплазматическом участке молекулы (Liu J., 2001; Gavin M. A. et al., 2002). Этот факт определяет практическую значимость и возможность применения данного исследования в области медицины.

Уровень экспрессии CD4 в клетках селезенки крыс, употреблявших чистую питьевую воду, равен $12,53 \pm 0,57\%$. Причем более половины всех идентифицированных нами CD4-позитивных клеток селезенки контрольных крыс зафиксировано в красной пульпе – 4,6%. В маргинальной зоне данной группы животных выявляются лишь 19,0% CD4-реактивных клеток. Таким образом, иммунокомпетентные клетки данного типа располагаются в непосредственной близости к сосудистому руслу селезенки – пульпарным артериям и маргинальному синусу –

месту поступления циркулирующих иммунных клеток из периферической крови в орган.

При употреблении питьевой воды, насыщенной кальцием, увеличивается экспрессия маркеров клеток с Т-хелперной активностью на $4,69 \pm 1,11\%$ и составляет $15,93 \pm 0,36\%$ ($p < 0,04$), а также происходит перераспределение $CD4^+$ клеток селезенки крыс с увеличением их количества в маргинальной зоне органа ($24,9\%$) и сокращением – в красной пульпе до $37,4\%$ ($p < 0,05$). Данные изменения свидетельствуют о наличии миграции $CD4^+$ клеток селезенки в маргинальную зону, где, согласно многочисленным исследованиям, располагаются Т-лимфоциты и происходит антигензависимая дифференцировка и пролиферация $CD4$ -позитивных клеток при первичном контакте с чужеродной молекулой (Kronin V. et al., 2001; Liu J., 2001; Steiniger B. et al., 2001; Swain S. L. et al., 2006; McGaha T. L. et al., 2011). Следовательно, наблюдается активация иммунного ответа селезенки на антигены крови с сопутствующим повышением антигензависимой дифференцировки Т-хелперного звена.

Известно, что кластер дифференцировки $CD4$ способны экспрессировать на своей мембране многие иммунокомпетентные клетки: зрелые Т-лимфоциты, тимоциты, моноциты, макрофаги, клетки Лангерганса, дендритные клетки (Ялалетдинова Л. Р. с соавт., 2013; Farber D. L. et al., 1995; Kamiński P. et al., 2000; Abbas A. K. et al., 2014). Для исследования цитологических основ иммунного ответа селезенки предпринята попытка определить принадлежность $CD4$ -позитивных клеток к различным популяциям. Интересно отметить различность цитологических популяций $CD4$ -позитивных клеток селезенки в белой и красной пульпе. Так, преобладающая доля $CD4^+$ клеток красной пульпы селезенки крыс мелкие, светло-коричневые, правильной округлой формы, без гранул. Данная морфология и локализация сходна с описанием в научной литературе зрелых циркулирующих Т-лимфоцитов, около 65 % которых относится к Т-хелперам (Kamiński P. et al., 2000; Germain R. N., 2002; Swain S. L. et al., 2006). В лимфоидных узелках селезенки крыс экспериментальных групп преобладают крупные,

округлые, с центрально расположенным круглым базофильным ядром, без видимых гранул и светло-коричневым продуктом реакции CD4-реактивные клетки, что соответствует описанию больших лимфоцитов, представленному в литературе (Воробьев А. И., 2005; Быков В. Л. с соавт., 2011; Kumar G. L. et al., 2011). Большие лимфоциты располагаются преимущественно лишь в лимфоидной ткани, где они являются активно делящимися формами развивающихся клеток лимфоидного ряда – лимфобластами или иммунобластами (Быков В. Л., 2011; Хаитов Р. М., 2013). Быков В. Л. (2011) также отмечает, что лимфоциты, сходные морфологически, могут выполнять неодинаковые функции и различаются экспрессией маркеров на своей поверхности, выявляемых специфическими иммуноцитохимическими методами. Не менее распространены крупные, с эксцентрично расположенным округлым ядром, гранулами и отростками, с темно-коричневым продуктом реакции CD4-позитивные клетки белой пульпы селезенки лабораторных крыс. Согласно иммуногистохимическим исследованиям периферических органов иммуногенеза Kronin V. et al. (2001) соответствующую морфологию имеют дендритные клетки, экспрессирующие на своей мембране CD4. Основной функцией дендритных клеток селезенки является антигенная презентация Т-лимфоцитам в комплексе с МНС I или МНС II классов, а также контроль за их дифференцировкой, регуляция активации и супрессии иммунного ответа (Wang Y. et al., 2002; Ueno H. et al., 2007).

Средняя площадь CD4-иммунореактивных клеток селезенки контрольных крыс равна $76,9 \pm 3,52$ мкм², которая остается стабильна после регулярного употребления соединения кальция в течение 60 суток – $78,0 \pm 2,09$ мкм² ($p < 0,05$). Согласно морфометрическим исследованиям Сладковой Е. А. с соавт. (2013) средняя площадь лимфоцитов находится в пределах $78,5 \pm 1,2$ мкм². А поскольку основная доля идентифицированных нами CD4⁺ клеток селезенки экспериментальных крыс (60,3% – 73,3%) имеет средние размеры с учетом вариационной кривой – 35,8 – 99,5 мкм², соответственно, имеется основание отнести их к лимфоцитарному пулу.

Интересно отметить, что на фоне гиперкальциемии у крыс количество клеток селезенки с Т-хелперной активностью в периартериолярной лимфоидной муфте увеличивается на 6,5% ($p < 0,009$). А на основании того, что данная зона относится к тимусзависимой области селезенки и 75% ее клеточного состава составляют $CD4^+$ клетки, и лишь 25% – $CD8^+$ клетки (Ellmeier W. et al., 1999; Swain S. L. et al., 2006), следует сделать вывод, при употреблении соединения кальция наблюдается усиление антигензависимой пролиферации и дифференцировки Т-лимфоцитов, экспрессирующих $CD4$.

Известно, что цитотоксические Т-лимфоциты ($CD8^+$) находятся под контролем и регуляцией Т-хелперной системы ($CD4^+$) (Ноздрачев А. Д. с соавт., 2002; Ellmeier W. et al., 1999; Germain R. N., 2002). В рамках комплексной оценки компонентов клеточного звена иммунитета селезенки крыс в норме и при употреблении соединения кальция проведено иммуногистохимическое исследование $CD8$ -позитивных структур органа. Цитотоксические Т-лимфоциты, как и Т-хелперы, селезенки лабораторных крыс концентрируются вокруг пульпарных артерий, маргинальных синусов и соединительнотканых трабекул с одноименными сосудами. Обобщая цитоархитектоническую организацию $CD4^+$ и $CD8^+$ Т-лимфоцитов обеих экспериментальных групп, можно ее определить как сопровождающую всю богатую сосудистую сеть органа, кроме центральных артериол внутри лимфоидных узелков. Внутри компонентов белой пульпы $CD8^+$ клетки встречаются единично, кроме маргинальной зоны с плотным расположением идентифицируемых клеток около маргинального синуса.

Уровень экспрессии Т-хелперов более активно отвечает на экспериментальные условия с увеличением количества $CD4$ -позитивных клеток селезенки на $4,69 \pm 1,11\%$. Экспрессия цитотоксических Т-лимфоцитов органа под действием питьевой воды, обогащенной кальцием, повышается лишь в пределах $1,63 \pm 0,57\%$. Как следствие, на фоне повышения концентрации общего кальция в периферической крови наблюдается индукция клеточного иммунитета селезенки с повышением иммунорегуляторного индекса (ИРИ) на $10,46 \pm 4,27\%$ –

с $1,28 \pm 0,03$ до $1,43 \pm 0,06$ ($p < 0,03$). Иммунорегуляторный индекс в структурах селезенки ранее изучен не был, однако его определение широко используется в иммунологическом исследовании крови. Установлено, что при адекватном иммунном ответе ИРИ (CD4/CD8) крови находится в пределах 1,5–2,5, при гиперактивности – более 2,5, а ИРИ менее 1 свидетельствует об иммунодефиците (Лолор Г.-мл. с соавт., 2000; Попов Н. Н. с соавт., 2004; Хаитов Р. М., 2013; Coico R. et al., 2015). Логично отметить невозможность сопоставления установленных гематологических нормативов на показатели иммунорегуляторного индекса в тканях селезенки, а, следовательно, существует необходимость разработки нормативов гистологических показателей ИРИ. Однако анализ изменений данного показателя выявил его повышение на фоне гиперкальциемии, что свидетельствует об активации иммунного ответа селезенки лабораторных крыс.

Морфометрический анализ выявил увеличение средней площади клеток селезенки, экспрессирующих маркер CD8 на $15,43 \pm 0,81\%$ в ответ на употребление питьевой воды с добавлением хлорида кальция, однако основная доля (71,5% – 72,0%) клеток находится в средних морфометрических границах ($p < 0,03$). Ранжирование цитотоксических Т-лимфоцитов по площади выявило увеличение процентной доли крупных лимфоцитов на 8,4% ($p < 0,02$), составляющих популяцию неактивированных форм (Тукин В. Н., 2007). Следовательно, на фоне экспериментальной гиперкальциемии происходит снижение напряженности иммунитета.

Kronin V. et al. (2001) экспериментально доказал, что CD8⁺ дендритные клетки стимулируют вторичные CD4⁺ лимфоциты. Данный факт объясняет синхронные повышения уровней экспрессии у CD4⁺ и CD8⁺ клеток селезенки крыс на фоне экспериментальной гиперкальциемии. Обратную динамику отметили Paganelli R. et al. (2004) со снижением CD4⁺ и CD8⁺ Т-лимфоцитов у больных синдромом хронической усталости, который в настоящее время рассматривается как проявление иммунной дисфункции.

Биохимические механизмы активации Т-лимфоцитов сложны. Крайне интересно в рамках настоящего исследования уточнить значение ионов кальция в данном иммунологическом механизме. Ноздрачевым А. Д. с соавт. (2002) доказано, что увеличение концентрации ионов Ca^{2+} в иммунокомпетентных клетках активирует различные ферментативные системы, что приводит к стимуляции синтеза РНК, белка и интерлейкина-2, активирующие дифференцировку и пролиферацию Т-лимфоцитарного звена иммунного ответа. Помимо этого подтверждено, что цитотоксические Т-лимфоциты (CD8^+) только в присутствии ионов кальция – Ca^{2+} -зависимым экзоцитозом – способны направленно секретировать белки перфорины и гранзимы для осмотической деструкции клетки-«мишени» (Ноздрачев А. Д. с соавт., 2002; Mason D. Y. et al., 1992; Wang Y. et al., 2002; Coico R. et al., 2015). Проведенный нами корреляционный анализ между концентрацией общего кальция в крови контрольных животных и уровнями экспрессии CD4^+ ($r = 0,78$) и CD8^+ ($r = 0,61$) клеток селезенки крыс выявил прямую сильную и среднюю взаимосвязь. А после употребления соединения кальция с питьевой водой данные связи усиливаются до $r = 0,83$ и $r = 0,63$ соответственно.

Известно, что герминативные центры лимфоидных узелков селезенки служат местом пролиферации В-лимфоцитов и их дифференцировки в плазматические клетки (Афанасьев Ю. И. с соавт., 2012; Волков В. П., 2015; Cesta M. F., 2006). CD20 экспрессирован у человека и крыс только на В-лимфоцитах: как на покоящихся, так и на активированных, но отсутствует на плазматических клетках. По мнению ряда исследователей, CD20 принимает участие в В-клеточной активации и пролиферации (Барсук А. В. с соавт., 2013; Bourget I. et al., 1993; Janas E. et al., 2005; Jain P. et al., 2013).

Актуальным для данного исследования является тот факт, что в клетках Jurkat (линия клеток с подавленным апоптозом и, как следствие, неограниченным количеством делений при благоприятных условиях обитания), трансфицированных геном CD20 , который непосредственно регулирует вход кальция в цитоплаз-

му (Nutt L. K. et al., 2002). Nutt L. K. et al. (2002) предполагают, что именно CD20 формирует кальциевый канал.

Интересно отметить, что показатели гуморального иммунного ответа селезенки в ответ на употребление питьевой воды, обогащенной кальцием, имеют обратную тенденцию, в сравнении со значениями клеточного звена. В отличие от CD4- и CD8-положительных клеток, В-лимфоциты часто обнаруживаются в герминативных центрах лимфоидных узелков селезенки обеих групп животных. В ходе иммуногистохимического исследования нами выявлено, что маркер CD20 экспрессируют клетки центра размножения, находящиеся как на периферии, на границе с мантийной зоной, так и с диффузным расположением внутри данной структуры. Однако максимальная экспрессия CD4, CD8 и CD20 наблюдается в клетках красной пульпы селезенки – вдоль пульпарных артерий и эллипсоидных капилляров, а также в белой пульпе вдоль маргинальных синусов. Известно, что в маргинальный синус открываются сосуды лимфоидного узелка, образуя маргинальный синус, в котором происходит первичный контакт с антигеном (Калинина Е. Ю. с соавт., 2015). А вокруг пульпарных артерий селезенки сосредоточены макрофаги, дендритные клетки, лимфоциты и плазматические клетки (Auerbach A., 2014). Эти особенности функционального строения органа обуславливают скопление иммунокомпетентных клеток вокруг данных структур.

На фоне повышения концентрации кальция в периферической крови происходит сокращение уровня экспрессии CD20 на клетках селезенки крыс на $19,29 \pm 4,93\%$ и составляет $18,93 \pm 0,83\%$ ($p < 0,005$). Согласно данным Барсук А. В. с соавт. (2013), снижение экспрессии CD20 на мембранах клеток говорит об уменьшении числа активированных В-лимфоцитов, что вероятно, отражает торможение гуморального иммунного ответа и свидетельствует об ингибировании процесса. А сочетание данных изменений с сокращением количества лимфоидных узелков селезенки с наличием зрелых герминативных центров (на 6,8%) свидетельствует о снижении плазматической реакции с сокращением созревания антителопродуцирующих плазматических клеток. В целом экспериментальная модель

гиперкальциемии демонстрирует ослабление гуморального звена иммунного ответа селезенки при употреблении питьевой воды, обогащенной кальцием.

Златник Е. Ю. с соавт. (2014) выявили дозозависимое действие наночастиц цинка и железа на морфологическую структуру селезенки, преимущественно белой пульпы, характеризующей снижение активности В-клеточного звена: сокращение количества и размеров лимфоидных узелков с герминативным центром, а также митотической активности в них.

Активация В-лимфоцитов является одним из ключевых этапов в развитии гуморального иммунного ответа. На фоне употребления соединения кальция происходит уменьшение средней площади В-лимфоцитов, экспрессирующих CD20, на $4,89 \pm 0,6\%$ ($p < 0,04$). На основании научных исследований, морфометрическим признаком активации служат увеличение размеров В-клетки, что свидетельствует о вступлении ее в стадию бласттрансформации (Ноздрачев Д. А. с соавт., 2002; Voross P. et al., 2012). Следовательно, полученные нами изменения могут свидетельствовать о снижении дифференцировки В-лимфоцитов в антителопродуцирующие клетки и их функциональной активности в структурах селезенки. Важное заключение представлено в работе Кудрина А. В. с соавт. (2007) о том, что все эссенциальные биоэлементы, в том числе и кальций, оказывают нормализующее действие на антителогенез.

Актуальное значение для настоящего исследования имеет научный факт о том, что активация В-лимфоцитов возможна лишь при увеличении концентрации в цитоплазме свободных ионов Ca^{2+} (Ноздрачев Д. А. с соавт., 2002; Janas E. et al., 2005). Корреляционный анализ между уровнем общего кальция в периферической крови и экспрессией CD20 на клетках селезенки экспериментальных крыс выявил прямую сильную связь ($r = 0,72$), с увеличением индекса корреляции на фоне гиперкальциемии ($r = 0,78$).

По результатам данного исследования употребление хлорида кальция с питьевой водой сопровождается выраженными изменениями иммунологических параметров селезенки лабораторных крыс: гиперактивностью хелперного и цито-

токсических звеньев иммунной системы ($CD4^+$ и $CD8^+$), повышением иммунорегуляторного индекса, инверсией гуморального иммунитета со снижением уровня экспрессии и количества $CD20^+$ клеток. Данные изменения находятся в рамках современных представлений о гомеостатической регуляции клеточного и гуморального звеньев иммунитета по типу замещения (Owen J. et al., 2013; Coico R., 2015). Так, выявленный нами комплекс изменений в селезенке крыс при гиперкальциемии свидетельствует о повышении клеточного звена с компенсаторным снижением показателей гуморального иммунитета, что отражает проявление активации и ауторегуляции иммунного ответа. Экспериментально доказан схожий иммуотропный эффект пищевого фосфора, который способствовал усилению клеточного звена иммунитета и снижению гуморального иммунного ответа (Campos M. S., 1998).

Обратную динамику описали многие исследователи при хроническом стрессе со сниженной регуляцией клеточного иммунитета (Th1), вызывающей усиление гуморального звена (Th2) (Сапин М. Р. с соавт., 2000; Бахмет А. А., 2004; Нестерова А. А. с соавт., 2006; Bartolomucci A. et al., 2003; Elenkov I. J. et al., 2006). Ермолина Е. В. с соавт. (2013) отметила угнетения клеточного звена иммунной защиты на фоне активизации В-системы селезенки при поступлении в соединения хрома в организм крыс в течение 90 суток. Всеми представленными авторами была зафиксирована картина со сниженной онкогенной защитой и склонностью к аллергическим заболеваниям ввиду сверхреактивного гуморального иммунитета.

Таким образом, проведенные исследования свидетельствуют об избирательном характере действия кальция на модуляцию кооперативного взаимодействия Т- и В-клеточных звеньев иммунного ответа.

Важное значение в интерпретации иммуногистохимических изменений селезенки имеет различная функциональная активность подклассов Т-хелперов. Так, Т-хелперы-1 отвечают преимущественно за реакции клеточного иммунитета и фагоцитарную активность. В то время как Т-хелперы-2 с помощью цитокинов сти-

мулируют гуморальный иммунитет, усиливая активацию В-лимфоцитов, их дифференцировку в плазматические клетки и последующий синтез иммуноглобулинов (Ноздрачев А. Д. с соавт., 2002; Janeway Ch. et al., 2001; Gibson J. et al., 2010; Owen J. et al., 2013).

В заключение обсуждения морфометрических исследований крайне важно отметить, что изменение площадей клеток, входящих в состав гетерогенных морфопопуляций, но имеющие общие рецепторы к исследуемым субстратам, свидетельствует о смене преобладающего типа клеток на иной в ответ на экзогенное воздействие, а не о гипертрофии самих клеток (Степанов В. А. с соавт., 2008; Ватазин А. В. с соавт., 2009; Гребнев Д. Ю. с соавт., 2011). Так, согласно данным научных исследований отечественных и зарубежных морфологов, средняя площадь лимфоцитов находится в пределах $78,5 \pm 1,2$ мкм² (Сладкова Е. А. с соавт., 2013), моноцитов - $122,0 \pm 1,71$ мкм² (Степанов В. А. с соавт., 2008; Lundahi J. et al., 1996; Platten M., 2003), макрофагов – от $96,2 \pm 4,9$ мкм² до $123,8 \pm 6,93$ мкм² (Огородникова Т. Л. с соавт., 2014), дендритных клеток – от $91,12 \pm 12,0$ мкм² (Ялалетдинова Л. Р. с соавт., 2014) до $197,23 \pm 11,24$ мкм² (Ueno H. et al., 2007).

Известно, что молекулы МНС II класса содержат многие типы клеток селезенки: Т-, В-лимфоциты, макрофаги, моноциты, дендритные клетки (Лолор Г.-мл. с соавт., 2000; Golovkina T. et al., 2001; Owen J. et al., 2013). При употреблении питьевой воды с добавлением хлорида кальция в селезенке крыс происходит увеличение средней площади МНС II-позитивных клеток органа на $6,63 \pm 0,82\%$ и составляет в опытной группе $183,6 \pm 8,01$ мкм² ($p < 0,05$). Согласно данным научной литературы, схожие, относительно крупные, размеры могут иметь моноциты и дендритные клетки (Огородникова Т. Л. с соавт., 2014; Lundahi J. et al., 1996; Platten M., 2003). Следовательно, происходит преобладание количества данного типа клеток, которое в общей морфологической картине дают увеличение средней площади антигенпрезентирующих клеток.

Интересно, что выявленные нами CD4⁺, CD8⁺, CD20⁺ клетки селезенки контрольных крыс имеют сравнительно схожие средние размеры: $76,9 \pm 3,52$ мкм²,

$61,37 \pm 2,15$ мкм² и $72,86 \pm 2,1$ мкм² соответственно. Данную площадь имеют клетки лимфоцитарного ряда – $78,5 \pm 1,2$ мкм² (Сладкова Е. А. с соавт., 2013).

Известно, что биогенные амины способны оказывать влияние на свойства клеток микроокружения селезенки, которые, в свою очередь, регулируют активность иммунных клеток в данном органе (Сысоева Л. А., 1983; Бережная Н. М. с соавт., 2009; Кузнецова Е. П. с соавт., 2013). Поэтому морфологическое и люминесцентно-гистохимическое исследования обеспеченности биогенными аминами селезенки крыс при употреблении соединения кальция с питьевой водой играют важную роль в сравнительной оценке изменений ее функциональной активности при экспериментальной гиперкальциемии.

Доказательством тесной функциональной взаимосвязи биогенных аминов, медиаторов и иммунокомпетентных клеток служит исследование Ставинской О. А. с соавт. (2008). Авторами установлено, что при низких уровнях гистамина отмечается увеличение средней концентрации цитотоксических лимфоцитов (CD8⁺) с формированием отрицательной корреляции с содержанием диамина. Рядом исследователей доказано, что гистамин, изменяя химическую среду межклеточного пространства, оказывает влияние на все этапы развития лимфоцита от пролиферации и дифференцировки до апоптоза (Ставинская О. А. с соавт., 2008; Dobrodeeva L. et al., 2008; Dawicki W. et al., 2010). В работе Лаврова О. В. с соавт. (2007) отмечается тесная корреляционная связь уровня экспрессии CD8⁺ и содержания биогенных аминов в крови. Важное значение в аспекте данного исследования является заключение Лаврова О. В. с соавт. (2007) о том, что биогенные амины проявляются иммуномодулирующие свойства в форме непосредственного влияния на экспрессию CD-маркеров: адреналин снижает число CD8⁺ клеток, а серотонин и гистамин угнетают экспрессию CD3-, CD4-, CD8-маркеров. Доказано, что в присутствии адреналина и гистамина макрофаги уменьшают долю серотонинсодержащих клеток, а при наличии серотонина снимают его угнетающее влияние на содержание в гранулах ЛГК адреналина и гистамина (Лавров О. В. с соавт., 2007).

Биохимические работы Tomilin V. N. et al. (2014) подтвердили, что кальциевый канал принимает участие в активации и миграции Т-лимфоцитов, дендритных и тучных клеток, а, следовательно, морфологические данные настоящего исследования представляются функционально логичными. Результаты экспериментов *in vitro* также свидетельствуют, что стимуляция биоаминсодержащих клеток антигенами при отсутствии внеклеточного кальция не сопровождается высвобождением медиаторов (Балезина О. П. с соавт., 2013; Theoharides T. C. et al., 2012).

На сегодняшний день доказано, что люминесцирующие гранулярные клетки (ЛГК), содержащие биогенные амины, имеют неоднородное происхождение: макрофаги (Гордон Д. С. с соавт., 1982; Любовцева Л. А. с соавт., 1993), дендритные клетки (Сергеева В. Е. с соавт., 1992; Любовцева Л. А. с соавт., 1993), клетки АПУД – серии (Сергеева В. Е. с соавт., 1992; Любовцева Л. А., 1993; Агафонкина Т. В. с соавт., 2006; Артемьева И. Л. с соавт., 2012; Дьячкова И. М. с соавт., 2014). Также ряд авторов отдельно выделяет люминесцирующие тучные клетки, так как они имеют специфичную только им морфологию при люминесцентной микроскопии (Гордон Д. С. с соавт., 1982; Любовцева Л. А. с соавт., 1993; Голубцова Н. Н. с соавт., 2000).

Гистохимические работы по качественному спектральному анализу люминесцирующих структур селезенки крыс установили, что биогенные амины содержатся в макрофагах красной пульпы, клетках маргинального синуса, герминативных центров и ПАЛМ (Зеленова И. Г., 1971; Гордон Д. С. с соавт., 1982; Сысоева Л. А., 1983; Каплиева И. В. 2010; Кроткова О. С. с соавт., 2014; Стручко Г. Ю. с соавт., 2014). По результатам данного исследования отмечено, что ЛГК селезенки лабораторных крыс имеет различную морфологию, характер и интенсивность люминесценции биогенных аминов (гистамина, серотонина, катехоламинов) в зависимости от локализации в структурах органа. Согласно данным литературы, большая часть люминесцирующих гранулярных клеток селезенки имеет макрофагальную природу (Гордон Д. С. с соавт., 1982; Сысоева Л. А., 1983). А в красной пульпе селезенки адренергические нервные волокна обнаруживаются в тес-

ном контакте с крупными полигональными и овальными клетками, содержащими желтые гранулы различной величины и глыбки черно-бурого цвета, которые при детальном рассмотрении определяются клетками макрофагальной системы (Гордон Д. С. с соавт., 1982, С. 36).

Клинические и лабораторные исследования, проведенные Ставинской О. А. с соавт. (2008) свидетельствуют о иммуносупрессирующем эффекте гистамина, который проявляется в подавлении активности клеточного звена иммунного ответа с достоверным снижением $CD3^+$ и $CD4^+$ клеток крови. Результаты данного исследования выявили, что употребление соединения кальция с питьевой водой сопровождается достоверным сокращением уровня люминесценции гистамина во всех микроструктурах селезенки крыс: как в ЛГК, так и в их микроокружении. В совокупности данные изменения представлены снижением свечения гистамина на $17,26 \pm 0,78\%$ ($p < 0,05$) при параллельном повышении уровней экспрессии компонентов клеточного звена иммунного ответа селезенки – $CD4^+$ и $CD8^+$ – на $4,69 \pm 1,11\%$ и $1,63 \pm 0,57\%$ соответственно ($p < 0,05$). Следует отметить, различия корреляционных связей уровня общего кальция в крови контрольных крыс между гистаминообеспеченностью селезенки ($r = - 0,34$) обратной направленности и уровнями экспрессии Т-клеточного звена ($r = 0,78$ и $r = 0,61$) с прямой зависимостью. Таким образом, проведенное комплексное исследование подтвердило установленные ранее данные и морфологически отражает иммуностимулирующий эффект кальция, проявляющийся, в том числе, ингибированием синтеза и выбросом гистамина в люминесцирующих гранулярных клетках селезенки.

Иную тенденцию имеют взаимоотношения гистамина и клетки гуморального звена иммунитета ($CD20^+$) селезенки с однонаправленным снижением активности при гиперкальциемии: на $17,26 \pm 0,78\%$ ($p < 0,05$) и на $19,29 \pm 4,93\%$ ($p < 0,005$) соответственно.

На фоне употребления питьевой воды, обогащенной кальцием, количество и размеры ЛГК значительно сокращаются во всех структурах селезенки, кроме зон ПАЛМ и герминативных центров, где гистаминсодержащие клетки встречаются

чаще. На основании фармакологического анализа данная группа клеток селезенки способна сама синтезировать амины, и является аминопродуцентами, в то время как ЛГК маргинального синуса рассматриваются как аминопоглотители (Зеленова И. Г., 1971; Гордон Д. С. с соавт., 1982). Гиперкальциемия активирует клетки-гистаминопродуценты селезенки, однако данные изменения отражаются только в незначительном увеличении количества, в то время как уровень люминесценции диамина в них снижается.

Представляет интерес исследования Kvetnoy I. M. et al. (2003), доказавшие, что клетки-предшественники Т-лимфоцитов ($CD4^+$, $CD8^+$) синтезируют и содержат серотонин. В подтверждение данного факта нами выявлена взаимосвязь увеличения люминесценции данного амина в структурах селезенки крыс в условия эксперимента на $3,16 \pm 0,97\%$ и повышения уровня экспрессии маркеров Т-клеточного звена иммунитета: CD4 на $4,69 \pm 1,11\%$, CD8 на $1,63 \pm 0,57\%$ ($p < 0,05$). Таким образом, результаты данного исследования подтвердили прямую зависимость серотонинового обеспечения с состоянием клеточного звена иммунного ответа структур селезенки.

В результате настоящего исследования отмечено, что серотонинсодержащие ЛГК селезенки крыс имеют различную морфологию в зависимости от их локализации в органе: ЛГК герминативного центра – крупные, с беловато-желтым; ЛГК маргинального синуса – мелкие, с люминесценцией желтого цвета; ЛГК красной пульпы – различной величины, с кирпично-оранжевым свечением, могут быть включения. Данные клетки активно реагируют на повышение уровня общего кальция в крови укрупнением размеров и синхронным повышением люминесценции серотонина на $3,16 \pm 0,23\%$ ($p < 0,05$).

ЛГК маргинального синуса и красной пульпы селезенки отвечают на гиперкальциемию накоплением серотонина внутри клеток и сокращением его выхода в микроокружение на $22,95\%$ и $8,42\%$ соответственно ($p < 0,05$). Однако в ЛГК герминативных центров лимфоидных узелков селезенки на фоне условий эксперимента выброс из клеток моноамина увеличивается на $7,54\%$ ($p < 0,05$). Следова-

тельно, при употреблении соединения кальция в клетках-аминопродуктах увеличивается продукция серотонина и его выход в окружающие структуры, а клетки-аминопоглотители маргинального синуса накапливают данный медиатор внутри ЛГК и снижают его выход из них.

В механизме действия гормон-рецепторного комплекса обязательно участвуют посредники, которые индуцируют ответ клетки. Наиболее важным из них считаются ионы кальция (Баранов В. Л. с соавт., 2011; Mravec V., 2011). Так, в среде, лишенной ионов кальция, или в клетках с недостаточным их количеством действие многих гормонов ослабляется. Интересно, что при применении веществ, увеличивающих внутриклеточную концентрацию кальция, возникают эффекты, идентичные воздействию некоторых гормонов (Sanders V. M., 2006).

Исследования последних двух десятилетий установили, что воздействие на клетки катехоламинов (КА) обеспечивают ионы кальция (Гущин Г. В., 1993; Баранов В. Л. с соавт., 2011; Котова П. Д. с соавт., 2013). О тесной взаимосвязи катехоламинов и ионов кальция говорит факт о том, что основным стимулом секреции КА является даже незначительное повышение уровня кальция в крови, которую можно активизировать пероральным приемом кальция или употреблением питьевой воды, обогащенной макроэлементом (Кветной И. М., 2002; Пальцев М. А. с соавт., 2008; Баранов В. Л. с соавт., 2011).

Накоплен достаточный объем знаний о иммуотропных эффектах катехоламинов, обусловленных связыванием с адренорецепторами иммунокомпетентных клеток (Репина В. П., 2006). КА оказывают влияние на дифференцировку и пролиферативную активность лимфоцитов, их реактивность и миграцию при иммунном ответе (Репина В. П., 2006; Sanders V. M., 2006). Репиной В. П. (2006) доказано, что катехоламины стимулируют функциональную активность Т-хелперной системы. Данный факт был подтвержден по результатам собственного исследования с синергичным повышением уровня люминесценции КА на $8,25 \pm 0,94\%$ и клеток с Т-хелперной активностью на $4,69 \pm 1,11\%$ в структурах селезенки крыс при употреблении соединения кальция с питьевой водой ($p < 0,05$).

При анализе серотонинового индекса выявлено преобладание уровня люминесценции катехоламинов над показателями серотонина во всех исследуемых структурах селезенки обеих групп животных ($I_s < 1$), кроме ЛГК герминативного центра контрольных крыс, где наблюдается накопление серотонина в клетках органа ($I_s = 1,13$). Согласно утверждению Пуговкина А. П. (1993), изменения функциональной активности адренергического звена селезенки, которые регистрируются по изменениям содержания катехоламинов, считаются специфическими, поскольку они ориентированы непосредственно на клетки лимфоидного ряда.

Определение ведущего биогенного амина в структурах селезенки крыс в условиях эксперимента выявило тесные конкурирующие взаимосвязи серотонина и катехоламинов в люминесцирующих гранулярных клетках и в окружающих их тканях с незначительным преобладанием последнего, на фоне сниженного уровня гистамина. В многочисленных работах Гордон Д. С. с соавт. (1982) и Девойно Л. В. (1985) также описаны антагонистические взаимоотношения между серотином и КА в структурах лимфоидных органов.

Таким образом, результаты проведенного люминесцентно-гистохимического исследования свидетельствуют, что клетки селезенки, содержащие биогенные амины, являются чувствительными маркерами, которые активно реагируют на поступление кальция с питьевой водой. Следовательно, прием препаратов, содержащих кальций, должен производиться с учетом тканевого метаболизма биологически активных веществ, и быть строго обоснованным.

Установленная нами исходная концентрация общего кальция в крови крыс контрольной группы отмечена в пределах 2,24 – 2,52 ммоль/л ($2,43 \pm 0,007$ ммоль/л), которая осталась практически без изменений на фоне употребления стандартного водного и пищевого рациона через 60 суток: 2,22 – 2,56 ммоль/л ($2,42 \pm 0,009$ ммоль/л). Работы ряда исследователей посвящены определению референтных значений биохимических показателей крови лабораторных животных. Однако диапазон концентраций общего кальция в крови не имеет значительных

видовых вариаций (Линева А., 2001; Мирошников С. А. с соавт., 2009). В книге Линева А. (2003) представлены физиологические показатели нормы концентрации общего кальция крови в пределах $2,47 \pm 0,2$ ммоль/л. Современные исследования Маракушина Д. И. с соавт (2013) зарегистрировали контрольные значения концентрации ионов кальция в сыворотке крови крыс в пределах средних значений – $2,1 \pm 0,16$ ммоль/л, а также ее реактивное снижение при острой интоксикации неоналами на 33,4% от контрольных значений ($p < 0,05$). Данными авторами также предложено обоснование клеточных механизмов повышения ионов кальция в сыворотке крови. Так, установлена связь с нарушением структурно-функциональной организации цитоплазматических мембран клеток, внутриклеточных органелл и метаболических комплексов, а также со снижением процессов потребления кальция клеточным аппаратом (Панченко Л.Ф. с соавт., 2004; Маракушин Д. И. с соавт., 2013).

Согласно исследованиям Ахполовой В.О. с соавт. (2012) и Хадарцева М. П. с соавт. (2012) введение хлорида кальция лабораторным крысам в течение 1,5 месяцев повышали концентрацию кальция в костном матриксе на 8% и 18% соответственно. Арокиной Н. К. с соавт. (2007) зафиксировано, что экспериментальное внутривенное введение 2%-ного раствора хлорида кальция вызывает повышение концентрации кальция в крови лабораторных крыс уже на первой минуте на $1,01 \pm 0,03 - 2,27 \pm 0,06$ ммоль/л, и через 20 минут превышает исходный уровень на 20–30%.

При употреблении питьевой воды с добавлением хлорида кальция (235 мг/л) в течение 60 суток у крыс происходит достоверное повышение концентрации общего кальция в крови на $14,39 \pm 0,69\%$ от исходных значений до $2,86 \pm 0,02$ ммоль/л ($p < 0,008$). Следовательно, выбранная модель формирования экспериментальной гиперкальциемии у крыс для оценки морфологических и иммуногистохимических реактивных изменений селезенки считается адекватной.

Краткая схема основных морфологических и иммуногистохимических изменений селезенки лабораторных крыс при употреблении соединения кальция с питьевой водой представлена на рисунке 50.

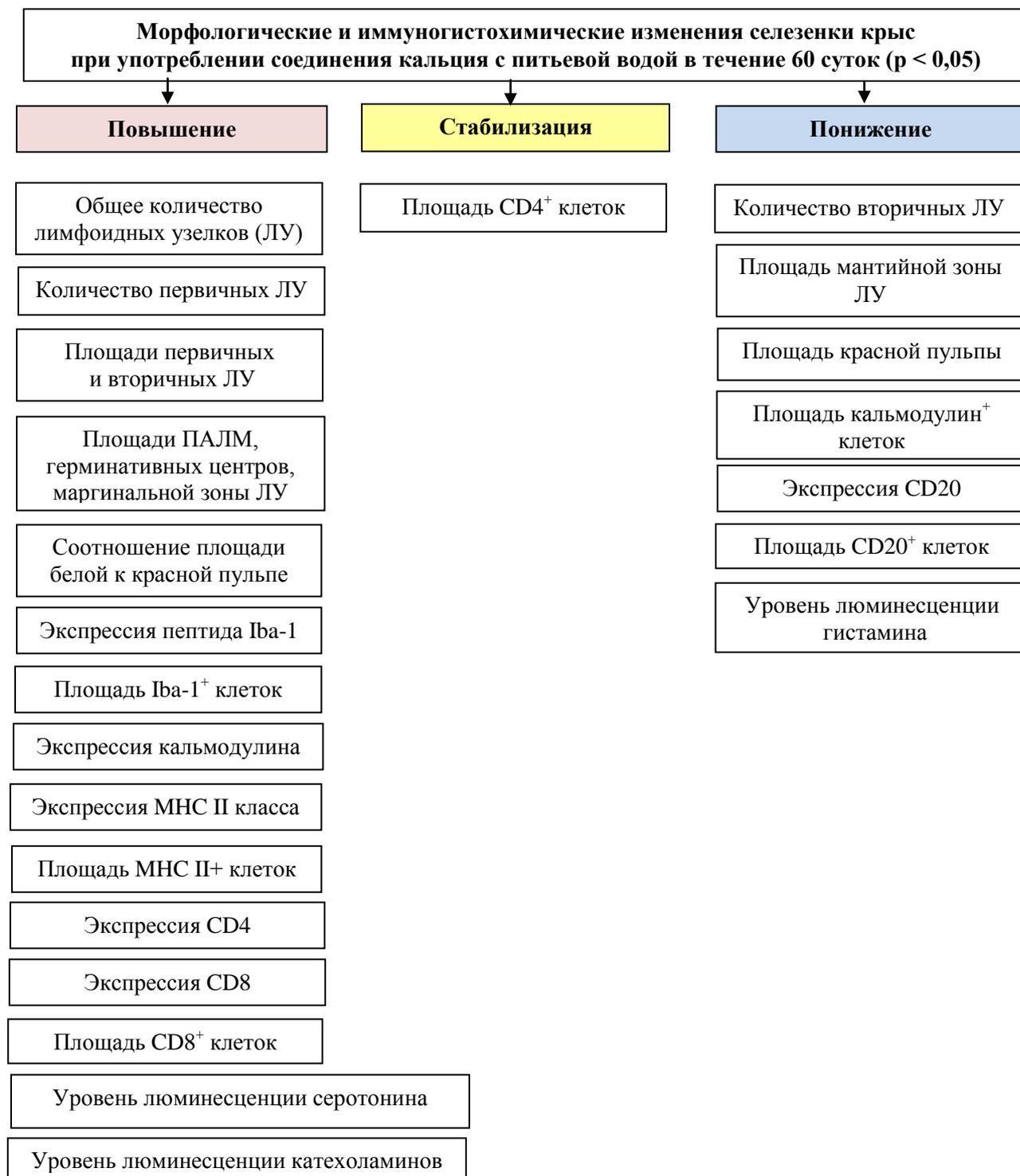


Рисунок 50. Краткая схема основных морфологических и иммуногистохимических изменений селезенки лабораторных крыс при употреблении соединения кальция с питьевой водой

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В проведенном исследовании впервые установлено иммуномодулирующее влияние соединения кальция, сопровождающееся морфо-функциональными изменениями селезенки лабораторных крыс и ее иммунокомпетентных клеток.

Употребление водного раствора хлорида кальция в концентрации 235 мг/л (в пересчете на кальций) в течение 60 суток формирует экспериментальную гиперкальциемию у лабораторных крыс с достоверным повышением уровня общего кальция в сыворотке крови на $14,39 \pm 0,69\%$ от контрольных значений ($p < 0,008$).

При употреблении соединения кальция с питьевой водой происходит увеличение площади лимфоидного аппарата селезенки на фоне повышения площади всех морфо-функциональных компонентов белой пульпы, за исключением мантийной зоны, а также количества первичных лимфоидных узелков.

При иммуногистохимическом исследовании в сочетании с морфометрическим и статистическим анализом установлено, что при употреблении питьевой воды, обогащенной кальцием, происходит количественное перераспределение клеток моноцитарно-макрофагальной системы селезенки крыс с увеличением их в маргинальной зоне лимфоидных узелков и красной пульпе, а также повышением уровня экспрессии пептида Iba-1 в клетках. Кальций вызывает качественные и количественные изменения антигенпрезентирующих клеток селезенки лабораторных животных с увеличением экспрессии и средней площади МНС II-позитивных клеток и повышением их числа в маргинальной зоне лимфоидных узелков.

Употребление хлорида кальция с питьевой водой сопровождается изменениями в показателях состояния клеточного и гуморального звеньев иммунного ответа селезенки лабораторных крыс: повышение уровня экспрессии CD4 и количества CD4⁺ клеток в белой пульпе, увеличение числа CD8⁺ клеток красной пульпы на фоне сокращения уровня экспрессии и количества CD20⁺ клеток во всех морфо-функциональных зонах, кроме герминативных центров. Таким образом, представленный комплекс изменений селезенки крыс свидетельствует об индукции

компонентов клеточного звена ($CD4^+$, $CD8^+$) иммунитета со снижением морфологических показателей гуморального иммунного ответа при гиперкальциемии.

Исследование молекулярных основ транспортных систем регуляции кальция выявило высокую степень реактивности внутриклеточного рецептора ионов кальция в селезенке при употреблении соединения данного макроэлемента с питьевой водой, сопровождающаяся усилением экспрессии, увеличением количества кальмодулин-позитивных клеток и их перераспределением в функциональных зонах органа.

Люминесцентно-гистохимические исследования показали, что ионы кальция активно участвуют в регуляции и обеспеченности биогенными аминами структур селезенки. При употреблении хлорида кальция с питьевой водой происходят разнонаправленные изменения в люминесцирующих гранулярных клетках герминативных центров и маргинального синуса с увеличением интенсивности люминесценции серотонина и катехоламинов и снижением в них – гистамина. Однако в люминесцирующих клетках красной пульпы селезенки происходит снижение всех исследуемых биогенных аминов на фоне условий эксперимента.

Выявлены тесные прямые корреляционные взаимосвязи между концентрацией общего кальция в крови и уровнями экспрессии пептида Iba-1, кальмодулина, молекул МНС II класса, $CD4$, $CD8$, $CD20$, и обратную зависимость с показателями люминесценции биогенных аминов (гистамина, серотонина, катехоламинов) в клетках селезенки экспериментальных крыс.

Совокупность выявленных морфологических, иммуногистохимических и люминесцентно-гистохимических изменений селезенки расширяет представление об иммуномодулирующей роли кальция, регулярно поступающего с питьевой водой.

ВЫВОДЫ

1. Употребление соединения кальция с питьевой водой в концентрации 235 мг/л (в пересчете на кальций) в течение 60 суток вызывает увеличение площади белой пульпы селезенки лабораторных крыс на фоне повышения количества первичных лимфоидных узелков и площадей периартериолярных лимфоидных муфт, герминативных центров и маргинальных зон.

2. При поступлении питьевой воды, обогащенной кальцием, происходит повышение экспрессии пептида Iba-1 (на $25,8 \pm 1,78\%$) и средней площади клеток моноцитарно-макрофагальной системы (Iba-1-позитивных клеток) (на $7,07 \pm 0,5\%$), а также увеличение их количества в маргинальной зоне и красной пульпе селезенки ($p < 0,05$). Отмечается усиление экспрессии молекул главного комплекса гистосовместимости II класса (на $4,24 \pm 0,34\%$) на мембранах антигенпрезентирующих клеток на фоне увеличения средней площади (на $6,63 \pm 0,82\%$) и количества МНС II-позитивных клеток в маргинальной зоне лимфоидных узелков селезенки лабораторных крыс ($p < 0,05$).

3. Выявлены изменения в системе кальций-связывающих пептидов селезенки лабораторных крыс при употреблении соединения кальция с питьевой водой: на фоне усиления экспрессии внутриклеточного рецептора ионов кальция (на $42,0 \pm 1,39\%$) и увеличения количества кальмодулин-позитивных клеток в мантийной, маргинальной зонах лимфоидных узелков и красной пульпе происходит уменьшение средней площади исследуемых клеток на $28,64 \pm 1,31\%$ ($p < 0,05$).

4. Поступление хлорида кальция с питьевой водой сопровождается перераспределением компонентов клеточного и гуморального звеньев иммунного ответа селезенки: повышением количества $CD4^+$ клеток белой пульпы, $CD8^+$ клеток красной пульпы на фоне сокращения количества $CD20^+$ клеток во всех морфофункциональных зонах, кроме герминативных центров.

5. Морфологические изменения селезенки лабораторных крыс при употреблении соединения кальция с питьевой водой сопровождаются однонаправленным снижением интенсивности люминесценции гистамина, серотонина, катехоламинов в клетках красной пульпы и разнонаправленным характером распределения исследуемых биогенных аминов в люминесцирующих гранулярных клетках белой пульпы: увеличением интенсивности люминесценции серотонина и катехоламинов и снижением – гистамина.

6. Употребление водного раствора хлорида кальция в концентрации 235 мг/л в течение 60 суток вызывает достоверное повышение уровня общего кальция в сыворотке крови на $14,39 \pm 0,69\%$ от контрольных значений ($p < 0,008$) и является адекватной моделью для формирования экспериментальной гиперкальциемии у крыс с последующей оценкой морфологических и иммуногистохимических изменений селезенки.

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

1. Врачам, назначающим препараты кальция в клинической практике, рекомендуется учитывать иммуномодулирующие эффекты данного макроэлемента с комплексом морфологических изменений в селезенке: усиление активности клеток моноцитарно-макрофагальной системы, антигенпрезетирующих клеток, компонентов клеточного звена (CD4+, CD8+) и снижение уровня экспрессии компонента гуморального звена (CD20+) иммунного ответа, и проводить соответствующий контроль иммунного статуса пациентов при длительном приеме кальцийсодержащих препаратов.

2. При проведении практических занятий по гистологии, гигиене, иммунологии в образовательных учреждениях высшего профессионального медицинского образования рекомендовано использовать полученные научные экспериментальные данные об адаптации селезенки и иммунокомпетентных клеток организма к повышенной концентрации общего кальция в крови.

3. С целью формирования экспериментальной модели гиперкальциемии у лабораторных животных рекомендовано употребление хлорида кальция с питьевой водой с концентрацией 235 мг/л в течение 60 суток.

ПЕРСПЕКТИВЫ НАСТОЯЩЕГО ИССЛЕДОВАНИЯ

Известны среднесуточные колебания концентрации общего кальция в крови в пределах не более $\pm 4\%$ (Лукьянчиков В. С., 2012). При том, что постоянство кальциевого гомеостаза поддерживается эндокринной системой, повышающая свою активность при смещении уровня кальция на 1–2% от исходных значений (Судаков К. В., 2000; Кухта В. К. с соавт., 2010). Следовательно, повышение данного показателя на $14,39 \pm 0,69\%$ от контрольных значений ($p < 0,008$) свидетельствует о достоверной гиперкальциемии, достигнутой в ходе эксперимента, и запуске гормональных регуляторных систем, основой которых является паратиреоидный гормон, кальцитонин и D-гормон (кальцитриол) (Ребров В. Г. с соавт., 2008; Лукьянчиков В. С., 2012). Исследование гормонального статуса лабораторных животных при экспериментальных гипо- и гиперкальциемии, сопровождающих морфологическую и функциональную перестройку органов иммунной системы, является перспективой настоящего научного исследования.

В планах настоящего исследования находится изучение иммунного статуса лабораторных животных в норме и при поступлении соединений кальция с проведением развернутых иммунограмм и комплексной лабораторной оценкой показателей иммунного ответа.

Исследования японских ученых Nishimuta M. et al. (1990) позволили сформировать новую концепцию внутри- и внеклеточных биоэлементов, которая заключается в необходимости поддержания гомеостатического баланса между данными составляющими для здорового функционирования всех систем организма. Причем поддержание уровня внутриклеточных биоэлементов является более значимым (Кудрин А. В. с соавт., 2007). Научный интерес представляет изучение внутриклеточной концентрации ионов кальция в селезенке крыс и его баланса с уровнем в периферической крови в норме и на фоне экспериментальной гиперкальциемии, а также оценка ее взаимосвязей с иммуногистохимическими и морфометрическими показателями селезенки лабораторных животных.

Для оценки регуляции кальциевого гомеостата, а также для контроля абсорбции кальция планируется комплексный анализ крови на витамины группы D: эргокальциферола (D_2) и холекальциферола (D_3) в норме и при употреблении соединений кальция.

Таким образом, перспективу исследования составляют параллельные исследования гистологических изменений органов лабораторных животных и их гематологических показателей на фоне экспериментальной гипо- и гиперкальциемии, включающие: определение гормонального и иммунного статуса, уровня внутриклеточной концентрации ионов кальция, оценки баланса витамина D в организме животных, а также исследование реактивных изменений животных в онтогенезе.

Важное клиническое значение имеет изучение влияния соединения кальция на состояние иммунной системы человека, включающий комплекс исследований здоровых людей и пациентов с различным иммунным статусом на фоне гипо- и гиперкальциемии: иммунологическое исследование, общий анализ крови с развернутой лейкоцитарной формулой при исследовании взаимосвязей их изменений от различной концентрации общего кальция в сыворотке крови. Данное исследование позволит установить способы и механизмы коррекции нарушенного иммунного гомеостаза с помощью препаратов кальция, а также соотнести и выявить зависимость патогенеза иммунных нарушений и концентрации кальция в крови пациентов.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

- АГ – антиген;
- АПК – антигенпрезентирующие клетки;
- АТ – антитело;
- Г – гистамин;
- ГЦ – герминативный центр;
- ИСП – интенсивность светопропускания;
- КА – катехоламины;
- КМ – кальмодулин;
- КП – красная пульпа;
- ЛГК – люминесцирующие гранулярные клетки;
- ЛУ – лимфоидный узелок;
- МГЗ – маргинальная зона;
- МГС – маргинальный синус;
- МКАТ – моноклональные антитела;
- МТЗ – мантийная зона;
- М/о – микроокружение;
- ПАЛМ – периартериолярная лимфоидная муфта;
- С – серотонин;
- Ca²⁺ – ионы кальция, ионизированный (свободный) кальций;
- CD (cluster of differentiation) – кластер дифференцировки, дифференцированный антиген;
- Is – серотониновый индекс;
- МНС (major histocompatibility complex) II класса – главный комплекс гистосовместимости второго класса;
- Iba-1 – иммуногистохимический маркер клеток моноцитарно-макрофагального происхождения.

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ

1. Авдонин, П. В. Рецепторы и внутриклеточный кальций / П. В. Авдонин, В. А. Ткачук. – М.: Наука, 1994. – С. 44–50.
2. Автандилов, Г. Г. Компьютерная микротелефотометрия в диагностике гистопатологии / Г. Г. Автандилов. – М.: РМАПО, 1996. – 256 с.
3. Агаджанян, Н. А. Химические элементы в среде обитания и экологический портрет человека / Н. А. Агаджанян, А. В. Скальный. – М.: Изд-во КМК, 2001. – 83 с.
4. Агафонкина, Т. В. Исследование структур тимуса и показателей крови крыс при кормлении цеолитсодержащим трепелом / Т. В. Агафонкина, Л. М. Меркулова, Г. Ю. Стручко // Вестник Чуваш. ун-та. – 2006. – №2. – С.46–56.
5. Алексеев, Л. П. Регуляторная роль иммунной системы в организме / Л. П. Алексеев, Р. М. Хаитов // Российский физиологический журнал имени И. М. Сеченова. – 2010. – Т. 96, № 8. – С. 787–805.
6. Ананьев, Л. М. Фотоэлектрический анализатор иммунологических реакций / Л. М. Ананьев, А. А. Аристов, А. Г. Яковлев, Г. С. Евтушенко // Актуальные проблемы электронного приборостроения: Труды III междунар. науч.-техн. конф. – Новосибирск: Изд-во НГТУ, 1996. – Т.3. – С. 35–36.
7. Ананьева, Н. Г. Графическое оформление результатов эксперимента. Построение графика в прямоугольной системе координат / Н. Г. Ананьева. – М.: Отдел оперативной печати физ. ф-та МГУ. – 2013. – 32 с.
8. Арокина, Н. К. Развитие гипотермии у крыс при повышении $[Ca^{2+}]$ в крови / Н. К. Арокина, Г. С. Федоров // Российский физиологический журнал, 2007. – № 10. – С. 1171 – 1180.
9. Арсеньева, Е. Н. Система ионизированный кальций – кальцийрегулирующие гормоны при соматических болезнях у детей / Е. Н. Арсеньева,

Ю. С. Акоев, Е. С. Тюменцева, В. Г. Пинелис // Российский педиатрический журнал. – 2006. – № 4. – С. 60–63 .

10. Артемьева, И. Л. Морфофункциональная характеристика структур тимуса при экспериментальной тестэктомии / И. Л. Артемьева, В. Е. Сергеева.- Чебоксары: Изд-во Чуваш. ун-та, 2012. – 96 с.

11. Артишевский, А. А. Гистология с техникой гистологических исследований / А. А. Артишевский, А. С. Леонтьук, Б. А. Слука. – Минск: Вышэйш. шк., 1999. – 236 с.

12. Арцимович, Н. Г. Роль симпато-адреналовой системы в регуляции иммунитета / Н. Г. Арцимович, А. В. Корнев, Т. С. Заяшникова // XVIII съезд физиологического общества им. И. П. Павлова. – Казань, 2001. – 304 с.

13. Афанасьев, Ю. И. Гистология, цитология и эмбриология / Ю. И. Афанасьев, Н. А. Юрина, Е. Ф. Котовский и др. – М.: Медицина, 2012. – 800 с.

14. Ахполова, В. О. Изменения содержания кальция и свинца в бедренных костях крыс с хронической свинцовой интоксикацией в условиях экспериментальной гипо- и гиперкальциемии / В. О. Ахполова, В. Б. Брин // Материалы Международной научной конференции «Физиология и патология почек и водно-солевого обмена», посвященной 100-летию со дня рождения профессора Н. Н. Прониной. – Владикавказ, 2012. – С. 42–46.

15. Аюшиева, С. Ц. Экспериментальное обоснование применения минеральных вод нарзановского типа при иммуносупрессии / С. Ц. Аюшиева, И. Э. Раднаева, В. Б. Хобракова // Бюллетень ВСНЦ СО РАМН. – 2010. – № 2 (72). – С. 161–164.

16. Бакуменко, Л. П. Статистический анализ влияния качества питьевой воды на здоровье населения региона / Л. П. Бакуменко, П. С. Коротков // Здоровоохранение. – 2011. – № 2(22). – С. 32–47.

17. Балаболкин, М. И. Эндокринология / М. И. Балаболкин. – 2-е изд., перераб. и доп. – М.: Универсум паблишинг, 1998. – 416 с.

18. Балезина, О. П. Са-активируемые ферменты – регуляторы секреции медиатора в моторных синапсах / О. П. Балезина // XXII съезд Физиологического общества имени И. П. Павлова: Тезисы докладов. – Волгоград: Изд-во ВолгГМУ, 2013. – С. 43–44.
19. Барсук, А. В. CD20 в оценке воспалительного инфильтрата поджелудочной железы при остром панкреатите / А. В. Барсук, А. А. Славинский // Международный журнал прикладных и фундаментальных исследований. – 2013. – №3. – С. 148.
20. Бахмет, А. А. Строение лимфоидных структур селезенки крыс при воздействии острого эмоционального стресса / А. А. Бахмет // Морфология. – 2004. – № 1. – С. 55–58.
21. Бережная, Н. М. Микроокружение и иммунореабилитация при различной патологии / Н. М. Бережная, Р. И. Сепиашвили // International Journal on Immunorehabilitation. – 2009. – Т. 11, № 1. – С. 5–9.
22. Бибик, Е. Ю. Современные представления о морфогенезе первичного лимфоидного органа / Е. Ю. Бибик, А. Ю. Берест // Украинский морфологический альманах. – 2011. – Т. 9, № 3. – С. 43–46.
23. Биохимия / под ред. Е. С. Северина. – 5-е изд., испр. и доп. – М. : ГЭОТАР – Медиа, 2013. – 768 с.
24. Бобова, Л. П. Гистофизиология крови и органов кроветворения и иммуногенеза / Л. П. Бобова, С. Л. Кузнецова, В. П. Сапрыкин. – М.: Новая волна, 2003. – 155с.
25. Бобрышева, И. В. Морфологическая реактивность селезенки крыс различных возрастных периодов при иммуностимуляции / И. В. Бобрышева // Журнал клинических и экспериментальных медицинских исследований. – Т. 1, № 3. – 2013. – С. 315–321.
26. Боков, Д. А. Новый взгляд на роль селезенки в качестве биологического индикатора пессимальных экологических условий / Д. А. Боков, Е. И. Шурьгина // Материалы Международного молодежного научного форума

«ЛОМОНОСОВ-2014». – М.: МАКС Пресс, 2014. – URL: lomonosov-msu.ru/archive/Lomonosov_2014/2479/2479.

27. Большаков, О. П. Дидактические и этические аспекты проведения исследований на биомоделях и на лабораторных животных / О. П. Большаков, Н. Г. Незнанов, Р. В. Бабахаян // Качественная клиническая практика. – 2002. – №1. – С. 58–61.

28. Бородюк, Н. Р. Адаптация и гуморальная регуляция / Н. Р. Бородюк. – М., 2003. – 151 с.

29. Букина, Е. Я. Синергетическая концепция здоровья человека. Природные минералы на службе человека. Минеральная среда и жизнь / Е. Я. Букина, А. В. Чичиндаев. – Новосибирск. – 1997. – С. 12–13.

30. Быков, В. Л. Цитология и общая гистология (функциональная морфология клеток и тканей человека) / В. Л. Быков. – СПб.: СОТИС, 2011. – 520 с.

31. Валиев, В. С. Результаты натурного наблюдения и гидрохимического исследования водохранилищ Волжского каскада осуществленного в ходе специальной комплексной научной экспедиции / В. С. Валиев // Гидрохимия Волги. – 2011. – С. 1–4.

32. Ватазин А. В. Витальная компьютерная морфометрия лимфоцитов в диагностике острого отторжения почечного аллотрансплантата / А. В. Ватазин, И. А. Василенко, А. Л. Валов, В. Б. Метелин, Е. Е. Круглов, А. Я. Цалман // Вестник трансплантологии и искусственных органов.– 2009. – Т. XI, № 4. – С. 18–25.

33. Вишневская, Т. Я. Селезенка кошки в аспекте гистофизиологии лимфоидной ткани и микрососудов / Т. Я. Вишневская, В. В. Капинус // Известия Оренбургского государственного аграрного университета. – 2011. – № 3 (31), ч. 2. – С. 342–345.

34. Влияние гистамина на регуляцию иммунологической реактивности у человека / О. А. Ставинская, В. П. Репина, А. В. Полетаева, Л. К. Добродеева // Вестник Северного (Арктического) федерального университета. – 2008. – № 2. – С. 35–40.

35. Влияние окисленного глутатиона и его фармакологического аналога препарата глутоксим на внутриклеточную концентрацию Ca^{2+} в макрофагах / Л. С. Курилова, З. И. Крутецкая, О. Е. Лебедев, В. Г. Антонов // Цитология. – 2008. – Т. 50, № 5. – С. 452–461 .
36. Влияние удаления селезенки у крыс-самок на морфофункциональное состояние надпочечников потомства / О. Ю. Кострова, Г. Ю. Стручко, Л. М. Меркулова, М. Н. Михайлова, Е. В. Москвичев.// Acta medica Eurasica. – 2015. – № 1–2. – С. 6–11. – URL: acta-medica-eurasica.ru/single/2015/1/2/
37. Волков, В. П. Новый алгоритм морфометрической оценки функциональной иммуноморфологии селезёнки / В. П. Волков // Universum: Медицина и фармакология : электрон. научн. журн. – 2015. – № 5–6 (18). – URL: 7universum.com/ru/med/archive/item/2341.
38. Волков, М. М. Фосфорно-кальциевый обмен и его регуляция / М. М. Волков, И. Г. Каюков, А. В. Смирнов // Нефрология. – 2010. – Т. 14, № 1. – С. 91–103 .
39. Воронкова, О. В. Влияние препарата «Кальций-Д3 Никомед» на гематологические показатели пациентов с разной иммунопринадлежностью / О. В. Воронкова // Всеукраинский медицинский журнал молодых ученых «Хист». – 2010. – № 1. – С. 42–43.
40. Воронкова, О. В. Коррекция иммунологического статуса пациентов препаратами кальция / О. В. Воронкова, В. Е. Сергеева // Материалы Пятого международного научного семинара «Фундаментальные исследования и инновации» и Всероссийского молодежного научного семинара «Наука и инновации». – 2010. – С. 252–256.
41. Вялов, С. С. Диагностическое значение лабораторных исследований / С. С. Вялов. – М.: Умный доктор, 2014. – 320 с.
42. Гайдуков, А. Е. Облегчение секреции ацетилхолина в моторных синапсах мыши, обусловленное выбросом депонированного кальция при активации

кальциевых каналов L-типа / А. Е. Гайдуков // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. – 2009. – Т. 148, № 8. – С. 124–128.

43. Гербут, А. О. Характеристика плотности клеточных элементов структурных компонентов белой пульпы селезенки после антигенной стимуляции в эксперименте / А.О. Гербут // Клиническая анатомия и оперативная хирургия. – Черновцы, 2007. – Т. 6, № 1. – С. 56–58.

44. Гистология, цитология и эмбриология: атлас / В. В. Гемонов, Э. А. Лаврова; под ред. члена-кор. РАМН С. Л. Кузнецова. – М.: ГЭОТАР – Медиа, 2013. – 168 с.: ил.

45. Голдовская-Перистая, Л. Ф. Гигиеническая оценка качества питьевой воды централизованной системы водоснабжения Белгородской области по некоторым химическим показателям / Л. Ф. Голдовская-Перистая, В. А. Перистый // Научные ведомости Белгородского государственного университета, 2008. – Т. 3, № 6. – С. 140–146.

46. Голубцова, Н. Н. Биоаминное обеспечение структур селезёнки после введения толуола / Н. Н. Голубцова, Л. А. Любовцева, А. О. Лойт // Бюлл. эксп. биол. и мед. – 2000. – Т. 130, № 12. – С. 643–647.

47. Гомазков, О. А. «Нейропептиды – универсальные регуляторы. Почему?» / О. А. Гомазков // Природа. – 1999. – № 4. – URL: vivovoco.rsl.ru/VV/JOURNAL/NATURE/04_99/GOM.HTM.

48. Горбачев, А. Л. Элементный статус населения в связи с химическим составом питьевой воды / А. Л. Горбачев // Микроэлементы в медицине. – 2006. – №7 (2). – С. 11–24.

49. Гордова, В. С. Антигенпрезентирующие клетки лимфоидных органов / В. С. Гордова, И. М. Дьячкова // Вестник Чувашского Университета. – Вып. 2. – 2014. – С. 217–224.

50. Гордова, В. С. Структурно-функциональное состояние лимфоидных органов лабораторных крыс при длительном поступлении соединения кремния с

питьевой водой: автореф. дис. ... канд. мед. наук: 03.03.04 / Гордова Валентина Сергеевна. – Саранск, 2014. – 21 с.

51. Гордон, Д. С. Нейромедиаторы лимфоидных органов (функциональная морфология) / Д. С. Гордон, В. Е. Сергеева, И. Г. Зеленова. – Л.: Наука, 1982. – 128 с.

52. Горлач, В. В. Обработка, представление, интерпретация результатов измерений: Учебное пособие / В. В. Горлач, В. Л. Егоров, Н. А. Иванов / Под ред. В. В. Горлача. – Омск: Изд-во СибАДИ, 2006. – 83 с.

53. ГОСТ Р 51309-99. Вода питьевая. Определение содержания элементов методами атомной спектрометрии. – М., 2006.

54. ГОСТ Р 52109-2003. Вода питьевая, расфасованная в емкости. Общие технические условия. – М., 2003.

55. Гребнев, Д. Ю. Возможность коррекции морфометрических показателей селезенки с помощью стволовых клеток / Д. Ю. Гребнев, А. П. Ястребов, И. Ю. Маклакова // Цитология. – 2011. – Т. 53, № 9. – С. 730–731.

56. Григоренко, Д. Е. Эффект воздействия легкой воды на лимфоидную ткань селезенки / Д. Е. Григоренко, Б. С. Федоренко, Д. Ф. Раков // Научные труды I съезда физиологов СНГ. – М.: Медицина – Здоровье, 2005. – С. 251.

57. Гугушвили, Н. Н. Гистохимия иммунокомпетентных органов и цитохимический анализ крови / Н. Н. Гугушвили, Н. П. Радуль, В. Н. Шевкопляс / Методические рекомендации. – Краснодар, 2001. – 90 с.

58. Гуцин, Г.В. Адренергические и холинергические механизмы регуляции функций лимфоидных клеток / Г. В. Гуцин // Основы современной физиологии. Иммунофизиология / под ред. Е. А. Корневой. – СПб: Наука, 1993. – С. 243–280.

59. Девойно, Л. В. Биогенные амины в регуляции иммунных реакций / Л. В. Девойно // Химия и биология иммунорегуляторов. – Рига: Зинатне, 1985. – С. 206–221.

60. Действие катионов кальция на кислотно-основные свойства и свободнорадикальное окисление дофамина и пирокатехина / А. В. Лебедев, М. В. Иванова, А. А. Тимошин, Э. К. Рууге // Биомедицинская химия. – 2008. – Т. 54.– Вып. 6. – С. 687–695 .
61. Джандарова, Т. И. Роль ионов кальция в организации и перестройке циркадианных ритмов эндокринных функций / Т. И. Джандарова. – Ставрополь: Изд-во СГУ, 2002. – 131 с.
62. Диндяев, С. В. Морфологические аспекты обмена биоаминов в эндометрии крыс в процессе полового цикла / С. В. Диндяев, С. Ю. Виноградов // Морфологические ведомости. – 2007. – № 1–2. – С. 55–57.
63. Доклад «Об экологической ситуации в Чувашской Республике в 2014 году»: Монография / Ю. Н. Абдулкин, А. Г. Евграфова, Т. М. Иванова и др. – Чебоксары, 2015. – 79 с.
64. Дорогова, В. Б. Методы фотометрического анализа в санитарно-гигиенических исследованиях / В. Б. Дорогова, Л. П. Игнатьева. – М.: Издательский дом Академии Естествознания, 2013. – 102 с.
65. Дьячкова, И. М. Изменение IVA-1 позитивных клеток тимуса при воздействии кремния и кальция / И. М. Дьячкова // Вопросы клинической и экспериментальной медицины: материалы регион. науч.-практ. конф., посвящ. 90-летию со дня рождения проф. Амосовой В. В. – Чебоксары : Изд-во Чуваш. ун-та, 2009. – С. 190–192.
66. Дьячкова, И. М. Некоторые адаптационные реакции тимуса на поступление кальция и кремния с питьевой водой / И. М. Дьячкова, В. С. Гордова, В. Е. Сергеева, С. П. Сапожников. – Чебоксары: Изд-во Чуваш. ун-та, 2014.–140 с.
67. Ермолина, Е. В. Структурные преобразования органов гипоталамо-гипофизарно-адренкортикальной и иммунной систем крыс при воздействии хрома и бензола / Е. В. Ермолина, И. С. Митрофанова, А. А. Стадников, А. И. Смолягин. // Астраханский медицинский журнал, 2013. – Т. 8, № 1. – С. 80–83.

68. Ерофеев, Ю. В. Влияние кальция и магния в питьевой воде на заболеваемость населения Омской области / Ю. В. Ерофеев, Т. А. Нескин, Д. В. Турчиных // Гигиена и санитария. – 2006. – № 6. – С. 23–27.
69. Ершова, О. Б. Проблема дефицита кальция и витамина D в организме / О. Б. Ершова, К. Ю. Белова, А. В. Назарова // Справочник поликлинического врача. – 2011. – № 9. – С. 19–22.
70. Жданов, В. В. Механизмы кроветворения у бестимусных мышей / В. В. Жданов, Т. А. Лукьянова, Е. В. Кириенкова // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. – 2002. – Т. 133, № 5. – С. 522–524.
71. Жилиев, Е. В. Клиническое значение и нарушения кальциевого обмена / Е. В. Жилиев, А. В. Глазунов, П. А. Глазунов // Клиническая медицина. – 2011. – Т. 89, № 4. – С. 13–17.
72. Загускин, С. Л. Ритмы клетки и здоровье человека / С. Л. Загускин. – Ростов н/Д: ЮФУ, 2010. – 292 с.
73. Замощина, Т. А. Особенности суточной динамики содержания натрия, калия, кальция и лития в крови, мозге и моче в зависимости от сезона года и режима освещения / Т. А. Замощина, Е. В. Иванова // Вестник ОГУ, 2006. – № 12. – С. 104–106.
74. Зверев, В. А. Оптические материалы / В. А. Зверев, Е. В. Кривоустова, Т. В. Точилина. – Часть 1. – СПб: СПбГУ ИТМО, 2009. – 244 с.
75. Зеленова, И. Г. Адренергическая иннервация селезенки кошки / И. Г. Зеленова // Архив анатомии. – 1971. – Т. 60. – Вып. 2. – С. 88–90.
76. Зерний, Е. Ю. С-концевой сегмент как встроенный модулятор функционирования белков семейства нейрональных кальциевых сенсоров / Е. Ю. Зерний, Т. В. Колпакова, С. Е. Пермяков и др. // Материалы V Российского симпозиума «Белки и пептиды», 2011. – С.114.
77. Зинченко, В. П. Внутриклеточная сигнализация / В. П. Зинченко, Л. П. Долгачева. Пушино: Электронное издательство Аналитическая микроскопия, 2003. – URL: www.booksite.ru/localtxt/zin/che/nko/zinchenko.pdf.

78. Златник, Е. Ю. Дозозависимое действие наночастиц переходных металлов на морфофункциональное состояние селезенки / Е. Ю. Златник, Л. В. Педреева // *Фундаментальные исследования*. – 2014. – № 7. – С. 282–285.
79. Злобина, О. В. Морфофункциональное состояние белой пульпы селезенки при пероральном введении наночастиц золота в эксперименте / О. В. Злобина, С. С. Фирсова, А. Б. Бучарская, И. О. Бугаева, Г. Н. Маслякова // *Морфология*. – Т. 140, № 5. – 2011. – С. 88.
80. Изменения иммунного статуса у пациентов с повреждениями селезенки в зависимости от выполненной операции / В. В. Масляков, В. Ф. Киричук, М. С. Громов, А. В. Поляков // *Современные проблемы науки и образования*. – 2012. – № 4. – URL: www.science-education.ru/ru/article/view?id=6841.
81. Иммуногистохимические методы: Руководство / Ed. by G. L. Kumar, L. Rudbeck.: ДАКО / Пер. с англ. под ред. Г. А. Франка, П. Г. Малькова. – М., 2011. – 224 с.
82. Иммунологические и биохимические аспекты воздействия хрома на организм крыс вистар / И. В. Михайлова, А. И. Смолягин, С. И. Красиков, Е. В. Ермолина, В. М. Боев // *Токсикологический вестник*. – 2015. – № 3. – С. 21–25.
83. Иммунологические показатели крови в сопоставлении с эхографическими параметрами селезенки у детей с дисплазией соединительной ткани / В. В. Суменко, С. Е. Лебедькова, Н. М. Лившиц, А. Р. Климова и др. // *Российский иммунологический журнал*. – 2015. – Т. 9(18), № 2(1). – С. 324–326.
84. Иммунология: учебник / Р. М. Хаитов. – 2-е изд., перераб. и доп. – М.: ГЭОТАР-Медиа, 2013. – 528 с.: ил.
85. Инфекционный процесс / Н. П. Чеснокова, А. В. Михайлов, В. В. Моррисон, Г. Е. Бриль и др. – М.: Изд-во Академия естествознания, 2006. – 484 с.
86. Использование математического моделирования для оценки функционирования иммунной системы / Г. Ю. Стручко, Л. М. Меркулова, Т. В. Агафонки-

на, И. С. Стоменская // Математические модели и их приложения: Сб. ст. – Чебоксары, 2002. – С. 133–138.

87. Калинина, Е. Ю. Морфофункциональные изменения органов иммунной системы при отравлениях бытовым газом / Е. Ю. Калинина, О. Д. Ягмуров // Современные проблемы науки и образования. – 2015. – № 3. – URL: www.science-education.ru/123-19884.

88. Кальций индуцированный выброс депонированного кальция определяет триггерный характер ответов мезенхимальных стромальных клеток на норадреналин / П. Д. Котова, П. А. Тюрин-Кузьмин, О. А. Рогачевская, Ю. И. Фадеева и др. // Биологические мембраны, 2013. – Т. 30, № 5–6. – С. 1–8.

89. Капитонова, М. Ю. Компьютерная оценка компартиментализации селезенки растущих крыс в различные возрастные периоды / М. Ю. Капитонова, Т. М. Аверина // XXI век: актуальные задачи морфологии / Морфология. – СПб: Эскулап, 2001. – Т. 120, № 4. – С. 73.

90. Каплиева, И. В. Специфика действия стандартной и аутогемохимиотерапии на содержание катехоламинов в селезенке и тимусе у крыс с саркомой 45 / И. В. Каплиева // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. – 2010. – Т. 150, № 7. – С. 77–79.

91. Карманова, Л. В. Экологическая физиология биоэлементов у жителей республики Коми / Л. В. Карманова, С. Г. Суханов // Фундаментальные исследования. – 2011. – № 5 – С. 73-77.

92. Карнаухов, В. Н. Люминесцентный анализ клеток / В. Н. Карнаухов, под ред. А. Ю. Буданцева. – Пушино: Электронная микроскопия, 2002. – 131 с.

93. Кащенко, С. А. Строение селезенки белых крыс подсосного возраста / С. А. Кащенко, М. В. Золотаревская, Н. В. Станишевская, Л. Г. Войновская // Таврический медико-биологический вестник. – 2013. – Т. 16, № 1. – Ч. 1. – С. 104–106.

94. Кветной, И. М. Нейроиммуноэндокринология и химическая общность регуляторных систем / И. М. Кветной // Цитокины и воспаление. – 2002. – Т. 1, № 2. – С. 55–56.
95. Кирик, О. В. Кальций-связывающий белок Iba-1/AIF1 в клетках головного мозга крысы / О. В. Кирик, Е. Г. Сухорукова, Д. Э. Коржевский // Морфология. – 2010. – Т. 136, № 2. – С. 5–7.
96. Клиническая иммунология и аллергология / под ред. Г. Лолора-младшего, Т. Фишера, Д. Адельмана. Пер. с англ. – М., Практика, 2000. – 806 с.
97. Клиническая лабораторная диагностика / В. В. Долгов, С. А. Луговская, В. Т. Морозова и др. – М.: Медицина, 2002. – 157 с.
98. Козырева, Т. В. Моделирующее влияние кальция на иммунный ответ в термонейтральных условиях и при глубоком охлаждении гомойотермного организма / Т. В. Козырева, Л. С. Елисеева, Г. М. Храмова // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. – 2009. – Т. 148, № 9. – С. 247–250.
99. Копаладзе, Р. А. Регламентация экспериментов на животных — этика, законодательства, альтернативы: Обзор / Под ред. Н.А. Горбуновой. – М., 1998. – 341 с.
100. Коровина, Н. А. Дефицит витаминов и микроэлементов у детей: современные подходы к коррекции / Н. А. Коровина, И. Н. Захарова, А. Л. Заплатников. – М., Медпрактика. – 2004. – 56 с.
101. Коротков, С. М. Исследование механизма действия диазоксида на митохондрии сердца крысы в условиях их кальциевой нагрузки / С. М. Коротков, В. П. Нестеров, Н. П. Рябчиков // Доклады Российской академии наук. – 2006. – Т. 408, № 2. – С. 271 – 275.
102. Корреляционный анализ. Использование MS Excel для расчета коэффициента корреляции. Учебно-методическое пособие для студентов. – КГМУ, Казань, 2011. – 18 с.

103. Костюк, П. Г. Ионы кальция и пластичность нервной системы / П. Г. Костюк // Российский физиологический журнал. – 2001. – № 8. – С. 1017–1025.
104. Кроткова, О. С. Люминесцентно-морфологические особенности селезенки мыши после иглоукалывания / О. С. Кроткова, Е. А. Гурьянова, С. В. Николаев, Л. А. Любовцева и др. // Бюлл. эксп. биол. и мед. – 2014. – Т. 157, № 6. – С. 791–795.
105. Крохина, Е. М. Симпатический (адренергический) компонент эффективной иннервации сердечной мышцы / Е. М. Крохина, П. Н. Александров // Кардиология. – 1969. – № 3. – С. 97–104.
106. Кудрин, А. В. Иммунофармакология микроэлементов / А. В. Кудрин А. В. Скальный, А. А. Жаворонков М. Г. Скальная и др. – М.: КМК, 2000. – 537 с.
107. Кудрин, А. В. Микроэлементы и кальций в регуляции апоптоза / А. В. Кудрин // Успехи современной биологии. – 1998. – № 5. – С. 17–21.
108. Кудрин, А.В. Микроэлементы в иммунологии и онкологии / А. В. Кудрин, О. А. Громова. – М.: ГЭОТАР - Медиа, 2007. – 544 с.
109. Кузнецов, С. Л. Атлас по гистологии, цитологии и эмбриологии / С. Л. Кузнецов, Н. Н. Мушкамбаров. – М.: ООО «Медицинское информационное агентство», 2007. – 600 с.
110. Кузнецова, Е. П. Селезенка: онтогенез и старение / Е. П. Кузнецова, Н. С. Линькова и др. // Геронтология. – 2013. – № 2. – С.135–144.
111. Кузник, Б. И. Общая гематология / Б. И. Кузник, О. Г. Максимова. – М.: Феникс. – 2007. – 582 с.
112. Кульбачинский, В. В. Использование биологически активных пищевых добавок для первичной и вторичной профилактики различных заболеваний / В. В. Кульбачинский // Натуральная фармакология и косметология. – 2005. – № 6. – С. 27–31.

113. Куприненко, Н. Н. Дефицит кальция и витамина D: глобальная проблема // Боль. Суставы. Позвоночник / Н. Н. Куприненко. – 2012. – № 1 (05). – URL: www.mif-ua.com/archive/article/30484.
114. Кутина, А. В. Катионы в сыворотке крови человека / А. В. Кутина, А. А. Кузнецова, Ю. В. Наточин // Успехи физиол. наук. – 2005. – Т. 36, № 3. – С. 3–32.
115. Кухта, В. К. Некоторые особенности действия ионов кальция в клетках в качестве сигнальной молекулы / В. К. Кухта, А. Д. Таганович, Э. И. Олецкий // Медицинский журнал. – 2010. – № 2. – С. 12–14.
116. Лавров, О. В. Значение биогенных аминов в развитии иммунопатологических состояний и стресса / О. В. Лавров, Е. П. Колеватых, С. И. Опалева // Вятский медицинский вестник. – 2007. – № 4. – С. 60–62.
117. Лебединская, О. В. Морфологические изменения лимфоидных и паренхиматозных органов мышц на фоне введения иммуномодуляторов бактериального происхождения / О. В. Лебединская, А. В. Годовалов, Н. К. Ахматова // Морфология. – 2011. – Т. 140, № 5. – С. 97.
118. Леонов, В. П. Об использовании прикладной статистики при подготовке диссертационных работ по медицинским и биологическим специальностям / В. П. Леонов, Л. В. Ижевский // Бюллетень ВАК РФ. – 1997. – Вып. 3. – С. 56–61.
119. Лимфоидная система – циркадная временная организация и десинхронизация / В. А. Труфакин, А. В. Шурлыгина, С. В. Мичурина // Бюллетень СО РАМН. – 2012. – Т. 32, № 1. – С. 5–12.
120. Линева, А. И. Физиологические показатели нормы животных / А. И. Линева. – М.: Аквариум, 2001. – 256 с.
121. Лузикова, Е. М. Морфофункциональная реакция антигенпрезентирующих клеток тимуса на введение мелатонина и препарата «Эндорфин» / Е. М. Лузикова, И. Л. Артемьева, В. Е. Сергеева // Вестник Чувашского университета, 2014. – № 2. – С. 28–29.

122. Лукьянчиков, В. С. Кальций: физиология, онтогенетический и клинический аспект / В. С. Лукьянчиков // Новые исследования. – 2012. – № 2(31). – С. 5–13.

123. Любич, Л. Д. HLA–антигенная характеристика нативных и культивируемых нейроцитов фетального и постнатального головного мозга человека / Л. Д. Любич, Н. И. Лисяный, В. М. Семенова, Л. П. Стайно. // Клеточные культуры. Информационный бюллетень. – Вып. 25. – СПб: Изд-во Политехн. ун-та, 2010. – С. 47–59.

124. Любовцева, Л. А. Люминесцентно-гистохимическое исследование аминсодержащих структур костного мозга, тимуса и крови при действии нейромедиаторов и антигенов // Л. А. Любовцева. – Чебоксары: Изд-во Чуваш. ун-та, 1993. – 100 с.

125. Любовцева, Л. А. Реакция биоаминсодержащих структур тимуса на введение нейромедиаторов / Л. А. Любовцева, Е. В. Любовцева, В. В. Любовцев // Здоровоохранение Чувашии. – Чебоксары. – № 3. – 2011. – С. 56–60.

126. Макалиш, Т. П. Морфофункциональные особенности селезенки при воздействии на организм факторов различного генеза / Т. П. Макалиш // Таврический медико-биологический вестник. – 2013. – Т. 16. – № 1, ч.1 – С. 265–269.

127. Макаренкова, В. П. Система дендритных клеток роль в индукции иммунитета и в патогенезе инфекционных, аутоиммунных и онкологических заболеваний / В. П. Макаренкова, Н. В. Кост, М. Р. Щурин // Иммунология. – 2002. – № 2. – С. 68–76.

128. Маракушин, Д. И. Влияние оксиэтилированных алкилфенолов на ионный обмен при подостром воздействии на белых крыс / Д. И. Маракушин, О. А. Наконечная, И. Г. Максимова // Украинский биофармацевтический журнал. – 2013. – № 2 (25). – С. 28–32.

129. Маркова, Т. Н. Распространенность дефицита витамина D и факторов риска остеопороза у лиц молодого возраста / Т. Н. Маркова, Д. С. Марков,

Т. Н. Маркелова, С. Р. Нигматуллина и др. // Вестник Чувашского университета. – 2012. – № 3. – С. 441–446.

130. Мартынова, Е. А. Роль питания в поддержании функциональной активности иммунной системы и развитии полноценного иммунного ответа / Е. А. Мартынова, И. А. Морозов // Материалы XVI сессии Академической школы-семинара имени А.М. Уголева «Современные проблемы физиологии и патологии пищеварения». – 2001. – Т. XI, № 4. – С. 28–38.

131. Медик, В. А. Статистика в медицине и биологии. Том 1. – Теоретическая статистика. / В. А. Медик, М. С. Токмачёв, Б. Б. Фишман. – М.: Медицина, 2000. – 412 с.

132. Мельникова, В. И. Динамика апоптоза и пролиферации в тимусе и селезенке крыс в перинатальном онтогенезе / В. И. Мельникова, М. А. Афанасьева и др. // Онтогенез. – 2006. – Т. 37, № 4. – С. 286–291.

133. Методические рекомендации МР № 2.3.1 1915-04. – МЗСР РФ. – М., 2004. – 34 с.

134. Мешкова, Р. Я. Руководство по иммунопрофилактике для врачей / Р. Я. Мешкова. – Смоленск: ГМА, 1998. – 133 с.

135. Микроэлементозы человека: этиология, классификация, органопатология / А. П. Авцын, А. А. Жаворонков, М. А. Риш и др. – М.: Медицина, 1991. – 496 с.

136. Мирная, С. С. Роль кальций-чувствительного рецептора в поддержании системы кальциевого гомеостаза / С. С. Мирная, Е. А. Пигарова, А. В. Беляева и др. // Остеопороз и остеопатии. – 2010. – № 3. – С. 32–36.

137. Мирошников, С. А. Диапазон концентраций (референтные значения) химических элементов в теле животных / С. А. Мирошников, С. В. Лебедев // Вестник Оренбургского государственного университета. – 2009. – № 6. – С. 241–243.

138. Молдавская, А. А. Селезенка человека в эмбриональном периоде развития / А. А. Молдавская, А. В. Долин // Современные наукоемкие технологии. – 2005. – № 7. – С. 21–22.

139. Молдавская, А. А. Морфофункциональные аспекты строения селезенки на этапах пренатального онтогенеза / А. А. Молдавская, А. В. Долин // Морфологические ведомости. – 2007. – №1–2. – С. 281–284.

140. Мороз, Г. А. Структурная организация селезенки интактных крыс-самцов линии Вистар 2-х, 6-ти и 12-ти месячного возраста / Г. А. Мороз, Н. Ю. Озерова // Таврический медико-биологический вестник. – 2010. – Т. 13, № 4 (52). – С. 111–114.

141. Морозова, Е. В. Влияние состава питьевой воды на состояние здоровья детей / Е. В. Морозова, Т. Г. Авдеева. – 2006. – URL: www.o8ove.ru.

142. Морфологическая диагностика. Подготовка материала для гистологического исследования и электронной микроскопии: руководство / Д. Э. Коржевский, Е. Г. Гилерович, О. В. Кирик, Е. Г. Сухорукова и др. – СПб.: СпецЛит, 2013. – 127 с.

143. Морфология альвеолярных макрофагов при экспериментальном воздействии лазерным излучением в красном диапазоне / Т. Л. Огородникова, Н. П. Красавина, С. С. Целуйко, С. Д. Чжоу, Ц. Ли // Бюллетень физиологии и патологии дыхания. – 2014. – № 51. – С. 48–53.

144. Морфометрия иммунокомпетентных клеток в экспресс-диагностике иммунологического конфликта у реципиентов почечного аллотрансплантата / В. А. Степанов, С. В. Арзуманов, А. Л. Валов, А. В. Ватазин, И. А. Василенко // Цитометрия в медицине и биологии: фундаментальные и прикладные аспекты. – М., РИАЛТЕКС: 2008. – С. 61–63.

145. Морфофункциональная адаптация структур тимуса крыс на поступление кремния с питьевой водой / В. С. Гордова, И. М. Дьячкова, В. Е. Сергеева, С. П. Сапожников, А. Т. Смородченко // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. – 2014. – № 158. – С. 786–790.

146. Москвичев, Е. В. Морфофункциональные изменения трансплантата селезенки в первые 45 дней после операции / Е. В. Москвичев, Л. М. Меркулова, Г. Ю. Стручко, Е. Б. Шумилова, М. В. Черненко // *Здравоохранение Чувашии*, 2005. – № 4. – С. 25–30.

147. Моталов, В. Г. Макрофагально-лимфоидные муфты (эллипсоиды) селезенки у человека в онтогенезе / В. Г. Моталов // *Морфология*. – 2008. – Т. 133, № 2. – С. 90.

148. Моталов, В. Г. Некоторые структурно-функциональные характеристики белой пульпы селезенки у детей / В. Г. Моталов // *Российский медико-биологический вестник им. академика И. П. Павлова*. – 2008. – № 1 – 2. – С. 65–66.

149. Навигационные рецепторы клеток: физиологическая роль и механизмы функционирования / В. А. Ткачук, Е. В. Семина, К. А. Рубина, В. Ю. Сысоева и др. // *Фізіологічний журнал: науково-теоретичний журнал / Інститут фізіології ім. О.О. Богомольц*. – 2011. – Т. 57, № 5. – С. 80–83.

150. Нанотехнологии микронутриентов: проблемы, перспективы и пути ликвидации дефицита макро- и микроэлементов / А. М. Сердюк, М. П. Гулич, В. Г. Каплуненко, М. В. Косинов // *Журнал академии медицинских наук Украины*. – 2010. – № 1. – С. 107–114.

151. Научные принципы обогащения пищевых продуктов микронутриентами / А. А. Кухаренко, А. Н. Богатырев, В. М. Короткий, М. Н. Дадашев // *Пищ. промышленность*. – 2008. – № 5. – С. 62–64.

152. Начала физиологии: Учебник для вузов. 2-е изд., испр. / А. Д. Ноздрачев, Ю. И. Баженов, И. А. Баранникова, А. С. Батуев и др. – СПб.: Лань, 2002. – 1088 с.

153. Оберлис, Д. Биологическая роль макро- и микроэлементов у человека и животных / Д. Оберлис, Б. Харланд, А. Скальный. – СПб.: Наука, 2008. – 273 с.

154. Общая патология гипомикроэлементозов / А. А. Жаворонков, А. М. Михалева, Л. В. Кактурский, А. В. Кудрин // Архив. Патологии. – 1997. – Т. 59, № 2. – С. 8–11.
155. Онтогенетические аспекты стромально-паренхиматозных взаимоотношений в селезенке / А. И. Рябикина, М. Ю. Капитонова, А. А. Нестерова, З. Ч. Морозова // Морфология. – 2008. – Т. 132, № 2. – С. 58.
156. Органические соли кальция: перспективы использования в клинической практике / О. А. Громова, Ю. И. Торшин, И. В. Гоголева и др. // Русский медицинский журнал. – 2012. – № 28. – С. 1407–1410 .
157. Орлов, С. Н. Кальмодулин: Общие проблемы физико-химической биологии / С. Н. Орлов. – М.: ВИНТИ АН СССР, 1987. – № 8. – 212 с.
158. Остеопороз / под ред. О. М. Лесняк, Л. И. Беневоленской. – 2-е изд., перераб. и доп. – М. : ГЭОТАР-Медиа, 2012. – 272 с.
159. Оценка влияния качества питьевой воды на здоровье населения / Е. А. Борзунова, С. В. Кузьмин, Р. Л. Акрамов, Е. Л. Киямова // Гигиена и санитария. – 2007. – №3. – С. 32–34.
160. Павлова, О. В. Исследование корреляционных взаимосвязей серотонинсодержащих структур брыжеечных лимфатических узлов при введении инсулина / О. В. Павлова, В. Е. Сергеева // Материалы Международной научно-практической конференции «Теоретические и прикладные проблемы современной науки и образования». – Курск, 2013. – С. 57–61.
161. Пальцев, М. А. Межклеточные взаимодействия / М. А. Пальцев, А. А. Иванов, С. Е. Северин. – М.: Медицина, 2003. – 288 с.
162. Пальцев, М. А. Руководство по нейроиммуноэндокринологии / М. А. Пальцев, И. М. Кветной. – М.: Медицина, 2008. – 512 с.
163. Панченко, Л. Ф. Клиническая биохимия элементов / Л. Ф. Панченко, И. В. Маев, К. Г. Гуревич. – М.: ГОУ ВУНМЦ МЗ РФ, 2004. – 368 с.
164. Пермяков, Е. А. Кальцийсвязывающие белки / Е. А. Пермяков. – М., Наука. – 1993. – 190 с.

165. Песнякевич, А. Г. Основы иммунологии. Курс лекций / А. Г. Песнякевич. – М., 2007. – 201 с.: ил.
166. Пигарова, Е. А. Физиология обмена кальция в почках / Е. А. Пигарова // Ожирение и метаболизм. – 2011. – № 4. – С. 3–8.
167. Платонов, А. Е. Статистический анализ в медицине и биологии: задачи, логика, компьютерные методы / А. Е. Платонов. – М.: Издательство РАМН, 2000. – 52 с.
168. Поветкина, В. Н. Ca²⁺ баланс и его роль в формировании экспериментальных язв желудка у стрессоустойчивых и стрессонеустойчивых крыс / В. Н. Поветкина, Л. Н. Рогова // Вестник новых медицинских технологий. – 2012. – Т. 19, № 2. – С. 361–364 .
169. Поликарпов, В. М. Современные методы компьютерной обработки экспериментальных данных: учебное пособие / В. М. Поликарпов, И. В. Ушаков, Ю. М. Головин. – Тамбов: Изд-во Тамб. гос. техн. ун-та, 2006. – 84 с.
170. Попов, Н. Н. Клиническая иммунология и аллергология / Н. Н. Попов, В. Ф. Лавров, Э. Н. Солошенко. – М.: Реинфор, 2004. – 524 с.
171. Прасолова, Л. А. Морфофункциональные характеристики селезенки у крыс разного поведения после воздействия рестрикционного стресса / Л. А. Прасолова, И. Н. Оськина, С. Г. Шухевич // Морфология. – 2004. – Т. 125, № 1. – С. 59–63.
172. Приказ МЗ РФ № 708н «Об утверждении Правил лабораторной практики» от 23. 08. 2010 г.
173. Пуговкин, А. П. Морфофункциональные основы обеспечения нейрогуморальной регуляции функций иммунной системы. / А. П. Пуговкин // Основы современной физиологии. Иммунофизиология. / под ред. Е. А. Корневой. – СПб: Наука, 1993. – С. 37–66.
174. Развитие селезенки в раннем постнатальном онтогенезе / М. Ю. Капитонова, А. И. Краюшкин, А. И. Рябикина, А. А. Нестерова // Вестник ВолГМУ. – 2007. – №4(24). – С. 56–58.

175. Раковщик, А. Л. Морфофункциональная гетерогенность фагоцитирующих клеток маргинальной зоны и красной пульпы селезенки мышей / А. Л. Раковщик, С. Л. Гриф, Н. И. Чурилова // Актуальные вопросы экспериментальной и клинической морфологии. – Томск, 2002. – Вып. 2. – С. 248.
176. Рахманин, Ю. А. Методика изучения влияния химического состава питьевой воды на состояние здоровья населения/ Ю. А. Рахманин, Г. И. Сидоренко, Р. И. Михайлова // Гигиена и санитария. – 1998. – №4. – С. 13–19.
177. Ребров, В. Г. Витамины, макро- и микроэлемент / В. Г. Ребров, О. А. Громова. – М.: ГЭОТАР-Медиа, 2008. – 960 с.
178. Реброва, О. Ю. Статистический анализ медицинских данных. Применение пакета прикладных программ STATISTICA / О. Ю. Реброва. – М.: МедиаСфера, 2006. – 312 с.
179. Репина, В. П. Влияние различных концентраций катехоламинов на функционирование иммунокомпетентных клеток / В. П. Репина // Экология человека. – Архангельск. – 2008. – С. 30–33.
180. Рожинская, Л. Я. Соли кальция в профилактике и лечении остеопороза / Л. Я. Рожинская // Остеопороз и остеопатии. – 1998. – №1. – С.43–45.
181. Ройт, А. Иммунология / А. Ройт, Дж. Бростофф, Д. Мейл / пер. с англ. – М.: Мир, 2000 – 592 с.
182. Руководство по биометрии / Р. М. Болл, Д. Х. Коннел, Ш. Панканти, Н. К. Ратха и др. – М.: Техносфера, 2007. – 368 с.
183. Руководство по гематологии: в 3 т. / под ред. А. И. Воробьева. – Т. 3. – М.: Ньюдиамед, 2005. – 416 с.
184. Руководство по гистологии / под ред. Р. К. Данилова. – 2-е изд., испр. и доп. – СПб.: «СпецЛит», 2010. – Т. 1. – 831 с.
185. Руководство по лабораторным животным и альтернативным моделям в биомедицинских исследованиях / под ред. Н. Н. Каркищенко, С. В. Грачева. – М.: Профиль, 2010. – 358 с.

186. Руководство по обеспечению качества питьевой воды. Том 1: 3-е изд. Всемирная организация здравоохранения. – Женева, 2004. – 121 с.
187. Садоян, В. А. Биологически активные добавки на фармацевтическом рынке: справ. рук. / В. А. Садоян; под ред. Л. В. Мошковой. – М.: Литтерра, 2006. – 199 с.
188. Санитарные правила по устройству, оборудованию и содержанию экспериментально-биологических клиник (вивариев) от 06. 04. 1973 г.
189. СанПиН 2.1.4.1116-02. Питьевая вода. Гигиенические требования к качеству воды, расфасованной в емкости. Контроль качества.
190. Сапин, М. Р. Иммунная система, стресс и иммунодефицит / М. Р. Сапин, Д. Б. Никитюк. – М.: Джангар, 2000. – 184 с.
191. Сапин, М. Р. Лимфатическая система и ее роль в иммунных процессах / М.Р. Сапин // Морфология. – 2012. – Т. 141. – № 3. – С. 139.
192. Сапин, М. Р. Цитоархитектоника белой пульпы селезенки у людей различного возраста / М. Р. Сапин, Е. Ф. Амбарцумян. – Архив анат., 1990. – Т. 98. – № 5. – С. 5–10.
193. Сапожников, А. Г. Гистологическая и микроскопическая техника. Руководство / А. Г. Сапожников, А. Е. Доросевич. – Смоленск: «САУ», 2000. – 476 с.
194. Сапожников, С. П. Воздействие водного кремния на морфологию периферической иммунной системы / С. П. Сапожников, П. Б. Карышев, В. С. Гордова, Д. А. Шумалкина, Н. А. Андреева // Современные проблемы естественнонаучных исследований: сборник научных статей Чуваш. гос. пед. ун-т; под ред. Ю. Ю. Пыльчиковой. – Чебоксары: Чуваш. гос. пед. ун-т, 2013. – С. 71–73.
195. Сапожников, С. П. Роль биогеохимических факторов в развитии краевой патологии / С. П. Сапожников, А. В. Голенков // Микроэлементы в медицине. – 2001. – № 2 (3). – С. 70–72.
196. Саркисов, Д. С. Микроскопическая техника / Д. С. Саркисов, Д. С. Перов. – М.: Медицина, 1996. – 544 с.

197. Сахаров, В. Н. Роль различных фенотипов макрофагов в развитии заболеваний человека / В. Н. Сахаров, П. Ф. Литвицкий // Вестник Российской Академии медицинских наук. – 2015. – № 1. – С.26–31.
198. Сашенков, С. Л. Влияние различных фармакологических препаратов на поверхностный заряд мембран эритроцитов / С. Л. Сашенков, Л. В. Алачева, Н. В. Тишевская // Вестник ЮУрГУ. – 2011. – № 7. – С. 101–104.
199. Светлов, А. В. Аллергия / А. В. Светлов. – М.: Научная книга, 2013. – 160 с.
200. Сергеева, В. Е. Гистаминсодержащие структуры вторичных лимфоидных органов крыс при длительном поступлении кремния с питьевой водой / В. Е. Сергеева, В. С. Гордова, Л. А. Басова // Современные проблемы естественнонаучных исследований : сборник научных статей Чуваш. гос. пед. ун-т; под ред. Ю. Ю. Пыльчиковой. – Чебоксары: Чуваш. гос. пед. ун-т, 2013. – С. 65–68.
201. Сергеева, В. Е. Люминесцентно-гистохимическая характеристика ранней реакции моноаминсодержащих структур тимуса на антигенные воздействия / В. Е. Сергеева, Д. С. Гордон. – Чебоксары: Изд-во Чуваш. ун-та, 1992. – 352 с.
202. Сергеева, В. Е. Макрофаги селезенки лабораторных крыс при длительном поступлении кремния с питьевой водой / В. Е. Сергеева, И. М. Дьячкова, В. С. Гордова, Л. А. Басова // Современные проблемы естественнонаучных исследований: сборник научных статей.- Чебоксары: Изд-во Чуваш. гос. пед. ун-т, 2014. – С. 63–66.
203. Сереброва, С. Ю. Взаимодействие микронутриентов при абсорбции компонентов витаминно-минеральных комплексов / С. Ю. Сереброва // Врач. – 2010. – № 3. – С. 36.
204. Серотонин-продуцирующие клетки в периоды нормо- и гипотермии / Л. В. Шестопалова, М. С. Виноградова, О. Н. Пономарева, Е. В. Дубинин // Бюлл.экспер.биол. – 1992. – Т. 115, № 2. – С. 119–122.

205. Симбирцев, А. С. Цитокины в иммунопатогенезе и лечении аллергии / А. С. Симбирцев // Российский аллергологический журнал. – 2007. – № 1. – С. 5–19.
206. Скальная, М. Г. Макро- и микроэлементы в питании жителей Москвы / М. Г. Скальная // Микроэлементы в медицине. – 2013. – №14(3). – С. 18–24.
207. Скальный, А. В. Биоэлементы в медицине / А. В. Скальный, И. А. Рудаков. – М.: Мир, 2004. – 272 с.
208. Скальный, А. В. Микроэлементы в диагностике и лечении / А. В. Скальный. – М.: Изд-во «Научный мир», 2001. – 96 с.
209. Сладкова, Е. А. Структурно-функциональные особенности лимфоцитов больных лимфобластным лейкозом / Е. А. Сладкова, М. Ю. Скоркина // Цитология. – 2013. – Т. 55, №6. – С. 388–393.
210. Слепчук, Н. А. Влияние концентрации ионов кальция в крови на физиологические функции крыс при иммерсионной гипотермии / Н. А. Слепчук, Н. Н. Мельникова // Рос. физиол. журн. им. И.М. Сеченова. – 2001. – № 87 (7). – С. 933–944.
211. Слюсаренко, А. Е. Иммунотропное действие железа, кольбата, марганца, молибдена, никеля, кальция и свинца в условиях фонового загрязнения городской среды / А. Е. Слюсаренко, Е. В. Евстафьева // Патология. – 2011. – Т. 8, №2. – С. 24–26.
212. Смердова, В. В. Люминесцентно-гистохимический анализ суточных колебаний гистамина в крови / В. В. Смердова, Л. М. Карзакова // Морфология и люминесцентная гистохимия. – Чебоксары: Изд-во Чуваш. ун-та, 1983. – С. 131–133.
213. Смирнова, Т. Л. Нейромедиаторное обеспечение лимфоидных и нелимфоидных органов в условиях экспериментальной нейромодуляции / Т. Л. Смирнова, С. П. Сапожников, В. Е. Сергеева, И. М. Дьячкова // Аллергология и иммунология. – 2009. – Т. 10, № 1. – С. 32–33.

214. Сокол, А. В. Динамика экспрессии вазоактивного интестинального полипептида в тимусе плодов и новорожденных человека / А. В. Сокол, В. В. Руденко // Иммунопатология, аллергология, инфектология. – 2012. – № 3. – С. 81–86.
215. Соколова, И. В. Влияние соединений кальция на серотонинсодержащие структуры тимуса / И. В. Соколова, И. М. Дьячкова, В. Е. Сергеева // Natural Technical Sciences Journal. – 2014. – №8 (56). – С. 291–305.
216. Соотношение иммуномодуляционных сдвигов в центральных и периферических органах иммунной защиты при хроническом стрессе / А. А. Нестерова, М. Ю. Капитонова, Н. А. Мураева, А. И. Краюшкин и др. // Морфология. – 2006. – № 5. – С. 49–50.
217. Сравнительное исследование токсических эффектов свинца и кадмия на селезенку и спленоциты крыс / В. А. Стежка, Н. Н. Дмитруха, М. Н. Диденко и др. // Институт медицины труда, АМН Украины. – Киев, 2004. – С. 2–9.
218. Ставинская, О. А. Содержание серотонина в крови у жителей Ненецкого Автономного округа и Архангельской области в сравнении с показателями иммунологической реактивности / О. А. Ставинская // Экология человека, 2010. – № 10. – С. 53–57.
219. Стаценко, Е. А. Морфогенез белой пульпы селезенки половозрелых крыс после введения им бисфосфоната «Зомета» / Е. А. Стаценко // Український морфологічний альманах. – 2009. – Т. 7, № 4. – С. 114–117.
220. Структурно-функциональная реорганизация селезенки крыс при внутримышечном введении наночастиц меди типа Cu10x / Е. А. Сизова, С. В. Лебедев, В. С. Полякова, Н. Н. Глущенко // Вестник Оренбургского государственного университета. – 2010. – № 2. – С. 129–133.
221. Стручко, Г. Ю. Морфофункциональные изменения селезенки и тимуса крысят, родившихся от спленэктомированных крыс-самок / Г. Ю. Стручко, Л. М. Меркулова, О. Ю. Кострова, М. Н. Михайлова, Е. Г. Драндрова, О. М. Арлашкина // Успехи современного естествознания. – 2014. – № 9. – С. 70–72.

222. Студеникин, В. М. Кальциопенические состояния и их коррекция / В. М. Студеникин, Э. М. Курбайтаева // Лечащий врач. – 2010. – № 10. – С. 54–56.
223. Судаков, К. В. Теория функциональных систем: новый подход к проблеме интеграции физиологических процессов в организме / К. В. Судаков // Российский физиологический журнал. – 2002. – Т. 88, № 12. – С. 1590–1599.
224. Сусликов, В. Л. Геохимическая экология болезней в 4-х томах / В. Л. Сусликов. – М., Гелиос АРВ, 2002. – 546 с.
225. Сыроешкин, А. В. Новый подход к исследованию патофизиологии клетки: исследование рассредотачивания клеток по размерам и форме как способ диагностики и мониторинга болезней / А. В. Сыроешкин, Т. В. Гребенникова, В. Н. Байкова // Клиническая лабораторная диагностика. – 2002. – №5. – С. 35–40.
226. Сыроева, Л. А. Сезонные изменения реакции аминсодержащих структур селезенки в первый час антигенного воздействия / Л. А. Сыроева // Морфология и люминесцентная гистохимия. – Чебоксары: Изд-во Чуваш.ун-та, 1983. – С. 64–72.
227. Типовые реакции иммунной системы на дифференцированную моноиммунокоррекцию / В. И. Золоедов, В. М. Земсков, А. М. Земсков, В. А. Ворновский, М. А. Луцкий // Физиология человека, 2001. – № 4. – С.97–103.
228. Толмачева, Н. В. Эколого-физиологическое обоснование нормативов оптимальных уровней и соотношение макро- и микроэлементов в питьевой воде и суточных пищевых рационах / Н. В. Толмачева, В. Л. Сусликов, Т. Ю. Винокур // Фундаментальные исследования. – 2011. – № 3. – С. 155–160.
229. Торопцова, Н. В. Подходы к профилактике и лечению остеопороза / Н. В. Торопцова, Л. И. Беневоленская // Лечащий врач. – 2005. – № 4. – С. 31–35.
230. Тотолян, А. А. Клетки иммунной системы / А. А. Тотолян, И. С. Фрейдлин. – СПб.: Наука, 2000. – 231 с.
231. Труфакин, В. А. Функциональная морфология клеток иммунной системы в эксперименте и клинике / В. А. Труфакин, А. В. Шурлыгина, М. В. Обинсон // Морфология. – 2005. – Т. 128, № 4. – С. 20–23.

232. Тукин, В. Н. Морфометический профиль лимфоцитов крови на фоне метаболических нарушений у больных сахарным диабетом пожилых людей / В. Н. Тукин // Успехи современного естествознания. – 2007. – № 12. – С. 62–63.

233. Фармакология / под ред. Р. Н. Аляутдина. – 2-е изд., испр. – М.: ГЭОТАР-МЕД, 2004. – 592 с: ил.

234. Федорова, Е. А. Применение микроглиального маркера Iba-1 для выявления фагоцитирующих клеток в тимусе / Е. А. Федорова, О. В. Кирик, Д. Э. Коржевский // Вопросы морфологии XXI века. – Вып. 1. – Сборник научных трудов, посв. 100-летию каф. мед. биологии СПб ГМА им. И.Н. Мечникова. – 2008. – С. 297–298.

235. Физиологическая роль кальция в организме / В. М. Студеникин, А. С. Николаев, О. В. Чумакова, Е. М. Мазурина и др. // Научные труды I съезда физиологов СНГ. – М.: Медицина-Здоровье, 2005. – С. 6.

236. Физиология человека: учебник / под ред. В. М. Покровского, Г. Ф. Коротько. – 3-е изд. – М., 2011. – 664 с.: ил.

237. Физиология. Основы и функциональные системы: Курс лекций / под ред. К. В. Судакова. – М.: Медицина, 2000. – 784 с.

238. Функционально-морфологическая характеристика почек и состояние антиоксидантной системы у крыс с экспериментальной гипокальциемией / И. Г. Джигоев, А. В. Козаев, Б. Н. Кабоева, Р. Э. Козаев // Фундаментальные исследования, 2013. – №7. – С. 301–304.

239. Хадарцева, М. П. Влияние измененного гомеостаза кальция на содержание кальция и кадмия в костной ткани крыс при экспериментальном кадмиозе / М. П. Хадарцева, В. Б. Брин // Материалы Международной научной конференции «Физиология и патология почек и водно-солевого обмена», посвященной 100-летию со дня рождения профессора Н. Н. Прониной. – Владикавказ, 2012. – С. 214–223.

240. Хайдуков, С. В. Цитометрический анализ субпопуляций Т-хелперов (Th1, Th2, Treg, Th17, Т-хелперы активированные) / С. В. Хайдуков, А. В. Зурочка

// Медицинская иммунология: Официальный журнал Санкт-Петербургского Регионального Отделения Российской Ассоциации Аллергологов и Клинических Иммунологов. – 2011. – Т. 13, № 1. – С. 7–16.

241. Храмов, В. А. Содержание гистамина и серотонина в структурах желудка у кроликов при спирта-новокаиновой блокаде чревных нервов / В. А. Храмов // Ученые записки Казанской государственной академии ветеринарной медицины им. Н.Э. Баумана. – 2014. – Т. 217. – С. 303–307.

242. Чадаев, В. Е. Этические принципы при работе с лабораторными животными / В. Е. Чадаев // Вестник проблем биологии и медицины. – 2012. – Т. 1, № 2. – С. 113–115.

243. Черненко, Н. В. Характеристика микроциркуляторного русла печени крыс после спленэктомии на основе корреляционного анализа / Н. В. Черненко // Мат. междунар. конф. «Структурные преобразования органов и тканей на этапах онтогенеза в норме и при воздействии антропогенных факторов». – Астрахань, 2007. – С. 89.

244. Чернин, В. В. Значение кальцийрегулирующей системы в патогенезе экспериментальной язвы желудка у кроликов / В. В. Чернин, Л. А. Фомина, Г. В. Хомулло // Экспериментальная и клиническая гастроэнтерология. – 2010. – № 11. – С. 63–66.

245. Шапкин, Ю. Г. Значение селезенки в иммунном статусе организма / Ю. Г. Шапкин // Анналы хирургии. – 2009. – № 1. – С. 9–12.

246. Шаршимбеев, Ж. А. Лимфоидные структуры селезенки после введения полиоксидония / Ж. А. Шаршимбеев // Морфология. – 2004. – №1. – С. 64–66.

247. Шевцов, А. Р. Морфология селезенки в норме, при моделировании синдрома длительного сдавления и в условиях применения полифенолов манжетки обыкновенной / А. Р. Шевцов, В. А. Головнёв, И. А. Голубева // Вестник НГУ. Серия: биология, клиническая медицина. – 2006. – Вып. 3. – Т. 4. – С. 62–65.

248. Элементный дисбаланс у детей Северо-Запада России / С. В. Алексеев, О. И. Янушанец, А. В. Храмов и др. – СПб.: СПбГПМА, 2001. – 149 с.

249. Эндокринология: руководство для врачей: в 2 томах / В. Л. Баранов и др. / под ред. С. Б. Шустова. – СПб: СпецЛит, 2011. – 400 с.: ил.
250. Энциклопедия лекарств. Регистр лекарственных средств России. – М., 2015. – URL: www.rlsnet.ru
251. Этическая экспертиза биомедицинских исследований. Практические рекомендации / под ред. Ю. Б. Белоусова. – М.: Изд-во Российское общество клинических исследований, 2005. – 156 с.
252. Юрина, Н. А. Морфофункциональная гетерогенность и взаимодействие клеток соединительной ткани / Н. А. Юрина, А. И. Радостина. – М.: Изд. УДН., 1990. – 398с.
253. Юрчинский, В. Я. Особенности микроморфологии тимуса млекопитающих / В. Я. Юрчинский, В. А. Забродин // Морфология. – 2012. – Т. 141, № 3. – С. 184.
254. Яглов, В. В. Маркеры в морфологии и стратегия их исследования / В. В. Яглов // Клиническая морфология новообразований эндокринных желез. – М., 2010. – С. 116–120.
255. Ялалетдинова, Л. Р. CD4-позитивные клетки тимуса при введении хорионического гонадотропина / Л. Р. Ялалетдинова, В. Е. Сергеева, С. А. Ястребова // Вестник Чувашского университета. – 2013. – № 3. – С. 572–577.
256. Ялалетдинова, Л. Р. Эффект хорионического гонадотропина на CD8-позитивные структуры вилочковой железы /Л. Р. Ялалетдинова, В. Е. Сергеева, С. А. Ястребова // Фундаментальные исследования. – 2014. – № 7. – С. 1075–1079.
257. Ярилин, А. А. Основы иммунологии / А. А. Ярилин. – М.: Медицина, 1999. – 608 с: ил.
258. Ярилин, А. А. Транскрипционные регуляторы дифференцировки Т-хелперов: обзор / А. А. Ярилин // Иммунология. – 2010. – Т. 31, № 3. – С. 153–168.
259. Abbas, A. K. Cellular and Molecular Immunology / A. K. Abbas, A. N. Lichtman, S. Pillai. – 2014. – 8th Edition. – 544 p.

260. A segment of the MHC class II beta chain plays a critical role in targeting class II molecules to the endocytic pathway / A. V. Chervonsky, L. Gordon, A. Sant. – *J. Int. Immunol.* – 1994. – Vol. 6. – P. 973–982.

261. A Toll-like receptor recognizes bacterial DNA / H. Hemmi, O. Takeuchi, T. Kawai, T. Kaisho et al. // *Nature.* – 2000. – Vol. 408(6813), № 7. – P. 740–745.

262. Absorbability and cost effectiveness in calcium supplementation / R. P. Heaney, M. S. Dowell, J. Bierman, C. A. Hale, A. Bendich // *J. Am. Coll. Nutr.* – 2001. – Vol. 20 (3). – P. 239–246.

263. Actin-binding proteins coronin-1a and IBA-1 are effective microglial markers for immunohisto-chemistry / Z. Ahmed, G. Shaw, V. P. Sharma, C. Yang, E. McGowan, D. W. Dickson // *J. Histochem Cytochem.* – 2007. – Vol. 55, № 7. – P. 687–700.

264. Airaksinen, M. S. et al. Ataxia and altered dendritic calcium signaling in mice carrying a targeted null mutation of the calbindin D28k gene // *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* – 1997. – № 94. – P. 1488–1493.

265. Alonso, M. T. Nuclear Ca²⁺ signaling / M. T. Alonso, J. García-Sancho // *Cell Calcium.* – 2011. – Vol. 49. – Issue 5. – P. 280–289.

266. Antigen presentation and T cell development in H2-M-deficient mice / W. P. Fung-Leung, C. D. Surh, M. Liljedahl, J. Pang et al. // *Science.* – 1996. – Vol. 271. – P. 1278–1281.

267. Auerbach, A. *Diagnostic Pathology: Spleen* / Auerbach A. – Lippincott Williams & Wilkins. – 2014. – 536 p.

268. Axelsson, S. Fluorescence histochemistry of biogenic monoamines. A study of the capacity of various carbonyl compounds to form fluorophores with biogenic monoamines in gas phase reactions / S. Axelsson, A. Björklund, O. Lindvall // *Journal of Histochemistry and Cytochemistry.* – 1972. – № 20(6). – P. 435–444.

269. Banchereau, J. Dendritic cells and the control of immunity / J. Banchereau, R. M. Steinman // *Nature.* – 1998. – Vol. 392. – P. 245–252.

270. BCL-2 is consistently expressed in hyperplastic marginal zones of the spleen, abdominal lymph nodes, and ileal lymphoid tissue / B. A. Meda, M. Frost // *Am. J. Surg. Pathol.* – 2003. – № 27 (7). – P. 888–894.

271. Berridge, M. J. Calcium a life and death signal / M. J. Berridge // *Nature.* – 1998. – Vol. 395, № 6703. – P. 645–648.

272. Biomarkers of immunosenescence within an evolutionary perspective: the challenge of heterogeneity and the role of antigenic load / C. Franceschi, S. Valcnsin, F. Fagnoni, C. Barbi, M. Bonafe // *Exp. Gerontol.* – 1999. – Vol. 34, № 8. – P.911–921.

273. Bjorklund, A. Fluorescence microscopic and microspectrofluorometric techniques for the cellular localization and characterization of biogenic amines / A. Bjorklund, B. Falck, C. Owman // *Methods of investigative and diagnostic endocrinology.* – Amsterdam, 1972. – P. 318–368.

274. Boross, P. Mechanisms of action of CD20 antibodies / P. Boross, J. H. Leusen. – *Am. J. Cancer Res.* – 2012. – 2 (6). – P. 676–690.

275. Bulinski, A. Statistical methods of SNP data analysis and applications / A. Bulinski, O. Butkovsky, V. Sadovnich // *Open Journal of Statistics.* – 2012. – Vol. 2, № 1. – P. 73–87.

276. Bulloch, K. Selective regulation of T cell development and function by calcitonin gene related peptide (CGRP) in the thymus and spleen: An example of regional regulation of immunity by the neuroendocrine system. In "Neuro-immunomodulation: Molecular Aspects, Integrative Systems and Clinical Advances" / K. Bulloch, B. S. McEwen, J. Norberg, A. Diwa et al. // *Ann. NY Acad. Sci.* – 1998. – Vol. 840. – P. 551–562.

277. Burgoyne, R. D. The neuronal calcium sensor family of Ca²⁺-binding proteins / R. D. Burgoyne, J. L. Weiss // *Biochem. J.* – 2001. – Vol. 353. – P. 1–12.

278. Ca²⁺-agonistic effect of a T-type Ca-channel blocker mibefradil (Ro 40-5967) / P.V. Avdonin, F.R. Buhler, V.A. Tkachuk // *Membrane & cell biology, Harwood Academic Publishers (Switzerland).* – 2000. – Vol. 13, № 5. – P. 645–655.

279. Calcium bioavailability from a calcium- and sulfate-rich mineral water, compared with milk, in young adult women / F. Couzy, P. Kastenmayer, M. Vigo, J. Cloush, R. Munoz-Box, D. V. Barclay // *Am. J. Clin. Nutr.* – 1995. – № 62. – P. 1239–1244.

280. Calcium bioavailability from a calcium-rich mineral water, with some observations on method / I. Bacciottini, A. Tanini, A. Falchetti, L. Masi et al. // *J. Clin. Gastroenterol.* – 2004. – № 38. – P. 761–766.

281. Calcium sensing receptor gene polymorphism, circulating calcium concentrations and bone mineral density in healthy adolescent girls / M. Lorentzon, R. Lorentzon, U.H. Lerner, P. Nordström // *Eur J Endocrinol.* – 2001. – № 144(3). – P. 257–261.

282. Calcium-sensing receptor polymorphisms influence on bone mineral density and bone metabolism markers in patients with primary hyperparathyroidism / E. A. Pigarova, L. Ya. Rozhinskaya, A. N. Tiulpakov, S. S. Mirnaya, A.V. Belyaeva // *IOF-ECCEO European Congress on Osteoporosis and Osteoarthritis / Osteoporosis International.* – 2012. – Vol. 23, № 1. – P. 234-236.

283. Calmodulin modulates insect odorant receptor function / L. Mukunda, F. Miazzi, S. Kaltofen, B. S. Hansson, D. Wicher // *Cell Calcium.* – 2014. – Vol. 55. – Issue 4. – P. 191–199.

284. Campos, M. S. Interactions among iron, calcium, phosphorus, and magnesium in the nutritionally iron-deficient rat. / M. S. Campos // *J. Exp. Physiology.* – 1998. – Vol. 83, № 6. – P. 771–781.

285. Carafoli, E. Calcium Signalling and Disease. Molecular Pathology of Calcium Subcellular Biochemistry / E. Carafoli, M. Brini. – University of Padova, Italy, Springer. – 2007. – 591 p.

286. Carrol, M. C. CD21/CD35 in B cell activation / M. C. Carrol // *Seminars in Immunology.* – 1998. – Vol. 10, № 4. – P. 279–286.

287. CD20 deficiency in humans results in impaired T cell-independent antibody responses / T. W. Kuijpers, R. J. Bende Baars, P. A. Grummels et al. // *J. Clin. Invest.* – 2010. – Vol. 120 (1). – P. 214–222.

288. CD20 monoclonal antibodies down-regulate IgM at the surface of B cells / I. Bourget, J. P. Breittmayer, N. Grenier-Brossette, J. L. Cousin // *European journal of immunology.* – 1993. – Vol. 23, № 3. – P. 768–771.

289. Cesta, M. F. Normal structure, function and histology of the spleen / M. F. Cesta // *Toxicologic Pathology.* – 2006. – № 34. – P. 455–465.

290. Chang, C.-C. Immunohistochemical expression patterns of germinal center and activation B-cell markers correlate with prognosis in diffuse large B-cell lymphoma / C.-C. Chang, S. Clintock, R. Cleveland. – *Am. J. Surg. Pathol.* – 2004. – № 28. – P. 464–470.

291. Chronic psychosocial stress-induced down-regulation of immunity depends upon individual factors / A. Bartolomucci, P. Sacerdote, A. E. Panerai, T. Pederzani, P. Palanza, S. Parmigiani // *J. Neuroimmunol.* – 2003. – Vol.141, № 1–2. – P. 58–64.

292. Chun, Y. S. Spectrum of primary vascular neoplasms of the spleen / Y. S. Chun, V. G. Robu // *J. Clin. Oncol.* – 2011. – Vol. 10, № 29. – P. 116–117.

293. Cloning and characterization of allograft inflammatory factor-1: a novel macrophage factor identified in rat cardiac allografts with chronic rejection / U. Utans, R. Arceci, Y. Yamashita, M. Russell // *J. Clin. Invest.* – 1995. – Vol. 95. – P. 2954–2962.

294. Cochrane, C. G. Polymorphonuclear leukocytes in immunologic reactions: the destruction of vascular basement membrane in vivo and in vitro / C. G. Cochrane, B. S. Aikin // *J. Exp. Med.* – 1996. – Vol. 124. – P.733–752.

295. Coico, R. *Immunology: A Short Course.* 7 th Edition / R. Coico, G. Sunshine. – 2015. – 432 p.

296. Colbran, R. J. Targeting of calcium/calmodulin-dependent protein kinase II / R. J. Colbran // *Biochem. J.* – 2004. – Vol. 378. – P. 1–16.

297. Cotruvo, J. Calcium and Magnesium in Drinking-water / J. Cotruvo, J. Bartram // Public health significance. – Geneva. – World Health Organization. – 2009. – P. 99.
298. Council Directive 86/609/EEC of 24 November 1986 on the approximation of laws, regulations and administrative provisions of the Member States regarding the protection of animals used for experimental and other scientific purposes // Official Journal L 358. – 1986. – № 18. – P. 1–28.
299. Cross, S. A. A study of methods available for cyto-chemical localization of histamine by fluorescence induced with a-ortophtaldehyde or acetaldehyde / S. A. Cross S. W. Even, F. W. Rost // Histochem. J. –1971. – Vol. 3, № 6. – P. 471–476.
300. Dawicki, W. Mast cells, histamine, and Il-6 regulate the selective influx of dendritic cell subsets into an inflamed lymph node / W. Dawicki, D. Jawdat, N. Xu, J. Marshall // J. Immunol. – 2010. – V. 184. – P. 2116–2123.
301. Diamanti-Kandarakis, E. Contemporary Aspects of Endocrinology / E. Diamanti-Kandarakis. – InTech, 2011. – 478 p.
302. Diaz, J. F. Improved recognition of leukoaraiosis and Cognitive Impairment in Alzheimer's Disease / J. F. Diaz, H. Merskey, V. C. Hachinski et al. // Arch. Neurol. – 1991. – Vol. 48(10). – P. 1022–1025.
303. Diet, nutrition and the prevention of chronic diseases: report of a Joint WHO/FAO Expert Consultation. Geneva: World Health Organization. – 2003.
304. Distinct Transcriptomic Features are Associated with Transitional and Mature B-Cell Populations in the Mouse Spleen / E. Kleiman, D. Salyakina, M. De Heusch, K. L. Hoek, J. M. Llanes, I. Castro, J. A. Wright et al // Immunol. – 2015. – P. 6–30.
305. Diverse repertoire of the MHC class II-peptide complexes is required for presentation of viral superantigens / T. Golovkina, Y. Agafonova, D. Kazansky, A. Chervonsky // J. Immunol. – 2001. – Vol. 166, № 4. – P. 2244–2250.

306. Dobrodeeva, L. Relations between biological amines and immune characteristics / L. Dobrodeeva, E. Sergeeva, V. Repina, O. Stavinskaya, G. Lyutfaliev // World immune regulation meeting. – Davos, Switzerland. – 2008. – P. 100.
307. Domínguez, D. C. Calcium Binding Proteins and Calcium Signaling in Prokaryotes / D. C. Domínguez, M. Guragain, M. Patrauchan // Cell Calcium. – 2014. – Vol. 57, № 7. – P. 191–199.
308. Effects of splenectomy on liver volume and prognosis of cirrhosis in patients with esophageal varices / M. Tomikawa et al. // J. Gastroenterol. Hepatol. Fukuoka. – 2002. – Vol. 17(1). – P. 77–80.
309. Eisenbarth, G. S. Immunoendocrinology / G. S. Eisenbarth. – Scientific and Clinical Aspects. – 2011. – Vol. XIV. – 579 p.
310. Elenkov, I. J. Stress System Organization, Physiology and Immunoregulation / I. J. Elenkov, G. P. Chrousos // Neuroimmunomodulation. – 2006. – Vol. 13. – P. 257–267.
311. Ellmeier, W., Sawada S., Littman D. R. The regulation of CD4 and CD8 coreceptor gene expression during T-cell development / W. Ellmeier, S. Sawada, D. R. Littman. – Annu. Rev. Immunol. – 1999. – Vol. 17. – P. 523–554.
312. Falk, B. Observations on the possibilities of the cellular localization of monoamines by a fluorescence method / B. Falk // Acta Physiol. Scand. – 1962. – Vol. 56. – P. 197–201.
313. Farber, D. L. Control of memory CD4 T cell activation: MHC class II molecules on APCs and CD4 ligation inhibit memory but not naive CD4 T cells / D. L. Farber // Immunity. – 1995. – Vol. 2. – P. 249–259.
314. Fenton, T. R. Meta-analysis of the quantity of calcium excretion associated with the net acid excretion of the modern diet under the acid-ash diet hypothesis / T. R. Fenton, M. Eliasziw, A. W. Lyon, S.C. Tough, D. A. Hanley // Am J Clin Nutr. – 2008. – Vol. 88(4). – P. 1159–1166.
315. Germain, R. N. T-cell development and the CD4-CD8 lineage decision / R. N. Germain. – Nature Rev. Immunol. – 2002. – Vol. 2. – P. 309–322.

316. Ghosh, A. Calcium/calmodulin-dependent kinase II and Alzheimer's disease / A. Ghosh, K. P. Giese // *Mol. Brain.* – 2015. – № 24. – P. 78.

317. Gibson, J. Expression and Function of innate Pattern Recognition Receptors in T and B cells / J. Gibson, N. Gow, S. Y. Wong // *Immun. Endoc & Metab. Agents in Med. Chem.* – 2010. – Vol. 10. – P. 11–20.

318. Glimcher, L. H. Sequences and factors: a guide to MHC class-II transcription / L. H. Glimcher, C. J. Kara // *Ann. Rev. Immunol.* – 1992. – Vol. 10. – P. 13–49.

319. Goldstein, J. S. ICAM-1 enhances MHC-peptide activation of CD8+ T cells without an organized immunological synapse / J.S. Goldstein., T. Chen, E. Gubina, R. W. Pastor, S. Kozlovski // *Eur. J. Immunol.* – 2000. – Vol. 30, № 11. – P. 3266–3270.

320. *Guide for the Care and Use of Laboratory Animals.* – Washington: National Academy Press, 1996.

321. Hokfelt, T. Modification of the Falck-Hillarp formaldehyde fluorescence method using the vibration: Simple, rapid and sensitive localization of catecholamines in sections of unfixed or formalin fixed brain tissue / T. Hokfelt, A. Ljungdahl // *Histochemie.* – 1972. – Vol. 29. – № 4. – P. 325–339.

322. Homeostasis and anergy of CD4+CD25+ suppressor T cells in vivo / M. A. Gavin, S. R. Clarke, E. Negrou, A. Gallegos, A. Rudensky // *Nat. Immunol.* – 2002. – Vol. 3. – № 1. – P. 33–41.

323. Hormonal function and proliferative activity of thymic cells in humans: Immunocytochemical correlations / I. M. Kvetnoy, V. O. Polyakova, A. V. Trifonov, V.V. Yuzhakov // *Neuroendocrinology Letters.* – 2003. – Vol. 24. – P. 263–268.

324. Horsey, P. J. Albumin Review not all it was cracked up to be / P. J. Horsey // *European Journal of Anesthesiology.* – 2002. – P. 701–704.

325. Immunohistochemical Detection of Markers for Translational Studies of Lung Disease in Pigs and Humans / D. K. Meyerholz, A. M. Lambertz, L. R. Reznikov // *Toxicol. Pathol.* – 2015. – P. 312–326.

326. Immunological memory. Immunobiology. The immune system in health and disease. 5th edition / Ch. Janeway, P. Travers, M. Walport, M. Shlomchik. – Garland Publishing Inc., Hamden. – 2001. – P. 412–419.

327. Induction of functional follicular dendritic cell development in severe combined immunodeficiency mice. Influence of B and T cells / Z. F. Kapasi, G. F. Burton, L. D. Sliultz, J. G. Tew, A. K. Szakal // *J. Immunol.* – 1993. – Vol. 150, № 7. – P. 2648–2658.

328. Ingle, G. S. High CD21-expression inhibits internalization of anti-CD 19-antibodies and cytotoxicity of an anti-CD 19-drag conjugate / G. S. Ingle, P. Chan, G. Elliot et al. // *Br J Haematol.* – 2008. – Vol. 140(1). – P. 46–58.

329. Institute for Clinical Systems Improvement (ICSI) Health Care Guideline: Diagnosis and Treatment of Osteoporosis. – 3rd edition. – 2004. – URL: www.icsi.org.

330. International Guiding Principles for Biomedical Research Involving Animals. Council for international organization of medical sciences and the international council for laboratory animal science. – Committee to revise the international guiding principles. – Geneva, 2012.

331. Intestinal calcium absorption from mineral water / A. Wynckel, C. Hanrotel, A. Wuillai, J. Chanard // *Miner. Electrolyte Metab.* – 1997. – Vol. 23. – P. 88–92.

332. Involvement of Iba1 in membrane ruffling and phagocytosis of macrophages/microglia / K. Y. Ohsawa, H. Imai, Y. Sasaki, S. Kohsaka // *Journal of Cell Science.* – 2000. – № 113. – P. 3073–3084.

333. Jain, P. Anti-CD20 monoclonal antibodies in chronic lymphocytic leukemia / P. Jain, S. O'Brien // *Expert Opin. Biol.* – 2013. – Vol. 13 (2). – P. 169–182.

334. Janas, E. Functional role of lipid rafts in CD20 activity? / E. Janas, R. Priest, R. Malhotra // *Biochemical Society symposium.* – 2005. – № 72. – P. 165–175.

335. Kincaid, R. L. Regional and developmental expression of calmodulin-dependent cyclic nucleotide phosphodiesterase in rat brain / R. L. Kincaid, C. D. Bala-

ban, M. L. Billingsley // *Adv. Second Messenger Phosphoprotein Res.* – 1992. – Vol. 25. – P.111–122.

336. Kiss, F. Examination of aggregation of various red blood cell populations can be informative in comparison of splenectomy and spleen autotransplantation in animal experiments / F. Kiss et al. // *Clin. Hemorheol. Microcirc.* – 2010. – Vol. 5, № 2–4. – P. 273–280.

337. Klee, C. B. Keeping up with calcium: conference on calcium-binding proteins and calcium function in health and disease / C. B. Klee // *EMBO.* – 2002. – № 3. – P. 823–827.

338. Kohler, C. Allograft inflammatory factor-1/ionized calcium-binding adapter moleculer-1 is specifically expressed by most subpopulations of macrophages and spermatids in testis / C. Kohler // *Cell Tissue Res.* – 2007. – Vol. 33, № 2, P. 291–302.

339. Korkusuz, P. Immunophenotypic analysis of human spleen compartments / P. Korkusuz, A. Dagdeviren, E. Asan // *Ann. Anat.* – 2002. – Vol. 184, № 5. – P. 431–441.

340. Kozlov, V. A. Influence of chronic consumption Zn 10 maximum concentrations limits on rats kidney bioaminic status / V. A. Kozlov, O. S. Glazirina // 4-th International symposium on trace elements in human: new perspective. – Greece. Athens. – 2003. – P. 705–715.

341. Kraal, G. New insights into the cell biology of the marginal zone of the spleen / G. Kraal, R. Mebius // *Int. Rev. Cytol.* – 2006. – Vol. 250. – P. 175–215.

342. Krantic, S. Peptides as regulators of the immune system: emphasis on somatostatin / S. Krantic // *Peptides.* – 2000. – № 21(12). – P. 1941–1964.

343. Kraus, M. D. Splenic histology and histopathology: an update / M. D. Kraus // *Seminars in Diagnostic Pathology.* – 2003. – Vol. 20, № 2. – P. 84–93.

344. Kronin, V. Differential effect of CD8 + and CD8– dendritic cells in the stimulation of secondary CD4 + T cells / V. Kronin, C. J. Fitzmaurice, I. Caminschi et al. // *International Immunology.* – 2001. – Vol. 13, № 4. – P. 465–473.

345. Langhi, L. G. Lipid-Laden Multilocular Cells in the Aging Thymus Are Phenotypically Heterogeneous / L. G. Langhi, L.R. Andrade, M. K. Shimabukuro // *PLoS One*. – 2015. – P. 452–459.
346. Lauder, J. M. Serotonin and morphogenesis: sites of 5-HT uptake and binding protein / J. M. Lauder, H. Tamir, T. W. Sadler // *Development*. – 1988. – Vol. 102. – P. 709–720.
347. Liu, J. Enhanced CD4⁺ T cell proliferation and Th2 cytokine production in DR6-deficient mice / J. Liu // *Immunity*. – 2001. – Vol. 15 (1). – P. 23–34.
348. Lorette, J. *Immunocytochemical Methods and Protocols* / J. Lorette // *Methods in Molecular Biology*. – 2003. – Vol. 115. – Second Edition. – Humana Press Inc., Totowa, NJ. – 457 p.
349. Lundahi, J. Human blood monocytes, but not alveolar macrophages, reveal increased CD11b/CD18 expression and adhesion properties upon receptor-dependent activation / J. Lundahi, G. Hallden, C. M. Skold // *European Respiratory Journal*. – 1996. – Vol. 9. – № 6. – P. 1188–1194.
350. Maekawa, T. Age-dependent and cell-population-restricted LRRK2 expression in normal mouse spleen / T. Maekawa et al. // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* – 2010. – Vol. 392, № 3. – P. 431–435.
351. Mason, D. Y. Immunohistological detection of human cytotoxic/suppressor T cells using antibodies to a CD8 peptide sequence / D. Y. Mason, J. L. Cordell, P. Gaulard et al. // *Journal of Clinical Pathology*. – 1992. – № 45. – P. 1084–1088.
352. McGaha, T. L. Marginal zone macrophages suppress innate and adaptive immunity to apoptotic cells in the spleen / T. L. McGaha, Y. Chen, B. Ravishankar, N. van Rooijen et al. // *Blood*. – 2011. – Vol. 117, № 20. – P. 5403–5412.
353. Mebius, R. E. Structure and function of the spleen / R. E. Mebius, G. Kraal // *Nat. Rev. Immunol.* – 2005. – № 5. – P. 606–616.
354. Mravec, B. Role of catecholamine-induced activation of vagal afferent pathways in regulation of sympathoadrenal system activity: negative feedback loop of stress response / B. Mravec // *Endocr. Regul.* – 2011. – № 45 (1). – P. 37–41.

355. Murray, G. Calmodulin-Binding Protein Detection Using a Non-Radiolabeled Calmodulin Fusion Protein / G. Murray, M. J. Marshall, W. Trumble, B. A. Magnuson // *BioTechniques*. – 2001. – № 30. – P. 1036–1042.

356. Nakano, K. Histamine produced by macrophage and T lymphocyte: a new type of signal transducer / K. Nakano, S. Takamatsu // *Nippon Yakurigaku Zasshi*. – 2001. – Vol. 118, № 1. – P. 15–22.

357. NCX1 expression and functional activity increase in microglia invading the infarct core / F. Boscia, R. Gala, A. Pannaccione, A. Secondo, A. Scorziello, G. D. Renzo, L. Annunziato // *Stroke*. – 2009. – № 40. – P. 3608–3617.

358. Nishimuta, M. The concept (intra and extra cellular minerals) / M. Nishimuta et al. // *Metal Ions in Biology and Medicine* / Eds Ph. Collery – Paris: John Libbey Eurotext, 1990. – P. 69–74.

359. Nitschke, L. CD22 and Siglec-G: B-cell inhibitory receptors with distinct functions / L. Nitschke // *Immunol. Rev.* – 2009. – Vol. 1, № 230. – P. 128–143.

360. Nutt, L. K. Bax-mediated Ca²⁺ mobilization promotes cytochrome c release during apoptosis / L. K. Nutt, J. Chandra, A. Pataer et al // *J. Biol. Chem.* – 2002. – № 277(23). – P. 20301–20308.

361. Owen, J. *Kuby immunology* / J. Owen, J. Punt, S. Stranford. – New York: Freeman W.H. & Company. – 2013. – 574 p.

362. Pashenkov, M. Augmented Expression of Daintain/Allograft In ammatory Factor-1 is Associated with Clinical Disease: Dynamics of Daintain/Allograft In ammatory Factor-1 Expression in Spleen, Peripheral Nerves and Sera during Experimental Autoimmune Neuritis / M. Pashenkov // *Scand. J. Immunol.* – 2000. – № 52. – P. 117–122.

363. Pei, X. Role of Ca/CaN/NFAT signaling in IL-4 expression by splenic lymphocytes exposed to phthalate (2-ethylhexyl) ester in spleen lymphocytes / X. Pei, Z. Duan, M. Ma, Y. Zhang // *Mol. Biol. Rep.* – 2014. – № 41(4). – P. 2129–2142.

364. Platten, M. Monocyte chemoattractant protein-1 increases microglial infiltration and aggressiveness of gliomas / M. Platten // *Ann. Neurol*, 2003. – P. 54–92.

365. Pochet, R. Calcium: The Molecular Basis of Calcium Action in Biology and Medicine / R. Pochet. – Kluwer Academic Publishers, 2000. – 732 p.

366. Prell, T. Calcium-dependent protein folding in amyotrophic lateral sclerosis/ T. Prell, J. Lautenschläger, J. Grosskreutz // Cell Calcium. – 2013. – Vol. 54, № 2. – P. 132–143.

367. Primary spleen extranodal NK/T cell lymphoma, nasal type, with bone marrow involvement and CD30 positive expression: a case report and literature review / Q. Cao, Y. Huang, Z. Ye, N. Liu, S. Li, T. Peng // Diagnostic Pathology. – 2014. – P. 9–169.

368. Randall, T. D. Development of secondary lymphoid organs / T. D. Randall, D. M. Carragher, J. Rangel-Moreno // Ann. Rev. Immunol. – 2008. – Vol. 26. – P. 627–650.

369. Redox regulation of calcium ion channels: Chemical and physiological aspects/ I. Bogeski, R. Kappl, C.Kummerow, R. Gulaboski, M. Hoth, B. A. Niemeyer // Cell Calcium. – 2011. – Vol. 50, № 5. – P. 407–423.

370. Regulation of Immunity via Multipotent Mesenchymal Stromal Cells / Y. P. Rubtsov, Y.G Suzdaltseva, K.V. Goryunov, N.I. Kalinina et al. // Acta naturae: Park Media Ltd. – 2012. – Vol. 4, № 1. – P. 23–31.

371. Reinhardt, R. L. Visualizing the generation of memory CD4 T cells in the whole body / R. L. Reinhardt, A. Khoruts, R. Merica et al. // Nature. – 2001. – Vol. 410. – P.101–105.

372. Ross, A. C. Dietary reference intakes for calcium and vitamin D / A. C. Ross et al. / Committee to Review Dietary Reference Intakes for Vitamin D and Calcium, Food and Nutrition Board. – Institute of Medicine Washington, DC: The National Academies Press. – 2011. – 1132 p.

373. Ross, M. H. Histology: a text and atlas: with correlated cell and molecular biology / M. H. Ross, P. Wojciech. – 2011. – 6th ed. – P. 996.

374. Rost, F. W. D. Fluorescence microscopy / F. W. D Rost. – 1995. – Vol. 2. – 459 p.

375. Ruddle, N. H. Secondary lymphoid organs: responding to genetic and environmental cues in ontogeny and the immune response / N. H. Ruddle, E. Akirav // *J. Immunol.* – 2009. – Vol. 183. – P. 2205–2212.

376. Samitas, K. B cells: from early development to regulating allergic diseases / K. Samitas, J. Lötvall, A. Bossios // *Arch. Immunol. Ther. Exp. (Warsz).* – 2010. – Vol. 3, № 58. – P. 209–225.

377. Sanders, V. M. Interdisciplinary research: noradrenergic regulation of adaptive immunity / V. M. Sanders // *Brain Behav. Immun.* – 2006. – Vol. 20. – P. 1–8.

378. Sasou, S. Periarterial lymphoid sheath in the rat spleen: A light, transmission, and scanning electron microscopic study / S. Sasou, T. Sugai // *The Anatomical Record.* – 1992. – Vol. 232, № 1. – P. 15–24.

379. Schatten, H. *Scanning Electron Microscopy for the Life Sciences* / H. Schatten. – Cambridge University Press. – 2013. – 300 p.

380. Schneider, D. A. Dynamics of bovine spleen cell populations during the acute response to *Babesia bovis* infection: an immunohistological study / D. A. Schneider // *Parasite Immunol.* – 2011. – Vol. 33, №1. – P. 34–44.

381. Selective regulation of T-cell development and function by calcitonin gene-related peptide in thymus and spleen. An example of differential regional regulation of immunity by the neuroendocrine system / B. S. McEwen, J. Nordberg, A. Diwa, S. Baird // *Ann. NY Acad. Sci.* – 1998. – № 840. – P. 551–562.

382. Sequential activation of microglia and astrocyte cytokine expression precedes increased iba-1 or GFAP immunoreactivity following systemic immune challenge / D. M. Norden, P. J. Trojanowski, E. Villanueva, E. Navarro, J. P. Godbout // *Glia*, 2015. – P. 1458–1467.

383. Slayton, W. B. The spleen is a major site of megakaryopoiesis following transplantation of murine hematopoietic stem cells / W. B. Slayton, A. Georgelas, L. J. Pierce, K. S. Elenitoba-Johnson et al. // *Blood.* – 2002. – Vol. 100, № 12. – P. 3975–3982.

384. Smorodchenko, A. CNS-irrelevant T-cells enter the brain, cause blood-brain barrier disruption but no glial pathology / A. Smorodchenko, J. Wuerfel, E. E. Pohl, J. Vogt et al. // *Eur. J. Neurosci.* – 2007. – Vol. 26, № 6. – P. 1387–1398.

385. Stacey, E. M. *Histology for pathologists* / E. M. Stacey – Lippincott Williams & Wilkins, 2007. – 1328 p.

386. Steiniger, B. The perifollicular and marginal zones of the human splenic white pulp: do fibroblasts guide lymphocyte immigration? / B. Steiniger, P. Barth, A. Hellinger *Am. J. Pathol.* – 2001. – Vol. 159. – P. 501–512.

387. Straub, D. A. Calcium supplementation in clinical practice: a review of forms, doses, and indications / D. A. Straub // *Nutr. Clin. Pract.* – 2007. – Vol. 22 (3). – P. 286–296.

388. Study of immune alterations in patients with chronic fatigue syndrome with different etiologies / R. Paganelli, J. Vecchiet, P. Zingariello, D. Racciatti et al. // *Int. J. Immunopathol. Pharmacol.* – 2004. – Vol 17. – P. 57–62.

389. Svensson, M. CCL25 mediates the localization of recently activated CD8 $\alpha\beta$ ⁺ lymphocytes to the small-intestinal mucosa / M. Svensson, J. Marsal, A. Ericsson, L. Carramolino, T. Broden, G. Marquez, W. W. Agace // *J. Clin. Invest.* – 2002. – № 110. – P. 1113–1121.

390. Swain, S. L. CD4⁺ T-cell memory: generation and multi-faceted roles for CD4⁺ T cells in protective immunity to influenza / S. L. Swain, J. N. Agrewala, D. M. Brown et al. – *Immunol Rev.*, 2006. – P. 8–22.

391. Tekes, K. Effect of perinatal stress on the biogenic amine neurotransmitter level of the adult rat's brain / K. Tekes et al. // *Int. J. Dev. Neurosci.* – 2011. – № 29 (2). – P. 171–175.

392. *Terminologia Histologica. Международные термины по цитологии и гистологии человека с официальным списком русских эквивалентов: справочное пособие* / под ред. В. В. Банина, В. Л. Быкова. – М.: ГЭОТАР-Медиа, 2009. – 272 с.

393. Theoharides, T. C. Mast cells and inflammation / T. C. Theoharides, K.-D. Alysandratos, D.-A. Delivanis et al. // *Biochim. Biophys. Acta.* – 2012. – Vol. 1822, № 1. – P. 21–33.
394. Thymus and lymph node cell CD4(+) and CD8(+) marker expression and their angiogenic activity of offspring of salbutamol-treated pregnant C3H mice / P. Kamiński, E. Skopińska-Rózewska, M. Wasik, J. Bany et al. // *Pharmacol Res.* – 2000. – Vol. 41(1). – P. 95–99.
395. Tomilin, V. N. Regulation of TRPV5/V6 channel activity in Jurkat T-Cells / V. N. Tomilin, S. B. Semenova, Y. A. Negulyaev // *Physiology*, London, UK, 2014. – P. 89.
396. Ueno, H. Dendritic cell subsets in health and disease / H. Ueno, E. Klechevsky, R. Morita // *J. Immunol. Rev.* – 2007. – Vol. 219. – P. 118–142.
397. Van Dokkum, W. Bioavailability of calcium of fresh cheese, enteral food and mineral water. A study with stable calcium isotopes in young adult women / W. Van Dokkum, V. de la Gueronniere, G. L. Schaafsma Bouley // *Br. J. Nutr.* – 1996. – Vol. 75. – P. 893–903.
398. Van Rooijen, N. Antigen processing and presentation in vivo: The micro-environment as a crucial factor / N. Van Rooijen // *Immunol. Today.* – 1990. – Vol. 11. – P. 436–439.
399. Vitamin D and Calcium: Systematic Review of Health Outcomes / M. M. Chung, M. S. Balk, J. Lau Lee, A. Lichtenstein, K. Patel // *Evidence Report / Technology Assessment.* – 2009. – № 183. – P. 290.
400. Wang, Y. Identification of CD8-alpha CD11c-minus lineage phenotype-negative cells in the spleen as committed precursor of CD8-alpha+ dendritic cells / Y. Wang, Y. Zhang, H. Yoneyama et al. // *Blood.* – 2002. – Vol. 100, № 2. – P. 569–577.
401. Williams, M. E. Hypocalcemia / M. E. Williams // *Medicine.* – 2009. – Vol. 37 (9). – P. 465–468.

СПИСОК ИЛЛЮСТРАТИВНОГО МАТЕРИАЛА

Рисунок 1 – Селезенка лабораторных крыс. Окраска гематоксилином и эозином.....	64
Таблица 1 – Количественные различия лимфоидных узелков по степени зрелости в селезенке крыс контрольной группы и после употребления соединения кальция.....	65
Рисунок 2 – Распределение по площади лимфоидных узелков селезенки крыс контрольной группы и после употребления соединения кальция.....	67
Рисунок 3 – Соотношения площадей морфо-функциональных зон лимфоидных узелков селезенки крыс контрольной группы и после употребления соединения кальция.....	68
Таблица 2 – Морфометрические показатели структурно-функциональных зон лимфоидных узелков селезенки лабораторных крыс ($M \pm m$).....	69
Таблица 3 – Морфометрические показатели структурно-функциональных зон белой и красной пульпы селезенки крыс контрольной группы и после употребления соединения кальция ($M \pm m$).....	70
Рисунок 4 – Соотношение белой и красной пульпы селезенки крыс контрольной группы и после употребления соединения кальция.....	71
Таблица 4 – Корреляционный анализ морфометрических показателей площади морфо-функциональных зон селезенки крыс контрольной группы (r).....	72
Таблица 5 – Корреляционный анализ морфометрических показателей площади морфо-функциональных зон селезенки крыс опытной группы (r)..	72
Рисунок 5 – Селезенка лабораторных крыс. Иммуногистохимический метод с антителами к Iba-1.....	75

Рисунок 6 – Первичные лимфоидные узелки селезенки лабораторных крыс. Иммуногистохимический метод с антителами к Iba-1.....	76
Рисунок 7 – Морфологическая параллель. Селезенка крыс контрольной группы. Иммуногистохимический метод с антителами к Iba-1. Окраска гематоксилином и эозином.....	77
Рисунок 8 – Количество клеток моноцитарно-макрофагальной системы в морфо-функциональных зонах селезенки на единицу площади ($M \pm m$), шт./мм ²	78
Рисунок 9 – Распределение по площади Iba-1-позитивных клеток селезенки крыс контрольной группы и после употребления соединения кальция.....	79
Таблица 6 – Сравнительная характеристика интенсивности светопропускания Iba-1-позитивных клеток в морфо-функциональных зонах селезенки крыс контрольной группы и после употребления соединения кальция ($M \pm m$), усл. ед.	80
Рисунок 10 – Селезенка лабораторных крыс. Иммуногистохимический метод с антителами к МНС II класса.....	82
Рисунок 11 – МНС II-позитивные клетки вдоль маргинального синуса селезенки лабораторных крыс опытной группы.....	83
Рисунок 12 – МНС II-позитивные клетки красной пульпы селезенки лабораторных крыс опытной группы.....	83
Рисунок 13 – Морфологическая параллель. Селезенка крыс контрольной группы. Иммуногистохимические методы с антителами к МНС II класса и Iba-1. Окраска гематоксилином и эозином.....	84
Рисунок 14 – Количество МНС II-позитивных клеток в морфо-функциональных зонах селезенки на единицу площади ($M \pm m$), шт./мм ²	85
Рисунок 15 – Распределение по площади МНС II-позитивных клеток селезенки крыс контрольной группы и после употребления соединения кальция.....	86

Таблица 7 – Сравнительная характеристика интенсивности светопропускания МНС II-позитивных клеток в морфо-функциональных зонах селезенки лабораторных крыс ($M \pm m$), усл. ед.	87
Рисунок 16 – Селезенка лабораторных крыс. Иммуногистохимический метод с антителами к кальмодулину.....	89
Рисунок 17 – Кальмодулин-позитивные клетки селезенки крыс опытной группы.....	90
Рисунок 18 – Количество кальмодулин-позитивных клеток в морфо-функциональных зонах селезенки на единицу площади ($M \pm m$), шт./мм ²	91
Рисунок 19 – Морфометрические показатели площади кальмодулин-позитивных клеток селезенки контрольных лабораторных крыс и после длительного употребления кальция.....	92
Таблица 8 – Сравнительная характеристика интенсивности светопропускания кальмодулин-позитивных клеток в морфо-функциональных зонах селезенки лабораторных крыс ($M \pm m$), усл. ед.	93
Рисунок 20 – Селезенка лабораторных крыс. Иммуногистохимический метод с антителами к CD4.....	94
Рисунок 21 – Морфологическая параллель. Селезенка крыс контрольной группы. Окраска гематоксилином и эозином. Иммуногистохимический метод с антителами к CD4.....	95
Рисунок 22 – Морфологическая параллель. Селезенка крыс опытной группы. Окраска гематоксилином и эозином. Иммуногистохимический метод с антителами к CD4.....	96
Рисунок 23 – Количество CD4-позитивных клеток в морфо-функциональных зонах селезенки крыс на единицу площади ($M \pm m$), шт./мм ²	97
Таблица 9 – Корреляционный анализ количества CD4-позитивных клеток в морфо-функциональных зонах селезенки крыс контрольной группы (r).....	98

Таблица 10 – Корреляционный анализ количества CD4-позитивных клеток в морфо-функциональных зонах селезенки крыс опытной группы (r)	99
Рисунок 24 – Распределение по площади CD4-позитивных клеток селезенки контрольных лабораторных крыс и после употребления соединения кальция.....	100
Рисунок 25 – Селезенка лабораторных крыс. Иммуногистохимический метод с антителами к CD8.....	102
Рисунок 26 – Количество CD8-позитивных клеток в морфо-функциональных зонах селезенки крыс на единицу площади ($M \pm m$), шт./мм ²	103
Таблица 11 – Корреляционный анализ количества CD8-позитивных клеток в морфо-функциональных зонах селезенки крыс контрольной группы (r).....	104
Таблица 12 – Корреляционный анализ количества CD8-позитивных клеток в морфо-функциональных зонах селезенки крыс опытной группы (r).....	104
Рисунок 27 – Распределение по площади CD8-позитивных клеток селезенки контрольных лабораторных крыс и после употребления соединения кальция.....	105
Рисунок 28 – Селезенка лабораторных крыс. Иммуногистохимический метод с антителами к CD20.....	107
Рисунок 29 – Количество CD20-позитивных клеток в морфо-функциональных зонах селезенки крыс на единицу площади ($M \pm m$), шт./мм ²	109
Таблица 13 – Корреляционный анализ количества CD20-позитивных клеток в морфо-функциональных зонах селезенки крыс контрольной группы (r).....	109
Таблица 14 – Корреляционный анализ количества CD20-позитивных клеток в морфо-функциональных зонах селезенки крыс опытной группы (r)	110

Рисунок 30 – Распределение по площади CD20-позитивных клеток селезенки контрольных лабораторных крыс и после употребления соединения кальция.....	111
Таблица 15 – Уровни экспрессии CD4, CD8, CD20 и иммунорегуляторный индекс (ИРИ) селезенки контрольных лабораторных крыс и после употребления соединения кальция ($M \pm m$).....	112
Рисунок 31 – Соотношение количества CD4-, CD8-, CD20-позитивных клеток селезенки в морфо-функциональных зонах селезенки лабораторных крыс на единицу площади ($M \pm m$), шт./мм ²	114
Рисунок 32 – Соотношение показателей уровня экспрессии компонентов клеточного (CD4, CD8) и гуморального (CD20) звеньев иммунного ответа в морфо-функциональных зонах селезенки контрольных лабораторных крыс и после употребления соединения кальция ($M \pm m$), %.....	115
Рисунок 33 – Корреляционные связи уровней экспрессии компонентов клеточного (CD4 ⁺ , CD8 ⁺) и гуморального (CD20 ⁺) звеньев иммунитета селезенки контрольных лабораторных крыс и после употребления соединения кальция.....	116
Рисунок 34 – Люминесцирующие гранулярные клетки маргинальной зоны лимфоидного узелка селезенки крыс контрольной группы. Метод Кросса, Эвена, Роста.....	118
Рисунок 35 – Люминесцирующие гранулярные клетки красной пульпы селезенки крыс контрольной группы. Метод Кросса, Эвена, Роста.....	118
Рисунок 36 – Люминесцирующие гранулярные клетки лимфоидного узелка селезенки крыс опытной группы. Метод Кросса, Эвена, Роста.....	119
Рисунок 37 – Люминесцирующие гранулярные клетки красной пульпы селезенки крыс опытной группы. Метод Кросса, Эвена, Роста.....	119
Таблица 16 – Интенсивность люминесценции гистамина в морфо-функциональных зонах селезенки контрольных лабораторных крыс и после употребления соединения кальция ($M \pm m$), усл. ед.	120

Рисунок 38 – Соотношение показателей люминесценции гистамина в люминесцирующих гранулярных клетках селезенки и их микроокружении ($M \pm m$), %.....	122
Рисунок 39 – Корреляционные связи между показателями обеспеченности гистамином люминесцирующих гранулярных клеток селезенки и их микроокружения.....	123
Рисунок 40 – Люминесцирующие гранулярные клетки лимфоидного узелка селезенки крыс контрольной группы. Метод Фалька-Хилларпа в модификации Е. М. Крохиной.....	125
Рисунок 41 – Люминесцирующие гранулярные клетки красной пульпы селезенки крыс контрольной группы. Метод Фалька-Хилларпа в модификации Е. М. Крохиной.....	125
Рисунок 42 – Люминесцирующие гранулярные клетки лимфоидного узелка селезенки крыс опытной группы. Метод Фалька-Хилларпа в модификации Е. М. Крохиной.....	126
Рисунок 43 – Люминесцирующие гранулярные клетки красной пульпы селезенки крыс опытной группы. Метод Фалька-Хилларпа в модификации Е. М. Крохиной.....	126
Таблица 17 – Интенсивность люминесценции серотонина в морфофункциональных зонах селезенки контрольных лабораторных крыс и после употребления соединения кальция ($M \pm m$), усл. ед.	128
Рисунок 44 – Соотношение показателей люминесценции серотонина в люминесцирующих гранулярных клетках селезенки и их микроокружении ($M \pm m$), %.....	129
Рисунок 45 – Корреляционные связи между показателями обеспеченности серотонином люминесцирующих гранулярных клеток селезенки и их микроокружения.....	130

Таблица 18 – Интенсивность люминесценции катехоламинов в морфофункциональных зонах селезенки контрольных лабораторных крыс и после употребления соединения кальция ($M \pm m$), усл. ед.	132
Рисунок 46 – Соотношение показателей люминесценции катехоламинов в люминесцирующих гранулярных клетках селезенки и их микроокружении ($M \pm m$), %	133
Рисунок 47 – Корреляционные связи между показателями обеспеченности катехоламинами люминесцирующих гранулярных клеток селезенки и их микроокружения.....	134
Рисунок 48 – Морфологическая параллель. Люминесцирующие гранулярные клетки красной пульпы селезенки крыс контрольной группы. Метод Кросса, Эвена, Роста. Метод Фалька-Хилларпа в модификации Е. М. Крохиной.....	136
Рисунок 49 – Соотношение интенсивности люминесценции биогенных аминов (гистамина, серотонина, катехоламинов) в различных морфофункциональных зонах селезенки контрольных лабораторных крыс и после употребления соединения кальция ($M \pm m$), усл. ед.....	137
Таблица 19 – Показатели серотонинового индекса в морфофункциональных зонах селезенки контрольных лабораторных крыс и после употребления соединения кальция.....	139
Таблица 20 – Корреляционный анализ показателей обеспеченности биогенными аминами селезенки контрольных лабораторных крыс и после употребления соединения кальция.....	141
Таблица 21 – Корреляционные связи между концентрацией общего кальция в крови и морфологическими иммуногистохимическими показателями селезенки крыс контрольных лабораторных крыс и после употребления соединения кальция.....	144

Рисунок 50 – Краткая схема основных морфологических и иммуногистохимических изменений селезенки лабораторных крыс при употреблении соединения кальция с питьевой водой.....

180