

## ПОВРЕЖДАЮЩЕЕ ВОЗДЕЙСТВИЕ ДИХЛОРЕТАНА НА МОРФОФУНКЦИОНАЛЬНОЕ СОСТОЯНИЕ ФАГОЦИТОВ

<sup>1</sup>Муфазалова Н.А., <sup>1</sup>Меньшикова И.А., <sup>1</sup>Камилов Ф.Х., <sup>1</sup>Муфазалова Л.Ф.

<sup>1</sup>ФГБОУ ВО «Башкирский государственный медицинский университет», Уфа, e-mail: i-menshikova@bk.ru

В статье представлены данные о морфофункциональном состоянии полиморфноядерных лейкоцитов и перитонеальных макрофагов в условиях хронической интоксикации дихлорэтаном (интоксикация крыс в течение 60 суток, в суммарной дозе - 0,1 ЛД<sub>50</sub>; введение через желудочный зонд, ежедневно, однократно). Установлено, что интоксикация дихлорэтаном приводит к формированию лейкопении, обусловленной преимущественно снижением числа нейтрофилов. Это сопровождается подавлением оксидантных и неоксидантных механизмов микробицидности нейтрофилов. В структуре кислородзависимого киллинга нейтрофилов страдают преимущественно пероксидазозависимые факторы микробицидности. Угнетение неоксидантных механизмов микробицидности полиморфноядерных лейкоцитов сопровождается снижением уровня катионных белков в них. Цитохимически выявлено изменение активности фосфатаз в нейтрофилах: повышение активности кислой фосфатазы и тенденция к снижению активности щелочной фосфатазы. Подавление токсикантом микробицидной способности макрофагов в условиях как функционирования, так и блокады оксидантных механизмов киллинга сопровождается снижением интенсивности образования активных форм кислорода, активности миелопероксидазы, уровня катионных белков.

Ключевые слова: дихлорэтан, полиморфноядерные лейкоциты, перитонеальные макрофаги, кислородзависимый метаболизм, микробицидная активность, миелопероксидаза, катионные белки, кислая фосфатаза, щелочная фосфатаза.

## DICHLOROETHANE DAMAGING EFFECTS ON MORFOFUNKTIONALE STATE NEUTROPHILS

<sup>1</sup>Mufazalova N.A., <sup>1</sup>Menshikova I.A., <sup>1</sup>Kamilov F.Kh., <sup>1</sup>Mufazalova L.F.

<sup>1</sup>Bashkirian State Medical University, Ufa, e-mail: i-menshikova@bk.ru

The article presents data on morfo-functional state of polymorphonuclear leukocytes and peritoneal macrophages in conditions of chronic intoxication with dichloroethane (intoxication of rats for 60 days, to total dose of 0.1 LD<sub>50</sub>; introduction through a gastric probe, daily, once). It is established that intoxication with dichloroethane leads to formation of leukopenia, primarily due to the decrease in the number of neutrophils. This is accompanied by suppression of oxidative and deoxidant mechanisms microbicidal neutrophils. In the structure kislородozavisimogo of killing of neutrophils predominantly affects peroxidizability factors microbicides. Oppression deoxidant mechanisms microbicides polymorphonuclear leukocytes is accompanied by a decrease in the level of cationic proteins in them. Cytochemical identified changes in the activity of the phosphatase in neutrophils: increased activity of acid phosphatase and the downward trend of alkaline phosphatase activity. Suppression of toxicant microbicidal ability of macrophages in conditions like functioning, and the blockade of oxidative mechanisms of killing, accompanied by a decrease in the intensity of the formation of reactive oxygen species, myeloperoxidase activity, the level of cationic proteins.

Keywords: dichloroethane, polymorphonuclear leukocytes, peritoneal macrophages, oxygen-dependent metabolism, microbicidal activity, myeloperoxidase, cationic proteins, acid phosphatase, alkaline phosphatase.

Дихлорэтан (ДХЭ) широко применяется в промышленности, в хлорорганическом синтезе, в качестве растворителя отравляющих веществ, а также для обезжиривания и чистки одежды [11]. Острые отравления ДХЭ возможны при авариях на химических объектах, что сопровождается попаданием токсиканта в почву, воздух, воду [4; 10; 11]. Наиболее часто длительному негативному влиянию ДХЭ подвергаются работники химических производств хлорорганического синтеза [4; 11].

Рядом авторов показано негативное влияние интоксикации ДХЭ на состояние

гуморального, клеточного иммунитета, антителозависимую клеточную цитотоксичность, а также способность вызывать апоптоз клеток иммунной системы [4; 13-15]. Иммуноповреждающее действие ДХЭ вносит значительный вклад в развитие инфекционных осложнений и смертность при интоксикации [4].

Особого внимания заслуживает проблема повреждающего воздействия ДХЭ на полиморфноядерные лейкоциты (ПМЯЛ) и мононуклеарные фагоциты, поскольку они осуществляют неспецифическую защиту организма, активно участвуют в процессах как врожденного, так и приобретенного иммунитета, а также реагируют на малейшие изменения состояния организма, что позволяет использовать фагоцитарные реакции в качестве индикатора для оценки состояния всей иммунной системы в целом [1; 3; 6; 7].

Известно, что одним из основных механизмов повреждающего действия хлорсодержащих экотоксикантов является активация процессов свободнорадикального перекисного окисления липидов [5; 8; 14; 15]. Следовательно, оксидативный стресс, развивающийся при воздействии хлорсодержащих токсикантов, может существенно нарушить антимикробную активность фагоцитов, молекулярную основу которой составляет продукция активных форм кислорода [3; 9].

В связи с этим целью исследования явилось изучение влияния дихлорэтана на некоторые показатели периферической крови, кислородзависимый метаболизм полиморфноядерных лейкоцитов (ПМЯЛ) и перитонеальных макрофагов (ПМФ), биоцидную способность, активность миелопероксидазы, кислой и щелочной фосфатазы и содержание катионных белков в ПМЯЛ и ПМФ.

### **Материал и методы исследования**

Эксперименты выполнены на 30 белых неинбредных крысах массой 180-200 г, содержащихся в стандартных условиях вивария. Животные были разделены на 2 группы: 1-я группа - контроль (интактные животные), 2-я группа – животные, получавшие ДХЭ. ДХЭ вводили животным внутривентрикулярно ежедневно с помощью специального зонда в течение 60 дней в суммарной дозе 50 мг/кг (0,1 ЛД<sub>50</sub>) в оливковом масле [10]. Контрольная группа животных получала только оливковое масло. Результаты регистрировали на следующий день после окончания введения ДХЭ.

Животные содержались в стандартных условиях вивария с естественным световым режимом, на стандартной диете лабораторных животных (ГОСТР 50258-92), с соблюдением Международных рекомендаций Европейской конвенции по защите позвоночных животных, используемых при экспериментальных исследованиях, а также правил лабораторной практики при проведении доклинических исследований в РФ (ГОСТ 3 51000.3-96 и 51000.4-96) и согласно Приказу МЗ РФ № 267 от 19.06.2003 г. «Об утверждении правил

лабораторной практики» (GLP).

Определяли количество лейкоцитов, нейтрофилов и лимфоцитов в периферической крови, интенсивность кислородзависимого метаболизма (спонтанный и индуцированный НСТ-тест), антимикробную активность ПМЯЛ и ПМФ в условиях функционирования и блокады (азидом натрия) кислородзависимых факторов микробицидности в отношении грибов *Candida albicans*, активность миелопероксидазы (МП), кислой фосфатазы (КФ), щелочной фосфатазы (ЩФ) и содержание катионных белков (КБ) в ПМЯЛ и ПМФ [12].

Результаты НСТ-теста оценивали после 30 минут инкубации суспензии ПМЯЛ в 0,1%-ном растворе нитросинего тетразолия (Chemapol) морфологическим методом. В окрашенных метиловым зеленым мазках определяли процент активных клеток (содержащих гранулы восстановленного диформаза) и индекс активации (степень активации в перераспределении на 1 фагоцит). Показатели вычисляли для интактной суспензии фагоцитов (спонтанный НСТ-тест) и в процессе фагоцитоза частиц латекса (индуцированный НСТ-тест).

Антимикробную активность определяли по числу колониеобразующих единиц (КОЕ) микробов (*S. albicans*, штамм 2), выросших через 3 суток на среде высева. Контролем служил высев микроба из среды реакции, не содержащей фагоцитирующих клеток (ПМЯЛ). Инактивирующую активность фагоцитов выражали в процентах микробных клеток, инактивированных фагоцитами (индекс инактивации, ИИ).

Активность МП, КФ, ЩФ и КБ оценивали по интенсивности окраски (пользуясь 5-балльной шкалой), вычисляли процент активных клеток в мазке (ПА) и средний цитохимический коэффициент (СЦК) по G. Astaldi, L. Verga [12]:  $СЦК = (1a + 2b + 3c + 4d) / 100$ , где 0-4 – интенсивность окраски, а, в, с, d – количество ПМЯЛ с соответствующей интенсивностью окраски [12].

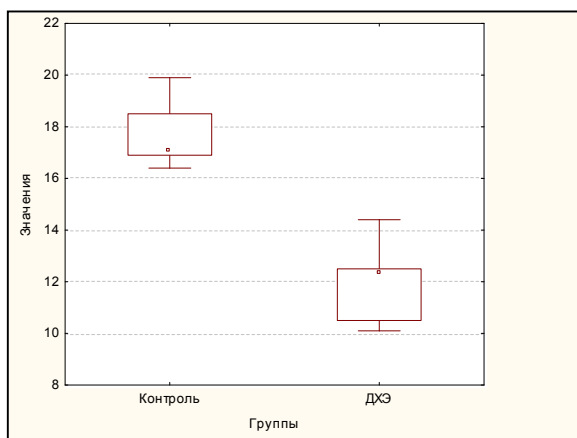
Статистическую обработку проводили с использованием методов вариационной статистики [2], пакета программ Statistica 8.0. Проверку на нормальность распределения данных выполняли с помощью критерия Шапиро-Вилка. Оценку значимости различий проводили, вычисляя медиану и межквартильный интервал. Дисперсионный анализ проводили с помощью H-критерия Краскела-Уоллиса, для множественных сравнений использован Q-критерий Дана. Критический уровень значимости  $p$  для статистических критериев принимали равным 0,05. Данные в тексте представлены в процентах к контролю (неинбредные животные).

### **Результаты исследования и их обсуждение**

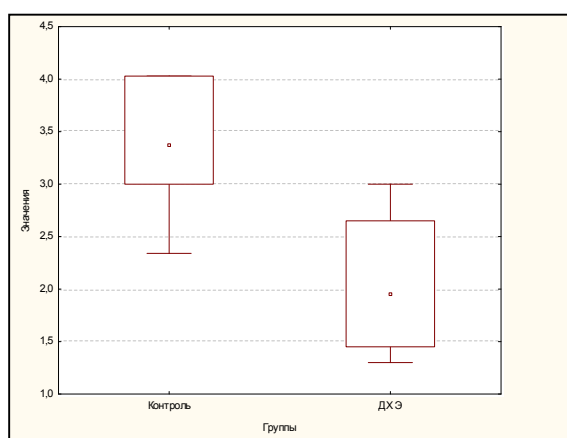
Длительное, в течение 60 дней, воздействие низких доз ДХЭ (в суммарной дозе 0,1 ЛД<sub>50</sub>) приводило к развитию у экспериментальных животных лейкопении (число лейкоцитов

снизилось до 71,93% по отношению к контролю,  $p=0,0017$ ), формирование которой было обусловлено преимущественно снижением числа нейтрофилов (до 58,04%,  $p=0,0017$ ). Отмечалось также и уменьшение числа лимфоцитов (до 72,60%,  $p=0,0026$ ) (рис. А, В, С).

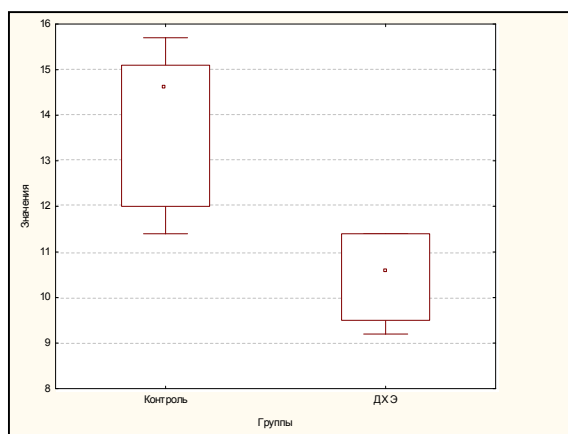
**А**



**В**



**С**



*Влияние дихлорэтана на содержание лейкоцитов (А), нейтрофилов (В) и лимфоцитов у экспериментальных животных*

Известно, что в нейтрофильных гранулоцитах существует два бактерицидных механизма: кислородзависимый и кислороднезависимый. Первый связан с функционированием миелопероксидазной системы ПМЯЛ.

В связи с этим на первом этапе нами была изучена активность кислородзависимых механизмов киллинга нейтрофилов. В группе животных, подвергшихся воздействию ДХЭ, было выявлено увеличение числа КОЕ (до 141.91%,  $p=0,0009$ ), в результате ИИ снизился до 74,55% (по отношению к контролю). Это свидетельствует о подавлении токсикантом оксидантных механизмов микробицидности ПМЯЛ.

Изучение интенсивности образования активных форм кислорода (АФК) (индуцированный НСТ-тест), которым принадлежит важная роль в механизмах кислородзависимого киллинга, выявило их снижение: процент активных клеток составил 75,0% ( $p=0,0153$ ), а индекс активации –72,22% ( $p=0,0312$ ). В то же время активность МП в

нейтрофилах, как было установлено при цитохимических исследованиях, несколько уменьшалась, не достигая, однако, статистической значимости: процент МП-позитивных клеток, как и средний цитохимический коэффициент (СЦК), снизились на 20% по сравнению с таковыми у интактных животных (табл.).

Влияние дихлорэтана на содержание миелопероксидазы и катионных белков в нейтрофилах и макрофагах (в % к контролю)

Показатель	Нейтрофилы		Макрофаги	
	Процент активных клеток	Средний цитохимический коэффициент	Процент активных клеток	Средний цитохимический коэффициент
МП	82,35 [76,47 – 97,06] p = 0,3611	81,91 [75,53 – 85,11] p = 0,0821	77,55 [68,37 – 84,69] p = 0,0034	62,07 [57,47 – 74,71] p = 0,00003
КБ	59,18 [53,06 – 69,39] p ≥ 0,00001	71,38 [50,00 – 73,91] p = 0,0015	69,89 [65,59 -78,49] p = 0,0082	72,67 [59,30 – 75,58] p = 0,0450

Примечание: достоверность отличий p – от контроля.

Полученные данные свидетельствуют о подавлении токсикантом кислородзависимой биоцидной системы ПМЯЛ с преимущественным угнетением пероксидазозависимых механизмов микробицидности нейтрофилов.

При изучении фунгицидной способности нейтрофилов в условиях блокады кислородзависимых механизмов киллинга наблюдалось увеличение числа КОЕ до 158,21% (p=0,0003). В результате ИИ снизился до 65,49% (по отношению к контролю).

Известно, что кислороднезависимый механизм биоцидности нейтрофильных гранулоцитов определяется потенциалом антимикробных катионных белков нейтрофилов, которые, кроме того, играют важную роль в развитии многих защитно-приспособительных и патологических процессов [12].

В связи с этим на следующем этапе было изучено содержание неферментных КБ в ПМЯЛ. Установлено существенное (статистически значимое) снижение уровня КБ в ПМЯЛ: процент КБ-положительных клеток снизился почти в два раза, а СЦК – на 30% по сравнению с интактными животными (табл.). Это свидетельствует об угнетении неоксидантных механизмов микробицидности ПМЯЛ.

Длительное воздействие низких доз ДХЭ приводило и к изменению активности фосфатаз в нейтрофилах. Так, установлено статистически значимое повышение активности

кислой фосфатазы: процент КФ-активных клеток (ПА) составил 173,58% ( $p \leq 0,00001$ ), а СЦК – 195,49% ( $p = 0,00002$ ). В то же время активность щелочной фосфатазы статистически значимо не изменялась, хотя отмечалась тенденция к ее снижению.

Выявленное повышение активности кислой фосфатазы, одного из основных маркеров лизосом, совпадает с известными данными об устойчивом росте активности кислой фосфатазы нейтрофилов при воздействии хлорированных углеводов, что указывает на усиление катаболических процессов в элементах гемопоэза [12]. Также повышение активности фермента, возможно, обусловлено повышением проницаемости субклеточных мембран нейтрофилов с учетом механизма повреждающего воздействия ДХЭ.

При цитоэнзимохимической оценке состояния клеток большее значение имеют не показания активности отдельных ферментов, а дискоординация их активности, поскольку это свидетельствует о нарушении взаимосвязи и сопряженности ферментативных процессов в клетке.

Учитывая, что кислая фосфатаза, как и МП, содержится в азурофильных гранулах ПМЯЛ, выявленное отсутствие корреляции в их содержании (тенденция к снижению активности МП и резкая активация КФ) может отражать разобщение гранулярных ферментативных процессов, характеризующих чувствительность клетки к повреждающему воздействию [3; 12].

Воздействие токсиканта оказывало негативное влияние и на антимикробную активность и мононуклеарных фагоцитов. В условиях функционирования кислородзависимых биоцидных систем ПМФ установлено увеличение числа КОЕ до 134,68% ( $p = 0,0034$ ), в результате ИИ составил 81,78% (по отношению к контролю). Это сопровождалось снижением образования АФК в условиях индукции: процент активных клеток составил 77,33% ( $p = 0,0098$ ), а индекс активации –73,33% ( $p = 0,0015$ ). Цитохимически было выявлено снижение почти на 30% активности МП в ПМФ (табл.).

Также наблюдалось подавление неоксидантных микробицидных систем мононуклеарных фагоцитов, о чем свидетельствовало повышение числа КОЕ до 182,22% ( $p \leq 0,00001$ ), в результате ИИ составил 72,59%. Это сопровождалось глубоким снижением уровня КБ в ПМФ (табл.). Полученные данные свидетельствуют об угнетении токсикантом оксидантных и неоксидантных механизмов микробицидности ПМФ.

Цитоэнзимохимические исследования не выявили статистически значимых изменений активности кислой и щелочной фосфатаз, наблюдалась лишь тенденция к повышению активности щелочной фосфатазы в ПМФ.

Изменения активности МП, КБ, кислой и щелочной фосфатазы являются отражением изменения функциональной активности фагоцитов, о чем свидетельствует падение

бактерицидной способности этих клеток в условиях длительного воздействия низких доз ДХЭ и согласуются с известными данными о развитии вторичных иммунодефицитных состояний при воздействии промышленных экотоксикантов.

Особенно ценно, что цитохимические нарушения могут предшествовать клиническим проявлениям воздействия профессиональных вредностей и служить маркером развития ранних нарушений в состоянии здоровья работающих, которые рассматриваются как предпатологические.

### **Выводы**

Таким образом, хроническая интоксикация экспериментальных животных ДХЭ приводит к развитию лейкопении, формирование которой обусловлено преимущественно снижением числа нейтрофилов. Количественные нарушения клеток фагоцитарного звена сопровождаются качественными изменениями функционального состояния нейтрофилов и мононуклеарных фагоцитов. Это проявляется падением интенсивности оксидантного метаболизма клеток, подавлением оксидантных и неоксидантных механизмов микробицидности, что сопровождается снижением в них активности миелопероксидазы (ПМФ) и уровня катионных белков (ПМЯЛ и ПМФ). Выявленные изменения показателей цитоэнзимохимической активности фагоцитов отражают тяжесть повреждающего воздействия длительного поступления в организм низких доз ДХЭ.

### **Список литературы**

1. Баев Д.А. Оценка эффективности физических методов гемостаза и диссекции при операциях на органах брюшной полости (экспериментально-клиническое исследование) : автореф. дис. ... канд. мед. наук. - Уфа, 2012. – 24 с.
2. Гареев Е.М. Основы математико-статистической обработки медико-биологической информации. – Уфа : Изд-во ГОУ ВПО «Башгосмедуниверситет Росздрава», 2009. - 346 с.
3. Грибы рода *Candida* стимулируют образование нейтрофильных внеклеточных ловушек / Ю.С. Андреева, И.И. Долгушин, А.Ю. Савочкина [и др.] // Медицинская иммунология. – 2009. – Т. 11, № 4-5. – С. 40-42.
4. Забродский П.Ф. Снижение иммунных реакций и изменение цитокинового профиля при подострой интоксикации 1,2-дихлорэтаном / П.Ф. Забродский, М.С. Громов, В.В. Масляков // Токсикологический вестник. – 2014. - № 1. – С. 18-21.
5. Камиллов Ф.Х. Биохимические маркеры костного и остеокластического дифференцирования в плазме крови при подострой интоксикации дихлорэтаном / Ф.Х. Камиллов, Е.Р. Фаршатова, Д.А. Еникеев, Г.В. Иванова // Казанский медицинский журнал. – 2015. – Т. 96. - № 5. – С.

828-831.

6. Маянский А.Н. НАДФН - оксидаза нейтрофилов: активация и регуляция // Цитокины и воспаление. – 2007. – Т. 6, № 3. – С. 3-13.
7. Пинегин Б.В. Нейтрофилы: структура и функция / Б.В. Пинегин, А.Н. Маянский // Иммунология. - 2007. - Т. 28, № 6. – С. 374-382.
8. Срубиллин Д.В., Еникеев Д.А., Мышкин В.А. Изменения цитокинового профиля и активности процессов перекисного окисления липидов в крови крыс в механизмах формирования воспалительного ответа при хронической интоксикации дихлорэтаном // Современные проблемы науки и образования. – 2015. – № 5. – URL: <https://www.science-education.ru/ru/article/view?id=21763>.
9. Степовая Е.А. Роль тиолдисульфидной системы в механизмах изменений функциональных свойств нейтрофилов при окислительном стрессе / Е.А. Степовая, Г.В. Петина, Т.В. Жаворонок // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. – 2010. – Т. 150, № 8. – С. 161-165.
10. Токсикологическая химия. Метаболизм и анализ токсикантов / под ред. Н.И. Калетиной. – М. : ГЭОТАР-Медия, 2008. – 1016 с.
11. Шаяхметов С.Ф. Оценка профессионального риска нарушений здоровья работников предприятий химической промышленности / С.Ф. Шаяхметов, М.П. Дьякович, Н.М. Мещакова // Мед. труда и пром. экология. - 2008. - № 8. - С. 27-33.
12. Ягода А.В. Клиническая цитохимия / под ред. А.В. Ягоды, Н.А. Локтева. – Ставрополь, 2005. – 485 с.
13. Lone M.I. Genotoxicity and immunotoxic effects of 1,2-dichloroethane in Wistar rats / M.I. Lone, N. Nazam, A. Hussain, S.K. Singh // J. Environ. Sci. Health C. Environ Carcinog. Ecotoxicol. Rev. - 2016. - Jul 2; 34 (3). - P. 169-186.
14. McDermott C. Toxicity of Industrially Relevant Chlorinated Organic Solvents In Vitro Catherine / C. McDermott, James J.A. Heffron // International Journal of Toxicology. - 2013. – 32 (2). - P. 136-145. DOI: 10.1177/1091581813482006.
15. Wang G. Effects of subacute exposure to 1,2-dichloroethane on mouse behavior and the related mechanisms / G. Wang, Y. Qi, L. Gao L, G. Li // Human and experimental toxicology. - 2013. – Sep. 32:9. - P. 983-991.