

ВЛИЯНИЕ НАНОДИСПЕРСНОЙ АМОРФНОЙ ФОРМЫ КАЛЬЦИЯ ГЛЮКОНАТА И ЕЕ КОМБИНАЦИИ С РЫБИМ ЖИРОМ НА ФУНКЦИОНАЛЬНОЕ СОСТОЯНИЕ НЕЙТРОФИЛОВ ПРИ ИНТОКСИКАЦИИ ДИХЛОРЕТАНОМ

**Муфазалова Н.А.¹, Меньшикова И.А.¹, Камиллов Ф.Х.¹, Муфазалова Л.Ф.¹,
Ахмадуллина Г.Х.¹**

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

В статье представлены данные о влиянии нанодисперсной аморфной формы кальция глюконата и ее комбинации с рыбьим жиром на функциональное состояние нейтрофилов в условиях хронической интоксикации дихлорэтаном. Дихлорэтан вводили животным интрагастрально ежедневно в дозе 0,84 мг/кг массы тела в течение 60 дней (суммарная доза - 0,1 ЛД₅₀). Препараты коррекции вводили подопытным животным интрагастрально ежедневно в течение последнего месяца опыта: Кальций-МАГ - в виде суспензии в дозе 253 мг/кг массы в день, рыбий жир - в дозе 0,05 мл/200 г крысы. Определяли количество лейкоцитов, нейтрофилов и лимфоцитов в периферической крови, интенсивность кислородзависимого метаболизма (индуцированный НСТ-тест), антимикробную активность в условиях функционирования и блокады (азидом натрия) кислородзависимых факторов микробицидности (*Candida albicans*), активность миелопероксидазы, кислой, щелочной фосфатазы и содержание катионных белков в нейтрофилах. Установлено, что применение нанодисперсной аморфной формы кальция глюконата и его комбинации с рыбьим жиром уменьшает негативное влияние токсиканта на количественные и качественные показатели функциональной активности нейтрофилов: устраняет лейкопению, восстанавливает активность кислородзависимого метаболизма, улучшает микробицидную способность, нормализует ряд показателей метаболической и ферментативной активности этих клеток. Большая эффективность выявлена при сочетанном использовании препаратов коррекции.

Ключевые слова: дихлорэтан, нейтрофилы, нанодисперсная аморфная форма кальция глюконата, рыбий жир, кислородзависимый метаболизм, микробицидная активность, миелопероксидаза, кислая фосфатаза, щелочная фосфатаза, катионные белки.

THE INFLUENCE OF NANODISPERSED AMORPHOUS FORMS OF CALCIUM GLUCONATE AND ITS COMBINATION WITH FISH OILS ON THE FUNCTIONAL STATE OF NEUTROPHILS IN DICHLOROETHANE INTOXICATION

**Mufazalova N.A.¹, Menshikova I.A.¹, Kamilov F.Kh.¹, Mufazalova L.F.¹,
Ahmadullina G.H.¹**

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

The article presents data on the influence of nanodispersed amorphous forms of calcium gluconate and its combination with fish oil on the functional status of neutrophils in conditions of chronic intoxication with dichloroethane. Dichloroethane was administered to animals intragastrically at a daily dose of 0,84 mg/kg of body weight for 60 days (total dose of 0,1 LD₅₀). Drugs correction was injected animals intragastrically daily for the last month of the experiment: the Calcium-MAG - in suspension at a dose of 253 mg/kg per day, fish oil in the dose of 0.05 ml/200 g rat. Determined the number of leukocytes, neutrophils and lymphocytes in peripheral blood, intensity kislородozavisimogo metabolism (induced nst-test), antimicrobial activity in the conditions of operation and the blockade (sodium azide) oxygen-dependent factors microbicides (*Candida albicans*), the activity of myeloperoxidase, acid and alkaline phosphatase and the content of cationic proteins in neutrophils. The use of nanodispersed amorphous forms of calcium gluconate and its combination with fish oil reduces the negative impact of the toxicant on quantitative and qualitative indicators of the functional activity of neutrophils: removes radiation, restores the activity kislородozavisimogo metabolism, improves the microbicidal ability, and normalizes a number of indicators of the metabolic and enzymatic activity of these cells. Greater efficiency identified in the combined use of drugs correction.

Keywords: dichloroethane, neutrophils, nanosized amorphous form of calcium gluconate, fish oil, oxygen-dependent metabolism, microbicidal activity, myeloperoxidase, acid phosphatase, alkaline phosphatase, and cationic proteins.

Дихлорэтан (ДХЭ), широко применяющийся в промышленности в качестве растворителя отравляющих веществ, для обезжиривания и чистки одежды, оказывает

плейотропное повреждающее воздействие на организм человека [3; 13; 14]. Наиболее часто негативному влиянию ДХЭ подвергаются работники химических производств хлорорганического синтеза [3; 11]. При длительном воздействии даже незначительных доз ДХЭ отмечается негативное влияние на гепатобилиарную, нервную, эндокринную, иммунную системы, а также усиление процессов резорбции в костной ткани с формированием остеопении и остеопороза [4; 5; 8; 14]. Рядом авторов показана эффективность нанодисперсной аморфной формы кальция глюконата (Кальций-МАГа) для коррекции остеотоксического действия ДХЭ [5; 6; 9].

С другой стороны, актуальным остается поиск возможных путей коррекции иммуноповреждающего действия ДХЭ, вносящего существенный вклад в развитие инфекционных осложнений и смертность при интоксикации [3; 4; 8]. Особый интерес привлекает состояние полиморфноядерных лейкоцитов (ПМЯЛ), которые, являясь одной из универсальных мишеней токсического воздействия, выступают в качестве чувствительных индикаторов тканевого гомеостаза, чутко реагируют на разнообразные влияния факторов внешней среды и производственной деятельности [2; 7; 12]. Цитохимический анализ ферментных систем, изучение биоцидности ПМЯЛ позволяет оценить процессы клеточного метаболизма, их координацию при воздействии повреждающих агентов, эффективность проводимой коррекции этих нарушений, а также способствует пониманию механизмов адаптации и компенсации в организме [2; 7; 12].

Учитывая возможность эффективной коррекции Кальций-МАГом остеоповреждающего действия ДХЭ, представляется значимым изучить его влияние на иммунотоксическое влияние токсиканта. Кроме того, учитывая нефротоксичность ДХЭ, с одной стороны, а также важную роль в процессах остеосинтеза и известную иммуномодулирующую активность рыбьего жира (Рж) - с другой, большой интерес представляет влияние сочетанного применения Кальций-МАГа и Рж на состояние иммунной системы при интоксикации ДХЭ [3; 9; 11; 15].

В связи с этим нами изучено влияние нанодисперсной аморфной формы кальция глюконата — Кальций-МАГа (СаМАГ) и его комбинации с рыбьим жиром (Рж) на функциональную активность ПМЯЛ в условиях хронической интоксикации дихлорэтаном.

Материалы и методы исследования

Эксперименты выполнены на 60 белых половозрелых неинбредных крысах-самках массой 180-200 г. Животные были разделены на 4 группы: 1-я группа - контроль (интактные животные), 2-я группа – животные, получавшие ДХЭ, 3-я группа – животные, получавшие ДХЭ и Кальций-МАГ (ДХЭ+СаМАГ), 4-я группа – животные, получавшие ДХЭ, Кальций-МАГ и рыбий жир (ДХЭ+СаМАГ+Рж).

ДХЭ вводили животным внутрижелудочно ежедневно с помощью специального зонда в течение 60 дней из расчета 0,082 мг/100 г массы, в суммарной дозе 0,1 ЛД₅₀ в оливковом масле [10]. Животные контрольной группы получали адекватный объем оливкового масла.

Кальций-МАГ (СаМАГ) вводили подопытным животным в оливковом масле в виде суспензии в дозе 253 мг/кг массы в день в течение последнего месяца опыта. В эксперименте использовали кальций-МАГ — механоактивированную аморфную форму кальция глюконата, полученного согласно патенту на изобретение [6]. По данным комплексного физико-химического анализа, после механоактивации (измельчения в энергонапряженном устройстве - активаторе) размер частиц составляет 50-300 нм, происходит переход исходного кристаллического порошка в рентгеноаморфное состояние [9]. Кальций-МАГ прошел государственную регистрацию, имеет сертификат № 77.99.23.3.У.8864.10.08, позволяющий использовать его для профилактических и лечебных целей.

Рыбий жир (Рж) вводили подопытным животным внутрижелудочно в дозе 0,05 мл/200 г крысы ежедневно в течение последних 30 дней опыта.

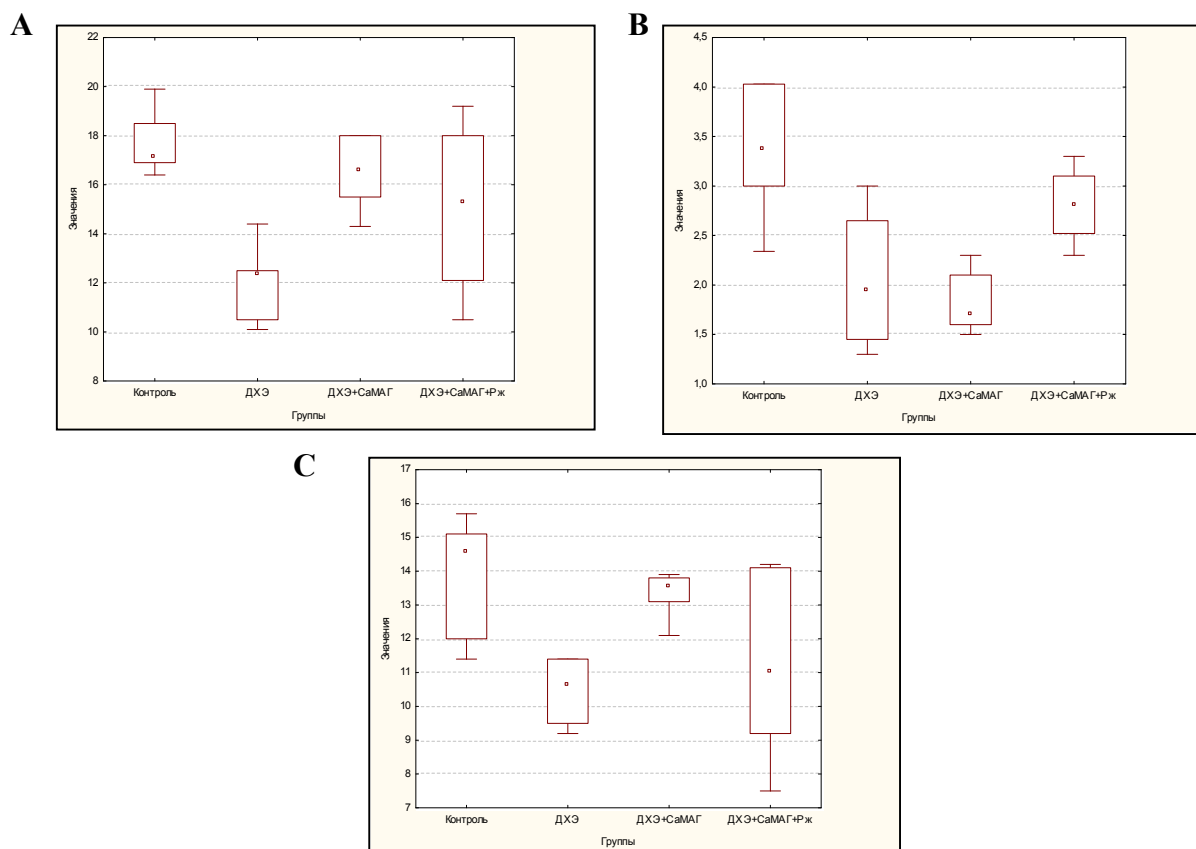
Животные содержались в стандартных условиях вивария с естественным световым режимом, на стандартной диете лабораторных животных (ГОСТР 50258-92), с соблюдением Международных рекомендаций Европейской конвенции по защите позвоночных животных, используемых при экспериментальных исследованиях, а также Правил лабораторной практики при проведении доклинических исследований в РФ (ГОСТ 3 51000.3-96 и 51000.4-96) 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 (индуцированный НСТ-тест), антимикробную активность ПМЯЛ 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 [12]. Результаты регистрировали на следующий день после окончания введения ДХЭ.

Статистическую обработку проводили с использованием методов вариационной статистики [1], 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 Н-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.

Результаты и обсуждение

Установлено, что длительное, в течение 60 дней, введение ДХЭ приводило к формированию лейкопении (число лейкоцитов снизилось до 71,93% по отношению к контролю, $p=0,0015$), преимущественно за счет снижения числа нейтрофилов (до 58,04%, $p=0,0040$) при уменьшении и числа лимфоцитов (до 72,60%, $p=0,0034$) (рис. А, В, С).



Влияние Кальций-МАГа и его комбинации с Рж на содержание лейкоцитов (А), нейтрофилов (В) и лимфоцитов у экспериментальных животных при интоксикации ДХЭ

Воздействие ДХЭ оказывало также негативное влияние на микробицидность ПМЯЛ. Наблюдалось угнетение как оксидантных, так и неоксидантных механизмов киллинга ПМЯЛ (индекс инактивации (ИИ) составил 74,55% и 66,49% соответственно). Отмечено снижение интенсивности образования активных форм кислорода (АФК) в ПМЯЛ при сохранении активности МП (табл. 1). Это свидетельствует о подавлении пероксидазонезависимых оксидантных факторов микробицидности ПМЯЛ. Угнетение кислороднезависимых механизмов фунгицидности нейтрофилов сопровождалось падением уровня катионных белков в них (табл. 1).

Интоксикация ДХЭ приводила к резкой активации кислой фосфатазы в ПМЯЛ: процент КФ-позитивных клеток увеличился на 70%, а СЦК – почти в 2 раза по сравнению с интактными животными (табл. 2).

Влияние Кальций-МАГа и его комбинации с Рж
на содержание миелопероксидазы и катионных белков в ПМЯЛ при интоксикации ДХЭ
(в % к контролю)

Показатель		ДХЭ	ДХЭ+СаМАГ	ДХЭ+СаМАГ+Рж
Миелопероксидаза	ПА	82,35 [76,47 – 97,06] $p_1 = 0,3611$	70,59 [52,94 – 85,29] $p_1 = 0,0009$ $p_2 = 1,0000$	86,76 [79,41 – 97,06] $p_1 = 0,5052$ $p_2 = 1,0000$ $p_3 = 0,4536$
	СЦК	81,91 [75,53 – 85,11] $p_1 = 0,0821$	67,55 [61,70 – 77,66] $p_1 \leq 0,00001$ $p_2 = 0,2866$	88,30 [80,85 – 92,55] $p_1 = 0,5262$ $p_2 = 1,0000$ $p_3 = 0,0569$
Катионные белки	ПА	59,18 [53,06 – 69,39] $p_1 \leq 0,00001$	84,69 [74,49 – 89,29] $p_1 = 0,0009$ $p_2 = 0,7672$	97,96 [93,88 – 102,04] $p_1 = 1,0000$ $p_2 = 0,0002$ $p_3 = 0,1372$
	СЦК	71,38 [50,00 – 73,91] $p_1 = 0,0015$	88,41 [78,26 – 92,75] $p_1 = 0,9045$ $p_2 = 0,4244$	114,86 [109,06 – 122,83] $p_1 = 0,7777$ $p_2 \leq 0,00001$ $p_3 = 0,0077$

Примечание: достоверность отличий P_1 – от контроля, P_2 – от ДХЭ, P_3 – от ДХЭ+СаМАГ
ПА – процент активных ПМЯЛ, СЦК - средний цитохимический коэффициент

Повышение активности КФ может быть обусловлено повреждающим воздействием и коррелирует с временем экспозиции токсических факторов [12]. Разнонаправленное изменение активности МП и КФ, выявленное в наших исследованиях, может свидетельствовать о нарушении взаимосвязи и сопряженности гранулярных ферментативных процессов, отражать нарушение функционального состояния клетки, и прежде всего ее микробоцидного потенциала [2; 12].

При изучении активности ЩФ была выявлена тенденция к снижению процента ЩФ-положительных клеток, в то время как СЦК не отличался от контроля (табл. 2).

Применение Кальций-МАГа как индивидуально, так и в комбинации с Рж нормализовало уровень лейкоцитов в периферической крови (число лейкоцитов составило 97,08% ($p=1,0000$) и 89,47% ($p=0,9454$) соответственно). В случае изолированного использования Кальций-МАГа это достигалось преимущественно за счет повышения числа лимфоцитов (до 92,47%, $p=1,0000$), а в комбинации с Рж наблюдалось равномерное

увеличения числа нейтрофилов (до 83,33%, $p=1,0000$) и лимфоцитов (до 75,34%, $p=0,2818$) (рис. А, В, С).

Таблица 2

Влияние Кальций-МАГа и его комбинации с Рж на активность кислой и щелочной фосфатазы в ПМЯЛ при интоксикации дихлорэтаном (в % к контролю)

Показатель		ДХЭ	ДХЭ + Кальций-МАГ	ДХЭ + Кальций-МАГ + Рж
Кислая фосфатаза	ПА	173,58 [158,49 – 188,68] $p_1 \leq 0,00001$	124,53 [103,77 – 133,96] $p_1 = 0,8355$ $p_2 = 0,0013$	139,62 [132,08 – 150,94] $p_1 = 0,0014$ $p_2 = 0,9002$ $p_3 = 0,3742$
	СЦК	195,49 [153,38 – 209,02] $p_1 = 0,00002$	109,77 [100,00 – 153,38] $p_1 = 1,0000$ $p_2 = 0,0043$	153,76 [148,12 – 157,52] $p_1 = 0,0064$ $p_2 = 1,0000$ $p_3 = 0,2456$
Щелочная фосфатаза	ПА	69,23 [53,85 – 86,81] $p_1 = 0,6515$	28,57 [16,48 – 43,96] $p_1 = 0,0029$ $p_2 = 0,7457$	92,31 [72,53 – 105,49] $p_1 = 1,0000$ $p_2 = 1,0000$ $p_3 = 0,0225$
	СЦК	81,67 [66,67 – 85,00] $p_1 = 1,0000$	43,33 [26,67 – 55,00] $p_1 = 0,0206$ $p_2 = 0,5199$	100,0 [83,33 – 123,33] $p_1 = 1,0000$ $p_2 = 1,0000$ $p_3 = 0,0074$

Примечание: достоверность отличий P_1 – от контроля, P_2 – от ДХЭ, P_3 – от ДХЭ+СаМАГ
ПА – процент активных ПМЯЛ, СЦК - средний цитохимический коэффициент

Использование Кальций-МАГа не устраняло депрессию токсикантом кислородзависимых механизмов киллинга ПМЯЛ (КОЕ - 135,29% ($p=0,0174$), ИИ - 78,57%).

Кальций-МАГ восстанавливал интенсивность образования АФК в ПМЯЛ (индуцированный НСТ-тест): процент активных клеток составил 125,0% ($p=1,0000$), а индекс активации – 116,67% ($p=0,1669$). Однако цитохимически было выявлено статистически значимое снижение активности МП в ПМЯЛ (табл. 1). Полученные данные свидетельствуют о восстановлении активности пероксидазонезависимых механизмов оксидантного киллинга нейтрофилов.

Сочетанное применение Кальций-МАГа и Рж полностью устраняло негативное влияние ДХЭ на активность оксидантных микробицидных систем ПМЯЛ (ИИ составил 86,61%), что достигалось восстановлением как пероксидазозависимых, так и пероксидазонезависимых механизмов биоцидности нейтрофилов (табл. 1).

В условиях же блокады оксидантных факторов микробицидности использование

Кальций-МАГа и его комбинации с Рж восстанавливало активность неоксидантных механизмов киллинга нейтрофилов (ИИ составил 86,73% и 90,27% соответственно), что сопровождалось повышением уровня КБ в ПМЯЛ (табл. 1).

Применение Кальций-МАГа полностью устраняло активацию КФ, вызванную токсикантом (табл. 2), что может быть обусловлено нормализующим влиянием Кальций-МАГа на проницаемость клеточных и субклеточных мембран нейтрофилов. В то же время активность ЩФ в группе животных, получавших Кальций-МАГ, была снижена (табл. 2).

Совместное применение Кальций-МАГа и Рж ослабляло, но не устраняло активацию КФ в нейтрофилах, в то время как активность ЩФ не отличалась от таковой у интактных животных (табл. 2).

Выводы

Таким образом, использование Кальций-МАГа, эффективного средства коррекции остеопении и остеопороза при хронической интоксикации ДХЭ [5], и его комбинации с Рж существенно уменьшает негативное влияние ДХЭ на количественные и качественные показатели функциональной активности ПМЯЛ: устраняет лейкопению, восстанавливает интенсивность кислородзависимого метаболизма, улучшает микробицидную способность, нормализует ряд показателей метаболической и ферментативной активности этих клеток. Большая эффективность выявлена при сочетанном использовании препаратов коррекции.

Список литературы

1. Гареев Е.М. Основы математико-статистической обработки медико-биологической информации. – Уфа : Изд-во ГОУ ВПО «Башгосмедуниверситет Розддрава», 2009. – 346 с.
2. 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.
3. Забродский П.Ф. Иммунотоксикология ксенобиотиков / П.Ф. Забродский, В.Г. Мандыч. - Саратов, 2007. - 420 с.
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. Камилов Ф.Х. Влияние антиоксидантного витаминного препарата и нанодисперсной кальциевой соли глюконовой кислоты на обмен костной ткани нижней челюсти у крыс при хронической интоксикации дихлорэтаном / Ф.Х. Камилов, Т.И. Ганеев, Е.Р. Фаршатова, Н.С. Стрелков // Астраханский медицинский журнал. – 2011. – Т. 6. - № 3. – С. 89, 91.

6. Кобыгин Г.Н., Стрелков Н.С., Тюлькин Е.П., Поздеев В.В., Максимов П.Н., Филиппов А.Н., Шишкин С.Б., Гильмутдинов Ф.З., Дорофеев Г.А., Елсуков Е.П. Способ лечения гипокальциемий, остеопорозов, переломов : Патент РФ № 2268053, 20.01.2006 г.
7. Маянский А.Н. НАДФН - оксидаза нейтрофилов: активация и регуляция // Цитокины и воспаление. – 2007. – Т. 6, № 3. – С. 3-13.
8. Срубиллин Д.В. Изменения цитокинового профиля и активности процессов перекисного окисления липидов в крови крыс в механизмах формирования воспалительного ответа при хронической интоксикации дихлорэтаном / Д.В. Срубиллин, Д.А. Еникеев, В.А. Мышкин // Современные проблемы науки и образования. – 2015. – № 5. – URL: <https://www.science-education.ru/ru/article/view?id=21763>.
9. Стрелков Н.С. Нанодисперсная аморфная форма кальция глюконата: биохимическая совместимость и терапевтическая эффективность при лечении заболеваний, связанных с обменом кальция в организме / Н.С. Стрелков, Г.Н. Кобыгин, Д.С. Рыбин // Альманах клинической медицины. - 2008. - № 17. – Т. 2. – С. 366-370.
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. Orchard T.S. A systematic review of omega-3 fatty acids and osteoporosis / T.S. Orchard, X. Pan, F. Cheek, S.W. Ing, R.D. Jackson // Br. J. Nutr. – 2012. Jun; 107. - Suppl 2: - S. 253-60. doi: 10.1017/S0007114512001638.