

АКТУАЛЬНЫЕ ПРОБЛЕМЫ БИОХИМИИ И ЛАБОРАТОРНОЙ ДИАГНОСТИКИ

УДК 613.632: 614.31: 612.112.3: 612.084: 615.9: 616.155.3

НО01

ФУНКЦИОНАЛЬНОЕ СОСТОЯНИЕ НЕЙТРОФИЛОВ ПРИ ИНТОКСИКАЦИИ АМИННОЙ СОЛЬЮ 2,4-ДИХЛОРФЕНОКСИУКСУСНОЙ КИСЛОТЫ

Зайтуна Алексеевна Ахметченко¹, Наталья Альбертовна Муфазалова²,
Ляйсан Фагимовна Муфазалова^{2*}, Анна Дмитриевна Ремезова Альбина Яхиевна Мухаметзянова²

¹Башкирский государственный университет, г. Уфа,
²Башкирский государственный медицинский университет, г. Уфа

Реферат

Цель. Изучить влияние подострой интоксикации аминной солью 2,4-дихлорфеноксиуксусной кислоты на функциональное состояние нейтрофилов.

Методы. Аминную соль 2,4-дихлорфеноксиуксусной кислоты вводили внутривенно (42 мг/кг) в течение 28 дней. Определяли количество лейкоцитов, нейтрофилов и лимфоцитов в периферической крови, интенсивность кислородозависимого метаболизма (спонтанный и индуцированный тесты восстановления нитросинего тетразолия), поглотительную способность, антимикробную активность нейтрофилов в условиях функционирования и блокады (азидом натрия) кислородозависимых факторов микробицидности, содержание миелопероксидазы и катионных белков в нейтрофилах. Результаты регистрировали на 7-е и 14-е сутки от окончания введения токсиканта.

Результаты. Подострая интоксикация аминной солью 2,4-дихлорфеноксиуксусной кислоты на 7-е сутки приводила к формированию лейкопении за счёт уменьшения числа нейтрофилов, что сопровождалось угнетением кислородозависимого цитолиза нейтрофилов в результате подавления пероксидазонезависимых механизмов микробицидности (уменьшалось образование активных форм кислорода). Также отмечалось снижение активности кислородонезависимых механизмов цитолиза, что коррелировало с уменьшением в них уровня катионных белков. На 14-е сутки лейкопения сменялась лейкоцитозом за счёт увеличения числа и нейтрофилов, и лимфоцитов. При этом продолжала снижаться активность как оксидантных, пероксидазозависимых, так и неоксидантных механизмов микробицидности нейтрофилов. Это сопровождалось уменьшением активности миелопероксидазы, уровня катионных белков в них и поглотительной способности нейтрофилов.

Вывод. Подострая интоксикация аминной солью 2,4-дихлорфеноксиуксусной кислоты вызывает глубокие количественные и функциональные нарушения нейтрофилов, которые не устраняются к 14-м суткам наблюдения; это свидетельствует о необходимости дальнейшего изучения иммуноповреждающего действия аминной соли 2,4-дихлорфеноксиуксусной кислоты с целью изыскания возможных путей фармакологической коррекции.

Ключевые слова: аминная соль 2,4-дихлорфеноксиуксусной кислоты, нейтрофилы, микробицидность, оксидантный метаболизм, поглотительная активность.

FUNCTIONAL STATUS OF NEUTROPHILS AT 2,4-DICHLOROPHOXYACETIC ACID AMINE SALT INTOXICATION Z.A. Akhmetchenko¹, N.A. Mufazalova², L.F. Mufazalova², A.D. Remezova², A.Ya. Mukhametzyanova². *1Bashkir State University, Ufa, Russia, 2Bashkir State Medical University, Ufa, Russia.* **Aim.** To study the influence of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid amine salt subacute intoxication on the functional status of neutrophils. **Methods.** 2,4-dichlorophenoxyacetic acid amine salt (42 mg/kg) was administered intragastrically during 28 days. The number of leukocytes, neutrophils and lymphocytes in peripheral blood, intensity of oxygen-dependent metabolism (spontaneous and induced tetrazolium test), absorbency, microbicidal activity of neutrophils in conditions of oxygen-dependent microbicidal factors functioning and sodium azide mediated blockade, the level of myeloperoxidase and cation proteins in neutrophils were registered at days 7th and 14th after the toxicant administration discontinuation. **Results.** Subacute 2,4-dichlorophenoxyacetic acid amine salt intoxication resulted in leucopenia due to neutropenia, accompanied by inhibition of oxygen-dependent neutrophils killing as the result of peroxidase-independent microbicidal mechanisms suppression (reduced synthesis of oxygen active forms). A reduced activity of oxygen-independent killing mechanisms correlating with a decrease of cation proteins levels was also registered. On the 14 day, leucopenia was replaced by leukocytosis due to elevated numbers of neutrophils and lymphocytes in the peripheral blood. At the same time, the activity of both oxidative peroxidase-dependent and oxygen-independent microbicidal mechanisms in neutrophils continued to decrease, accompanied by reduction of myeloperoxidase activity, neutrophil absorbency and cation proteins levels. **Conclusion.** Subacute intoxication with 2,4-dichlorophenoxyacetic acid amine salt led to quantitative and functional disorders in neutrophils that persisted by the 14 day of follow-up, indicating a need for further study of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid amine salt immunotoxic action to find the possible opportunities for its pharmacological correction. **Keywords:** 2,4-dichlorophenoxyacetic acid amine salt, neutrophils, microbicide activity, oxidative metabolism, absorptive activity.

Загрязнение окружающей среды экотоксикантами остаётся важной экологической проблемой [7]. Около 34 производных 2,4-дихлорфеноксиуксусной кислоты (2,4Д) разрешены к применению на территории РФ в качестве гербицида, в том числе 8 из них — содержащие её аминную соль (2,4ДА): «Луварам», «Октиген», «Дикокур Ф», «Дикамин-Д», «Аминопелик», «Диален супер», «Дуплет», «Трезор

гранд» [8]. Ежегодное производство гербицидов только этой группы составляет более 2 млн тонн [4, 10, 13]. В 2011 г. этот список пополнили гербицидами «Диамакс», «Микодин», «Дикокур Топ», «Метис», «Анкор-85» и др. [9]. Столь широкое применение производных 2,4Д обусловлено их эффективностью и невысокой стоимостью [6, 7, 12]. При этом гербицид 2,4ДА токсичен как на этапе производства, так и при применении. Проникая в организм человека через неповреждённые кожные покровы,

Адрес для переписки: lya-mufazalova@ya.ru

дыхательные пути, пищеварительный тракт, он оказывает плейотропное повреждающее действие [4, 5, 7, 8, 12–14]. Несмотря на многолетнее изучение негативного воздействия 2,4-ДА на организм человека, остаётся открытым вопрос повреждения базовой составляющей первой линии защиты организма – нейтрофилов [1, 3, 5].

В связи с этим целью исследований было изучение повреждающего действия 2,4-ДА на функциональное состояние нейтрофилов.

Протоколы экспериментов и условия содержания животных были составлены в соответствии с «Международными рекомендациями по проведению медико-биологических исследований с использованием животных» (1985) и приказа МЗ РФ №267 от 19.06.2003 «Об утверждении правил лабораторной практики».

Эксперименты выполнены на 30 белых неинbredных половозрелых крысах с массой тела 200–220 г. Животные были разделены на две группы (по 15 животных в группе): контроль и 2,4-ДА. Гербицид 2,4-ДА вводили внутривентрикулярно в течение 28 дней в дозе 42 мг/кг, что соответствует суммарной полувзрослой дозе 1200 мг/кг [8]. Определяли количество лейкоцитов, нейтрофилов и лимфоцитов в периферической крови, интенсивность кислородозависимого метаболизма (спонтанный и индуцированный тест восстановления нитросинего тетразолия), поглотительную и антимикробную активность полиморфноядерных лейкоцитов (ПМЯЛ) в условиях функционирования и блокады (азидом натрия) кислородозависимых факторов микробицидности в отношении грибов *Candida albicans*, индекс инактивации (ИИ), активность миелопероксидазы и содержание катионных белков [3, 11]. Активность миелопероксидазы и количество катионных белков оценивали по интенсивности окраски, пользуясь 5-балльной шкалой по методу L.S. Karlow, вычисляли процент активных клеток в мазке и средний цитохимический коэффициент (СЦК):

$$\text{СЦК} = (1a + 2b + 3c + 4d) / 100,$$

где 1–4 – интенсивность окраски, а, в, с, d – количество ПМЯЛ с соответствующей интенсивностью окраски [11].

Результаты регистрировали на 7-е и 14-е сутки от окончания введения токсиканта.

Статистическую обработку проводили с использованием методов вариационной статистики [2], пакета программ Statistica 8.0. Нормальность распределения данных проверяли с помощью критерия Шапиро–Уилка. При нормальности распределения признака оценку значимости различий проводили с использованием t-критерия Стьюдента, в противном случае вычисляли медиану и межквартильный интервал. Дисперсионный анализ проводили с использованием H-критерия Краскела–Уоллиса, для множественных сравнений использован Q-критерий Дана. Критический уровень значимости p для статистических критериев принимали равным 0,05. Данные представлены в процентах по отношению к контролю.

На 7-е сутки от окончания введения 2,4-ДА в пе-

риферической крови зарегистрирована лейкопения (77,63%, p=0,0298), обусловленная преимущественно уменьшением числа нейтрофилов (до 57,10%, p=0,0001). Это сопровождалось угнетением оксидантного цитолиза ПМЯЛ (ИИ составил 84,09%, p=0,0033) в результате подавления пероксидазозависимых факторов микробицидности (рис. 1), о чём свидетельствовало снижение образования активных форм кислорода в ПМЯЛ (индуцированный тест восстановления нитросинего тетразолия) до 70,59% (p=0,0303).

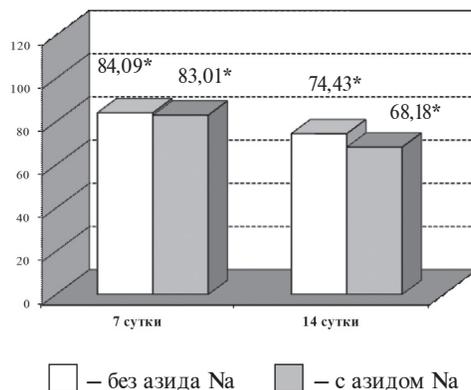


Рис. 1. Влияние гербицида, содержащего аминную соль 2,4-дихлорфеноксиуксусной кислоты, на индекс инактивации полиморфноядерных лейкоцитов (7-е и 14-е сутки наблюдения); *статистическая значимость отличий от контроля (p < 0,05).

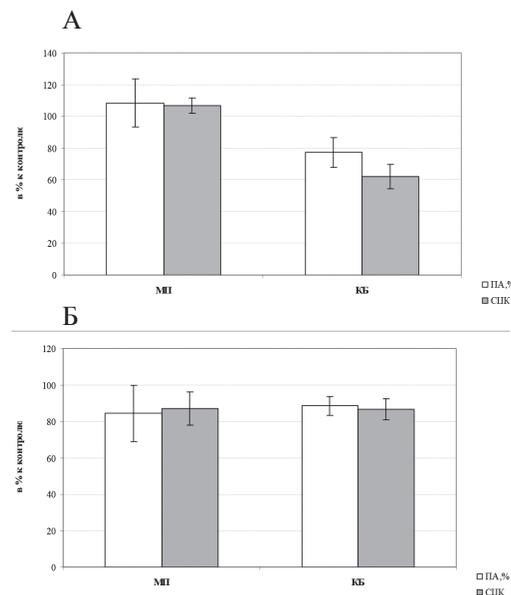


Рис. 2. Влияние гербицида, содержащего аминную соль 2,4-дихлорфеноксиуксусной кислоты, на количество миелопероксидазы и катионных белков в полиморфноядерных лейкоцитах с помощью оценки процентных активных клеток в мазке (ПА) и среднего цитохимического коэффициента (СЦК); А – 7-е сутки наблюдения, Б – 14-е сутки наблюдения; МП – миелопероксидаза; КБ – катионные белки.

При цитохимическом исследовании не зарегистрировано изменения активности миелопероксидазы в ПМЯЛ (рис. 2а). Подавление неоксидантных механизмов фунгицидности нейтрофилов коррелировало с уменьшением уровня катионных белков в ПМЯЛ (см. рис. 1, 2а).

К 14-м суткам лейкопения сменилась лейкоцитозом (до 123,07%, $p=0,0119$) за счёт равномерного увеличения числа нейтрофилов и лимфоцитов. Это сопровождалось, однако, дальнейшим падением их функциональной активности. Так, происходило снижение фунгицидности в условиях как функционирования, так и блокады кислородозависимых механизмов цитолиза (см. рис. 1), что цитохимически подтверждалось снижением активности миелопероксидазы и уровня катионных белков в ПМЯЛ (рис. 2б). Это сочеталось со снижением поглощательной способности нейтрофильных гранулоцитов.

ВЫВОДЫ

1. Полученные данные свидетельствуют о том, что подострая интоксикация гербицидом, содержащим аминную соль 2,4-дихлорфеноксисукусной кислоты, приводит к глубоким нарушениям функционирования нейтрофилов, которым принадлежит ведущая роль в механизмах неспецифической резистентности: снижается активность пероксидазозависимых и пероксидазонезависимых оксидантных факторов микробицидности, кислородонезависимых механизмов цитолиза, поглощательная способность клеток.

2. Указанные нарушения не устранялись к 14-м суткам наблюдения, что свидетельствует о необходимости дальнейшего изучения иммунопережающего действия данного гербицида с целью изыскания возможных путей фармакологической коррекции.

ЛИТЕРАТУРА

1. Волчегорский И.А., Долгушин И.И., Колесников О.Л. и др. Экспериментальное моделирование и лабораторная оценка адаптивных реакций организма. — Челябинск:

Изд-во Челябинского государственного педагогического университета, 2000. — 167 с.

2. Гареев Е.М. Основы математико-статистической обработки медико-биологической информации. — Уфа: Башгосмедуниверситет Розддрава, 2009. — 346 с.

3. Долгушин И.И., Андреева Ю.С., Савочкина А.Ю. Нейтрофильные ловушки и методы оценки функционального статуса нейтрофилов. — М.: Изд-во РАМН, 2009. — 208 с.

4. Забродский П.Ф., Мандыч В.Г. Иммунотоксикология ксенобиотиков. — Саратов: Изд-во СВИБХБ, 2007. — 420 с.

5. Камилов Ф.Х. Патохимия токсического действия хлорорганических и ароматических соединений // Мед. вестн. Башкортостана. — 2007. — Т. 2, №6. — С. 76–80.

6. Комарова Н.В., Карцова А.А. Пестициды группы хлорфеноксикарбоновых кислот. Анализ в водных объектах методом капиллярного электрофореза // Аналит. хим. — 2004. — <http://www.novedu.ru/2000/pitvod.htm#pes> (дата обращения: 01.08.13).

7. Лебедева Н., Жамсаранова Д. Использование пептидных биорегуляторов при отравлении гербицидом 2,4-дихлорфеноксисукусной кислоты // Гигиена и санитария. — 2004. — №4. — С. 68–70.

8. Мартыненко В.И., Прамоненков В.К., Кукаленко С.С. и др. Пестициды (справочник). — М.: Агропромиздат, 1992. — С. 209–212.

9. Справочник пестицидов и агрохимикатов, разрешённых к применению на территории Российской Федерации в 2012 году // Защита и карантин растений: прил. к ж. — 2012. — №6. — 850 с.

10. Хизбуллин Ф.Ф. Диоксины в жизненном цикле хлорорганических химических продуктов. — Уфа: Реактив, 2005. — 180 с.

11. Ягода А.В., Локтев Н.А. Клиническая цитохимия. — Ставрополь: СтГМА, 2005. — 485 с.

12. Troudi A., Soudani N., Mahjoubi S.A. et al. 2,4-Dichlorophenoxyacetic acid effects on nephrotoxicity in rats during late pregnancy and early postnatal periods // Ecotoxicol. Environ. Saf. — 2011. — Vol. 74, N 8. — P. 2316–2323.

13. Schreinemachers D.M. Perturbation of lipids and glucose metabolism associated with previous 2,4-D exposure: a cross-sectional study of NHANES III data, 1988-1994 // Environm. Health. — 2010. — Vol. 9. — P. 11.

14. Soloneski S., González N.V., Reigosa M.A. et al. Herbicide 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D)-induced cytogenetic damage in human lymphocytes *in vitro* in presence of erythrocytes // Cell Biol. Int. — 2007. — Vol. 31. — P. 1316–1322.

УДК 612.084: 613.2: 615.9: 615.099.08: 616.36-002.4-003.826

НО02

ЭФФЕКТИВНОСТЬ ТАКТИВИНА И ТОКОФЕРОЛА ДЛЯ КОРРЕКЦИИ ГЕПАТОТОКСИЧЕСКОГО ДЕЙСТВИЯ АМИННОЙ СОЛИ 2,4-ДИХЛОРФЕНОКСИУКСУСНОЙ КИСЛОТЫ

Зайтуна Алексеевна Ахметченко¹, Наталья Альбертовна Муфазалова²,
Ляйсан Фагимовна Муфазалова^{2*}, Анна Дмитриевна Ремезова², Альбина Яхиевна Мухаметзянова²

¹Башкирский государственный университет, г. Уфа,
²Башкирский государственный медицинский университет, г. Уфа

Реферат

Цель. Изучить эффективность индивидуального и сочетанного применения тимуса экстракта (тактивина) и витамина Е (токоферола) для коррекции гепатотоксических эффектов аминной соли 2,4-дихлорфеноксисукусной кислоты.

Адрес для переписки: lya-mufazalova@ya.ru