

ВЛИЯНИЕ ДИХЛОРЭТАНА НА МИКРОБИЦИДНУЮ АКТИВНОСТЬ НЕЙТРОФИЛОВ И МОНОНУКЛЕАРНЫХ ФАГОЦИТОВ

Ирина Асхатовна Меньшикова*, Наталья Альбертовна Муфазалова,
Феликс Хусаинович Камилев, Ляйсан Фагимовна Муфазалова

Бакирский государственный медицинский университет, г. Уфа, Россия

Поступила 31.01.2017; принята в печать 14.03.2017.

Реферат

DOI: 10.17750/KMJ2017-415

Цель. Изучить повреждающее воздействие дихлорэтана на функциональное состояние нейтрофилов и перитонеальных макрофагов.

Методы. Дихлорэтан вводили животным внутрижелудочно ежедневно в оливковом масле в дозе 0,84 мг/кг массы тела в течение 60 дней, что в суммарной дозе составило 0,1 LD₅₀. Определяли количество лейкоцитов, нейтрофилов и лимфоцитов в периферической крови, интенсивность кислородзависимого метаболизма (индуцированный тест с нитросиним тетразолием), антимикробную активность в условиях функционирования и блокады (азидом натрия) кислородзависимых факторов микробицидности, содержание миелопероксидазы и катионных белков в нейтрофилах и перитонеальных макрофагах. Результаты регистрировали на следующий день после окончания введения токсиканта. Фунгицидную активность определяли по числу колониеобразующих единиц *C. albicans*, выросших через 3 сут на среде посева.

Результаты. Интоксикация дихлорэтаном в течение 60 дней приводит к формированию лейкопении преимущественно за счёт уменьшения числа нейтрофилов при снижении и количества лимфоцитов. Это сопровождается угнетением кислородзависимого киллинга нейтрофилов в результате подавления пероксидазонезависимых механизмов микробицидности (уменьшается образование активных форм кислорода). Кроме того, происходит снижение активности кислороднезависимых механизмов киллинга, что коррелирует с уменьшением в них уровня катионных белков. Выявлено также подавление оксидантных и неоксидантных механизмов микробицидности перитонеальных макрофагов. Это сопровождается снижением интенсивности кислородзависимого метаболизма, активности миелопероксидазы и уровня катионных белков в данных клетках.

Вывод. Интоксикация дихлорэтаном в течение 60 дней в суммарной дозе 0,1 LD₅₀ оказывает глубокое повреждающее воздействие на клетки фагоцитарного звена неспецифической резистентности: происходят формирование лейкопении, угнетение оксидантного метаболизма и микробицидной активности нейтрофилов и мононуклеарных фагоцитов.

Ключевые слова: дихлорэтан, полиморфноядерные лейкоциты, перитонеальные макрофаги, микробицидная активность.

IMPACT OF DICHLOROETHANE ON THE MICROBICIDAL ACTIVITY OF NEUTROPHILS AND MONONUCLEAR PHAGOCYTES

I.A. Men'shikova, N.A. Mufazalova, F.Kh. Kamilev, L.F. Mufazalova

Bashkir State Medical University, Ufa, Russia

Aim. To study the damaging effect of dichloroethane on the functional state of neutrophils and peritoneal macrophages.

Methods. Dichloroethane was administered to animals intragastrically daily in olive oil at a dose of 0.84 mg/kg of body weight for 60 days so that the total dose was 0.1 of 50% lethal dose. The number of leukocytes, neutrophils and lymphocytes in peripheral blood, intensity of oxygen-dependant metabolism (induced test with nitro blue tetrazolium), antimicrobial activity in the conditions of functioning and blockade (by sodium azide), oxygen-dependant factors of microbicidity, content of myeloperoxidase and cationic proteins in neutrophils and peritoneal macrophages were measured. The results were recorded the next day after introduction of the toxicant. Fungicidal activity was measured by the number of colony-forming units of *C. albicans*, growing on day 3 at culture medium.

Results. Intoxication with dichloroethane for 60 days leads to the formation of leukopenia, mainly due to the decreased number of neutrophils while reducing the number of lymphocytes. This is accompanied by inhibition of oxygen-dependant killing of neutrophils as a result of suppression of peroxidase-dependant mechanisms of microbicidity (the formation of oxygen active forms decreases). Besides, decrease of activity of oxygen-independant mechanisms of killing develops, which correlates with a reduction of cationic proteins level. Suppression of oxidative and non-oxidative mechanisms of microbicidity of peritoneal macrophages. This is accompanied by a decrease of oxygen-dependant metabolism intensity, myeloperoxidase activity and cationic protein level in these cells.

Conclusion. Intoxication with dichloroethane for 60 days in a total dose of 0.1 of 50% lethal dose has a profound damaging effect on the cells of phagocytic link of nonspecific resistance: formation of leukopenia, suppression of oxidative metabolism and microbicidal activity of neutrophils and mononuclear phagocytes occur.

Keywords: dichloroethane, polymorphonuclear leukocytes, peritoneal macrophages, microbicidal activity.

Одна из актуальных медико-биологических проблем — изучение повреждающего действия экотоксикантов на организм человека. К числу этих соединений относится и

дихлорэтан (ДХЭ), широко применяемый в производстве хлорвинила и полихлорвиниловой продукции в качестве растворителя отравляющих веществ, для обезжиривания и чистки одежды [1–3].

Острые отравления ДХЭ при авариях

на химических производствах характеризуются высокой смертностью [1]. При этом попадание ДХЭ в почву, воду и воздух, а также длительный контакт в процессе работы на производстве могут приводить к хронической интоксикации ДХЭ [1–3]. Проникая в организм человека через неповрежденные кожные покровы, дыхательные пути, пищеварительный тракт, ДХЭ оказывает плейотропное повреждающее действие [1, 2, 4, 5].

Несмотря на многолетнее изучение негативного воздействия ДХЭ на иммунную систему, остается открытым вопрос повреждения токсикантом нейтрофилов и мононуклеарных фагоцитов, которым принадлежит ведущая роль в первой линии защиты организма [1, 6–9]. Поскольку нейтрофилы и мононуклеарные фагоциты исключительно чувствительны к минимальным изменениям гомеостаза, фагоцитарные реакции служат индикатором состояния иммунной системы в целом [8, 10–12].

В связи с этим целью исследований стало изучение влияния ДХЭ на функциональную активность полиморфноядерных лейкоцитов (ПМЯЛ) и перитонеальных макрофагов (ПМФ).

Проведено экспериментальное исследование. Эксперименты выполнены на 30 белых неинбредных крысах с массой тела 180–200 г. Животных содержали 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 Российской Федерации (РФ; ГОСТ 3 51000.3-96 и 51000.4-96) и приказа Министерства здравоохранения РФ №267 от 19.06.2003 «Об утверждении правил лабораторной практики» (GLP).

Животные были разделены на две группы (по 15 животных в группе): первая группа — контроль (интактные животные), вторая группа — животные, получавшие ДХЭ. ДХЭ вводили животным внутрижелудочно ежедневно с помощью специального зонда в оливковом масле в дозе 0,84 мг/кг массы тела в течение 60 дней, что в суммарной дозе составило 0,1 LD₅₀ [13]. Контрольная группа животных получала внутрижелу-

дочно равный объем оливкового масла.

Определяли количество лейкоцитов, нейтрофилов и лимфоцитов в периферической крови, интенсивность кислородзависимого метаболизма (индуцированный тест с нитросиним тетразолием — НСТ-тест), антимикробную активность ПМЯЛ и ПМФ в условиях функционирования и блокады (азидом натрия) кислородзависимых факторов микробицидности, активность миелопероксидазы и содержание катионных белков в этих клетках [10, 14].

Фунгицидную активность определяли по числу колониеобразующих единиц *C. albicans*, штамм 2, выросших через 3 сут на среде посева. Контролем служила степень посева гриба из среды, не содержащей фагоцитирующих клеток (ПМЯЛ, ПМФ). Инактивирующую активность фагоцитов выражали в процентах микробных клеток, инаktivированных фагоцитами (индекс инаktivации) [15].

Активность миелопероксидазы и катионных белков оценивали по интенсивности окраски, пользуясь 5-балльной шкалой по методу L.S. Kaplow. 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 [14].

Результаты регистрировали на следующий день после окончания введения ДХЭ.

Статистическую обработку проводили с использованием методов вариационной статистики [16], пакета программ Statistica 8.0. Нормальность распределения данных проверяли с помощью критерия Шапиро–Уилка. Вычисляли 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 по отношению к контролю (неинбредные животные).

Интоксикация ДХЭ приводила к лейкопении (снижение до 71,93%, $p=0,0017$), в структуре которой наблюдали преимущественное снижение числа нейтрофилов (до 58,04%, $p=0,0017$) при уменьшении также

Таблица 1

**Влияние дихлорэтана на содержание
миелопероксидазы и катионных белков в
перитонеальных макрофагах
(% по отношению к контролю)**

Показатель	Доля активных клеток, %	Средний ци- тохимический коэффициент
Миелоперок- сидаза	77,55 [68,37–84,69] p=0,0034	62,07 [57,47–74,71] p=0,00003
Катионные белки	69,89 [65,59–78,49] p=0,0082	72,67 [59,30–75,58] p=0,0450

Примечание: p — статистическая значимость отличий от контроля.

НСТ-тест), в то время как активность миелопероксидазы снижалась, не достигая статистической значимости: доля активных клеток в мазке составила 82,35% (p=0,3611), а СЦК — 81,91% (p=0,0821).

В условиях блокады кислородзависимых факторов микробицидности ПМЯЛ также зафиксировано увеличение числа КОЕ (до 158,21%, p=0,0003), в результате индекс инактивации снизился до 66,49%. Это сопровождалось значимым снижением уровня катионных белков в ПМЯЛ (доля активных клеток в мазке составила 59,18%, p≤0,00001, а СЦК — 71,38%, p=0,0015).

Полученные данные свидетельствуют об угнетении ДХЭ как оксидантных, так и неоксидантных механизмов фунгицидности ПМЯЛ. При этом в структуре кислородзависимого киллинга происходит подавление преимущественно пероксидазозависимых факторов микробицидности.

Исследование микробицидной активности ПМФ также выявило увеличение числа КОЕ в условиях как функционирования (до 134,68%, p=0,0034), так и блокады (до 182,22%, p≤0,00001) кислородзависимых механизмов киллинга. В результате индекс инактивации составил 81,78% и 72,59% соответственно. Это сопровождалось снижением интенсивности образования активных форм кислорода (индуцированный НСТ-тест): процент активных клеток составил 77,33%, p=0,0098, а индекс активации — 73,33%, p=0,0015.

При цитохимическом исследовании установлено также снижение активности миелопероксидазы и уровня катионных белков в ПМФ (табл. 1). Это свидетельствует об угнетении токсикантом как оксидантных, так и неоксидантных механизмов микробицидности мононуклеарных фагоцитов.

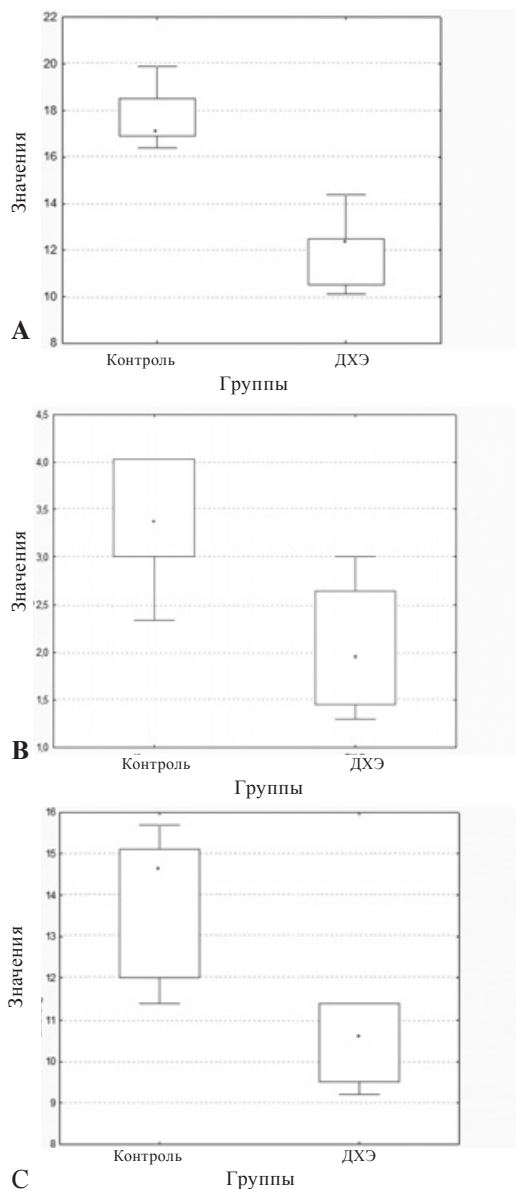


Рис. 1. Влияние дихлорэтана (ДХЭ) на содержание лейкоцитов (А), нейтрофилов (В) и лимфоцитов (С) у экспериментальных животных

и числа лимфоцитов (до 72,60%, p=0,0026; рис. 1, А, В, С).

При изучении оксидантного киллинга ПМЯЛ выявлено статистически значимое увеличение числа колониеобразующих единиц (КОЕ) до 141,91% (p=0,0009), что свидетельствует о подавлении фунгицидной способности нейтрофилов. Соответственно индекс инактивации составил 74,55%.

Также зарегистрировано снижение интенсивности кислородзависимого метаболизма нейтрофилов (индуцированный

ВЫВОДЫ

1. Подострая интоксикация дихлорэтаном в суммарной дозе 0,1 LD₅₀ оказывает глубокое повреждающее воздействие на клетки фагоцитарного звена неспецифической резистентности: наблюдаются формирование лейкопении, угнетение оксидантного метаболизма и микробицидной активности нейтрофилов и мононуклеарных фагоцитов.

2. Полученные данные свидетельствуют о необходимости изыскания возможных путей коррекции выявленных нарушений, что обеспечит восстановление функциональной, в том числе противоинфекционной, активности фагоцитов при интоксикации дихлорэтаном.

ЛИТЕРАТУРА

1. Забродский П.Ф., Мандыч В.Г. *Иммунотоксикология ксенобиотиков*. Саратов: СВИБХБ. 2007; 420 с. [Zabrodskiy P.F., Mandych V.G. *Immunotoksikologiya ksenobiotikov*. (Immunotoxicology of xenobiotics.) Saratov: SVIBKhB. 2007; 420 p. (In Russ.)]
2. Mayer-Blackwell K., Fincker M., Molenda O. et al. 1,2-Dichloroethane exposure alters the population structure, metabolism, and kinetics of a trichloroethene-dechlorinating dehalococcoides mccartyi consortium. *Environ. Sci. Technol.* 2016; 50 (22): 12 187–12 196. DOI: 10.1021/acs.est.6b02957.
3. McDermott C., Heffron J.A. Toxicity of industrially relevant chlorinated organic solvents *in vitro* catherine. *Intern. J. Toxicol.* 2013; 32 (2): 136–145. DOI: 10.1177/1091581813482006.
4. Sun Q., Wang G., Gao L. et al. Roles of CYP2e1 in 1,2-dichloroethane-induced liver damage in mice. *Environ. Toxicol.* 2016; 31 (11): 1430–1438. DOI: 10.1002/tox.22148.
5. Wang G., Qi Y., Gao L., Li G. Effects of subacute exposure to 1,2-dichloroethane on mouse behavior and the related mechanisms. *Human Experim. Toxicol.* 2013; 9: 983–991. DOI: 10.1177/0960327112470270.
6. Забродский П.Ф., Громов М.С., Масляков В.В. Снижение иммунных реакций и изменение цитокинового профиля при подострой интоксикации 1,2-дихлорэтаном. *Токсикол. вестн.* 2014; (1): 18–21. [Zabrodskiy P.F., Gromov M.S., Maslyakov V.V. The decrease of immune reactions and changes of cytokine profile in subacute intoxication with 1,2-dichloroethane. *Toksikologicheskii vestnik*. 2014; (1): 18–21. (In Russ.)]
7. 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. *Соврем. пробл. науки и образования*. 2015; (5). <https://www.science-education.ru/ru/article/view?id=21763> (дата обращения: 12.03.2017). [Srubililn D.V., Enikeev D.A., Myshkin V.A. Changes of the cytokine profile and activity of lipid peroxidation processes in blood of rats in mechanisms of formation of the inflammatory answer at chronic intoxication the dichloroethane. *Sovremennye problemy nauki i*

obrazovaniya. 2015; (5). <https://www.science-education.ru/ru/article/view?id=21763> (access date: 12.03.2017). (In Russ.)]

8. Волчегорский И.А., Долгушин И.И., Колесников О.Л. и др. *Экспериментальное моделирование и лабораторная оценка адаптивных реакций организма*. Челябинск: ЧелГПУ. 2000; 167 с. [Volchegorskiy I.A., Dolgushin I.I., Kolesnikov O.L. et al. *Eksperimental'noe modelirovanie i laboratornaya otsenka adaptivnykh reaksiiy organizma*. (Experimental modelling and laboratory evaluation of adaptive reactions of the organism.) Chelyabinsk: ChelGPU. 2000; 167 p. (In Russ.)]

9. Lone M.I., Nazam N., Hussain A., Singh S.K. Genotoxicity and immunotoxic effects of 1,2-dichloroethane in Wistar rats. *J. Environ. Sci. Health C. Environ. Carcinog. Ecotoxicol. Rev.* 2016; 34 (3): 169–186. DOI: 10.1080/10590501.2016.1193924.

10. Долгушин И.И., Андреева Ю.С., Савочкина А.Ю. *Нейтрофильные ловушки и методы оценки функционального статуса нейтрофилов*. М.: РАМН. 2009; 208 с. [Dolgushin I.I., Andreeva Yu.S., Savochkina A.Yu. *Neytrofil'nye lovushki i metody otsenki funktsional'nogo statusa neytrofilov*. (Neutrophil traps and methods of evaluation of the functional status of neutrophils.) Moscow: RAMN. 2009; 208 p. (In Russ.)]

11. Маянский А.Н. НАДФН-оксидаза нейтрофилов: активация и регуляция. *Цитокины и воспаление*. 2007; 6 (3): 3–13. [Mayanskiy A.N. NADPH-oxidase of neutrophils: activation and regulation. *Tsitokiny i vospalenie*. 2007; 6 (3): 3–13. (In Russ.)]

12. Степовая Е.А., Петина Г.В., Жаворонок Т.В. Роль тиолдисульфидной системы в механизмах изменений функциональных свойств нейтрофилов при окислительном стрессе. *Бюлл. эксперим. биол. и мед.* 2010; 150 (8): 161–165. [Stepovaya E.A., Petina G.V., Zhavoronok T.V. Role of thiol-disulfide system in mechanisms of functional changes in neutrophils under conditions of oxidative stress. *Byulleten' eksperimental'noy biologii i meditsiny*. 2010; 150 (8): 161–165. (In Russ.)]

13. *Токсикологическая химия. Метаболизм и анализ токсикантов*. Под ред. Н.И. Калетиной. М.: ГЭОТАР-Медиа. 2008; 1016 с. [Toksikologicheskaya khimiya. *Metabolizm i analiz toksikantov*. (Toxicologic chemistry. Metabolism and analysis of toxicants.) Ed. by N.I. Kaletinaya. Moscow: GEOTAR-Media. 2008; 1016 p. (In Russ.)]

14. Ягода А.В. *Клиническая цитохимия*. Под ред. А.В. Ягоды, Н.А. Локтева. Ставрополь. 2005; 485 с. [Yagoda A.V. *Klinicheskaya tsitokhimiya*. (Clinical cytochemistry.) Ed. by A.V. Yagoda, N.A. Loktev. Stavropol'. 2005; 485 p. (In Russ.)]

15. Сбойчаков В.В. *Медицинская микология. Посobie для врачей*. М.: ГЭОТАР-Медиа. 2008; 218 с. [Sboychakov V.B. *Meditsinskaya mikologiya. Posobie dlya vrachev*. (Medical mycetology. Guide for doctors.) Moscow: GEOTAR-Media. 2008; 218 p. (In Russ.)]

16. Гареев Е.М. *Основы математико-статистической обработки медико-биологической информации*. Уфа: Башгосмедуниверситет Росздрава. 2009; 346 с. [Gareev E.M. *Osnovy matematiko-statisticheskoy obrabotki mediko-biologicheskoy informatsii*. (Basics of mathematical statistical processing of medical and biological information.) Ufa: Bashgosmeduniversitet Roszdrava. 2009; 346 p. (In Russ.)]