

УДК 615.015.37:616.155.394:[615.9:547.854.4]-092.9

ВЛИЯНИЕ ОКСИМЕТИЛУРАЦИЛА НА ФУНКЦИОНАЛЬНОЕ СОСТОЯНИЕ НЕЙТРОФИЛОВ ПРИ ИНТОКСИКАЦИИ ТЕТРАХЛОРМЕТАНОМ

Муфазалова Л.Ф., Муфазалова Н.А.

ГБОУ ВПО «Башкирский государственный медицинский университет»,
Уфа, e-mail: lya-mufazalova@ya.ru

Изучена эффективность применения оксиметилурацила для коррекции повреждающего воздействия тетрахлорметана на функциональное состояние нейтрофилов. Тетрахлорметан вводили внутривенно (1,25 мл/кг 50% раствора в оливковом масле) на протяжении 4 суток, оксиметилурацил (50 мг/кг) в течение 7 дней после окончания введения токсиканта. Определяли количество лейкоцитов, нейтрофилов и лимфоцитов в периферической крови, интенсивность кислородзависимого метаболизма (НСТ-тест), поглотительную и антимикробную активность, содержание миелопероксидазы и катионных белков в нейтрофилах. Результаты регистрировали на 7, 14 и 28 сутки от окончания введения токсиканта. В условиях интоксикации тетрахлорметаном оксиметилурацил устраняет депрессию токсикантом оксидантных и неоксидантных факторов микробицидности, повышает интенсивность кислородзависимого метаболизма и восстанавливает поглотительную способность нейтрофилов. Оксиметилурацил в условиях интоксикации тетрахлорметаном оказывает значимое корригирующее воздействие на функциональное состояние нейтрофилов.

Ключевые слова: тетрахлорметан, нейтрофилы, микробицидность, оксиметилурацил

EFFECTS OF OXYMETHYLURACIL ON THE FUNCTIONAL STATE OF NEUTROPHILS IN TETRACHLORMETHANE INTOXICATION

Mufazalova L.F., Mufazalova N.A.

Bashkirian State Medical University, Ufa, e-mail: lya-mufazalova@ya.ru

To perform studies on oxymethyluracil used for the correction of hazardous effects of tetrachlormethane (TCM) on the functional state of neutrophils. Tetrachlormethane (1,25 ml/kg of 50% olive oil solution) was injected for 4 days. Oxymethyluracil (50 mg/kg) was injected for 7 days after the discontinuation of toxicant administration. The number of leukocytes, neutrophils and lymphocytes in peripheral blood, intensity of oxygen-dependent metabolism (NST-test), absorptive and microbicide activity, the content of mieloperoxidase and cation proteins in neutrophils were identified. The results were registered by 7, 14 and 28 days of the discontinuation of toxicant administration. Under conditions of tetrachlormethane intoxication, the use of oxymethyluracil significantly removes TCM affects on neutrophils. It restores neutrophil oxygen-dependent and non-oxygen-dependent microbicide activity, increases the intensity of oxygen-dependent metabolism and neutrophil absorption capacity. The use of oxymethyluracil significantly corrects tetrachlormethane affects on the functional state of neutrophils.

Keywords: tetrachlormethane, neutrophils, microbicide activity, oxymethyluracil

Тетрахлорметан (ТХМ) широко применяется в промышленности как растворитель масел, жиров, каучука, чистки и обезжиривания одежды [11]. Хорошо известно гепатотоксическое действие ТХМ [7, 8, 11], однако установлено, что высокая смертность при острых интоксикациях ТХМ тесно связана и с его иммунотоксическим действием [3, 4]. Попадая в организм, ТХМ оказывает плейотропное повреждающее действие, основным механизмом которого является активация процессов перекисного окисления липидов (ПОЛ) [11]. Это особенно важно для нейтрофилов, поскольку продукция активных форм кислорода является молекулярной основой реализации ими эффекторной функции [2]. Следовательно, оксидативный стресс, вызывая нарушение редокс-статуса нейтрофилов, может существенно нарушить антимикробный потенциал этих клеток [12, 14].

Цель исследования. Изучение эффективности применения оксиметилурацила

(ОМУ) – иммуномодулятора с антиоксидантным и гепатопротекторным действием [5, 6, 8, 9, 10], для коррекции повреждающего воздействия ТХМ на функциональное состояние нейтрофилов.

Материалы и методы исследования

Протоколы экспериментов и содержание животных были составлены в соответствии с «Международными рекомендациями по проведению микробиологических исследований с использованием животных» (1985) и приказа МЗРФ №267 от 19.06.2003 «Об утверждении правил лабораторной практики». Эксперименты выполнены на 145 белых неинбредных крысах массой 200–220 г. Животные были разделены на 3 группы (по 15 животных в группе): контроль, ТХМ, ТХМ + ОМУ. ТХМ вводили внутривенно в дозе 1,25 мл/кг 50% раствора в оливковом масле на протяжении 4 суток (в –4, –3, –2 и –1 дни) [13]. ОМУ применяли в виде суспензии на 2% крахмальной слизи в дозе 50 мг/кг в течение 7 дней [9], считая день окончания введения токсиканта нулевым днем.

Определяли количество лейкоцитов, нейтрофилов и лимфоцитов в периферической крови, интенсивность кислородзависимого метаболизма (спонтан-

ный и индуцированный НСТ-тест), поглотительную способность, антимикробную активность полиморфноядерных лейкоцитов (ПМЯЛ) в условиях функционирования и блокады (азидом натрия) кислородзависимых факторов микробицидности в отношении грибов *Candida albicans*, активность миелопероксидазы (МП) и содержание катионных белков (КБ) в нейтрофилах [2, 15]. Активность МП и КБ оценивали по интенсивности окраски, пользуясь 5-балльной шкалой по методу L.S. Karlow, вычисляли процент активных клеток в мазке (ПА) 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 [15].

Результаты регистрировали на 7-е, 14-е и 28-е сутки от окончания введения токсиканта. Статистическую обработку полученных данных проводили с использованием методов вариационной статистики [1], пакета программ Statistica 6.0. Проверку на нормальность распределения фактических данных выполняли с помощью критерия Шапиро-Вилка. При нормальности распределения признака оценку значимости различий проводили с использованием t-критерия Стьюдента, достоверными считали различия при уровне значимости $p < 0,05$. Данные представлены в % к контролю.

Результаты исследования и их обсуждение

В результате проведенных исследований установлено, что воздействие токсиканта приводило к формированию лейкопении все сроки наблюдения, обусловленной на 7 сутки лимфопенией (62,1%, $p < 0,001$), на 14 сутки – равномерным снижением, как нейтрофилов, так и лимфоцитов (до 59,1% ($p < 0,02$) и 65,9% ($p < 0,001$) соответственно), а на 28 сутки наблюдалось преимущественное снижение числа нейтрофилов (60,9%, $p < 0,001$). При этом наблюдалось падение микробицидной способности ПМЯЛ. Двукратное снижение кислородзависимого киллинга ПМЯЛ отмечено на 7 и 14 сутки наблюдения (индекс инактивации (ИИ) составил 59,1% ($p < 0,001$) и 61,3% ($p < 0,001$) соответственно), что цитохимически подтверждалось уменьшением активности МП: число МП-позитивных клеток составило 67,9% ($p < 0,001$) и 72,2% ($p < 0,001$), а СЦК – 67,8% ($p < 0,001$) и 72,8% ($p < 0,001$) (на 7 и 14 сутки соответственно). При этом было отмечено снижение интенсивности кислородзависимого метаболизма ПМЯЛ в условиях индукции (индуцированный НСТ-тест). Полученные данные свидетельствуют об угнетении токсикантом как пероксидазозависимых, так и пероксидазозависимых оксидантных микробицидных систем ПМЯЛ на 7-е и 14-е сутки наблюдения. Следует отметить глубокое угнетение

токсикантом неоксидантных механизмов киллинга: на 7 сутки ИИ снизился более чем в 4 раза (ИИ – 24,8%, $p < 0,001$), что цитохимически подтверждалось снижением уровня КБ в ПМЯЛ (СЦК – 38,8%, $p < 0,001$). На 14 сутки активность неоксидантных микробицидных систем повышалась в 2 раза (по сравнению с 7 сутками), но не восстанавливалась (ИИ – 60,5%, $p < 0,01$), что коррелировало с двукратным (по сравнению с 7 сутками) повышением уровня КБ в нейтрофильных гранулоцитах (СЦК – 73,2%, $p < 0,001$).

К 28 суткам наблюдения как кислородзависимая, так и кислороднезависимая микробицидность ПМЯЛ повышалась, не достигая, однако, уровня интактных животных (ИИ составил 84,5% ($p < 0,02$) и 84,4% ($p < 0,01$) соответственно). Это сопровождалось снижением активности МП (СЦК – 74,3%, $p < 0,01$), интенсивности оксидантного метаболизма (индуцированный НСТ-тест) и количества КБ (СЦК – 72,6%, $p < 0,001$) в ПМЯЛ.

На все сроки наблюдения было отмечено снижение поглотительной способности нейтрофилов (фагоцитарный индекс (ФИ) составил 76,4% ($p < 0,001$), 78,5% ($p < 0,05$) и 86,6% ($p < 0,05$) соответственно).

На 7-е сутки наблюдения применение ОМУ ослабляло выраженность лейкопении за счет увеличения числа лимфоцитов (до 78,9%, $p < 0,05$). Однако ОМУ не устранял падения микробицидной способности ПМЯЛ в условиях как функционирования, так и блокады оксидантных механизмов киллинга (ИИ составил 50,1 и 34,2% соответственно), что сопровождалось снижением активности МП (СЦК – 71,7%) и уровня КБ (СЦК – 54,0%) в ПМЯЛ, что согласуется с данными других авторов о постепенном наступлении эффекта препарата [6].

На 14-е сутки использование ОМУ устраняло индуцированную токсикантом лейкопению за счет равномерного увеличения как нейтрофилов, так и лимфоцитов (до 93,7% ($p < 0,01$) и 90,5% ($p < 0,001$) соответственно). Наблюдалось полное восстановление активности кислородзависимых фунгицидных систем ПМЯЛ (ИИ составил 104,5%, $p < 0,001$). Это сопровождалось повышением до нормы активности МП (процент МП-позитивных клеток составил 92,5% ($p < 0,001$), СЦК – 91,0% ($p < 0,001$)) и активацией оксидантного метаболизма ПМЯЛ (индуцированный НСТ-тест), что свидетельствует о восстановлении под влиянием ОМУ как пероксидазозависимых, так и пероксидазозависимых оксидантных механизмов киллинга нейтрофилов. Также

ОМУ устранял депрессию токсикантом неоксидантных фунгицидных систем ПМЯЛ (ИИ составил 94,4%, $p < 0,001$), что цитохимически подтверждалось повышением до нормы уровня КБ в нейтрофилах: процент КБ-позитивных клеток составил 111,4% ($p < 0,001$), СЦК – 110,3% ($p < 0,001$). Ценно, что применение ОМУ обеспечило снижение до нормы числа ПМЯЛ, участвующих в фагоцитозе (87,7%, $p < 0,001$) с повышением их поглотительной способности (ФИ – 138,1%, $p < 0,01$).

На 28 сутки сохранялась индуцированная ТХМ лейкопения. Вместе с тем ОМУ устранял, как и на 14 сутки, депрессию токсикантом кислородзависимых фунгицидных систем ПМЯЛ (ИИ – 91,7%, $p < 0,05$), что сопровождалось повышением активности МП (процент МП-положительных клеток составил 120,4% ($p < 0,001$), а СЦК – 118,1% ($p < 0,001$)) и восстановлением интенсивности оксидантного метаболизма этих клеток. Наблюдалась активация неоксидантных механизмов микробицидности ПМЯЛ (ИИ – 123,4%, $p < 0,001$), что сочеталось с повышением уровня КБ (СЦК – 94,8%, $p < 0,001$) в нейтрофилах. Также ОМУ восстанавливал поглотительную способность ПМЯЛ (ФИ – 92,5%), что согласуется с данными других авторов [5].

Выводы

Таким образом, оксиметилурацил в условиях интоксикации ТХМ оказывает значимое корректирующее воздействие на функциональное состояние нейтрофильных гранулоцитов: устраняет депрессию токсикантом оксидантных и неоксидантных факторов микробицидности, повышает интенсивность кислородзависимого метаболизма и восстанавливает поглотительную способность нейтрофилов.

Список литературы

1. Гареев Е.М. Основы математико-статистической обработки медико-биологической информации. – Уфа: Изд-во ГОУ ВПО «Башгосмедуниверситет Роздрава», 2009. – 346 с.
2. Долгушин И.И., Андреева Ю.С., Савочкина А.Ю. Нейтрофильные ловушки и методы оценки функционального статуса нейтрофилов. – М.: Изд-во РАМН, 2009. – 208 с.
3. Влияние тетрахлорметана на показатели иммунной системы / П.Ф. Забродский, В.Г. Германчук, В.Ф. Киричук, Н.И. Карпенко // Бюлл. эксперим. биологии и медицины. – 2004. – Т. 137, № 1. – С. 56–58.
4. Забродский П.Ф. Изменение цитокинового профиля и редукция функции субпопуляций лимфоцитов при подостром отравлении тетрахлорметаном / П.Ф. Забродский, В.Ф. Киричук, В.Г. Лим // Бюлл. эксперим. биологии и медицины. – 2009. – Т. 147, № 1. – С. 55–57.
5. Лазарева Д.Н., Алехин Е.К., Плечев В.В. Иммурег. – Уфа, 2004. – 103 с.

6. Лазарева Д.Н. Оксиметилурацил (иммурег) – стимулятор иммунитета / Д.Н. Лазарева, Е.К. Алехин, В.В. Плечев // Медицинский вестник Башкортостана. – 2007. – №6. – С. 70–75.

7. Лемза С.В. Фармакотерапевтическая эффективность комплексного растительного средства «гепагон» при экспериментальном повреждении печени / С.В. Лемза, Т.А. Ажунова, А.Г. Мондодоев // Бюллетень ВСНЦ СО РАМН. – 2010. – №2 (72). – С. 181–184.

8. Мананова С.Ш. Оппозитное влияние 5-оксиметилурацила на митогенный ответ Т-лимфоцитов при стимуляции через Т-клеточный рецептор или через Т-клеточный рецептор и Ко-рецепторную молекулу CD28 / С.Ш. Мананова, И.А. Пашнина, С.В. Сибиряк // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. – 2010. – Т. 150, № 7. – С. 66–69.

9. Мирсаев Т.Р. Гепатопротекторная активность оксиметилурацила: автореф. дис. ... канд. мед. наук. – Уфа, 2002. – 22 с.

10. Мышкин В.А., Бакиров А.Б. Оксиметилурацил (очерки экспериментальной фармакологии). – Уфа: ДАР, 2001. – 218 с.

11. Мышкин В.А., Ибагуллина Р.Б., Бакиров А.Б. Поражения печени химическими веществами. (Функционально-метаболические нарушения, фармакологическая коррекция). – Уфа: Изд-во Гилем, 2007. – 177 с.

12. Плескова С.Н. Модуляция кислородзависимого и кислороднезависимого метаболизма нейтрофильных гранулоцитов квантовыми точками / С.Н. Плескова, Э.Р. Михеева // Бюлл. эксперим. биологии и медицины. – 2011. – Т. 151, № 4. – С. 452–454.

13. Саратиков А.С. Влияние гепатопротекторов, содержащих фосфолипиды, на зависимость от цитохрома Р-450 антитоксическую функцию печени при экспериментальном токсическом гепатите / А.С. Саратиков, А.И. Венгерский // Бюлл. эксперим. биологии и медицины. – 1999. – Т. 127, № 4. – С. 392–394.

14. Степовая Е.А., Роль тиолдисульфидной системы в механизмах изменений функциональных свойств нейтрофилов при окислительном стрессе / Е.А. Степовая, Г.В. Петина, Т.В. Жаворонок // Бюлл. эксперим. биологии и медицины. – 2010. – Т. 150, № 8. – С. 161–165.

15. Ягода А.В. Клиническая цитохимия / под ред. А.В. Ягоды, Н.А. Локтева. – Ставрополь, 2005. – 485 с.

References

1. Gareev E.M. *Osnovy matematiko-statisticheskoy obrabotki mediko-biologicheskoy informacii*. Ufa: Izd-vo GOU VPO «Bashgosmeduniversitet Rozdrava». 2009. 346 p.
2. Dolgushin I.I., Andreeva Ju.S., Savochkina A.Ju. *Nejtrofilnye lovushki i metody otsenki funktsionalnogo statusa nejtrofilov*. M.: Izd-vo RAMN. 2009. 208 p.
3. Zabrodskij P.F. *Vlijanie tetrakhlormetana na pokazateli immunnnoj sistemy* / P.F. Zabrodskij, V.G. Germanchuk, V.F. Kirichuk, N.I. Karpenko // Bjull. jeksperim. biologii i mediciny. 2004. T. 137, no. 1. pp. 56–58.
4. Zabrodskij P.F. *Izmenenie citokinovogo profila i redukcija funkcii subpopuljacij limfocitov pri podostrom otravlenii tetrakhlormetanom* / P.F. Zabrodskij, V.F. Kirichuk, V.G. Lim – Bjull. eksperim. biologii i mediciny. 2009. T. 147, no. 1. pp. 55–57.
5. Lazareva D.N., Alekhin E.K., Plechev V.V. *Immureg*. Ufa, 2004. 103 p.
6. Lazareva D.N. *Oksimetiluracil (immureg) – stimulyator immuniteta* / D.N. Lazareva, E.K. Alekhin, V.V. Plechev – Meditsinskij vestnik Bashkortostana. 2007. no. 6. pp. 70–75.
7. Lemza S.V. *Farmakoterapevticheskaja effektivnost kompleksnogo rastitelnogo sredstva «gepaton» pri eksperimentalnom povrezhdenii pecheni* / S.V. Lemza, T.A. Azhunova, A.G. Mondodoev – Bjulleten VSNTs SO RAMN. 2010. no. 2 (72). pp. 181–184.

8. Mananova S.Sh., Pashnina I.A., Sibirjak S.V. *Oppozitnoe vlijanie 5-oksimetiluratsila na mitogenij otvet T-limfocitov pri stimuljacii cherez T-kletochnyj receptor ili cherez T-kletochnyj receptor i Ko-retseptornuju molekulu CD28* / S. Sh. Mananova, I.A. Pashnina, S.V. Sibirjak – Bžulleten eksperimentalnoj biologii i meditsiny. 2010. T. 150, no. 7. pp. 66–69.
9. Mirsaev T.R. *Gepatoprotekornaja aktivnost oksimetiluratsila*: Avtoref. dis. kand. med. nauk. Ufa, 2002. 22 p.
10. Myshkin V.A., Bakirov A.B. *Oksimetiluratsil (očerki eksperimentalnoj farmakologii)*. Ufa: DAR, 2001. 218 p.
11. Myshkin V.A., Ibatullina R.B., Bakirov A.B. *Porazhenija pečeni khimicheskimi veschestvami*. (Funktsionalno – metabolicheskie narushenija, farmakologicheskaja korrektsija). Ufa: Izd-vo Gilem, 2007. 177 p.
12. Pleskova S.N. *Moduljatsija kislorodzavisimogo i kislorodnezasvisimogo metabolizma nejtrofilnyh granulocitov kvantovymi tochkami* / S.N. Pleskova, E.R. Miheeva – Bžull. eksperim. biologii i mediciny. 2011. T. 151, no. 4. pp. 452–454.
13. Saratikov A.S. *Vlijanie gepatoprotektorov, sodержaschih fosfolipidy, na zavisimuju ot tsitokhroma P-450 antitoksicheskiju funktsiju pečeni pri eksperimentalnom toksicheskom gepatite* / A.S. Saratikov, A.I. Vengerovskij – Bžull. eksperim. biologii i mediciny. 1999. T. 127, no. 4. pp. 392–394.
14. Stepovaja E.A., *Rol tioldisulfidnoj sistemy v mekhanizmakh izmenenij funktsionalnykh svojstv nejtrofilov pri oksislitel'nom stresse* / E.A. Stepovaja, G.V. Petina, T.V. Zhavoronok – Bžull. eksperim. biologii i mediciny. 2010. T. 150, no. 8. pp. 161–165.
15. Yagoda A.V. *Klinicheskaja tsitokhimiya* / Pod red. A.V. Yagody, N.A. Lokteva. Stavropol, 2005. 485 p.

Рецензенты:

Валеева Л.А., д.м.н., профессор, декан фармацевтического факультета, зав. кафедрой фармакологии №2 ГБОУ ВПО «Башкирский государственный медицинский университет» Минздравсоцразвития России, г. Уфа;

Медведев Ю.А., д.м.н., профессор, научный консультант лаборатории препаратов крови НПО «Микроген» отделение «Иммунопрепарат», г. Уфа.

Работа поступила в редакцию 22.02.2012.