

ИЗМЕНЕНИЯ В СОСТОЯНИИ КРОВИ В УСЛОВИЯХ ДЕЙСТВИЯ ОТНОСИТЕЛЬНО ВЫСОКИХ ДОЗ ИОНОЛА

Хисамов Э.Н., Еникеев Д.А., Фаршатова Е.Р., Срубиллин Д.В.,
Галимова Э.Ф., Еникеев О.А., Фаюршин А.З.

ФГБОУ ВО «Башкирский государственный медицинский университет»
Министерства здравоохранения Российской Федерации, Уфа,
e-mail: Hisamov7958@yandex.ru

В работе проводилось исследование влияния антиоксиданта ионола на состояние крови при ее высокой концентрации. Изучались возможные изменения направления его действия на окислительный процесс в связи с повышением его содержания в крови. Для этого было предпринято исследование состояния некоторых параметров красной крови и лейкоцитарной реакции. Действие относительно высокой концентрации ионола на уровне 200 мг/кг ежедневно в течение 10 дней обуславливало появление признаков гиперхромной анемии. Причиной последней, вероятно, явилось доминирование свободнорадикального окисления над окислительным фосфорилированием с последующим развитием смешанной гипоксии, в том числе в системе крови. Такое состояние вполне согласуется с усилением при этом перекисного окисления липидов эритроцитов. Ускорение апоптоза в системе красной крови также явилось результатом аварийного функционирования эритроцитов с высоким износом структур в условиях гемической гипоксии. Данное состояние отражалось и в повышении значения цветового показателя, и в увеличении процентного содержания дегенеративных форм эритроцитов в процессе опыта. Параметры белой крови указывали на ускорение процессов катаболизма и одновременно на ответное усиление адаптивной реакции в условиях действия относительно высокой концентрации (200 мг/кг) ионола в течение 10 дней. Повышение апоптозного процесса при этом отражалось, в частности, в увеличении среднего содержания в лейкограмме деструктивных лейкоцитов. Увеличение количества лейкоцитов, в том числе нейтрофилов со сдвигом влево и моноцитоз, а также увеличение значения среднего цитохимического коэффициента миелопероксидазы, очевидно, связаны с расширением масштабов фагоцитоза при ускорении апоптоза в условиях прооксидантного действия ионола в данной концентрации.

Ключевые слова: ионол, апоптоз, миелопероксидаза, лейкоциты

CHANGES IN BLOOD CONDITION UNDER CONDITIONS OF RELATIVELY HIGH DOSES OF IONOL

Khislamov E.N., Enikeev D.A., Farshatova E.R., Srubilin D.V.,
Galimova E.F., Enikeev O.A., Fayurshin A.Z.

Bashkir State Medical University of the Ministry of Health of the Russian Federation,
Ufa, e-mail: Hisamov7958@yandex.ru

The study investigated the effect of the antioxidant ionol on the state of blood at its high concentration. Possible changes in the direction of its action on the oxidative process due to an increase in its content in the blood were studied. For this purpose, a study of the state of some parameters of red blood and leukocyte reaction was undertaken. The effect of a relatively high concentration of ionol at the level of 200 mg/kg daily for 10 days caused the appearance of signs of hyperchromic anemia. The reason for the latter was probably the dominance of free radical oxidation over oxidative phosphorylation, followed by the development of mixed hypoxia, including in the blood system. This condition is quite consistent with an increase in the peroxidation of red blood cell lipids. The acceleration of apoptosis in the red blood system was also the result of abnormal functioning of erythrocytes with high structural wear under conditions of hemic hypoxia. This condition was reflected both in an increase in the value of the color index and in an increase in the percentage of degenerative forms of red blood cells during the experiment. The parameters of white blood indicated an acceleration of catabolism processes and at the same time a response to an increased adaptive response under the action of a relatively high concentration (200 mg/kg) of ionol for 10 days. An increase in the apoptosis process was reflected, in particular, by an increase in the average content of destructive leukocytes in the leukogram. An increase in the number of leukocytes, including left-shifted neutrophilosis and monocytosis, as well as an increase in the value of the average cytochemical coefficient of myeloperoxidase, are obviously associated with an expansion in the scale of phagocytosis with accelerated apoptosis under the conditions of the prooxidant action of ionol at a given concentration.

Keywords: ionol, apoptosis, myeloperoxidase, leukocytes

Введение

Широко применяемый в практике антиокислитель ионол (2,6-ди-треть-бутил-п-крезол, бутилированный окситолуол, алкофен-БП, бубинол) считается малотоксичным ингибитором окислительных процессов, применяется в качестве консер-

ванта в производстве пищевых продуктов, смазочных масел, каучуков, пластмасс и др. [1]. Поступление в организм малых доз ионола с пищей может иметь положительный эффект благодаря возможности нейтрализовать свободные радикалы и прерывать цепные реакции с участием свободных ра-

дикалов. Системы свободнорадикального окисления и антиоксидантов в нормальных условиях течения физиологических процессов сбалансированы. Негативные отклонения той или другой системы в сторону усиления или ослабления наблюдаются в патологических процессах. Одинаково отрицательно сказывается как усиление свободнорадикального окисления, так и высокая активность антиоксидантной системы. Поэтому эти процессы принимаются во внимание при изучении различных патологических процессов.

В реализации неспецифической резистентности организма широким планом выступает фагоцитоз. В фазе переваривания вслед за погружением фагосомы усиливаются окислительные процессы, при которых определенную роль играют внутриклеточная глюкоза и фермент миелопероксидаза, отражая при этом усиление активности свободных радикалов.

Физиологическая и патологическая регенерация в процессе обновления тканей включает и процесс апоптоза клеток. С потерей клеток функциональной способности начинается процесс деструкции. Клетка приобретает свойства антигена и становится объектом фагоцитоза. Следовательно, уровень активности внутриклеточных ферментов миелопероксидазы и гликогена в условиях повышения количества кислородных радикалов может отражать и динамику апоптоза. В процессе патологического обновления тканей, естественно, играет важную роль и антиоксидантная система ткани. Это обстоятельство учитывается в процессе лечебно-профилактических мероприятий. Во многих нозологических формах патологии преобладает апоптоз с усилением активности фермента миелопероксидазы и содержания внутриклеточного гликогена. В таких случаях широко применяются антиоксиданты. При этом возникает проблема, связанная с передозировкой антиоксиданта.

Вполне определенное значение в настоящее время приобретают исследования, связанные с ролью свободных радикалов кислорода в динамике масштабов апоптоза. Повышение активных форм кислорода отмечено при усилении апоптоза во многих патологических состояниях: сахарный диабет, гибель макрофагов, фибробластов, гладких миоцитов в области атеробластических бляшек, Т-клеток хелперов при СПИДе, синовиальных клеток при ревматоидном артрите, нервных клеток при нейродегенеративных заболеваниях. Есть также сведения, что гипоксия снижает апоптоз тимоцитов, обусловленный повышением содержания глюкокортикоидов [2, 3].

Целью в данном исследовании явилось установление изменения направленности действия антиоксидантов на показатели крови с повышением их концентрации в организме.

Материалы и методы исследования

В качестве материала исследования были использованы взрослые самцы кроликов породы шиншилла в возрасте 1–3 года. Животным вводили раствор ионала внутримышечно ежедневно в продолжение 10 дней в дозе равной 200 мг/кг. Показатели форменных элементов крови определялись с помощью гематологического анализатора. Цветовой показатель (ЦП) равнялся: гемоглобин (г/л) х3 / три первые цифры количества эритроцитов. Окраска мазков крови производилась краской азур-эозином. Цитохимические исследования фермента миелопероксидазы в нейтрофилах производились с использованием окраски мазков крови по методу Грэхема – Кнолля [3, 4].

Средний цитохимический коэффициент (СЦК) определяли в процентах по формуле:

$$\text{СЦК} = (\text{Ах}3 + \text{Вх}2 + \text{Сх}1 + \text{Дх}0) / 100,$$

где А – % клеток с интенсивным окрашиванием; В – % клеток с умеренным окрашиванием, С – % клеток со слабым окрашиванием, Д – % клеток при отсутствии окрашивания.

Перекисное окисление липидов (ПОЛ) эритроцитарной массы исследовалось с помощью биохемиллюминометра БХЛ-06 с фотоэлектронным множителем ФЭ 000.335.557.

Цифровые результаты работы были проанализированы методами математической статистики. Для определения достоверности различий использовали непараметрический критерий Вилкоксона для сопряженных распределений пар. При этом одно и то же животное является контролем (исходное состояние) и экспериментальным (в процессе опыта) [5, с. 34, 35]. Вычисление проводится по формуле: $S = \Sigma d^2 - \Sigma d/n$; $Sd = \sqrt{S / (n-1)}$; $t_d = d / Sd$. ($h = 0,2$, $S = 0,04 - 0,2 = 0,16$, $Sd = \sqrt{0,16} = 0,4/9 = 0,044$, $t_d = 0,2/0,044 = 4,48$, $4,48 > 2,3$). d – разность между средними показателями (M) исходного состояния эксперимента. Если $t_d > t_{st}$, то при $P = 0,05$ (по таблице), разница получается достоверно [5].

Опыты проводились с соблюдением основных принципов биоэтики, морально-этических принципов проведения биомедицинских экспериментов на животных, сформулированных локальным этическим комитетом БГМУ (председатель проф. А.Г. Хасанов).

Сводные показатели крови кроликов при введении ионола 200 мг/кг
($M \pm m$; $n=10$; * – $P < 0,05$ в сравнении с исходным уровнем)

Показатели	Исходный уровень	Через 4 сут	Через 6 сут	Через 8 сут	Через 10 сут
Количество эритроцитов ($\times 10^{12}/л$)	4,66 \pm 0,155	4,23 \pm 0,143	4,11 \pm 0,165	3,89 \pm 0,133	3,61 \pm 0,135
Содержание гемоглобина (г/л)	141,60 \pm 4,982	139,86 \pm 4,796	138,31 \pm 4,881	137,65 \pm 4,812	134,66 \pm 4,682
Средняя концентрация корпускулярного гемоглобина (МСНС) (г/л)	321,12 \pm 10,358	304,91 \pm 11,147	289,11 \pm 9,318	273,41 \pm 9,328	253,21 \pm 8,958
Цветовой показатель	0,911 \pm 0,031	0,992 \pm 0,033	1,009 \pm 0,029	1,061 \pm 0,042	1,080 \pm 0,041
Дегенеративные эритроциты (%)	0,73 \pm 0,031	1,13 \pm 0,033	1,44 \pm 0,035	1,87 \pm 0,034	2,12 \pm 0,037
ПОЛ эритроцитов (S-60 с. имп. $\times 10^2$)	23,2 \pm 0,873	25,2 \pm 0,867	31,6 \pm 0,965	35,0 \pm 0,975	39,3 \pm 1,211
Количество лейкоцитов ($\times 10^9/л$)	6,45 \pm 0,215	7,12 \pm 0,255	7,56 \pm 0,297	8,61 \pm 0,311	9,71 \pm 0,363
Нейтрофилы юные (%)	0	0	0,76 \pm 0,025	1,13 \pm 0,029	1,52 \pm 0,036
Нейтрофилы палочкоядерные (%)	3,11 \pm 0,107	3,89 \pm 0,011	4,57 \pm 0,019	5,71 \pm 0,021	6,55 \pm 0,028
Нейтрофилы сегментоядерные (%)	29,12 \pm 0,939	31,54 \pm 1,13	32,71 \pm 1,165	34,32 \pm 1,189	36,92 \pm 1,198
Деструктивные лейкоциты (%)	0,91 \pm 0,031	1,21 \pm 0,039	1,46 \pm 0,041	1,89 \pm 0,056	2,11 \pm 0,061
Моноциты (%)	3,47 \pm 0,119	4,12 \pm 0,123	4,68 \pm 0,141	5,11 \pm 0,155	5,33 \pm 0,159
СЦК миелопероксидазы (усл. ед.)	2,81 \pm 0,093	3,18 \pm 0,121	3,22 \pm 0,145	3,29 \pm 0,152	3,36 \pm 0,161

Примечание: М – среднее арифметическое значение, m – среднее квадратическое отклонение, N – число подопытных животных. * $P < 0,05$ – признак статистической значимости.

Результаты исследования и их обсуждение

В данной работе было предпринято изучение влияния антиоксиданта ионола на состояние крови при высокой ее концентрации на уровне 200 мг/кг. Задачей стало установление возможного изменения направления его действия на окислительный процесс в связи с повышением его содержания в крови. Поэтому проводилось исследование состояния некоторых параметров красной крови и лейкоцитарной реакции (таблица).

Изучение изменений общего количества эритроцитов и процентного содержания ее дегенеративных форм, а также гемоглобина дало возможность установить некоторые особенности процесса регенерации. Так, количество эритроцитов в конкретном объеме крови по мере продолжения действия ионола имело тенденцию к снижению и через 10 суток начала опыта в среднем составляло 77,46% от исходного уровня. Относительное число дегенеративных эритроцитов повысилось и через 10 суток равнялось 290,41%. Одновременно снижалось содержание гемоглобина и через 10 суток

оказалось на уровне 95,1%, то есть значительно в меньшей степени, чем уменьшение количества эритроцитов. Это отражалось в повышении значения ЦП. Через 10 суток действия ионола этот параметр равнялся 118,68% от исходного уровня. Повышение значения ЦП согласуется со сдвигом сводного значения средней концентрации корпускулярного гемоглобина (МСНС). Через 10 суток опыта величина МСНС равнялась 78,8% от исходного состояния. Следовательно, под действием относительно высокой концентрации ионола (200 мг/кг) наступила гиперхромная анемия. Чтобы выяснить причины эритропении, было предпринято изучение красной крови методом хемилюминесценции. При этом было установлено, что светосумма (S-60 с. имп. $\times 10^2$) ПОЛ эритроцитов изменилась и через 10 суток действия ионола оказалась на 169,4% выше исходного уровня. Итак, в процессе действия ионола имело место доминирование процесса эритродиэреза над эритропозом. Повышение значения цветового показателя во время опыта, очевидно, является результатом усиления гемолиза эритроци-

тов вследствие повышения активности свободных радикалов кислорода и подавления темпов окислительного фосфорилирования. Следовательно, тканевая и гемическая гипоксия вместе уже представляют смешанную форму гипоксии. Итак, возможно наступил порочный круг, тканевая гипоксия усиливает гемическую гипоксию, в свою очередь, анемия обуславливает присоединение анаэробного окисления с уменьшенной формой синтеза АТФ. Снижение окислительного фосфорилирования повышает темпы апоптоза и некроза структур, ответственных за кислородное обеспечение. Усиление апоптоза и некроза этих структурных образований в целом усугубляет кислородное голодание. Таким образом, порочный круг замыкается в масштабе всего организма.

Кислородная недостаточность в организме, естественно, сопровождается изменением лейкоцитарной реакции. Чтобы установить возможный сдвиг со стороны белой крови, было предпринято изучение количества лейкоцитов в конкретном объеме циркулирующей крови и состояние нейтрофилов, моноцитов и деструктивных лейкоцитов (таблица). Было установлено, что по мере повышения концентрации ионола в крови количество лейкоцитов увеличивалось с максимальным выражением на 10 суток эксперимента и составило 144,7% по сравнению с исходным уровнем. Изменения произошли и в лейкоцитарной формуле. Юные формы нейтрофилов в периферической крови в первые 5 суток отсутствовали, появились через 6 суток, а через 10 суток среднее число их увеличилось на 200%. Повышение содержания палочкоядерных нейтрофилов по сравнению с исходным уровнем через 10 суток составило 210,61%. Увеличение процентного содержания сегментоядерных нейтрофилов происходило в меньшей степени, через 10 суток в среднем составило 126,78% от исходного уровня. Количество моноцитов и деструктивных лейкоцитов также повышалось, и через 10 суток опыта разница с исходным состоянием в среднем составляла соответственно 153,6% и 231,86%.

Одновременно изучалось состояние активности миелопероксидазы нейтрофилов в условиях действия на организм относительно высокой дозы ионола. По мере увеличения сроков введения препарата было отмечено повышение значения данного показателя и через 10 суток СЦК составлял 119,57% от исходного уровня.

Итак, введение ионола в дозе 200 мг/кг ежедневно в течение 10 суток, когда наступил определенный уровень кислородного голодания организма, повысилась актив-

ность белой крови, в частности был отмечен нейтрофильный лейкоцитоз со сдвигом влево и с повышением активности миелопероксидазы, а также моноцитоз. Одновременно происходило и усиление деструкции лейкоцитов. Увеличение количества деструктивных лейкоцитов, естественно, является отражением сдвига процессов обновления, регенерации в виде усиления апоптоза клеток в белой крови и сокращения сроков функционирования.

Со снижением, далее потерей клеток функциональной способности начинается и процесс деструкции. Клетка приобретает свойства антигена и становится объектом фагоцитоза. Следовательно, состояние внутриклеточных миелопероксидазы и гликогена при повышении активности кислородных радикалов может показать динамику апоптоза. В процессе патологического обновления тканей, естественно, играет важную роль и антиоксидантная система ткани. Это обстоятельство учитывается и при лечебно-профилактических мероприятиях. Следовательно, важно сохранить оптимальное взаимодействие между системой свободно-радикального окисления и антиоксидантами. С одной стороны, апоптоз клеток и усиление фагоцитоза в этом процессе являются катаболическими процессами, с другой – это обязательный компонент тканевого обновления, одновременно стимулирующий пластический процесс, анаболизм. Во многих нозологических формах патологии преобладает апоптоз с усилением активности фермента миелопероксидазы и содержания внутриклеточного гликогена. В таких случаях широко применяются антиоксиданты. При этом возникает вопрос о передозировке антиоксиданта и учет уровня активности фермента миелопероксидазы и внутриклеточного содержания гликогена в нейтрофилах крови. Усиление апоптоза клеток, естественно, сопровождается повышением процесса элиминации разрушенных структур, которое реализуется в том числе фагоцитозом макрофагами и нейтрофилами.

Фагоцитоз сопровождается «окислительным взрывом», в процессе которого усиливается окисление глюкозы и в десятки раз повышается потребление кислорода. В динамике этого процесса используется перекись водорода, который распадается с образованием гидроксильного водорода (НО), самого агрессивного из активных форм кислорода против антигенного действия. Этот процесс катализируется содержащейся в фагоцитирующих клетках миелопероксидазой. Одновременно представляет интерес тот факт, что в случае незавершенного фагоцитоза, который характерен сохранением

активности фагосомы, образование активных форм кислорода продолжается. Этот процесс может привести к деструкции самого фагоцита и окружающей ткани. Следовательно, гемическая гипоксия, наблюдаемая при действии относительно высоких доз ионола, является результатом усиления процесса апоптоза в красной крови с последующим высоким уровнем фагоцитоза, в том числе со стороны лейкоцитов. Исходя из этого следует полагать, что ионол в дозе равной 200 мг/кг проявляет проокислительное действие, способствует повышению ПОЛ клеточных мембран, доминированию свободнорадикального окисления над окислительным фосфорилированием, обуславливая анемическое состояние.

Выводы

1. Действие относительно высокой концентрации ионола на уровне 200 мг/кг ежедневно в течение 10 дней обуславливало появление признаков гиперхромной анемии. Причиной последней, вероятно, явилось доминирование свободнорадикального окисления над окислительным фосфорилированием с последующим развитием смешанной гипоксии, в том числе в системе крови. Такое состояние вполне согласуется с усилением при этом ПОЛ эритроцитов. Ускорение апоптоза в системе красной крови также явилось результатом аварийного функционирования эритроцитов с высоким износом структур в условиях гемической гипоксии. Данное состояние отражалось и в повышении значения ЦП и увеличении процентного содержания дегенеративных форм эритроцитов в процессе опыта.

2. Параметры белой крови указывали на ускорение процессов катаболизма и одновременно на ответное усиление адаптивной реакции в условиях действия относительно высокой концентрации (200 мг/кг) ионола в течение 10 дней. Повышение апоптозного процесса при этом отражалось, в частности, увеличением среднего содержания в лейкограмме деструктивных лейкоцитов. Увеличение количества лейкоцитов, в том числе нейтрофилов со сдвигом влево и моноцитоз, а также увеличение значения СЦК миелопероксидазы, очевидно, связаны с расширением масштабов фагоцитоза при ускорении апоптоза в условиях проокислительного действия ионола в данной высокой концентрации.

Список литературы

1. Прохоренко С.Ю., Козеева И.С. Эффективность использования антиоксидантов при производстве ферментированных колбас // Все о мясе. 2019. № 4. С. 35–37. DOI: 10.21323/2071-2499-2019-4-35-37.
2. Биохимия оксидативного стресса: учебно-методическое пособие / ФГБОУ ВО РНИМУ имени Н.И. Пирогова Минздрава России. М.: Изд-во XX, 2018. 60 с.
3. Сирак А.Г., Пискарева Е.И., Долгашова М.А., Магомедова О.Г., Арутюнова А.П. Гемопоз и функциональное состояние лейкоцитов крови при воспалении на фоне локального удаления нефагоцитирующих гранулоцитов // Вестник Волгоградского государственного медицинского университета. 2020. № 2 (74). С. 153–156.
4. Атаева М.Ж., Василенко В.М., Гурижева М.В., Медиаева Р.Х., Альмова И.Х. Значение определения активности миелопероксидазы в нейтрофильных лейкоцитах у больных атеросклерозом // Клиническая медицина. Серия «Естественные и технические науки». 2018. № 9. С. 73–77.
5. Зверев А.А., Зефирова Т.Л. Статистические методы в биологии: учебно-методическое пособие. Казань: КФУ, 2013. 42 с.