

УДК 615.9:546.289:616.155.3

М.В. Долгушин, **А.С. Вахрин**, Г.Г. Юшков, Д.И. Колесник

**ЦИТОХИМИЧЕСКАЯ ОЦЕНКА МЕТАБОЛИЧЕСКИХ ИЗМЕНЕНИЙ В ЛЕЙКОЦИТАХ  
ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ КРОВИ КРЫС В УСЛОВИЯХ ХРОНИЧЕСКОЙ ИНТОКСИКАЦИИ  
ТЕТРАФТОРИДОМ ГЕРМАНИЯ**

**АФ НИИ медицины труда и экологии человека ГУ НЦ МЭ ВСНЦ СО РАМН (Ангарск)  
НИИ Биофизики Ангарской государственной технической академии (Ангарск)**

---

Оценивали характер изменения в метаболическом статусе лейкоцитов периферической крови крыс при ингаляционном воздействии тетрафторида германия ( $GeF_4$ ) в концентрациях  $5 \text{ мг/м}^3$  и  $10 \text{ мг/м}^3$ . При этом цитохимическими методами определяли активность щелочной фосфатазы, миелопероксидазы, лактатдегидрогеназы, кислой фосфатазы и содержание лизосомальных катионных белков через 1, 3 и 4 месяца после начала интоксикации. Ответная реакция лейкоцитов заключалась в снижении уровня щелочной фосфатазы и миелопероксидазы в начальный период воздействия с последующей активацией этих ферментов, чему предшествовало уменьшение внутриклеточного содержания катионных белков. Активность лактатдегидрогеназы и кислой фосфатазы оставалась стабильно низкой на протяжении всего эксперимента.

**Ключевые слова:** лейкоциты, метаболизм, цитохимия, тетрафторид германия

**CYTOCHEMICAL ASSESSMENT OF METABOLIC ALTERATIONS IN RAT PERIPHERAL BLOOD LEUCOCYTES UNDER CONDITIONS OF CHRONIC INTOXICATION WITH GERMANIUM TETRAFLUORIDE**

**M.V. Dolgushin, A.S. Vakhryn, G.G. Yushkov, D.I. Kolesnik**

*Research Institute of Industrial Medicine and Human Ecology, SC ME ESSC SB RAMS, Angarsk  
Research Institute of Biophysics of State Technical Academy, Angarsk*

*Alteration character of metabolic state of rat peripheral blood leucocytes has been assessed in inhalation exposure to germanium tetrafluoride (GeF<sub>4</sub>) in concentrations 5 mg/m<sup>3</sup> and 10 mg/m<sup>3</sup>. The activities of alkaline phosphatase, myeloperoxidase, lactate dehydrogenase, acidic phosphatase and lysosomal cation protein content were determined 1, 3 and 4 months after starting intoxications using cytochemical methods. Leucocyte response included the decrease in the levels of alkaline phosphatase and myeloperoxidase at the initial exposure period with a following activation of these enzymes and with a previous decrease in intracellular cation protein contents. Lactate dehydrogenase and acidic phosphatase activities were found to be continually low during the experiment performed.*

**Key words:** leucocytes, metabolism, cytochemistry, germanium tetrafluoride

В ходе токсикологических исследований часто возникает необходимость оценки характера ответной реакции организма на клеточном и субклеточном уровнях. В качестве модельного объекта с этой целью могут быть использованы лейкоциты периферической крови, а в качестве тестов — цитохимические реакции определения метаболических параметров. В клинических и экспериментальных работах отмечена высокая чувствительность ферментов в лейкоцитах крови к экзогенным воздействиям различной природы, что позволяет выявить внутриклеточные изменения, указывающие на динамику процесса компенсации и предшествующие клиническим проявлениям патологии [4, 5, 6].

Определенный интерес представляет оценка направленности внутриклеточных метаболических сдвигов при воздействии фторсодержащих соединений. Фториды относятся к политропным ядам, что связано, прежде всего, с их способностью к устойчивому комплексованию с ионами металлов (оказывающих активирующее влияние на ферменты или входящих в состав последних в качестве простетических групп) [12]. Однако очевидно, что ответная реакция на токсиканты направленного действия не будет ограничиваться обменными сдвигами специфического характера.

Изучение состояния внутриклеточных ферментативных параметров в ходе хронического эксперимента позволяет разграничить специфические эффекты от преобразований, связанных с реализацией общих механизмов реагирования. Полученная информация о фазовых изменениях, отмеченных на уровне цитохимических показателей в динамике хронической интоксикации в относительно низких дозах или концентрациях, может явиться основой для разработки дополнительных критериев, используемых в комплексной оценке состояния здоровья людей, контактирующих с профессиональными вредностями.

Учитывая вышеизложенное, была поставлена цель изучить метаболический статус лейкоцитов периферической крови лабораторных животных в условиях хронической фтористой интоксикации. В качестве воздействующего фактора нами был

выбран тетрафторид германия (GeF<sub>4</sub>). В настоящее время указанное соединение имеет промышленное применение, в то время как о характере его биологического действия известно очень мало [2].

**МЕТОДИКА**

В опыте были использованы нелинейные белые крысы — самцы, выращенные в стандартных условиях вивария. Всего было использовано 3 группы животных (1-я группа — контроль, остальные — подопытные). В каждую группу входило по 8 особей. При этом подопытные животные подвергались ингаляционному воздействию тетрафторида германия в ингаляционной камере по 4 часа ежедневно в течение 4-х месяцев. Как известно, GeF<sub>4</sub> в обычных условиях не является химически устойчивым соединением, при взаимодействии с влагой воздуха значительная часть вещества вступает в реакцию пиролизного гидролиза с образованием HF [2]. В нашем эксперименте воздействующая концентрация находилась на уровне 5 мг/м<sup>3</sup> (2-я группа) и 10 мг/м<sup>3</sup> (3-я группа), что приблизительно в 25 и в 50 раз превышало полученное расчетным методом значение ПДК для воздуха рабочей зоны [2].

Кровь из хвостовой вены крыс забирали через 1, 3 и 4 месяца после начала воздействия. Метаболические показатели лейкоцитов определяли на мазках с использованием цитохимических методов. При этом оценивали активность миелопероксидазы (МП), щелочной фосфатазы (ЩФ) и содержание катионных белков (КБ) в нейтрофилах, активность лактатдегидрогеназы (ЛДГ) в лимфоцитах, активность кислой фосфатазы (КФ) в нейтрофилах и лимфоцитах. Реакцию на МП проводили при помощи метода с о-толидином [3], реакцию на ЛДГ — с использованием п-нитротетразолия фиолетового [9], уровень КБ оценивали по методу с бромфеноловым синим [7]. Используя методы азосочетания, определяли активность ЩФ [8] и КФ [13]. В качестве субстрата использовали нафтол-АС-ВС-фосфат, а в качестве азосочетателя — прочный синий ВВ. Перед постановкой реакции на фосфатазы проводили фиксацию мазков в парах формалина.

Интенсивность реакции на МП, ЩФ, КФ и КБ выражали в условных единицах цитохимического индекса, а уровень активности ЛДГ — в среднем числе гранул формазана на клетку. Достоверность различий между контрольной и опытной группами оценивали при помощи непараметрического критерия Вилкоксона — Манна — Уитни.

**РЕЗУЛЬТАТЫ**

Согласно полученным результатам, представленным в таблице, достоверные изменения средних значений определяемых параметров животных опытных групп по отношению к контролю отмечались на всех этапах обследования. При этом для цитохимических реакций лейкоцитов подопытных животных практически не было выявлено различий в направленности сдвигов в зависимости от величины действующей концентрации. На характер метаболических изменений прежде всего влияла продолжительность интоксикации (на что указывал фазовый характер ответной реакции со стороны МП, ЩФ и КБ). Снижение уровня МП и ЩФ в начальный период эксперимента (после воздействия в течение месяца) сменялось в конечном итоге активацией этих ферментов, чему предшествовало уменьшение внутриклеточного содержания КБ в нейтрофилах (табл. 1).

Различия в направленности изменения метаболических показателей у подопытных животных в зависимости от концентрации наблюдались лишь в 2-х случаях. Это касалось активности КФ в лимфоцитах (после 3-х мес. воздействия) и ЩФ в нейтрофилах (на завершающем этапе обследования). Однако подобные «аномальные» факты не связаны с нарушением общей тенденции в характере ответной реакции. Возрастание активности фосфатазы в лимфоцитах у животных 3-й группы (на 2 этапе обследования) было практически полностью связано с дестабилизацией лизосомальных мембран. На это указывало достоверное ( $p < 0,01$ ) снижение уровня «связанной» КФ ( $0,55 \pm 0,06$ ) по

отношению к контролю ( $0,93 \pm 0,07$ ) при отсутствии изменений в «общей» КФ ( $1,40 \pm 0,05$  в опыте и  $1,42 \pm 0,04$  в контроле). При завершении обследования (после 4-х мес. воздействия) реакция на ЩФ у животных 3-й группы не была одинаковой. У 4-х особей из восьми активность этого фермента варьировала в пределах контрольной группы и составляла в среднем  $2,23 \pm 0,16$ . У остальных крыс значения активности ЩФ были выше таковых в контроле (в среднем  $3,47 \pm 0,06$ ), что было достоверным ( $p < 0,01$ ) не только по отношению к контролю, но и по отношению к другой подопытной группе.

Таким образом, смена в направленности ответной реакции в ходе хронической интоксикации тетрафторидом германия отмечалась лишь для ЩФ и МП. Параллельная активация этих ферментов свидетельствует о функциональной мобилизации защитных систем нейтрофильных гранулоцитов, наблюдается в результате воздействия различных химических факторов [1, 6], т.е. имеет неспецифический характер. В данном случае подобная реакция может быть связана с начальным этапом в развитии вялотекущего воспалительного процесса, вызванного повреждающим влиянием фторидного компонента (фтористого водорода, продукта гидролитического разложения фторида германия). Напротив, отмеченная нами способность к угнетению ЩФ и МП (наряду с ферментами гликолиза) относится к эффектам, специфичным для фторидов [10, 12, 15]. Проведенное ранее исследование метаболического статуса лейкоцитов периферической крови кроликов, получавших в условиях хронического воздействия питьевую воду с фторидом натрия в концентрации 30 мг/л (30 ПДК), также показало снижение активности ЩФ, ЛДГ и КФ. Ингибирующий эффект выявлялся уже через месяц после начала введения токсиканта и после четырехмесячного воздействия полностью сохранялся [11]. Аналогичный эффект по отношению к ЩФ в нейтрофилах периферической крови крыс наблюдался при ежедневном введении

**Таблица 1**  
**Характер изменения цитохимических показателей лейкоцитов периферической крови крыс в динамике хронического воздействия тетрафторида германия (GeF<sub>4</sub>)**

Период обследования	Показатель Группа	МП	ЩФ	КФ	КБ	КФ	ЛДГ
		(нейтроф)	(нейтроф)	(нейтроф)	(нейтроф)	(лимф)	(лимф)
1 месяц воздействия	Контроль	1,51 ± 0,05	1,88 ± 0,05	0,29 ± 0,02	1,75 ± 0,12	0,36 ± 0,02	21,7 ± 1,3
	5 мг/м <sup>3</sup>	1,17 ± 0,04*	1,22 ± 0,16**	0,17 ± 0,03*	1,54 ± 0,11	0,24 ± 0,04*	12,3 ± 1,8**
	10 мг/м <sup>3</sup>	1,28 ± 0,07*	1,49 ± 1,49**	0,15 ± 0,02**	1,48 ± 0,13	0,20 ± 0,04**	13,6 ± 1,8**
3 месяца воздействия	Контроль	1,43 ± 0,06	2,28 ± 0,14	0,24 ± 0,03	1,79 ± 0,13	0,49 ± 0,05	19,6 ± 1,9
	5 мг/м <sup>3</sup>	1,54 ± 0,13	2,31 ± 0,11	0,12 ± 0,02**	1,29 ± 0,12**	0,35 ± 0,03*	11,1 ± 1,0**
	10 мг/м <sup>3</sup>	1,30 ± 0,07	2,06 ± 0,18	0,09 ± 0,01**	1,10 ± 0,14**	0,85 ± 0,06**	9,5 ± 0,9**
4 месяца воздействия	Контроль	1,42 ± 0,06	2,49 ± 0,14	0,21 ± 0,02	1,74 ± 0,15	0,41 ± 0,03	22,2 ± 0,9
	5 мг/м <sup>3</sup>	1,81 ± 0,11*	3,00 ± 0,08**	0,15 ± 0,01**	1,43 ± 0,14	0,24 ± 0,02**	12,8 ± 1,1**
	10 мг/м <sup>3</sup>	2,03 ± 0,09**	2,85 ± 0,29	0,09 ± 0,01**	1,47 ± 0,11	0,16 ± 0,02**	13,3 ± 1,2**

**Примечание:** достоверность отличия от контроля: \* –  $p < 0,05$ ; \*\* –  $p < 0,01$ .

с водой фторида натрия в дозе 20 мг/кг [14]. Полученные нами данные подтверждают наличие специфичной реакции на фториды со стороны МП и ЩФ в начальный период обследования, тогда как изменения активности АДГ и КФ можно считать специфичными на всех этапах эксперимента. При этом, оценивая результаты настоящего исследования, следует учитывать, что неорганические соединения фтора, поступающие через органы дыхания, более токсичны, чем эквивалентные количества данного галоида, вводимые в организм с водой [10]. Одним из наиболее чувствительных к направленному действию фтора ферментов считается ЩФ [12]. Однако в натуральных исследованиях может возникнуть проблема с выявлением специфических эффектов даже по отношению к данному параметру. В частности, в ходе клинического обследования людей, подвергавшихся длительному воздействию фтора в условиях производства (гальванические цеха алюминиевого завода), не было отмечено снижения уровня ЩФ в гранулоцитах крови. Напротив, наблюдалась активация фермента при продолжительном стаже работы (7–15 лет) [10].

Оценивая возможность применения полученных результатов, можно отметить, что определение состояния цитохимических реакций лейкоцитов в подобного рода экспериментах имеет самостоятельное значение для выяснения механизмов повреждающего действия токсикантов. В то же время, достоверный характер выявленных изменений позволяет рекомендовать выбранные цитохимические тесты в качестве дополнительных показателей донозологической диагностики в практике лечебно-оздоровительных подразделений промышленных предприятий.

#### ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Использование цитохимических приемов исследования лейкоцитов периферической крови животных (МП, ЩФ, КБ, КФ, АДГ) в оценке метаболических изменений при хроническом ингаляционном воздействии тетрафторидом германия позволило установить гематологические признаки развития хронической интоксикации на значимых концентрационных уровнях (в 25 и 50 раз превышающих предполагаемую величину ПДК для воздуха рабочей зоны). На всех сроках обследования отмечены статистически достоверные изменения средних значений показателей по отношению к контролю, однако, без отличий в направленности сдвигов в зависимости от величины действующей концентрации. На характер ответной реакции лейкоцитов влияла преимущественно продолжительность воздействия.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Белоскурская Г.И. Функционально-морфологические особенности лейкоцитов у больных с хронической фосфорной интоксикацией / Г.И. Белоскурская, Р.М. Балмахаева // Гигиена труда. — 1982. — № 9. — С. 46–48.
2. Вахрин А.С. Токсикология соединений германия в свете потенциальной опасности для чело-

века / А.С. Вахрин, Г.Г. Юшков // Оценка риска для здоровья неблагоприятных факторов окружающей среды: опыт, проблемы и пути их решения: Матер. Всерос. конф., 23–25 октября 2002 г. — Ангарск, 2002. — Ч. 2. — С. 17–19.

3. Дворник В.Я. Метод цитохимического определения активности миелопероксидазы в мазках / В.Я. Дворник, С.И. Овчинников, Т.И. Самойленко // Клин. лаб. диагностика. — 1992. — № 11–12. — С. 49–50.

4. Долгушин М.В. Закономерности метаболических изменений в лейкоцитах периферической крови при вибрационной болезни и воздействии экотоксикантов: Автореф. дис. ... канд. биол. наук: 14.00.16 / ВСНЦ СО РАМН. — Иркутск, 2002. — 23 с.

5. Значение цитохимического исследования внутриклеточного метаболизма нейтрофилов в оценке воздействия продуктов хлорорганического производства / И.В. Макарьева, Г.Р. Башарова, Р.М. Салехова, А.Ж. Гильманов // Клин. лаб. диагностика. — 2004. — № 9. — С. 42–43.

6. Иванова Л.А. Цитохимия ферментов клеток крови в диагностике, оценке характера течения и эффективности терапии некоторых профессиональных заболеваний: Автореф. дис. ... докт. мед. наук: 14.00.05 / НИИ ГТ и ПЗ АМН СССР. — М., 1991. — 47 с.

7. Лабораторные методы исследования в клинике: Справочник / Под ред. В.В. Меньшикова. — М., 1987. — 368 с.

8. Лойда З. Гистохимия ферментов: Лабораторные методы / З. Лойда, Р. Госсрау, Т. Шиблер. — М., 1982. — 272 с.

9. Нормы энзимоцитохимических показателей лейкоцитов крови как критерии оценки состояния здоровья / Сост. В.А. Алиев. — Баку, 1979. — 17 с.

10. Окунев В.Н. Патогенез, профилактика и лечение фтористой интоксикации / В.Н. Окунев, В.И. Смоляр, Л.Ф. Лаврушенко. — Киев, 1987. — 152 с.

11. Очиров И.А. Закономерности изменений репаративно-регенеративных процессов при переломах длинных костей в условиях хронической интоксикации фторидом натрия: Автореф. дис. ... канд. мед. наук: 14.00.22, 14.00.16 / ВСНЦ СО РАМН. — Иркутск, 2003. — 23 с.

12. Строчкова Л.С. Влияние неорганических соединений фтора на ферменты клетки / Л.С. Строчкова, В.И. Сороковой // Успехи совр. биол. — 1983. — Т. 96, Вып. 2. — С. 211–223.

13. Хейхоу Ф.Г. Дж. Гематологическая цитохимия / Ф.Г. Дж. Хейхоу, Д. Кваглино. — М., 1983. — 320 с.

14. Borysewicz-Kewicka M. Periodontal disease, oral hygiene and fluoride content of dental deposits in aluminum worker / M. Borysewicz-Kewicka, M. Kobylanska // Fluoride. — 1983. — Vol. 16, N 1. — P. 5–10.

15. Gabler W.L. Effect of fluoride on polymorphonuclear leucocyte myeloperoxidase / W.L. Gabler, P.A. Leong // J. Dent. Res. — 1980. — Vol. 59, N 2. — P. 135.