

Е.В. Уланова, Д.В. Фоменко, Н.В. Кизиченко, Т.К. Ядыкина, Е.Н. Масленникова

ТОКСИЧЕСКОЕ ДЕЙСТВИЕ ФТОРИДА НАТРИЯ ПРИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОМ ФЛЮОРОЗЕ*НИИ комплексных проблем гигиены и профессиональных заболеваний СО РАМН (Новокузнецк)**Показано, что метаболические нарушения, вызванные хронической фтористой интоксикацией, развиваются стадийно. На ранних стадиях развития нарушается минеральный обмен. В более поздние сроки проявляется действие фторидов на системном уровне.***Ключевые слова:** хроническая фтористая интоксикация, ферменты**TOXIC ACTION OF SODIUM FLUORIDE IN EXPERIMENTAL FLUOROSIS****E.V. Ulanova, D.V. Fomenko, N.V. Kizichenko, T.K. Yadykina, E.N. Maslennikova***Research Institute of Complex Problems of Hygiene and Occupational Diseases SB RAMS, Novokuznetsk**It is shown that the metabolic disorders caused by chronic fluorine intoxication develop by stages. At early stages of development the mineral exchange is broken. In later terms fluoride effect is revealed at the system level.***Key words:** chronic fluorine intoxication, enzymes

Хронические интоксикации занимают одно из ведущих мест среди причин, вызывающих производственно обусловленные заболевания. Наиболее многочисленную группу с интоксикациями составляют рабочие алюминиевого производства, подвергающиеся длительному воздействию фтора, обуславливающего развитие профессионального флюороза, патогенез которого вызывает многочисленные суждения и споры. Поскольку фтор — жесткий лиганд по отношению ко многим минералам, в костях его соединение с кальцием и магнием — фтороапатит — замещает нормальный апатит, нарушая минеральный метаболизм, прежде всего в костной ткани. А потому общепризнанным на сегодняшний день является представление о действии фторидов точно на высокоминерализованные ткани и большинство исследователей исключают развитие висцеральных нарушений хронической фтористой интоксикации. Немногочисленные литературные данные по этому вопросу противоречивы, так как эффекты микроэлемента многоплановы и не могут быть охарактеризованы однозначно [1 — 5].

В этой связи **целью** наших исследований явилось экспериментальное изучение механизмов токсического действия на организм хронической фтористой интоксикации (ХФИ).

МЕТОДИКА

Эксперимент проводился на 60 нелинейных белых крысах-самцах массой 200 — 250 г, которые были разделены на 2 группы: 1 группа — интактные, 2 группа — животные с ХФИ, которую моделировали пассивным запаиванием фтористым натрием в дозе 10 мг/л в течение 3 месяцев.

Эксперимент проводился в соответствии с «Правилами проведения работ с использованием экспериментальных животных» (Приложение к

приказу Министерства здравоохранения СССР от 12.08.1977 года № 755).

Для характеристики основных метаболических нарушений определяли содержание фтора в моче ионоселективным методом на иономере «Анион 4100» (Россия) с использованием фтор-селективного электрода; кальция, и P_n в моче и плазме — колориметрическим методом с помощью наборов фирмы «Биокон» на фотометре РМ-5010 (Германия). Активность ферментов аланинаминотрансферазы (АЛТ), аспаратаминотрансферазы (АСТ), гаммаглутамилтранспептидазы (γ -ГТ), щелочной фосфатазы (ЩФ) и содержание общего белка, глюкозы определяли в негемолизированной сыворотке крови колориметрическим методом на фотометре РМ-5010 (Германия).

Исследование ферментативной активности кислой фосфатазы (КФ), щелочной фосфатазы (ЩФ), сукцинатдегидрогеназы (СДГ), альфаглицерофосфат-дегидрогеназы цитоплазматической и митохондриальной (α -ГФДГ цит., α -ГФДГ мит.), глутаматдегидрогеназы (ГДГ) проводили цитохимическим методом окрашивания с последующим микроскопическим описанием мазков крови (микроскоп MS-50, Австрия).

Компьютерная обработка данных осуществлялась программой «Multiscan Magic».

С-концевые телопептиды (фрагменты деградации коллагена I типа) в моче определяли с помощью твердофазного иммуноферментного анализа [ELISA] на Мультискане EX (Labsystems, Финляндия). Содержание сывороточного остеокальцина — иммуноферментным тестом набором Diagnostic System Laboratories на Мультискане EX (Labsystems, Финляндия).

Для гистологического исследования забирали фрагменты костной ткани и печени. Из этих органов вырезали кусочки, которые фиксировали 12 %

нейтральным формалином и подвергали парафиновой проводке: проводили через спирты возрастающей концентрации 70°, 80°, 96°, абсолютные. Костную ткань перед проводкой подвергали декальцинации. Далее материал пропитывали в смеси спирта и ксилола в равных соотношениях, ксилоле, в смеси ксилола и парафина при температуре 37 и 58 °С. Готовили срезы толщиной 5–7 микрометров. Депарафинированные срезы окрашивали гематоксилином и эозином по методу Ван-Гизона и исследовали под микроскопом.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Пусковым механизмом метаболических нарушений при ХФИ являлся сдвиг минерального обмена. Содержание фтора и кальция в моче у интактных крыс составило $1,8 \pm 0,2$ ммоль/л и $1,4 \pm 0,1$ ммоль/л соответственно. На ранних стадиях развития ХФИ (1–2 недели) наблюдалось увеличение фтора в 3 раза и снижение кальция в моче в 1,5 раза при сохранении фосфора неорганического на физиологическом уровне. С 3-й недели и на протяжении 4-й уровень белков и активность сывороточных ферментов: АЛТ, АСТ, ЩФ и γ -ГТ, — а также глюкозы сохранились в физиологических пределах (табл. 1).

На 5-й неделе происходило снижение фтора в моче при значительном повышении кальция и фосфора в 3,2 и 2 раза соответственно. Таким образом, в развитии фтористой интоксикации наблюдалась фазовость: компенсаторные взаимоотношения фтора, кальция и фосфора, очевидные на ранних стадиях интоксикации, нарушались в более поздние сроки ее развития. С 6-й недели наблюдалось повышение в моче всех трех показателей, что свидетельствует о нарушении минерального обмена и является иницирующим фактором перехода острого периода заболевания в хроническую форму. Содержание кальция, фосфора неорганического и фтора в моче 2 группы крыс к 9-й неделе превысили контрольные значения в 6,2, 2,5 и 9,5 раз соответственно. Усиленное выведение кальция с мочой свидетельствует о вымывании его из организма, прежде всего из

костной ткани. Это связано с тем, что отрицательно заряженный ион фтора атакует положительные ионы кальция, образуя слабо растворимую соль: CaF_2 , которая выводится из организма.

На 6-й неделе происходило поступательное увеличение активности ферментов: АЛТ, АСТ и ЩФ, сохранявшееся до 9-й недели, на фоне снижения γ -ГТ, что, вероятно, связано с напряжением функции печени, нарушением целостности гепатоцитов и переходом острого периода интоксикации к хроническому. На 9-й неделе затравки происходило увеличение в сыворотке альбумина и глюкозы, что свидетельствует об активации глюконеогенеза и использовании в качестве энергоресурсов белковых топливных молекул.

12-я неделя ХФИ сопровождалась снижением активности всех ферментных систем, за исключением АСТ, что свидетельствует о раскогласовании внутриклеточных метаболических процессов, истощении субстратных молекул и преобладании катаболических реакций в печени и неспособностью справиться со столь агрессивным лигандом как фтор.

С 9-й по 12-ую недели затравки отмечены морфологические изменения в печени: наблюдалось неравномерное кровенаполнение центральных вен, дисконплектация и гипертрофия гепатоцитов с умеренной зернистой дистрофией. Ядра клеток гиперхромные.

Нарушение минерального обмена сопровождалось и морфологическими изменениями, прежде всего в костной ткани: было обнаружено пери- и эндостальное разрастание кости, сужение костномозговой полости, утолщение кортикального слоя кости, границы между ним и губчатым веществом стерты, неравномерное распределение остеонов, которые плохо дифференцировались, гаверсовы каналы либо были сужены, либо расширены. Основное вещество кости окрашивалось неравномерно. Костные балки также неравномерной толщины, между ними располагалась миелоидная ткань. В надкостнице обнаруживались скудные лимфолейкоцитарные инфильтраты.

Таблица 1

Биохимические показатели сыворотки крови в условиях ХФИ

Показатель	Контроль n = 10	Хроническая фтористая интоксикация				
		1 неделя n = 10	3 неделя n = 10	6 неделя n = 10	9 неделя n = 10	12 неделя n = 10
АЛТ (Е/л)	39,1 ± 2,6	39,2 ± 1,61	35,5 ± 1,40	56,2 ± 1,25**	80,8 ± 4,39***	49,2 ± 1,83**
АСТ (Е/л)	151,3 ± 18,2	156,3 ± 7,9	139,4 ± 4,2	188,2 ± 15,3*	185,8 ± 6,2*	198,8 ± 10,1*
ЩФ (Е/л)	436,0 ± 31,0	416,8 ± 46,9	502,4 ± 29,7	711,0 ± 24,8***	703,1 ± 69,8**	367,5 ± 28,9
γ -ГТ (Е/л)	7,0 ± 3,6	–	7,6 ± 0,38	6,3 ± 0,01*	4,46 ± 0,43***	4,38 ± 0,25***
Общий белок (г/л)	71,4 ± 3,2	73,2 ± 4,0	67,1 ± 2,1	78,7 ± 2,1*	70,3 ± 1,7	70,1 ± 1,8
Альбумин (г/л)	33,6 ± 1,1	33,2 ± 1,1	28,3 ± 1,2*	31,5 ± 0,7*	37,7 ± 0,8*	34,1 ± 2,1
Глюкоза (моль/л)	5,7 ± 0,4	5,5 ± 0,5	5,4 ± 0,2	6,1 ± 0,4	8,9 ± 0,5***	6,7 ± 0,4

Примечания: * – достоверные отличия данных по отношению к контрольной группе при $p \leq 0,05$; ** – $p \leq 0,01$; *** – $p \leq 0,001$.

Морфологические изменения костной ткани были отмечены на фоне метаболических, которые проявились в нарушении баланса между процессами остеосинтеза и остеорезорбции на 6-й неделе интоксикации. Наиболее информативными их маркерами являются С-концевые телопептиды мочи и остеокальцин сыворотки. ХФИ сопровождалась значительным повышением уровня продуктов деградации коллагена в моче животных — С-концевых телопептидов в 2,5 раза и уровня неколагенового белка костной ткани — остеокальцина в 3,2 раза в сыворотке, — свидетельствующем о нарушении баланса между остеосинтезом и остеорезорбцией, с преобладанием последней.

Таким образом, нарушение минерального обмена и морфологические изменения костной ткани и печени подтверждают тезис об избирательном действии избыточных доз фторидов на высокоминерализованные ткани, прежде всего, костную. Дальнейшая затравка фторидом сопровождалась переходом ХФИ в хроническую стадию и системными нарушениями, опосредованными повреждающим действием фтора на ферментные системы различных уровней.

Начиная с 6-й недели затравки обнаружена относительная резистентность к фтору системы окислительного фосфорилирования: активность СДГ — основного маркера активности митохондрий, оказалась одинаковой у контрольной и группы с ХФИ, что свидетельствует о достаточном энергетическом потенциале ведущего метаболического цикла — цикла Кребса. Дополнительным подтверждением является сохранность в организме фосфора неорганического, который, видимо, не затребованный в макроэргических связях, начинает патологически теряться только с 9-й недели. При изучении ферментного профиля лейкоцитов было выявлено снижение активности α -глицерофосфатного шунта и особенно его цитоплазматического компонента. ХФИ сопровождалась снижением активности ГДГ на 18 %. Вероятно, фтор, как активный галоген, ингибирует активность ГДГ и, как следствие, малое количество кетоглутарата используется в цикле Кребса, что подтверждается снижением α -ГФДГ.

Сведения об авторах:

Учреждение Российской академии медицинских наук Научно-исследовательский институт комплексных проблем гигиены и профессиональных заболеваний Сибирского отделения РАМН (НИИ КПГПЗ СО РАМН): 654041, Кемеровская область, г. Новокузнецк, ул. Кутузова, 23, тел. (3843) 796-979(3843)796-669, e-mail: nvkzgig@nvkz.kuzbass.net.

Уланова Евгения Викторовна, старший научный сотрудник лаборатории экспериментальных гигиенических исследований, к.б.н., доцент.

Фоменко Диана Валериевна, старший научный сотрудник лаборатории экспериментальных гигиенических исследований, к.б.н., доцент.

Кизиченко Наталья Викторовна, старший научный сотрудник лаборатории экспериментальных гигиенических исследований, к.б.н., доцент.

Ядыкина Татьяна Константиновна, м.н.с. лаборатории популяционной генетики.

Масленникова Елена Николаевна, м.н.с. лаборатории экспериментальных гигиенических исследований.

В ходе эксперимента выявлено повышение активности ЩФ на 37 %. ЩФ служит биохимическим маркером фосфорно-кальциевого обмена в костной ткани и состояния остеобластов. Выявленное в работе угнетение активности КФ, влияет на изменение активности остеобластов и процессы оссификации.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, анализ результатов свидетельствует о влиянии избытков поступления фтора не только на высокоминерализованные ткани, но и на мягкие ткани, то есть дает основание признать тезис о системном уровне действия избытка фтора, которое опосредовано, видимо, через влияние его на ферменты гликолиза, в том числе и окислительного фосфорилирования, а через них на синтез АТФ и далее на все энергозависимые процессы [1, 3, 4]. Механизм токсического действия избыточных доз фтора обусловлен длительностью интоксикации: на ранних стадиях нарушения носят избирательный характер, а в более поздние сроки — на организм в целом.

ЛИТЕРАТУРА

1. Давыдова Е.В. Периферическая вегетативная регуляция пейсмекерной активности синусового узла сердца при хронической профессиональной интоксикации соединениями марганца и фтора: автореф. дис. ... канд. мед. наук / Е.В. Давыдова. — Пермь, 2003. — 23 с.

2. Клинико-рентгенологическая диагностика и классификация профессионального флюороза / Е.П. Жовтяк [и др.] // Мед. труда и пром. экология. — 2000. — № 3. — С. 17–20.

3. Лукьянова М.В. Влияние длительного воздействия фторидов на развитие ишемической болезни сердца у металлургов алюминиевого производства: автореф. дис. ... канд. мед. наук / М.В. Лукьянова. — Новосибирск, 2002. — 20 с.

4. Разумов В.В. Флюороз как проявление преждевременного старения и атаксического остеогенеза: монография / В.В. Разумов. — Новокузнецк, 2003. — 120 с.

5. Франке Ю. Остеопороз: монография / Ю. Франке, Г. Рунге. — М., 1995. — 304 с.