

ВЗАИМОСВЯЗИ МЕЖДУ КОЛИЧЕСТВОМ И ПАРАМЕТРАМИ РАСПРЕДЕЛЕНИЯ ОБЪЕМОВ ЛЕЙКОЦИТОВ КРЫС ПРИ ВОЗДЕЙСТВИИ МЕДНО-ЦИНКОВОЙ КОЛЧЕДАННОЙ РУДЫ

Аюпова А.Р.¹, Зиякаева К.Р.¹, Каюмова А.Ф.¹, Шамратова В.Г.¹, Самоходова О.В.¹, Фазлыахметова М.Я.¹

¹ФГБОУ ВО «Башкирский государственный медицинский университет» Минздрава России, Уфа, e-mail: klazia@yandex.ru

При добыче медно-цинковых колчеданных руд образуется рудничная пыль, которая находится во взвешенном состоянии и содержит в составе тяжёлые металлы, такие как кадмий, ртуть, свинец, селен, мышьяк и другие. Данная пыль может проникать в организм с пищевыми продуктами, с водой и атмосферным воздухом. Изучение механизмов ответной реакции организма на действие рудничной пыли требует детального изучения, в особенности ее действие на центральное звено иммунитета – лейкоциты. Это позволит выявить риск развития заболеваний у работников горнодобывающей промышленности. Цель работы заключалась в изучении взаимосвязи между количественными и корпускулярными показателями лейкоцитов крови крыс в динамике воздействия медно-цинковой колчеданной руды. Работа была выполнена на 48 беспородных крысах-самцах в возрасте 3–4 мес., массой $210,5 \pm 10,5$ г. Крысам опытной группы перорально вводили водную суспензию руды в дозе 600 мг/кг массы тела. По условию эксперимента крысы были разделены на группы в зависимости от срока интоксикации: в первую группу вошли контрольные крысы, не получавшие медно-цинковую колчеданную руду, вторую группу составили крысы, получавшие руду в течение 10 суток, третью – в течение 20 суток, четвертую – в течение 30 суток. Исследование периферической крови проводили с помощью гематологического анализатора Vet Exigo 19 (Швеция). В результате проведенного эксперимента установлено, что в норме регуляция состава клеточных популяций по объему у лейкоцитов разных типов осуществляется относительно однотипно и независимо от количества клеток в сосудистом русле. Влияние медно-цинковой колчеданной руды на взаимоотношения количественных и морфофункциональных характеристик лейкоцитов проявляется на 20-е и 30-е сутки эксперимента только у гранулоцитов.

Ключевые слова: лейкоциты, гранулоциты, моноциты, лимфоциты, медно-цинковая колчеданная руда, тяжелые металлы, крысы, объем клеток.

RELATIONSHIPS BETWEEN THE NUMBER AND VOLUME DISTRIBUTION PARAMETERS OF RAT LEUKOCYTES DURING EXPOSURE TO COPPER-ZINC PYRITE ORE

Ayupova A.R.¹, Ziyakaeva K.R.¹, Kayumova A.F.¹, Shamratova V.G.¹, Samokhodova O.V.¹, Fazluakhmetova M.Ya.¹

¹Bashkir State Medical University Ministry of Health of Russia, Ufa, e-mail: klazia@yandex.ru

During the extraction of copper-zinc pyrite ores, mine dust is formed, which is suspended and contains heavy metals such as cadmium, mercury, lead, selenium, arsenic and others. This dust can enter the body with food, water and atmospheric air. The mechanisms of the body's response to mine dust need to be studied in detail, in particular its effect on the central immune system, the leukocytes. This will make it possible to identify the risk of disease development in mining workers. The aim of the work was to study the relationship between quantitative and corpuscular indices of rat leukocytes in dynamics of exposure to copper-zinc pyrite ore. The work was performed on 48 mongrel male rats aged 3-4 months, weight 210.5 ± 10.5 g. The rats of the experimental group were orally administered an aqueous suspension of the ore at a dose of 600 mg/kg of body weight. According to the experimental conditions, the rats were divided into groups depending on the intoxication period: the first group included control rats that did not receive copper-zinc-ferrous ore, the second group consisted of the rats that received the ore within 10 days, the third group - within 20 days, the fourth group - within 30 days. Peripheral blood tests were performed using a Vet Exigo 19 (Sweden) hematological analyser. As a result of the experiment, the regulation of cell population volume composition in leucocytes of different types was found to be relatively uniform and independent of the number of cells in the vascular bed. The effect of copper-zinc-containing pyrite ore on relations of quantitative and morphofunctional characteristics of leukocytes is shown on day 20 and 30 of the experiment only in granulocytes.

Keywords: leukocytes, granulocytes, monocytes, lymphocytes, copper-zinc pyrite ore, heavy metals, rats, cell volume

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Изучение влияния на организм медно-цинковой колчеданной руды (МЦКР) является чрезвычайно важным для Республики Башкортостан, так как в регионе функционируют крупные производства горнодобывающей промышленности, к которым относится ОАО «Учалинский горно-обогатительный комбинат» (УГОК). Медно-цинковые колчеданные руды (МЦКР) кроме основных металлов, таких как медь, цинк и сера, содержат тяжёлые металлы и токсичные элементы: кадмий, ртуть, свинец, селен, мышьяк и другие. Они находятся в составе рудничной пыли, которая образуется в процессе ведения горных работ и находится во взвешенном состоянии. Данная пыль может оседать на поверхности и проникать в организм в основном с пищевыми продуктами, с водой и атмосферным воздухом [1]. Действие МЦКР может оказывать на организм комбинированное воздействие, уменьшая устойчивость различных клеток за счет окислительного повреждения мембран, модифицируя скорость метаболических процессов ферментов, вызывая мутации генов, некроз и апоптоз клеток [2-5].

Одним из наиболее широко используемых лабораторных исследований, позволяющих быстро оценить состояние организма, является общий анализ крови. Различные изменения состава периферической крови имеют важное диагностическое значение и могут быть использованы при диагностике состояния здоровья работников горно-обогатительной промышленности. Особый интерес представляет изучение влияния МЦКР на лейкоциты, так как они составляют основное звено крови, защищающее организм от воздействия внешних и внутренних факторов. Однако изучению этой проблемы посвящены лишь единичные исследования [6-9]. При этом анализировались преимущественно количественные параметры лейкоцитов.

Целью исследования явилось изучение взаимосвязей между количественными и корпускулярными показателями лейкоцитов в динамике воздействия медно-цинковой колчеданной руды на организм крыс.

Материал и методы исследования

Экспериментальное исследование проводили на 48 белых беспородных крысах-самцах в возрасте 3–4 мес., массой $210,5 \pm 10,5$ г. Опытной группе крыс перорально вводили водную суспензию руды в дозе 600 мг/кг массы тела [10]. В исследуемом образце руды доля свинца и кадмия составила 0,060% и 0,09% соответственно. По условию эксперимента крысы были разделены на группы, в зависимости от срока интоксикации: в первую группу вошли контрольные крысы, не получавшие МЦКР, вторую группу составили крысы, получавшие МЦКР в течение 10 суток, третью – в течение 20 суток, четвертую – в течение 30 суток. Образец руды был выделен УГОК (г. Учалы). Измерения показателей крови проводили на

ветеринарном полуавтоматическом гематологическом анализаторе Vet Exigo 19 (Швеция), на котором определяли: общее количество лейкоцитов (WBC), абсолютное количество лимфоцитов (LYM), моноцитов (MONO) и гранулоцитов (GRAN).

При проведении исследования соблюдали принципы гуманности, изложенные в директивах Европейского сообщества (86/609/ЕЕС) и Хельсинкской декларации, в соответствии с «Правилами проведения работ с использованием экспериментальных животных» и рекомендациями о соблюдении биоэтических норм биоэтического совета ФГБОУ ВО «Башкирский государственный медицинский университет» Минздрава России. Животные содержались в стандартных клетках в условиях свободного доступа к питью и еде при температуре воздуха в виварии 24 ± 2 °С в соответствии с правилами СП 2.2.1.3218 и с Директивой 2010/63/EU по охране животных, используемых в научных целях. Все болезненные манипуляции с животными при взятии периферической крови и эвтаназии животных путем декапитации проводили под эфирным наркозом в отдельном от вивария помещении.

Статистическую обработку полученных данных проводили в русифицированной лицензионной программе Statistica 12 (StatSoft, США). С помощью описательной статистики рассчитывали следующие показатели: медиану распределения клеток по объему (Me), SD, As и Ex распределения клеток. Оценку связей учтенных показателей осуществляли с помощью факторного анализа, достоинство использования которого заключалось в возможности по структуре выделенных факторов получить объективную информацию о характере и динамике взаимоотношений количественных и корпускулярных параметров в ходе эксперимента.

На основе выдаваемых прибором гистограмм распределения клеток по объему в популяциях однотипных клеток после расшифровки осей кривых были составлены интервальные вариационные ряды данных и рассчитаны средние объемы гранулоцитов (MGV), моноцитов (MMV), лимфоцитов (MLV). Дополнительную информацию об особенностях популяции лейкоцитов можно получить, количественно оценивая параметры, характеризующие форму распределения этих клеток по объему: стандартное отклонение (SD), коэффициент асимметрии (As), коэффициент эксцесса (Ex) лейкограмм.

По коэффициенту асимметрии принято судить о соотношении в общей популяции долей клеток с разным объемом. Положительная As свидетельствует о преобладании в общей массе лейкоцитов с пониженным объемом, отрицательная – с повышенным. Коэффициент эксцесса является показателем гетерогенности популяции: при положительном Ex совокупность характеризуется относительной однородностью клеток, соответственно, отрицательная – повышенным разнообразием. Стандартное отклонение описывает ширину распределения гистограмм, что с физиологических позиций можно рассматривать как

анизоцитоз лейкоцитов. При возрастании SD наблюдается увеличение анизоцитоза, то есть повышение в популяции клеток с резко отличающимися от средней величины размерами.

Результаты исследования и их обсуждение

На основе матриц корреляций показателей всех типов лейкоцитов (количественные и корпускулярные характеристики) для каждой опытной группы было сформировано по два фактора (F1, F2), совместно описывающих 65-80% общей дисперсии (таблица).

Факторные матрицы параметров клеток белой крови

Показатель	Контроль		Опытная группа 10 дней		Опытная группа 20 дней		Опытная группа 30 дней	
	F1	F2	F1	F2	F1	F2	F1	F2
MLV, фл.		0,80			0,86		0,90	
SD LYM, фл.	0,92		0,73		0,98		0,82	
As LYM (y.e.)	0,94		0,94		0,86			0,90
Ex LYM (y.e.)		-0,71		-0,89		0,91	-0,85	
LYM (x10 ⁹ клеток/л)								
Дисперсия, %	53	27	44	23	50	34	49	30
MGV, фл.	-0,94		-0,89			0,83		-0,85
SD GRAN, фл.	0,91		0,92			-0,81		-0,79
As GRAN (y.e.)	0,80		0,80		-0,89		-0,98	
Ex GRAN, (y.e.)	-0,87			0,88	-0,91		-0,88	
GRAN (x10 ⁹ клеток/л)		0,95			-0,70		-0,74	
Дисперсия, %	64	19	48	27	44	36	55	27
MMV, фл.	0,99		0,94		-0,96			
SD MONO, фл.	0,99		0,98		-0,97		-0,80	
As MONO (y.e.)				-0,97		0,95	-0,94	
Ex MONO (y.e.)	0,94		0,95		-0,78			

MONO ($\times 10^9$ клеток/л)		-0,82						-0,72
Дисперсия, %	61	24	59	28	55	25	37	29

Примечание: приведены только достоверные факторные нагрузки – коэффициенты корреляции признаков с факторами ($p < 0,05$).

При анализе связей показателей лимфоцитов было установлено, что в контроле фактор F1 состоял из параметров, характеризующих состояние популяции (A_s , SD). При этом увеличение ширины распределения сопровождалось сдвигом вершины гистограммы влево. С физиологической точки зрения такие взаимоотношения означают, что чем больше возрастал диапазон варьирования клеток, тем больше накапливались в сосудистом русле мелкие клетки. Уменьшение дисперсии, напротив, сочеталось со смещением вершины в область высоких значений показателя, свидетельствуя об увеличении доли крупных клеток по мере снижения анизоцитоза. Фактор F2, включавший показатели MLV и E_x , характеризовал варьирование среднего объема клеток путем изменения неоднородности популяции.

В опытной группе на 10-е сутки эксперимента воздействия МЦКР фактор F1 имел структуру, аналогичную контрольной, фактор F2 описывал независимое варьирование показателя E_x . В опытных группах 20- и 30-дневного этапов эксперимента ведущий фактор (F1) контролировал взаимосвязи показателей состава популяции со средними величинами объема. В обеих группах средний объем лимфоцитов возрастал параллельно с увеличением размаха колебания признака. На 20-е сутки воздействия МКЦР система связей была дополнена корреляцией между MLV и A_s . На 30-е сутки эта связь перестала быть статистически значимой, однако появилась отрицательная корреляция показателей MLV и SD с коэффициентом E_x , которая объясняла влияние степени гетерогенности популяции лимфоцитов на средние размеры клеток (таблица).

Фактор 1 контрольной группы, характеризующий состояние популяции гранулоцитов, включал параметры распределения и среднюю величину объема. Показатель MGV повышался при условии преобладания в популяции доли крупных клеток на фоне увеличения однородности популяции (возрастание E_x и снижение SD).

На 10-е сутки воздействия МЦКР F1 также координировал изменения показателя MGV путем перераспределения клеток в популяции: возрастание их среднего объема обусловлено относительным приростом крупных клеток и уменьшением анизоцитоза. Фактор F2 состоял из показателя E_x .

На 20-е и 30-е сутки факторные структуры были практически однотипны, но существенно отличались от картины контрольной и опытной группы на 10-е сутки. В эти сроки определялась четкая взаимосвязь параметров распределения (A_s и E_x) с количеством

клеток (F1). Учитывая знаки переменных к фактору, можно заключить, что с уменьшением количества клеток в циркуляции увеличивалась доля крупных клеток и уменьшалась однородность популяции. В завершение срока эксперимента воздействия МЦКР (30-е сутки) показатель MGV коррелировал только с дисперсией F2. Фактор F2 свидетельствовал об уменьшении среднего объема гранулоцитов при уменьшении физиологического анизоцитоза.

При оценке моноцитарного звена выяснилось, что в контрольной группе фактор F1 объяснял сопряженное варьирование размера клеток и степени однородности популяции (Eх и SD). При снижении анизоцитоза и однородности популяции показатель MMV уменьшался. Фактор F2 описывал независимые вариации количества клеток.

В опытных группах на 10-е и 20-е сутки была выявлена картина, сходная со структурой связей в контроле: фактор F1 связывал средние размеры клеток с однородностью популяции; в этих группах фактор F2 включал показатель As. Характер распределения моноцитов на 30-е сутки существенно отличался от исходного состояния и от предыдущих сроков эксперимента. В сферу действия фактора F1 не входили параметры, влияющие на размер клеток.

Таким образом, при анализе факторных структур было установлено, что параметры распределения, средний объем и количество клеток варьировали согласованно. Однако степень и характер взаимодействия этих показателей у лейкоцитов разных типов различались в зависимости от сроков интоксикации крыс рудой. В норме (в контроле) выделенный для всех типов лейкоцитов по сути однотипный фактор (F1) регулировал состояние популяции клеток по их среднему объему, соотношению субпопуляций и степени анизоцитоза. Под влиянием МЦКР в первый период исследования (10-е сутки) существенных перемен в системе корреляции не происходило. Позднее, начиная с 20-х суток интоксикации, наблюдалась перестройка структуры популяции, различающаяся у лейкоцитов разных типов. У лимфоцитов формировались связи, указывающие на усиление вклада степени гетерогенности популяции в варьирование их среднего объема. У моноцитов структура популяции на 20-е сутки практически не отличалась от картины контроля и начала эксперимента.

Что касается гранулоцитов, на 20-е и 30-е сутки под влиянием МЦКР выявилась связь особенностей состава популяции с их количеством. По мере снижения количества циркулирующих в крови клеток в сосудистом русле увеличивалась доля более крупных лейкоцитов при сохранении однородности распределения. Взаимосвязи между количеством лейкоцитов и их объемом были продемонстрированы также в периферической крови человека [11]. Считается, что молодые клетки крупнее, чем клетки, которые находятся долгое время в сосудистом русле. Можно допустить, что относительное преобладание крупных клеток при уменьшении их количества в сосудистом русле обусловлено активацией миелопоэза. Так, в литературе приводятся сведения о стимуляции процесса созревания миелоидных и

лимфоидных ростков в красном костном мозге под влиянием наночастиц золота [12]. В свою очередь в популяциях моноцитов и лимфоцитов корреляции между количеством клеток и параметрами их распределения по объему были статистически незначимы. Судя по картине изменений факторных структур показателей лейкоцитов разных типов под влиянием МЦКР, в наибольшей степени модифицируется система корреляций параметров гранулоцитов. В отличие от клеток других видов в регуляцию баланса соотношений клеток по объему существенный вклад вносит изменение количества циркулирующих клеток.

Выводы

1. В норме регуляция состава клеточных популяций по объему у лейкоцитов разных видов осуществляется относительно однотипно и независимо от количества клеток в сосудистом русле.
2. Влияние медно-цинковой колчеданной руды на взаимоотношения количественных и морфофункциональных характеристик лейкоцитов проявляется на 20-е и 30-е сутки эксперимента только у гранулоцитов.

Список литературы

1. Рафиков С.Ш., Сулейманов Р.А., Валеев Т.К. Влияние предприятий горнорудной промышленности на состояние окружающей среды и здоровье населения (обзор литературы) // Медицина труда и экология человека. 2021. № 3. С. 62-75. DOI: 10.24412/2411-3794-2021-10305.
2. Fu Z., Xi S. The effects of heavy metals on human metabolism // Toxicol. Mech. Methods. 2020. Vol. 30, №3. P. 167-176. DOI: 10.1080/15376516.2019.1701594.
3. Kim J.J., Kim Y.S., Kumar V. Heavy metal toxicity: An update of chelating therapeutic strategies // J. Trace Elem. Med. Biol. 2019. Vol. 54. P. 226-231. DOI: 10.1016/j.jtemb.2019.05.003.
4. Hryntsova N., Hodorová I., Mikhaylik J., Romanyuk A. A Response of the Pineal Gland in Sexually Mature Rats under Long-term Exposure to Heavy Metal Salts // Prague Med. Rep. 2022. Vol. 123, № 4. P. 225-242. DOI: 10.14712/23362936.2022.21.
5. Huat T.J., Camats-Perna J., Newcombe E.A. Metal Toxicity Links to Alzheimer's Disease and Neuroinflammation // J. Mol. Biol. 2019. Vol. 431, № 9. P. 1843-1868. DOI: 10.1016/j.jmb.2019.01.018.
6. Рыбьянов Ж.С., Дерхо М.А. Сопряженность уровня тяжелых металлов с количеством лейкоцитов в организме коров // Ученые записки Казанской государственной академии ветеринарной медицины им. Н.Э. Баумана. 2019. № 6. P. 198-204.

7. Huang C.H., Hsieh C.Y., Wang C.W., Tu H.P., Chen S.C., Hung C.H. Associations and Interactions between Heavy Metals with White Blood Cell and Eosinophil Count // *Int. J. Med. Sci.* 2022. Vol. 19, № 2. P. 331-337. DOI: 10.7150/ijms.68945.
8. Mitra S., Chakraborty A.J., Tareq A.M., Emran T.B., Nainu F., Khusro A., Abubakr M. Idris, Khandaker M.U., Osman H., Alhumaydhi F.A., Simal-Gandara J. Impact of heavy metals on the environment and human health: Novel therapeutic insights to counter the toxicity // *J King Saud University – Science.* 2022. № 34. P. 101865. DOI: 10.1016/j.jksus.2022.101865.
9. Аюпова А. Р., Зиякаева К. Р., Каюмова А. Ф., Шамратова В.Г., Самоходова О.В., Фазлыяхметова М.Я. Влияние медно-цинковой колчеданной руды на объемные характеристики лейкоцитов в эксперименте // *Современные проблемы науки и образования.* 2022. № 5. URL: <https://science-education.ru/ru/article/view?id=32136> (дата обращения: 12.04.2023). DOI: 10.17513/spno.32136.
10. Зиякаева К.Р., Каюмова А.Ф., Шамратова В.Г. Дизрегуляторные сдвиги в системе красной крови при длительной интоксикации медно-цинковой колчеданной рудой (экспериментальное исследование) // *Мед. труда и пром. экол.* 2021. Т. 61, № 4. P. 224–230. DOI: 10.31089/1026-9428-2021-61-4-224-230.
11. Шамратова В.Г., Тупиневич Г.С. Гендерные особенности соотношения объема и количества клеток крови // *Морфология.* 2019. Т. 155, № 2. С. 322.
12. Фирсова С.С., Бучарская А.Б., Маслякова Г.Н., Злобина О.В., Матвеева О.В., Бугаева И.О. Изменение морфологических показателей костного мозга и периферической крови при длительном воздействии золотых наночастиц // *Известия Саратовского университета.* 2011. № 2. С. 5-57.