

ИССЛЕДОВАНИЕ ЖИЗНЕСПОСОБНОСТИ КЛЕТОК ПРИ ВОЗДЕЙСТВИИ АЦЕТАТА СВИНЦА НА ОРГАНИЗМ КРЫСЫ

¹Мельникова Н.А., ¹Шубина О.С., ¹Дуденкова Н.А., ¹Лапшина М.В., ¹Лиференко О.В.,
¹Тимошкина О.И.

¹ФГБОУ ВПО «Мордовский государственный педагогический институт им. М.Е. Евсевьева», Саранск, Россия (430007, г. Саранск, ул. Студенческая, 11 А), e-mail: mgpi@moris.ru

Свинец является одним из основных и опасных антропогенных загрязнителей окружающей среды, обладающих политропным действием. С помощью метода окраски трипановым синим установлено снижение жизнеспособности эритроцитов крови и повышение их агрегационных свойств при воздействии ацетата свинца. Влияние ацетата свинца на продуктивность семенных желез самцов белых крыс исследовали с помощью автоматического счетчика клеток Countess™. Показано уменьшение общей концентрации сперматозоидов в эякуляте, концентрации живых сперматозоидов, а также их жизнеспособности соответственно. Впервые экспериментально определены уровни разведения семенной жидкости для анализа. Полученные результаты могут быть использованы в процессе быстрой диагностики последствий ацетата свинца на организм.

Ключевые слова: кровь, эритроциты, эпидидимис (придаток семенника), эякулят, сперматозоиды, ацетат свинца.

A STUDY OF THE VIABILITY OF CELLS WHEN EXPOSED TO LEAD ACETATE ON THE ORGANISM OF RATS

¹Melnikova N.A., ¹Shubina O.S., ¹Dudenkova N.A., ¹Lapshina M.V., ¹Liferenko O.V.,
¹Timoshkina O.I.

¹Mordovian State Pedagogical Institute named after M.E. Evsevjev, Saransk, Russia (430007, Saransk, Studencheskaya Street, 11 A), e-mail: mgpi@moris.ru

Lead is one of the major and dangerous anthropogenic pollutants of the environment with polytropic effect. Using the method of painting trypan blue established a reduction in the viability of red blood cells and increase their aggregation properties when exposed to lead acetate. Influence of lead acetate on the productivity of the seminal glands male white rats was investigated using automatic meter cells Countess™. Shows a decrease in the total concentration of sperm in the ejaculate, concentration of live sperm and their viability, respectively. For the first time experimentally determined levels of cultivation in the seminal fluid analysis. The results can be used in the process of rapid diagnostic effects of lead acetate on the body.

Keywords: blood, erythrocytes, epididymis (appendage testis), ejaculate, spermatozoa, lead acetate.

Введение

Свинец является одним из основных и опасных антропогенных загрязнителей окружающей среды, обладающих политропным действием. Он воздействует на многие клетки и ткани организма. Одной из первых на такую интоксикацию реагирует кровь [5]. Также ранее нами было установлено отрицательное влияние свинца на морфофункциональное состояние мужской и женской репродуктивных систем, на течение беременности и развитие плода [1; 3; 4]. В дальнейших экспериментах была сделана попытка установить, как влияет ацетат свинца на жизнеспособность клеток организма.

Как известно, продолжительность жизни высокоспециализированных клеток многоклеточного организма ограничена. Их гибель происходит естественным путем, за счет процессов апоптоза. В результате воздействия неблагоприятных факторов на

клеточном уровне развиваются патологические процессы, характерные для некроза, и количество жизнеспособных клеток в тканях и жидкостях организма может существенно снижаться. Установление подобного факта может быть прямым и точным доказательством негативного воздействия изучаемого фактора на организм.

Вместе с тем в доступной литературе, при наличии разнообразных исследований по влиянию свинца на клетки и ткани организма, отсутствуют данные о прямом влиянии свинца на их жизнеспособность. Возникшие противоречия можно объяснить тем, что до относительно недавнего времени исследователям приходилось определять уровень жизнеспособности клеток жидких тканей и культур под микроскопом, что является трудоемкой операцией, не всегда дающей достоверные данные из-за незначительных размеров объектов исследования и особенностей самого исследования. Возможность использования современного оборудования научно-образовательного центра «Естественно-научное образование» позволило решить эту проблему и обеспечило валидность результатов исследования [2].

В связи с вышеизложенным **целью** эксперимента явилось изучение влияния острой интоксикации под действием ацетата свинца на жизнеспособность клеток тканей организма и установление возможности использования полученных данных в диагностике уровня свинцовой интоксикации.

Материалы и методы исследования

Экспериментальные исследования проводились на 50 белых беспородных половозрелых крысах-самцах массой 200-250 г. Контрольную группу составили 20 животных, находившихся на общем режиме вивария. Опытную группу составили 30 крыс, находившихся на общем режиме вивария и получавших в течение 7 дней перорально ацетат свинца $Pb(CH_3COO)_2 \cdot 3H_2O$ в дозе 45 мг/кг/сутки.

Животные забивались путем декапитации под наркозом смеси эфира с хлороформом (1:1) с соблюдением принципов гуманности, изложенных в директивах Европейского сообщества (86/609/ЕЕС) и Хельсинкской декларации, и в соответствии с требованиями правил проведения работ с использованием экспериментальных животных.

Материалом исследования служили кровь, забранная из сердца шприцом с антикоагулянтом гепарином (30 IU/мл крови), и эякулят, полученный из хвостовой части продольно вскрытого и освобожденного от жира эпидидимиса (придатка семенника).

Влияние ацетата свинца на жизнеспособность клеток оценивали по следующим показателям:

- 1) общая концентрация клеток;
- 2) концентрация живых клеток;

- 3) концентрация мертвых клеток;
- 4) жизнеспособность клеток (% живых клеток от их общего количества).

Для определения вышеперечисленных показателей смесь образцов материала и физраствора (1:4) окрашивали трипановым синим на предметном стекле и исследовали с помощью автоматического счетчика клеток Countess™ (Invitrogen, США).

Живые клетки трипановый синий окрашивает по краям, мертвые – однородно по всей клетке.

Фотосъемку препаратов производили при помощи встроенной цифровой камеры при увеличении 100×2,3.

Разрешение полученных изображений – 2048×1536 пикселей.

Статистическая обработка цифровых данных проводилась с помощью программ FStat и Excel. Проверка статистических гипотез осуществлялась по t-критерию Стьюдента. При оценке статистических гипотез принимались следующие уровни значимости: $p \leq 0,05$.

Математическая обработка результатов морфометрических исследований проводилась с использованием метода корреляционного анализа.

Результаты исследования и их обсуждение

Система крови, как внутренняя среда организма, одновременно активно участвующая в сохранении его гомеостаза, откликается одной из первых на внешние воздействия, в том числе и на соединения свинца.

При проведении исследований по оценке жизнеспособности эритроцитов крови контрольных животных было установлено, что они располагаются свободно в толще плазмы, не агрегированы (рис. 1).

После 7 дней воздействия ацетата свинца в крови опытных животных наблюдалась большая склонность эритроцитов к образованию агрегатов по типу «монетных столбиков» (рис. 2).

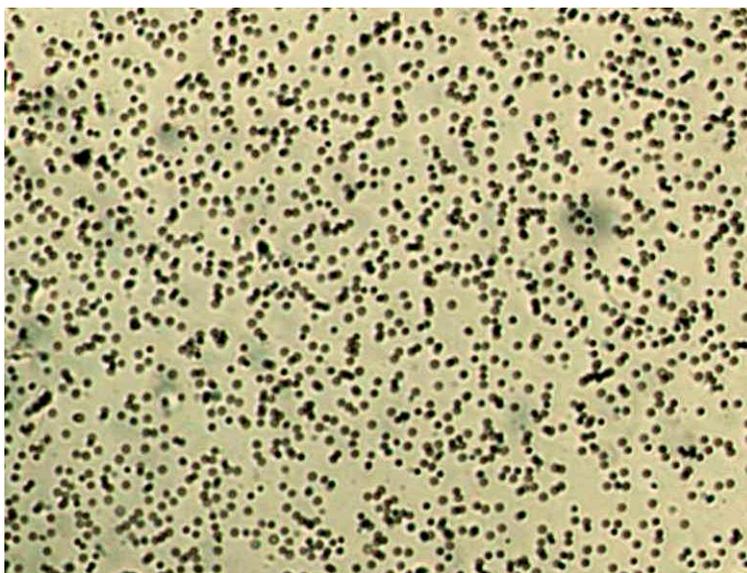


Рис. 1. Эритроциты в плазме крови белых крыс (контроль).
Окраска трипановым синим. Ув. 100×2,3.

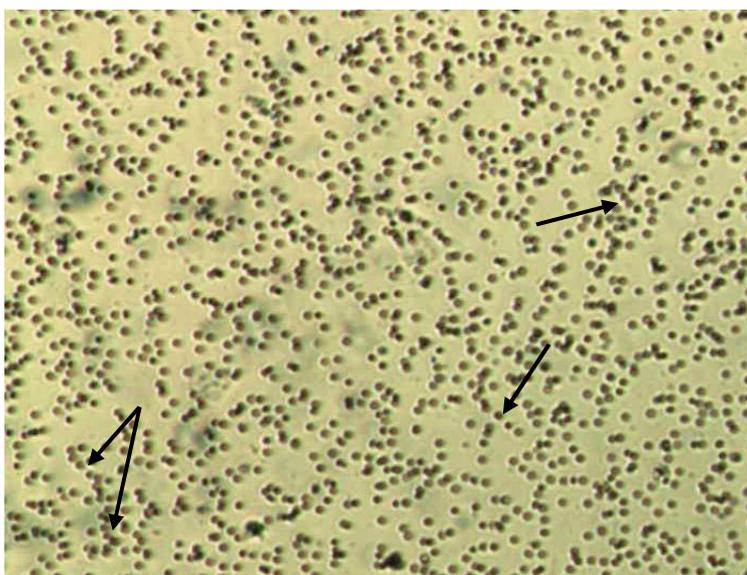


Рис. 2. Эритроциты в плазме крови белых крыс (опыт). Стрелкой показаны
«монетные столбики» из эритроцитов. Окраска трипановым синим. Ув. 100×2,3.

Морфометрические исследования показали, что в опытной группе животных по сравнению с контролем происходит достоверное уменьшение концентрации живых эритроцитов в крови и их жизнеспособности соответственно на 32,64% ($P \leq 0,01$) и 34,72% ($P \leq 0,01$). Одновременно с этим происходит увеличение общей концентрации эритроцитов в крови, а также концентрации мертвых эритроцитов в крови соответственно на 8,74% ($P \leq 0,01$) и 79,90% ($P \leq 0,001$) (табл. 1).

Таблица 1

Количественные и качественные показатели эритроцитов в крови самцов белых крыс

№ п/п	Показатель	Контроль	Опыт
1	Общая концентрация эритроцитов в крови, $\times 10^9$ /мл	4,28 \pm 0,15	4,69 \pm 0,17*
2	Концентрация живых эритроцитов в крови, $\times 10^9$ /мл	3,86 \pm 0,13	2,60 \pm 0,11*
3	Концентрация мертвых эритроцитов в крови, $\times 10^9$ /мл	0,42 \pm 0,08	2,09 \pm 0,12**
4	Жизнеспособность эритроцитов, %	90,17 \pm 2,25	55,45 \pm 1,79*

Примечание: * – $P \leq 0,01$ по сравнению с контрольными животными;
** – $P \leq 0,001$ по сравнению с контрольными животными.

После проведенных исследований по оценке жизнеспособности сперматозоидов в семенной жидкости было выявлено, что эякулят контрольной группы животных имеет густую консистенцию. Он мутного или молочно-белого цвета. Отмечена высокая концентрация сперматозоидов в эякуляте (рис. 3).



Рис. 3. Сперматозоиды в эякуляте самцов белых крыс (контроль).
Окраска трипановым синим. Ув. 100 \times 2,3.

После 7 дней воздействия ацетата свинца отмечено, что эякулят приобретает более прозрачный цвет и меньшую вязкость. На гистопрепаратах наблюдаются обрывы хвостов и агглютинация сперматозоидов (рис. 4).

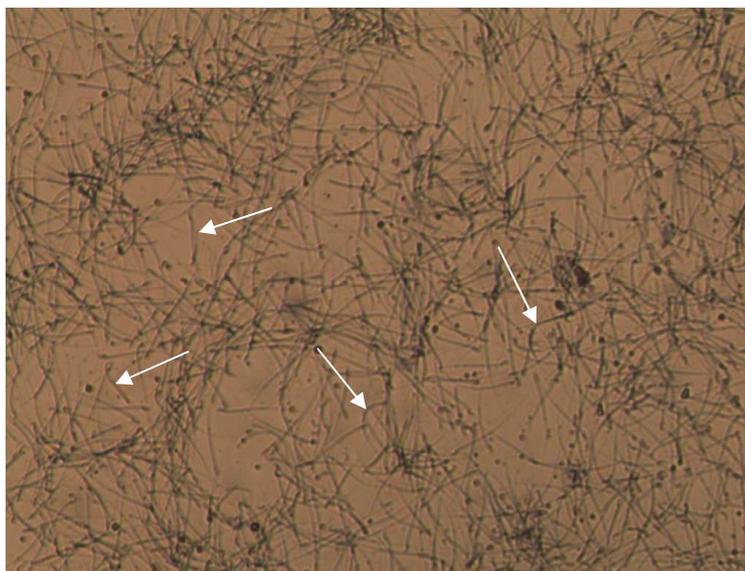


Рис. 4. Сперматозоиды в эякуляте самцов белых крыс (опыт).
Стрелкой показаны обрывы хвостов и агглютинация сперматозоидов.
Окраска трипановым синим. Ув. 100×2,3.

Проведенные исследования показали, что в опытной группе животных по сравнению с контролем происходит уменьшение общей концентрации сперматозоидов в эякуляте, концентрации живых сперматозоидов в эякуляте, а также их жизнеспособности соответственно на 50,63% ($P \leq 0,001$), 81,68% ($P \leq 0,001$) и 53,05% ($P \leq 0,001$). Одновременно с этим происходит увеличение концентрации мертвых сперматозоидов в эякуляте на 60,68% ($P \leq 0,001$) (табл. 1).

Таблица 2

Количественные и качественные показатели эякулята самцов белых крыс

№ п/п	Показатель	Контроль	Опыт
1	Общая концентрация сперматозоидов в эякуляте, $\times 10^7$ /мл	7,96±0,45	3,93±0,11**
2	Концентрация живых сперматозоидов в эякуляте, $\times 10^7$ /мл	7,04±0,12	1,29±0,09**
3	Концентрация мертвых сперматозоидов в эякуляте, $\times 10^7$ /мл	0,92±0,07	2,34±0,14**
4	Жизнеспособность сперматозоидов, %	88,62±3,48	35,57±2,75**

Примечание: ** – $P \leq 0,001$ по сравнению с контрольными животными.

Выводы

1. Воздействие ацетата свинца приводит к снижению процента жизнеспособных эритроцитов в крови, а также повышению их агрегационных свойств.

2. Ацетат свинца приводит к уменьшению концентрации сперматозоидов в эякуляте, а также их жизнеспособности, что указывает на уменьшение продуктивности семенных желез.

Работа проводилась при поддержке Минобрнауки РФ в рамках Программы стратегического развития «Педагогические кадры для инновационной России» (госзадание № 2 от 16.03. 2013 г.).

Список литературы

1. Грызлова Л.В., Киреева Ю.В., Шубина О.С. Влияние свинца на потомство белых крыс // Успехи современного естествознания. – 2006. – № 5. – С. 68-68.
2. Шубина О.С., Мельникова Н.А. О деятельности научно-образовательного центра «Естественно-научное образование» // Гуманитарные науки и образование. – 2012. – № 2 (10). – С. 51-53.
3. Dydenkova N., Shybina O. Morphological and functional changes in seminiferous epithelium of the testes of white rats under the effect of lead acetate // DOAJ – Lund University: Koncept : Scientific and Methodological e-magazine. – Lund, Sweden, 2013. – Vol. 1. – № 2. – P. 291-295.
4. Shubina O.S., Dudenkova N.A. Morphological changes in the structure of ovarian white rats under the influence of lead acetate // 3rd International Conference on Science and Technology, London, 17-18 June 2013. – London : SCIEURO, 2013. – P. 313-322.
5. Shubina O.S., Melnikova N.A., Liferenko O.V., Bardin V.S. Effect of chronic lead intoxication on formed elements morphology and some biochemical parameters of blood plasma of white rats // 3rd International Conference on Science and Technology, London, 17-18 June 2013. – London : SCIEURO, 2013. – P. 323-333.

Рецензенты:

Кузьмичева Л.В., д.б.н., профессор кафедры биохимии ФГБОУ ВПО «Мордовский государственный университет имени Н.П. Огарева», г. Саранск.

Федотова Г.Г., д.б.н., профессор кафедры теории и методики физической культуры и спорта ФГБОУ ВПО «Мордовский государственный педагогический институт имени М.Е. Евсевьева», г. Саранск.