

ВЛИЯНИЕ МЕДНО-ЦИНКОВОЙ КОЛЧЕДАННОЙ РУДЫ НА НЕКОТОРЫЕ ГЕМАТОЛОГИЧЕСКИЕ ПОКАЗАТЕЛИ И КИСЛОТНУЮ РЕЗИСТЕНТНОСТЬ ЭРИТРОЦИТОВ В ЭКСПЕРИМЕНТЕ

Зиякаева К.Р.¹, Габдулхакова И.Р.¹, Зайнетдинова А.Т.², Муллаянова А.Н.¹, Шамратова В.Г.², Каюмова А.Ф.¹

¹ФГБОУ ВО «Башкирский государственный медицинский университет» Минздрава РФ, Уфа, e-mail: claraz@ufanet.ru;

²ФГБОУ ВО «Башкирский государственный университет», Уфа, e-mail: lbina_zaynetdinova96@mail.ru

Цель исследования заключалась в изучении кислотной резистентности эритроцитов (КРЭ) периферической крови и показателей красной крови при воздействии медно-цинковой колчеданной руды на организм экспериментальных животных. Эксперименты проведены на 40 беспородных крысах-самцах, животным опытной группы в течение 30 дней перед стандартным кормлением один раз в сутки ежедневно перорально вводили мелко измельченную руду. Было установлено, что на 10-е сутки эксперимента по сравнению с интактными животными в опытной группе увеличились КРЭ и доля популяции высокоустойчивых клеток со сдвигом главного пика эритрограммы вправо. На 30-е сутки эксперимента КРЭ уменьшилась и гемолизу подвергались все популяции эритроцитов. К этому сроку снизилось абсолютное количество эритроцитов, гематокрит и уровень гемоглобина, в то время как увеличился средний объем эритроцитов и наблюдался анизоцитоз. Полученные данные позволяют сделать вывод, что снижение стойкости эритроцитов является следствием повреждения мембраны под воздействием ионов тяжелых металлов, это приводит к появлению нормохромной макроцитарной анемии, что связано с нарушением эритропоэза в костном мозге экспериментальных крыс, получавших медно-цинковую колчеданную руду.

Ключевые слова: руда, макроцитарная анемия, кислотная резистентность эритроцитов.

THE INFLUENCE OF COPPER-ZINC PYRITE ORE ON SOME HAEMATOLOGICAL INDICES AND ACID RESISTANCE OF ERYTHROSYTES IN EXPERIMENT

Ziyakaeva K.R.¹, Gabdulkhakova I.R.¹, Zainetdinova A.T.², Mullayanova A.N.¹, Shamratova V.G.², Kayumova A.F.¹

¹Bashkir State Medical University, Ufa, e-mail: claraz@ufanet.ru;

²Bashkir State University, Ufa, e-mail: lbina_zaynetdinova96@mail.ru

The purpose of the study was exploring of dynamics of acid resistance of erythrocytes (ARE) and hematological indices of red blood under the influence of copper-zinc pyrite ore on experimental animals. There were 40 noninbred male rats in the experiment. The experienced group of animals was fed with ore powder injected orally once a day before the standard feeding within 30 days. It was found that on the 10-th day of research compared with healthy animals in the experimental group were increased ARE and the proportion of highly-resistant populations of cells with a shift of the main peak of erithrogramm to the right site. On the 30-th day of experiment ARE was decreased and all populations of red blood cells were in hemolysis. By that time absolute number of erythrocytes, hematocrit and hemoglobin level were decreased, while the average amount of erythrocytes was increased, it was observed anisocytosis. The obtained data allows considering decrease of erythrocytes resistance is a consequence of damage of membrane under the influence of ions of heavy metals of ore, this influence leads to normochromic macrocytic anemia which is connected with violation of erythropoiesis in bone marrow of experimental rats treated with ore.

Keywords: pyrite ore, macrocytic anemia, acid resistance of erythrocytes.

Токсичные вещества, нарушая функции мембран, во многих случаях являются причиной патологических изменений, происходящих в клетке и в организме в целом [1; 2]. В настоящее время изучению влияния ионов тяжелых металлов на систему крови уделяется большое внимание [3]. Токсическое действие этих соединений преимущественно обусловлено взаимодействием с белками мембраны клеток, особенно крови, иммунной,

эндокринной и центральной нервной систем [4].

На территории Республики Башкортостан расположены крупнейшие медно-колчеданные месторождения. Несмотря на использование современных технологий добычи цветных руд и применение высокотехнологичной техники, условия труда работников горнодобывающей промышленности остаются потенциально опасными. Добыча руды всегда связана с повышенным риском возникновения профессиональных заболеваний у рабочих. При изучении профессиональных заболеваний у горняков были выявлены болезни органов дыхания, нейросенсорная тугоухость, а также заболевания костно-мышечной системы. Эти заболевания развиваются как вследствие тяжелого физического труда, так и в результате воздействия вредных факторов рабочей среды и трудового процесса [5]. В плазме крови у рабочих горно-обогатительных комбинатов определялся завышенный уровень биохимических маркеров функции печени и многократное увеличение содержания кадмия, свинца, цинка и меди в печени, почках и легких. Развивающийся дисэлементоз свидетельствует о поступлении и накоплении в организме тяжелых металлов [4].

Ранее нами было подтверждено мембранотоксическое действие медно-цинковой колчеданной руды при анализе осмотической устойчивости эритроцитов крыс [6]. В данном исследовании нами была изучена кислотная резистентность эритроцитов, которая, как известно, отражает интенсивность и характер кроветворения, в том числе эритропоэз в норме и при различных патологиях организма [7].

Цель исследования

Цель исследования заключалась в изучении гематологических показателей периферической крови и кислотной резистентности эритроцитов (КРЭ) под воздействием медно-цинковой колчеданной руды на организм лабораторных крыс.

Материалы и методы исследования

Исследования были проведены на 40 беспородных крысах самцах (200-250 г) с соблюдением соответствующих требований этических норм и международных рекомендаций о гуманном отношении к животным, которые используются в научных целях. Животным опытной группы ($n=20$) перед стандартным кормлением в течение 30 дней вводили перорально руду, измельченную в порошок, из расчета 60 мг руды на 100 г веса крысы. Кровь собирали из хвостовой вены крысы на 10-е и 30-е сутки эксперимента. Кислотную резистентность определяли с помощью метода эритрограмм, который графически характеризует процесс вовлечения популяций эритроцитов различной стойкости во время гемолиза. Последовательное вступление эритроцитов в процесс гемолитической трансформации представляет функциональную зависимость в следующем виде: $G = f(t)$, где G – количество гемолизированных эритроцитов в %, и t – время в минутах. Степень гемолиза

эритроцитов в слабом растворе соляной кислоты определяли на спектрофотометре ПЭ-5400ВИ (ООО «Экохим») при длине волны 640 нм с помощью программы кинетического анализа Kin5400. По полученным значениям строились кислотные эритрограммы. Анализ кислотных эритрограмм проводили по следующим параметрам: время начала, окончания и пика гемолиза, общее время гемолиза. Для сравнения соотношения популяций эритроцитов с разной устойчивостью по эритрограммам рассчитывались доли клеток, разрушающихся в следующих временных интервалах: 0–1,5 мин. - популяция низкоустойчивых клеток; 1,5–3 мин. - популяция среднеустойчивых клеток; 3–4,5 мин. - популяция высокоустойчивых клеток; 4,5–9 мин - популяция клеток повышенной стойкости [8-10].

Оценку клеточного состава красной крови и эритроцитарных индексов проводили с помощью гематологического анализатора «Эксиго» (Vet Exigo 19, Sweden) [6; 11; 12]. Статистическую обработку результатов проводили, используя программы StatSoft Statistica10 и MS Excel 2010, t-критерий Стьюдента, определяли медиану, верхний (Q1) и нижний (Q3) квартили. Различия между опытной и контрольной группами считались достоверными при $p < 0,05$.

Результаты и обсуждение

В опытной группе наблюдались значительные изменения индексов красной крови. В приведенной ниже таблице представлены количественные показатели красной крови на 10-е и 30-е сутки введения медно-цинковой колчеданной руды в организм животных.

Снижение количества эритроцитов у крыс отмечалось на 30-е сутки экспозиции препарата. Такая же динамика была характерна для гематокрита. Полученные данные позволили полагать, что соотношение объема плазмы и эритроцитов в периферической крови крыс, подвергнутых интоксикации рудой, не приводило к увеличению вязкости крови. Показатель ширины распределения эритроцитов достоверно увеличился на 10-е сутки, а на 30-е сутки снизился до величины показателя контрольной группы крыс. Обратная динамика наблюдалась в отношении показателя средней концентрации гемоглобина в эритроцитах, который достоверно снизился на 10-е сутки по сравнению с контрольным значением и увеличился на 30-е сутки эксперимента.

Показатели периферической крови крыс в контроле и в эксперименте (10-е и 30-е сутки)

| Параметры | Контрольная группа | Опытная группа | |
|--|---------------------|---------------------|-----------------------|
| | | 10 суток | 30 суток |
| Абсолютное количество эритроцитов ($\times 10^{12}/л$) | 7,48 [7,26-7,98] | 7,26 [6,93-7,52] | 6,25*Δ [5,85-7,17] |

| | | | |
|--|------------------------|-------------------------|--------------------------|
| Гематокрит (%) | 38,95 [37,55-40,6] | 37,85* [36,0-39,3] | 31,8*Δ [31,8-37,1] |
| Содержание гемоглобина (г/л) | 142,0 [137,0-148,0] | 132,0* [126,0-136,0] | 113,0*Δ [112,0-127,0] |
| Средний объем эритроцитов (фл) | 51,1 [50,45-53,15] | 52,1 [51,5-52,75] | 52,8* [51,1-55,1] |
| Ширина распределения эритроцитов (%) | 21,9 [21,35-22,4] | 24,55* [23,15-25,95] | 21,6Δ [21,1-22,1] |
| Средняя концентрация гемоглобина в эритроцитах (г/л) | 365,5 [362,0-370,0] | 347,5* [346,0-350,5] | 356,0*Δ [353,0-357,0] |
| Среднее содержание гемоглобина в эритроцитах (пг) | 18,75 [18,45-19,35] | 18,2 [18,05-18,3] | 18,6 [18,2-19,4] |

Примечания: * $p < 0,05$ - показатель опытной группы достоверно отличается от показателя контрольной группы; Δ $p < 0,05$ - показатели в опытной группе достоверно отличаются по срокам эксперимента.

Для определения механизмов, лежащих в основе обнаруженного эффекта действия медно-цинковой колчеданной руды, был проведен анализ кислотных эритрограмм, который дает информацию о распределении эритроцитов кровяного русла по устойчивости к кислотному гемолизу.

На рис. 1 представлены эритрограммы кислотной устойчивости периферической крови крыс опытной и контрольной групп на 10-е и 30-е сутки эксперимента.

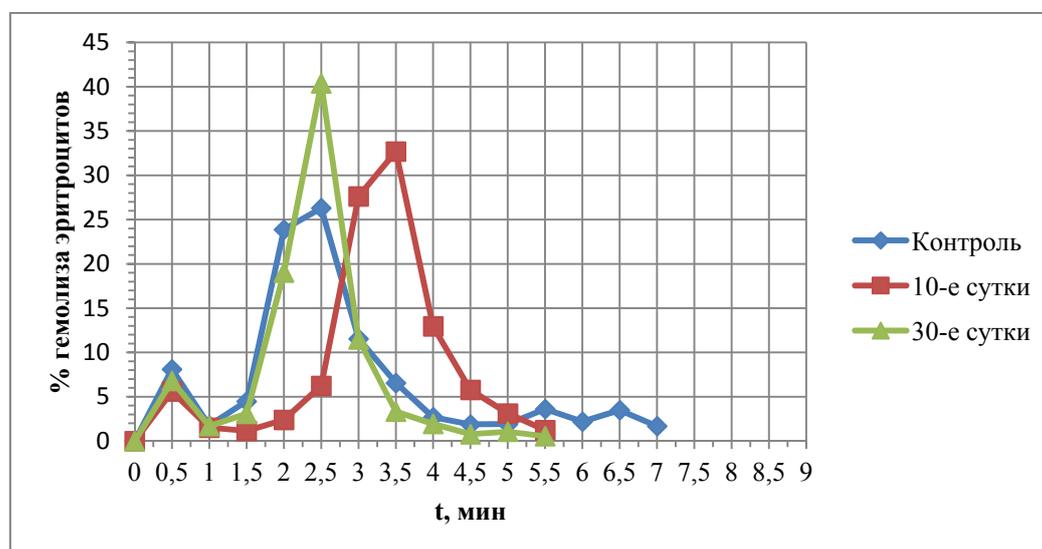


Рис. 1. Эритрограммы кислотной устойчивости эритроцитов в эксперименте с медно-цинковой колчеданной рудой

В контрольной группе главный пик кислотной эритрограммы приходился на $2,69 \pm 0,09$ мин и соответствовал популяции среднеустойчивых клеток. Две незначительные вершины соответствовали популяции клеток повышенной стойкости, продолжительность гемолиза составила $7,0 \pm 0,51$ мин. На 10-е сутки в опытной группе наблюдался сдвиг главного пика

кислотной эритрограммы вправо относительно контроля и соответствовал $3,42 \pm 0,13$ мин. Это могло свидетельствовать об увеличении кислотной резистентности популяции высокоустойчивых эритроцитов. В то же время отмечалось значительное снижение общей продолжительности гемолиза до $5,57 \pm 0,27$ мин, что указывало на уменьшение доли клеток повышенной устойчивости. На 30-е сутки эксперимента главный пик кислотной эритрограммы опытной группы соответствовал $2,42 \pm 0,07$ мин, данное значение было таким же, как у основного пика эритрограммы контрольной группы крыс.

Наиболее полное представление о реакции клеток на кислотный гемолитик дает дифференциальная кривая распределения эритроцитов по устойчивости. На рис. 2 представлена диаграмма соотношения популяций эритроцитов с разной кислотной устойчивостью на 10-е и 30-е сутки эксперимента в контрольной и в опытных группах.

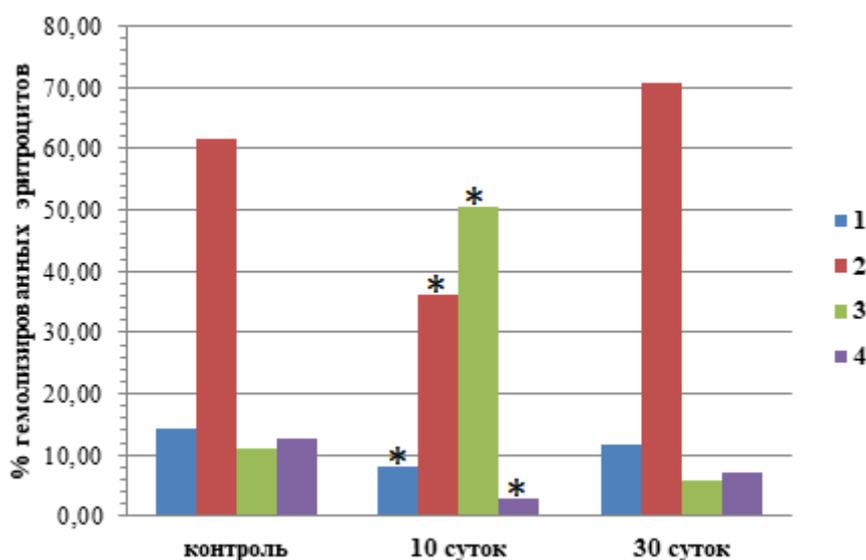


Рис. 2. Соотношение популяций эритроцитов в контрольной и опытных группах:

1 - популяция низкоустойчивых клеток; 2 - популяция среднеустойчивых клеток;

3 - популяция высокоустойчивых клеток; 4 - популяция клеток повышенной стойкости;

* $p < 0,05$ - показатель опытной группы достоверно отличается от показателя контрольной группы

Полученные данные свидетельствовали о том, что под влиянием медно-цинковой колчеданной руды в опытной группе на 10-е сутки эксперимента доля популяции среднеустойчивых клеток ($36,26 \pm 5,9\%$) в сравнении с контрольной группой ($61,73 \pm 6,12\%$) достоверно снизилась на $25,37\%$. Доля популяции высокоустойчивых клеток ($50,59 \pm 5,7\%$) при этом достоверно увеличилась на $39,46\%$ по сравнению с контрольным значением ($11,13 \pm 2,7\%$). На 30-е сутки количество клеток в популяции среднеустойчивых клеток увеличилось до $70,87 \pm 4,81\%$, в основном за счет снижения популяции высокоустойчивых клеток ($5,93 \pm 1,06\%$). Популяция клеток повышенной устойчивости в опытных группах

уменьшилась относительно значения контрольной группы ($12,78 \pm 3,8\%$) на 10-е сутки эксперимента и составила $3,01 \pm 1,5\%$, а на 30-е сутки соответственно $5,05 \pm 1,24\%$.

Заключение и выводы

Анализ взаимосвязей между количественными гематологическими показателями красной крови и распределением популяций эритроцитов по кислотной резистентности свидетельствует о том, что в контрольной группе при уменьшении КРЭ их численность, объем и содержание гемоглобина возрастало, и, напротив, возрастание доли низкоустойчивых клеток сопровождалось уменьшением количества эритроцитов и их качественных и количественных характеристик. Такое взаимодействие показателей свидетельствует о вкладе резистентности клеток в регуляцию численности и качественного состава эритроцитов. На 10-е сутки эксперимента увеличение среднего объема эритроцитов и увеличение доли популяции среднеустойчивых клеток происходило на фоне снижения гематокрита, гемоглобина и средней концентрации гемоглобина в эритроцитах [6]. На эритрограмме данное состояние характеризуется возрастанием доли популяции высокоустойчивых клеток, смещением основного пика вправо, а также снижением продолжительности гемолиза. Таким образом, можно предположить, что данные взаимоотношения отражают компенсаторные процессы, так как в эти сроки костный мозг экспериментальных животных пытается восполнить сниженное количество эритроцитов появлением в крови популяции клеток, более устойчивых к гемолизу, и направленные на поддержание общей дыхательной поверхности крови.

Профессор А.Ф. Каюмова в своих работах указывает на то, что влияние, например, гербицида 2,4-дифенилфеноксисукусной кислоты на систему крови экспериментальных животных приводило к увеличению времени продолжительности кислотного гемолиза; сдвигу «пиков» эритрограмм вправо и развитию ретикулоцитоза. Появление этих признаков указывает на активирование эритропоэза и, как следствие этого - омоложение эритроцитов в периферической крови [13; 14].

Действие медно-цинковой колчеданной руды на кровь расценивается как действие сильного гипоксического раздражителя с развитием стресса эритропоэза (10-е сутки), с последующим его угнетением к концу эксперимента (30-е сутки), что подтверждается данными эритрограмм КРЭ. На 30-е сутки наблюдается сдвиг пика эритрограммы в область значений контрольной группы, но с такой же короткой продолжительностью гемолиза, как и на 10-е сутки. Средний объем эритроцитов возрастает по мере уменьшения доли популяции клеток высокой устойчивости, увеличение размера клеток не сопровождается увеличением количества клеток, а также наблюдается анизоцитоз [15]. Кроме того, полученные данные подтверждают прямое влияние токсического действия руды на эритроциты и подавление

пролиферации в костном мозге. Срыв адаптационных возможностей костного мозга под влиянием медно-цинковой колчеданной руды позволяет нам нацелиться на более детальное изучение эритропоэза, а именно исследование эритробластических островков, как структурно-функциональную единицу эритропоэза.

Таким образом, действие медно-цинковой колчеданной руды в эксперименте в течение 30-ти суток приводит к изменению морфофункциональных свойств эритроцитов, изменению их кислотной устойчивости. Гемолитическое действие ионов тяжелых металлов на мембрану эритроцитов в конечном счете приводит к снижению индексов красной крови и появлению нормохромной макроцитарной анемии, что связано с нарушением эритропоэза в костном мозге экспериментальных крыс, получавших медно-цинковую колчеданную руду.

Список литературы

1. Состояние перекисного окисления липидов и антиоксидантной защиты эритроцитов, костного мозга, сыворотки крови и печени при интоксикации полихлорированными бифенилами / А.Ф. Каюмова [и др.] // Медицинский вестник Башкортостана. – 2015. – Т. 10. № 6 (60). – С. 44-48.
2. Goncharov A., Pavuk M., Foushee H.R., Carpenter D.O. Blood pressure in relation to concentrations of PCB congeners and chlorinated pesticides // Environmental Health Perspect. 2011. № 119. P. 319-325.
3. Роль тяжелых металлов в развитии анемий (обзор литературы) / Н.Н. Рыспекова [и др.] // Вестник Казахского Национального медицинского университета. – 2013. - № 3 (2). – С. 46-51.
4. Накопление тяжелых металлов в печени крыс в процессе хронической интоксикации медно-цинковой колчеданной рудой / Л.М. Саптарова [и др.]. // Вестник Башкирского университета. – 2017. – Т. 22. - № 1. – С. 90-92.
5. Профессиональные риски нарушения здоровья работников, занятых добычей и переработкой полиметаллических руд / Л.К. Каримов, П.В. Серебряков, Э.Р. Шайхисламова, И.В. Яцына. – Уфа: ООО «Принт-2», 2016. – 337 с.
6. Динамика количественных и морфофункциональных показателей красной крови при длительном воздействии медно-цинковой колчеданной руды в эксперименте / К.Р. Зиякаева [и др.] // Современные проблемы науки и образования. – 2017. - № 6. - URL: <http://science-education.ru/ru/article/view?id=27141> (дата обращения: 25.04.2018).
7. Влияние ионов тяжелых металлов на мембранную устойчивость эритроцитов в норме и при различной патологии организма / Н.К. Кочарли [и др.] // Фундаментальные

исследования. – 2012. – № 11. – С. 299-303.

8. Гительзон И.И. Эритрограммы как метод клинического исследования крови / И.И. Гительзон, И.А. Терсков. - Красноярск: Изд-во Сибирского отделения Академии наук СССР, 1959. – 247 с.

9. Игнатъев В.К., Никитин В.К., Храмов А.В. Анализатор стойкости эритроцитов // Вестник ВолГУ. – 2010. - № 13. – С. 151–157.

10. Влияние нейрометаболических препаратов на кислотноую резистентность эритроцитов дизадаптированных пловцов / В.А. Лиходеева [и др.] // Вестник ВолгГМУ. – 2013. - № 1 (45). – С. 88-91.

11. Daice and Lewis Practical Haematology / Barbara J. Bain, Imelda Bates, Michael A. Laffan; ed. by E.S.M. Levis.: Elsevier Limited, 2017. – P. 499-505.

12. Гематология. Национальное руководство / под ред. О.А. Рукавицына. - М.: ГЭОТАР-Медиа, 2017. - 784 с.

13. Эритропоэз в эритробластических островках костного мозга в токсигенном периоде после воздействия разных доз полихлорированных бифенилов / А.Ф. Каюмова [и др.] // Пермский медицинский журнал. – 2016. – Т. XXXIII. - № 2. – С. 90-97.

14. Каюмова А.Ф. Нарушения в системе крови, вызванные гербицидом – аминной солью 2,4 – дихлорфеноксиуксусной кислоты (экспериментальное исследование): дис. ... д-ра мед. наук. - Уфа, 1996. – 292 с.

15. Шиффман Фред Дж. Патопфизиология крови / ред. Е.Б. Жибурт, Ю.Н. Токарев, Ю.В. Наточин, пер. с англ. Н.Б. Серебряной, В.И. Соловьева. – М.: БИНОМ, 2016. – С. 71-101.