

УДК 612.11-053.9:613.632

© Сікора В.З., Приходько О.О., 2010

СТРУКТУРНО-ФУНКЦІОНАЛЬНА ХАРАКТЕРИСТИКА КРОВІ ЩУРІВ СТАРЕЧОГО ВІКУ В УМОВАХ ДІЇ СОЛЕЙ ВАЖКИХ МЕТАЛІВ**Сікора В.З., Приходько О.О.***Медичний інститут Сумського державного університету*

Сікора В.З., Приходько О.О. Структурно-функціональна характеристика крові щурів старечого віку в умовах дії солей важких металів // Український морфологічний альманах. – 2010. – Том 8, №2. – С. 191-193.

У роботі наведені експериментальні дані про морфологічні зміни клітин крові та окремі її функціональні показники у щурів старечого віку, які отримували надлишкову кількість солей важких металів (цинку, заліза, міді, марганцю і свинцю) протягом 1-го та 2-х місяців. Встановлено, що мікроелементоз викликає зменшення розмірів еритроцитів, гематокриту, рівня гемоглобіну, лейкоцитів, тривалий поліморфізм червоних клітин периферійної крові, структурну дезорганізацію мембран еритроцитів.

Ключові слова: Солі важких металів, трансформація еритроцитів, ультроструктура, кров, щури.

Сікора В.З., Приходько О.О. Структурно-функціональна характеристика крові крыс старечого віку в умовах дії солей важких металів // Український морфологічний альманах. – 2010. – Том 8, №2. – С. 191-193.

В работе изложены экспериментальные данные о морфологических изменениях клеток крови и отдельных ее функциональных показателей у крыс старческого возраста, которые получали избыточное количество солей тяжелых металлов (цинка, железа, меди, марганца и свинца) на протяжении 1-го и 2-х месяцев. Установлено, что микроэлементоз вызывает уменьшение размеров эритроцитов, гематокрита, уровня гемоглобина, лейкоцитов, продолжительный полиморфизм красных клеток периферической крови, структурную дезорганизацию мембран эритроцитов.

Ключевые слова: Соли тяжелых металлов, трансформация эритроцитов, ультроструктура, кровь, крысы.

Sikora V.Z., Prykhodko O.O. Structural and functional characteristics of rat blood senile age in terms of heavy metal salts // Український морфологічний альманах. – 2010. – Том 8, №2. – С. 191-193.

This paper gives experimental data on the morphological changes of blood cells and some of its functional parameters in rats senile age who received excessive amount of salts of heavy metals (zinc, iron, copper, manganese, and lead) in the first and second months. Found, that microelementosis caused by reducing the size of erythrocytes, hematocrit, HB level, leucocytes, prolonged polymorphism of the red cells of peripheral blood, membrane structural desorganisation.

Key words: Heavy metal salts, transformation of erythrocytes, ultrastructure, blood, rats.

Вступ. Дослідження змін крові при впливі на організм важких металів набуває актуальності у зв'язку з техногенним забрудненням навколишнього середовища. Особливого значення має проблема поєднаної дії сполук важких металів за умов тривалого надходження їх в організм. Кожному періоду життя властиві певні особливості дії, розподілу та рівня накопичення хімічних речовин, до яких відносять і важкі метали. У процесі старіння змінюється резистентність, чутливість, адаптація організму до дії екзогенних полуметалів. Це пов'язано з проникністю біологічних мембран, різними потребами в хімічних сполуках, рівнем використання енергії та інтенсивністю перебігу обмінних процесів [2,3,6].

Клітини крові здатні змінювати свою структуру при патологіях різного генезу та відображають стан організму в цілому [11,12].

Метою роботи було вивчення морфофункціональних особливостей крові щурів старечого віку в умовах отруєння комплексом солей цинку, міді, заліза, марганцю і свинцю. Ця робота є складовою частиною науково-дослідної теми кафедри анатомії людини медичного інституту Сумського державного університету: «Морфофункціональні особливості перебудови скелета та внутрішніх органів в умовах порушення гомеостазу організму» (№ держреєстрації 010U001287).

Матеріали та методи дослідження. Експеримент проведений на 40 щурах-самцях старечого віку, які були поділені на II серії.

I серія – інтактні тварини 20-ї та 21-го місячного віку (по 10 тварин), які споживали питну воду стандартної якості.

II серія – експериментальна група щурів 20-ї, 21-го місячного віку (по 10 тварин), у питну воду яких

додавали надлишкову суміш солей важких металів (марганцю, заліза, міді, цинку, свинцю) протягом 1-го та 2-х місяців, імітуючи екоситуацію деяких районів Сумської області [1]. Тварин утримували в стандартних умовах виварію з вільним доступом до їжі та води. Всі експерименти на тваринах проводилися згідно до "Правил проведення работ с использованием экспериментальных животных" та з дотриманням міжнародних принципів Європейської конвенції про захист хребетних тварин, які використовуються для експериментів та інших наукових цілей (Страсбург, 1985) [4,9]. Матеріалом для досліджень була змішана периферійна кров, яку отримували після декапітації тварин дослідних і контрольних груп.

Гематологічні показники (кількість еритроцитів, лейкоцитів, рівня гемоглобіну, гематокриту, лейкоцитарна формула) досліджували за загальноприйнятими методиками, мазки крові фарбували за Романовським-Гімзою [10]. Мікроскопічне дослідження проводили на світловому мікроскопі "Олімпус" із цифровою фоторесстрацією морфологічної картини крові. Підрахунок морфологічних форм усіх еритроцитів проводили по мікросвітлинах, зроблених на растровому електронному мікроскопі з камерою низького вакууму «РЭМ 106 - И». Співвідношення різних морфологічних типів еритроцитів та зміни поверхневого рельєфу вивчали із 1000 клітин кожного щура на електроннограмах, отриманих при збільшенні від 2000 до 45 000 разів [5,8]. Підготовку еритроцитів для скануючої електронної мікроскопії проводили за загальноприйнятою методикою [8], для трансмісійної електронної мікроскопії еритроцити виділяли із гепаринізованої крові щурів шляхом центрифугування, фіксували в 2,5% розчині глутаральдегіду на фосфатному буфері з наступною дофіксацією у 1 %

розчині чотирьохокису осмію, дегідрували в спиртах і ацетоні, контрастували уранілацетатом і заливали в епоксидні смоли. Із заливних в епонові смоли зразків виготовляли ультратонкі зрізи, які контрастували за Рейнольдсом і вивчали в електронному мікроскопі ПЕМ-125.

Індекс трансформації (ІТ). $ІТ = \%ЗД / \%НД$ / $\%Д$. Де ЗД – відсоток зворотньодеформованих еритроцитів, НД – відсоток незворотньодеформованих еритроцитів, Д – відсоток дискоцитів) розраховували за В.Н.Кидаловим, К.К.Зайцевою [7].

Аналіз морфологічних параметрів еритроцитів (діаметр, периметр) на мікросвітлинах при збільшенні в 2000 разів, виконували з використанням системи комп'ютерного аналізу зображення "Відео Тест 5,0" та "Відео Размер 5,0". Площа червоних кров'яних клітин обчислювалася за формулою:

$$S = 0,64 \cdot 3,14 \cdot d^2,$$

$$\text{об'єм} - V = 0,15 d^3,$$

$$\text{товщина краю} - h = \frac{d}{4} [13].$$

Результати дослідження. З'ясовано, що при вживанні комбінації солей важких металів протягом місяця у тварин дослідної групи виявляється тенденція до зменшення концентрації гемоглобіну на 17% ($p < 0,01$) та гематокриту на 13 % ($p < 0,05$), кількість еритроцитів залишається на рівні контролю. Результати досліджень вмісту лейкоцитів показали вірогідні зміни у загальній кількості цих клітин порівняно з контролем, які зменшуються на 31% ($p < 0,05$). Виявлено істотне збільшення вмісту сегментоядерних нейтрофілів на 25,5 % ($p < 0,05$) та зменшення лімфоцитів на 33,3 % ($p < 0,05$). Збільшується кількість широкоплазмових лімфоцитів до 15 % ($p < 0,05$) у порівнянні з контрольним показником. При світлооптичному вивченні червоних кров'яних клітин у мазках крові спостерігаємо анізопоїкілоцитоз: появу великої кількості гіпохромних еритроцитів та анулоцитів (еритроцити у вигляді кільця), веретеноподібних та мішенеподібних клітин, мікроцитів, сфероцитів, елптоцитів.

При детальному вивченні морфологічних типів еритроцитів за допомогою РЕМ визначається зростання структурної неоднорідності еритроцитів, збільшується кількість трансформованих форм еритроцитів на тлі зниження частки дискоцитів у порівнянні з показником контрольної групи на 25,0 % ($p < 0,001$). Зворотні форми еритроцитів – ехіноцити (клітини зі спікулами) збільшились у 1,7 раза ($p < 0,05$), стомацити (клітини з видовженим пелором) не змінились. Число незворотньодеформованих форм зросло достовірно за рахунок мішенеподібних (кодоцитів) – у 5 разів ($p < 0,05$), еритроцитів овальної форми у 2 рази, клітин у вигляді сфер – у 4,1 раза ($p < 0,01$), гіпохромних еритроцитів та анулоцитів у 10 разів ($p < 0,01$), клітин у вигляді спущеного м'яча – у 5,2 раза ($p < 0,01$). Кількість дегенеративних клітин зросло у 5 разів. ІТ еритроцитів достовірно збільшився у 4,5 раза у порівнянні з контролем ($p < 0,001$). Зустрічались поодинокі групи еритроцитів, які були з'єднані цитоплазматичними місточками (рис.1).

При дослідженні рельєфу клітин при збільшенні у 30000-40000 разів спостерігаємо серед еритроцитів із гладкою поверхнею клітини з ямками та горбиками (рис. 2).

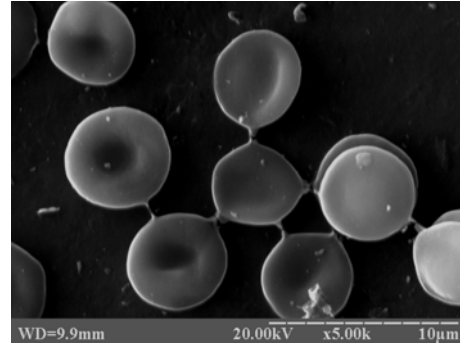


Рисунок 1. Еритроцити з цитоплазматичними місточками щура старечого віку ІІ серії через 1 місяць експерименту, РЕМ x 5000.

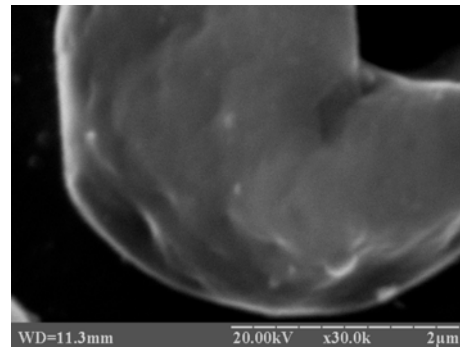


Рисунок 2. Рельєф із впадинами та горбиками поверхні гіпохромного еритроцита щура старечого віку ІІ серії через 1 місяць експерименту, РЕМ x 30000.

При ультраструктурному дослідженні еритроцитів підослідних тварин даної серії зустрічаються клітини з чітким контуром плазмолемми і з локальними та обширними дефектами у вигляді потовщення, звуження та розриву. Зустрічаються ділянки з розрізженою внутрішньою структурою еритроцитів, мікрорезикуляцією. Такі зміни ми зустрічали більше у незворотньодеформованих типах еритроцитів.

Аналіз розмірів еритроцитів показав, що відбулося зменшення їх діаметру на 5,4 % ($p < 0,001$), периметру на 5,6% ($p < 0,001$), площі поверхні на 10,0 % ($p < 0,001$), об'єму на 14,2% ($p < 0,001$), товщини краю на 5 % ($p < 0,001$).

При вживанні щурами старечого віку питної води з солями важких металів впродовж 2-х місяців показник кількості еритроцитів в крові незначно зменшився. Гемоглобін та гематокрит зменшились відповідно на 15 % ($p < 0,05$) та 18 % ($p < 0,01$), кількість лейкоцитів на 35 % ($p < 0,01$) порівняно з контрольними показниками. Виявлені зміни морфології лейкоцитів у вигляді гіперсегментозу нейтрофілів та пікнозу лімфоцитів. При аналізі лейкоцитарної формули відмічається збільшення кількості сегментоядерних гранулоцитів на 57 % ($p < 0,001$) та зменшення кількості лімфоцитів на 27,3 % ($p < 0,001$). Збільшується кількість широкоплазмових лімфоцитів до 20 % ($p < 0,01$) у порівнянні з контрольним показником. При світлооптичному вивченні мазків на фоні нормоцитів визначались гіпохромні еритроцити та анулоцити, веретеноподібні клітини, мікросфероцити та сфероцити, рідко-мішенеподібні еритроцити.

У досліджуваному еритроцитарному пулі методом растрової електронної мікроскопії виявлено, що двояковитнуті дискоцити переважають, але кількість їх зменшилась на 23 % ($p < 0,001$), в той же час відмі-

часться тенденція до одночасного збільшення зворотньоотрансформованих та незворотньоотрансформованих форм еритроцитів, як і в попередній серії дослідження. Відмічається достовірне збільшення ехіноцитів у 2,4 рази ($p < 0,05$), та стоматоцитів у 2 рази ($p < 0,05$). Незворотніх, функціонально неповноцінних форм, а саме: кодоцитів (мішеневидних еритроцитів) збільшилось у 5 разів ($p < 0,001$), клітин у вигляді сфери у 3,8 раз ($p < 0,01$), сфероцитів зі вм'ятинами (у вигляді спущеного м'яча) – у 5 разів ($p < 0,01$), гіпохромних та анулоцитів у 5 разів ($p < 0,05$), клітин різноманітних дегенеративних форм у 3 рази ($p < 0,01$) у порівнянні з контролем. Незмінними в кількісному співвідношенні залишилися еліптоцити. Спостерігалось утворення множинних цитоплазматичних місточків між окремими еритроцитами та злипання червоних клітин у вигляді "монетних стовпчиків" (рис. 3).

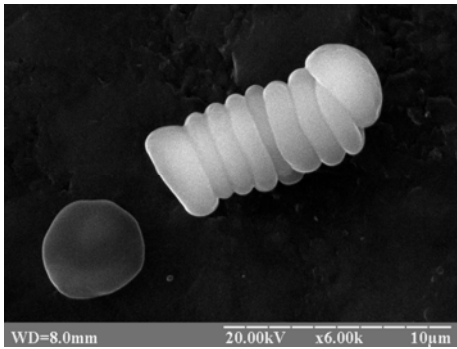


Рисунок 3. Еритроцити у вигляді "монетного стовпчика" щура старечого віку II серії через 2 місяці експерименту, РЕМ x 6000.

Індекс трансформації еритроцитів, досліджуваних тварин, збільшився достовірно у порівнянні з інтактною групою у 6 разів ($p < 0,001$).

Одночасно з кількісними змінами у співвідношенні між морфологічними типами еритроцитів при більш детальному вивченні поверхневої цитоархитектоники червоних кров'яних клітин визначається, як і в попередній серії, більш жорстка та "бугриста" поверхня еритроцитів.

При вивченні ультраструктури мембрани еритроцитів при трансмісійній електронній мікроскопії, зустрічаються клітини з чітко контурованою плазмолемою та з локальними і обширними дефектами у вигляді розшарування, потовщення, звуження, розриву та фрагментації утворенням мікробезикул. Частіше такі зміни ми спостерігали в мембранах незворотньоотрансформованих типів еритроцитів.

Дослідження морфометричних розмірів еритроцитів показали, як і в попередній серії, вірогідне зменшення середніх показників: діаметру на 6 %, периметру еритроцитів - на 5,5 %, площі поверхні еритроцитів - на 12 %, об'єму на 16,8 %, товщини краю на 4,7 %. Вищепераховані морфометричні показники достовірні, $p < 0,001$.

Висновки та перспективи подальших розробок. На експериментальному матеріалі розкриті особливості трансформації еритроцитів та функціональних змін периферійної крові щурів старечого віку в умовах дії солей важких металів.

1. Результати проведеного нами дослідження вказують на значну морфологічну перебудову еритроцитів, як за рахунок підвищення зворотньоотрансформованих так і незворотньоотрансформованих

форм еритроцитів, а також виражену структурну дезорганізацію мембрани червоних клітин крові, зменшення рівня гематокриту, кількості лейкоцитів та гемоглобіну у тварин, що отримували солі важких металів протягом 1 та 2-х місяців, ці зміни мають однотипний характер.

2. Зміни морфометричних показників еритроцитів носять односпрямований напрямок, зменшуючись у досліджуваній серії.

3. У лейкоцитарній формулі щурів експериментальної серії відмічається збільшення нейтрофілних гранулоцитів та зменшення кількості лімфоцитів при обох термінах вживання солей важких металів.

У подальшому планується з'ясування можливості корекції виявлених змін.

ЛІТЕРАТУРА:

1. Доповідь про стан навколишнього природного середовища в Сумській області у 2006 році. – Суми : Видавництво «Джерело», 2007. 8 – 21.
2. Вікові особливості морфофункціональних змін в нирках щурів при хронічному впливі свинцю. С.П.Луговський, М.А.Комаров, А.А.Легкоступова [та інші.] // Актуальные проблемы транспортной медицины. — № 2 (4). — 2006 – С.57-
3. Гордієнко В. В. Віковий профіль токсикологічних і патоморфологічних змін в організмі щурів за тривалої дії малих доз свинцю ацетату / В.В. Гордієнко, І.С. Давиденко // Клінічна та експериментальна патологія. — 2006. — Т.5., №1 – С.31– 35.
4. Западнюк В.И. Лабораторные животные / В.И. Западнюк, И.П. Западнюк, Е.А. Захария. – К.: Выща школа, 1985. – 385 с.
5. Ионов Б.В. Морфологическая характеристика эритроцитов артериальной и венозной крови крысы по данным сканирующей электронной микроскопии / Б.В. Ионов., А. М. Чернух // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. – 1981. – Т. 92, № 12. – С. 749-751.
6. К вопросу о нефротоксичности свинца, кадмия и ртути у животных. И.Н. Андрусихина, Е.Г. Лампека, И.Н. Андрусихина. [и др.] // Актуальные проблемы транспортной медицины. — № 2 (4). — 2006 – С.53-57.
7. Кидалов В.Н. Трансформация и ультраструктурные изменения эритроцитов при сенсибилизации организма сывороточным белком / В.Н.Кидалов, К.К.Зайцева // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины – 1986. – Т.11, № 7. –С. 112-114.
8. Козинец Г.И. Конфигурация и поверхность клеток крови в норме и патологии / Козинец Г.И., Шипканова З.Г., Новодержкина Ю.К. – Москва: Триада-фарм, 2004. – 17.с.
9. Лоскутова З.В. Виварий / З.В. Лоскутова. – М.: Медицина, 1980. – 93 с.
10. Монастирська О.С. Клінічні лабораторні дослідження / О.С. Монастирська. – Вінниця :Нова книга , 2007. – 14-35.
11. Новицкий В.В. Физиология и патофизиология эритроцита / В.В.Новицкий, Н.В.Рязанцева, Е.А. Степоява / Томск. -Изд-во Томского ун-та. -2004. - С.200.
12. Применение метода голографической интерференционной микроскопии для изучения влияния озонотерапии на форму эритроцитов крови человека / Т.В. Тишко, В.П. Титарь., Т.М. Бархоткина [и др.] // Биофизический вестник. Вестник Харьковского университета. – 2000. – Т.2 (7), №497. – С. 103–111.
13. Чижевский А.А. Структурный анализ движущейся крови / А.А. Чижевский – Москва: Ак. Наук СССР, 1959. – 474 с.
14. Bessis M. Deformability of normal, sharp-altered and pathological red blood cells / M.Bessis, N. Mohandas // 1975.- Vol.1, № 2.- С.315-329.