

ОЦЕНКА ИЗМЕНЕНИЙ ЯДЕРНО-ЯДРЫШКОВОГО АППАРАТА И ВЫЖИВАЕМОСТИ КЛЕТОК СПЕРМАТОГЕННОГО ЭПИТЕЛИЯ ПРИ ЦИНКОВОЙ ИНТОКСИКАЦИИ

В статье проведен сравнительный анализ количества всех выявляемых морфофункциональных типов ядрышек с дифференцированным подсчетом активных и малоактивных их вариантов при воздействии соли тяжелого металла на клетки сперматогенного эпителия.

Ключевые слова: ядрышки, хлорид цинка, тяжелые металлы, ядро, клетка.

T. M. Vladimtseva

NUCLEAR-KERNEL APPARATUS CHANGES AND CELLS SURVIVAL RATE ASSESSMENT OF SPERMATOGENOUS EPITHELIUM IN ZINC INTOXICATION

The comparative analysis of the quantity of all kernels' morpho-functional types being revealed with their active and non-active variants differentiated calculation under the influence of heavy metals salts on spermatogenous epithelium cells is conducted in the article.

Key words: kernels, zinc chloride, heavy metals, kernel, cell.

Введение. Изменение уровня и направленности процессов клеточного метаболизма привлекло внимание к важнейшему звену в синтезе белков – ядрышку. Хорошо известно, что ядрышко относится к одним из наиболее пластичных клеточных органелл, его морфология и иммунореактивные свойства изменяются в ответ на разные химические и стрессовые воздействия [1, 2]. Состояние ядрышкового аппарата является адекватным показателем редоксинтетической функции клеток. В ряде клеточных популяций активность ядрышкового аппарата отражает активность пролиферативных процессов [5]. Все свойства ядрышек обусловлены спецификой функционирования генетического аппарата клеток, активность которого должна отразиться на значениях параметров их ядер и ядрышек, непосредственно связанных с синтезом нуклеиновых кислот. Изменения в параметрах ядер отражаются в степени активности ядрышек и играют немаловажную роль в клеточной патологии, отражая степень функциональной активности клеток [2, 4].

Цель исследований. Оценка изменений ядерно-ядрышкового аппарата и выживаемости клеток сперматогенного эпителия при цинковой интоксикации.

Материалы и методы исследований. Работа проведена на 40 белых беспородных мышах – самцах массой 19–21 г в двухмесячном возрасте, по 10 животных в каждой группе. В качестве модельного ксенобиотика использовался хлорид цинка в дозе 20 мг/кг массы тела. Полиморфизм ядрышек анализировали через 24 часа. Животным 2-й и 3-й групп вводили ксенобиотик в той же дозе ежедневно в течение 5 и 10 дней соответственно, с последующим аналогичным исследованием. Животным контрольной группы вводили внутривенно физиологический раствор. Забой животных осуществлялся путем цервикальной дислокации спинного мозга в шейном отделе.

Исследование изменений активности ядрышкового аппарата клеток сперматогенного эпителия проводили путем фиксирования в течение 7 минут в метаноле мазков сперматогенного эпителия и обработки их следующим раствором: смешивали 2 г желатина, растворенного в 50 мл дистиллированной воды, и 0,5 мл 1%-й муравьиной кислоты, в эту смесь добавляли 12 г нитрата серебра (Уральский завод химреактивов). Затем заливали мазки этим раствором и помещали в термостат при температуре 37–38°C на 20 минут, после чего стекла промывали дистиллированной водой и высушивали [8]. После окраски клетки классифицировали по форме ядра (на 200 клеток сперматогенного эпителия, увеличение $\times 1000$) по видам:

I – клетки без морфологических повреждений;

II – клетки с морфологическими признаками дегенерации хроматина.

В клетках определяли 2 типа ядрышек:

1 – крупные (2–4 мкм в диаметре): компактные и нуклеолонемные с высокой функциональной активностью; 2 – мелкие (до 2 мкм в диаметре): плотные фибриллярные с низкой функциональной активностью [7]. Диаметр ядрышек определяли с помощью окуляра-микрометра МОВ-1 \times 5.

Жизнеспособность клеток сперматогенного эпителия определяли при помощи теста с витальным красителем (трипановым синим). Равные объемы (по 20 мкл) суспензии клеток сперматогенного эпителия и 0,1%-го трипанового синего («Serva») смешивали и помещали в камеру Горяева. Микроскопировали с помощью микроскопа «Биомед 1», увеличение $\times 300$. По морфологии цитоплазматической мембраны сперматозоиды дифференцировали на два типа:

жизнеспособные клетки (с прозрачной цитоплазмой) и нежизнеспособные клетки (с прозрачной цитоплазмой фиолетового цвета).

Клетки подсчитывали в больших квадратах. Пересчитывали клетки по стандартной формуле: $x = a \times 5$, полученной в результате преобразования: $x = (a \times 250 \times 2) / 100$,

где x – общее количество клеток в 1 мкл жидкости;

2 – коэффициент разведения;

a – число клеток в подсчитанных квадратах;

100 – число сосчитанных больших квадратов;

250 – множитель, приводящий результат к объему в 1 мкл жидкости [7].

Статистическую обработку результатов проводили методом вариационной статистики с использованием t -критерия Стьюдента [3]. Различия считали значимыми, если вероятность случайности не превышала 5% ($P < 0,05$).

Результаты и их обсуждение. В ходе наших экспериментов установлено, что при острой затравке животных хлоридом цинка в дозе 20 мг/кг через 24 часа отмечалось достоверное увеличение числа клеток с деградацией хроматина. Количество ядрышек 1-го и 2-го типов в клетках без видимых морфологических повреждений снизилось и составило $88,28 \pm 0,61\%$ ($P < 0,001$) и $81,62 \pm 0,35\%$ ($P < 0,001$) по сравнению с контролем $97,98 \pm 0,27\%$ и $94,76 \pm 0,46\%$ соответственно. Вместе с тем в клетках сперматогенного эпителия с деградацией хроматина количество крупных и мелких ядрышек увеличилось и составило $11,72 \pm 0,6\%$ ($P < 0,001$) и $18,38 \pm 0,35\%$ ($P < 0,001$) по сравнению с контролем соответственно. При пятисуточном введении ксенобиотика наблюдалась тенденция к возрастанию количества клеток с деградацией хроматина в 14 раз. При этом в клетках без видимых морфологических повреждений количество ядрышек 1-го и 2-го типов снижалось до $86,40 \pm 0,27\%$ ($P < 0,001$) и $67,0 \pm 0,1\%$ ($P < 0,001$) по сравнению с контролем $97,98 \pm 0,27\%$ и $94,76 \pm 0,4\%$ соответственно. В клетках с деградацией хроматина в ядре количество ядрышек 1-го типа возросло в 6,7 раза, а ядрышек 2-го типа – в 6,3 раза по сравнению с контрольным уровнем. Десятисуточное введение хлорида цинка привело к возрастанию количества клеток с деградацией хроматина в ядре и составило $35,02 \pm 0,34\%$ ($P < 0,001$) и $1,76 \pm 0,23\%$ в опыте и контроле соответственно и снижению количества клеток без видимых морфологических повреждений – $64,98 \pm 0,34\%$ ($P < 0,001$) и $98,24 \pm 0,24\%$ в опыте и контроле соответственно. Количество крупных и мелких ядрышек в клетках без видимых морфологических повреждений снизилось и составило $83,56 \pm 0,29\%$ ($P < 0,001$) и $61,64 \pm 0,52\%$ ($P < 0,001$) соответственно, тогда как в клетках с признаками деградации хроматина количество крупных и мелких ядрышек достоверно возросло в 8,4 и в 7,3 раза соответственно (рис. 1, 2).

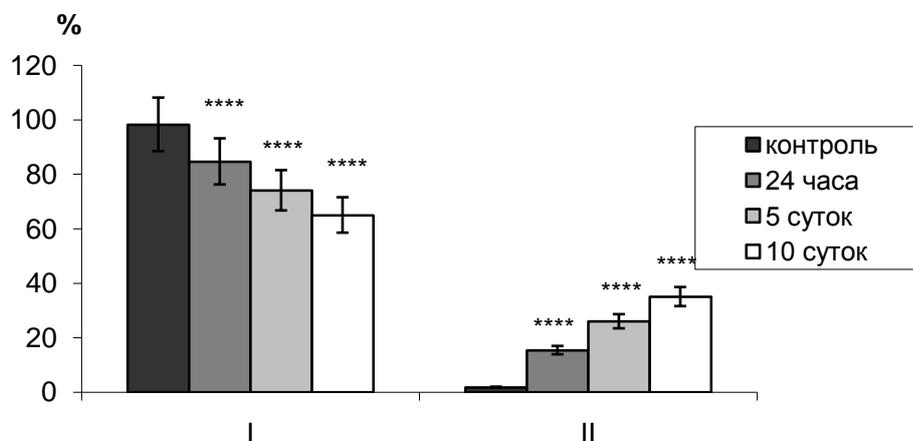


Рис. 1. Изменение ядерного материала в клетках сперматогенного эпителия мышей при внутрибрюшинном введении хлорида цинка в дозе 20 мг/кг

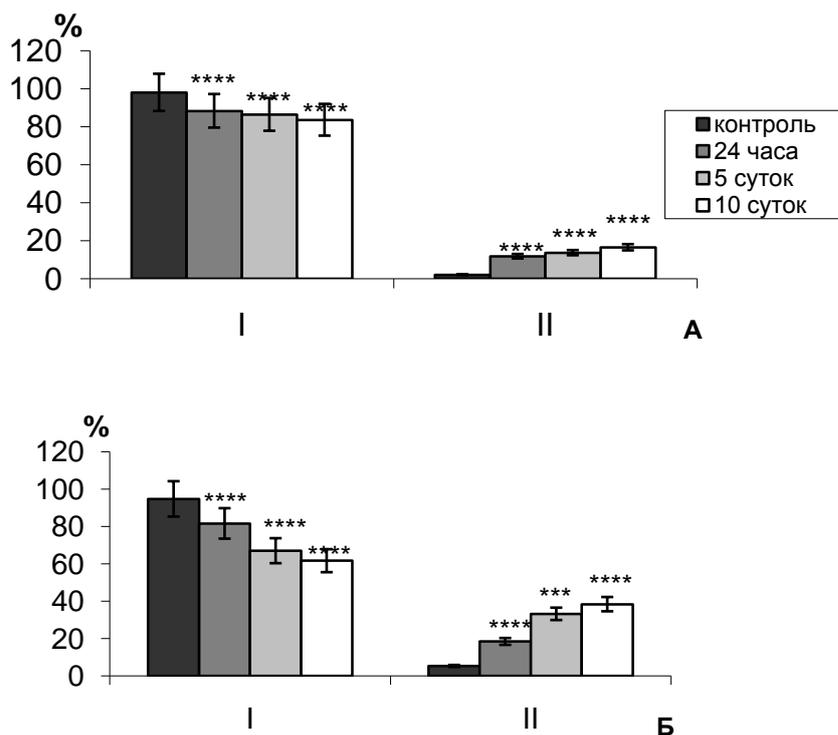


Рис. 2. Относительное количество ядрышек 1 типа (А) и 2 типа (Б) в клетках без морфологических признаков повреждения ядер (I) и в клетках с деградацией хроматина (II)

Таким образом, воздействие хлорида цинка проявляется в повреждении нуклеолярного аппарата клеток сперматогенного эпителия по типу снижения транскрипционной активности в прямой зависимости «время-эффект».

При исследовании жизнеспособности клеток сперматогенного эпителия мышей установлено, что при затравке животных хлоридом цинка в дозе 20 мг/кг через 24 часа и 5 суток отмечалось недостоверное снижение числа живых сперматозоидов до $89 \pm 0,57$ и $83,75 \pm 2,41$ соответственно по сравнению с контролем ($88,25 \pm 2,56$), а при 10-дневной затравке животных ксенобиотиком количество жизнеспособных половых клеток достоверно снижалось до $83,75 \pm 2,41$ ($P < 0,01$) (рис. 3).

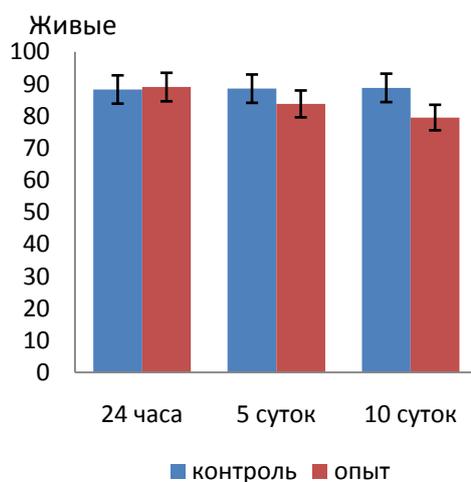


Рис. 3. Динамика процессов выживаемости половых клеток мышей при действии хлорида цинка в дозе 20 мг/кг. По оси абсцисс: продолжительность воздействия хлорида цинка в днях

Выводы. Таким образом, интоксикация хлоридом цинка в дозе 20 мг/кг приводит к значительному снижению транскрипционной активности ядрышкового аппарата клеток ткани семенников, снижая их жизнеспособность, с проявлением зависимости «время-эффект».

Литература

1. Изменения состояния ядрышка при длительном культивировании культуры клеток человека HeLa / А.А. Григорьев [и др.] // Бюл. экспериментальной биологии и медицины. – 2007. – Т. 144. – № 9. – С. 321–324.
2. Исследование оптических параметров ядрышек при действии ингибиторов транскрипции методом когерентной фазовой микроскопии / В.П. Тьчинский [и др.] // Бюл. экспериментальной биологии и медицины. – 2006. – Т. 142. – № 10 – С. 465–470.
3. Лакин Г.Ф. Биометрия. – М.: Высш. шк., 1990. – 352 с.
4. Поведение клеток лимфоидной популяции, их ядер и ядрышек при периодической болезни и лейкозе / Ю.А. Магакян [и др.] // Бюл. экспериментальной биологии и медицины. – 2008. – Т. 145. – № 2. – С. 162–166.
5. Ядерно-ядрышковый аппарат эпидермиоцитов при атоническом дерматите и красном плоском лишае / С.Г. Сапунцова [и др.] // Бюл. экспериментальной биологии и медицины. – 2007. – Т. 144. – № 9. – С. 352–354.
6. Регуляторная роль оксида азота в апоптозе нейтрофилов / Е.А. Стеновая [и др.] // Бюл. экспериментальной биологии и медицины. – 2008. – Т. 146. – № 12. – С. 646–650.
7. Челидзе П.В., Зацепина О.В. Морфофункциональная классификация ядрышек // Успехи соврем. биологии. – 1988. – Т. 105. – № 2. – С. 252–268.
8. Ploton D., Menager M., Jeannesson P. Improvement in the staining and in the visualization of the argyrophilic proteins of the nucleolar organizer region at the optical level // Histochem. J. – 1986. – V. 18. – P. 5–18.



УДК 619:636.7

С.Г. Смолин, С.Н. Донская

СОДЕРЖАНИЕ КАЛЬЦИЯ И НЕОРГАНИЧЕСКОГО ФОСФОРА В СЫВОРОТКЕ КРОВИ СОБАК ПОРОДЫ НЕМЕЦКАЯ ОВЧАРКА ПРИ ПРИМЕНЕНИИ ПАРААМИНОБЕНЗОЙНОЙ КИСЛОТЫ В ОСЕННИЙ И ЗИМНИЙ ПЕРИОДЫ ГОДА

Представлены результаты исследований по содержанию кальция и неорганического фосфора в сыворотке крови у собак породы немецкая овчарка при применении витамина парааминобензойной кислоты.

Ключевые слова: витамин парааминобензойная кислота, кальций, неорганический фосфор, ферментативные процессы, фосфопротеиды.

S.G.Smolyn, S.N.Donskaya

CALCIUM AND INORGANIC PHOSPHORUS CONTENT IN BLOOD SERUM OF GERMAN SHEPHERD BREED DOGS WHILE USING P-AMINO-BENZOIC ACID IN THE AUTUMN AND WINTER PERIOD

The research results on calcium and inorganic phosphorus content in the blood serum of German Shepherd breed dogs while using paraaminobenzoic (p-amino-benzoic) acid vitamin are presented in the article.

Key words: vitamin paraaminobenzoic (p-amino-benzoic) acid, calcium, inorganic phosphorus, enzymatic processes, phosphorus proteides.

Введение. Минеральные вещества обеспечивают процессы роста, размножения, поддержания физиологического равновесия, поскольку в определенных сочетаниях участвуют во всех жизненных проявлениях организма: дыхании, работе сердца и мышц, деятельности нервной системы.

Кальций участвует в процессе свертывания крови, он необходим для нормальной деятельности сердца, функционирования иммунной системы, защищающей организм от инфекций. В организме кальций усваивается одновременно с фосфором и накапливается в основном в костной ткани, обеспечивая ее механиче-