

ПОЛИМОРФИЗМ СПЕРМАТОЗОИДОВ И ИЗМЕНЕНИЕ ЯДЕРНОГО МАТЕРИАЛА ПРИ ВОЗДЕЙСТВИИ ХЛОРИДА ЦИНКА

Проведен сравнительный анализ количества патологических форм сперматозоидов и выявляемых морфофункциональных типов ядрышек с дифференцированным подсчетом активных и малоактивных их вариантов при воздействии соли тяжелого металла на клетки сперматогенного эпителия.

Установлено, что при 24-часовом воздействии хлорида цинка структура и количество ядрышек изменялось незначительно, тогда как 5- и 10-суточное воздействие выявило резкое увеличение процента клеток с деградацией хроматина и возрастание в них числа крупных и особенно мелких ядрышек. Количество патологических форм половых клеток также возрастало к 10 суткам, что указывает на повреждение генетического и нуклеолярного аппарата половых клеток по типу снижения транскрипционной активности в прямой зависимости от времени воздействия ксенобиотика.

Ключевые слова: сперматозоид, хлорид цинка, тяжелые металлы, воздействие, ядрышки, ядро, клетка, сперматогенный эпителий.

Т.М. Vladimtseva

SPERMATOOA POLYMORPHISM AND NUCLEOLUS MATERIAL CHANGES UNDER THE ZINC CHLORIDE INFLUENCE

The comparative analysis of the abnormal sperm forms number and the revealed morpho-functional nucleolus types with differentiated calculation of active and inactive variants under the heavy metal salt influence in the cells of spermatogenic epithelium is conducted.

It is determined that under 24-hours of zinc chloride influence the structure and number of nucleoli varied slightly, while 5 and 10 days influence showed the great increase in the percentage of cells with chromatin degradation and the increase in the number of large and especially small nucleoli in them. The number of germ cells pathological forms also increased within 10 days, that indicates the germ cells apparatus genetic and nucleolar damage according to the type of transcriptional activity reduction directly related to xenobiotic influence time.

Key words: spermatozoon, zinc chloride, heavy metal, influence, nucleoli, nucleus, cell, spermatogenic epithelium.

В условиях природного и антропогенного загрязнения особую значимость приобретают вопросы объективной оценки экологической безопасности последствий воздействия химических токсикантов на организм. Важная роль в этом процессе принадлежит избыточному поступлению в биосферу тяжелых металлов и их солей. Для многих из них характерны эффекты токсичности, затрагивающие такие основополагающие функции живых организмов, как биопродуктивность [4,7]. Соли тяжелых металлов оказывают неспецифическое воздействие, которое реализуется через бессимптомное накопление изменений в тканях и органах [9] и проявляется в связывании, блокировании активных центров ферментов, влияющих на состояние органелл специфических ферментных систем различных субклеточных структур репродуктивных органов, центральной нервной системы и др. [1].

Вместе с тем токсическое воздействие тяжелых металлов оказывает влияние и на нуклеолярный аппарат клетки. Известно, что ядрышко является самоорганизующейся динамической системой, реагирующей на действие агентов, внутриклеточные мишени, которых находятся вне ядрышка, поэтому структурно-функциональная организация ядрышек может изменяться в ответ на разнообразные воздействия. Особенно важное значение имеет совокупность структурно-функциональных изменений ядрышек при воздействии на клетки химических соединений, являющихся непосредственными ингибиторами генной транскрипции [8]. При этом структурная организация ядрышка тесно связана с его функциональной активностью, т.е. уровнем синтеза предшественника рибосомной РНК (рРНК), скоростью процессинга и выхода зрелых субъединиц рибосом из ядрышка в нуклеоплазму и отражает уровень метаболизма клетки в целом. Многообразные морфологические типы ядрышек отражают степень патологических изменений в клетке [3].

Целью наших исследований явилась оценка полиморфизма сперматозоидов и изменения ядерного материала при воздействии хлорида цинка.

Методика исследования. Эксперименты выполнены на белых беспородных мышках-самцах ($n=52$) двухмесячного возраста массой 19 ± 2 г. Животных содержали на стандартном рационе в условиях свободного доступа к воде и пище. В качестве модельного ксенобиотика использовался хлорид цинка ($ZnCl_2$) (ОАО Уральский завод химреактивов, Россия).

Исследование гонадотоксического эффекта в клетках репродуктивной системы животных производили при подостром применении хлорида цинка в дозе 20 мг/кг массы животного, который инъецировали внутривентриально ежедневно в течение 5 и 10 дней. Животным контрольной группы вводили внутривентриально физиологический раствор. Хлорид цинка использовали в дозе, соответствующей, согласно литературным данным [2], диапазону доз, обладающих цитотоксическим и гонадотоксическим эффектом.

Для определения количества спермиев с аномальной морфологией готовили препараты по модифицированной методике Ю.В. Иванова [5]. Извлеченные из мошонки семенники гомогенизировали в 2 мл 0,9% раствора NaCl. Брали 100 мкл суспензии семенников и вносили в 1 мл 1% раствора эозина, тщательно смешивали. Из капли этой смеси готовили мазок, сушили на воздухе. Анализ количества аномальных форм спермиев осуществляли методом световой микроскопии (увеличение $\times 400$). Анализировали по 200 клеток в мазках, при этом учитывали изменение размеров и формы головки (грушевидные, удлинённые, карликовые и гигантские головки), повреждения шейки и хвоста (расщепленные, изогнутые, нитевидные средние части; скрученные хвостики, прирастание хвоста к голове, сломанный хвост и удвоение хвостика) [11].

Аргентофильность ядрышек в клетках сперматогенного эпителия осуществляли методом окраски мазков нитратом серебра. Готовые препараты сперматогенного эпителия фиксировали в метаноле 5–7 мин, затем обрабатывали в термостате при температуре 37–38°C в течение 20 мин смесью 50% водного раствора серебра и 2% раствора желатина на 1% муравьиной кислоте. После окраски клетки классифицировали по форме ядра (на 200 клеток сперматогенного эпителия, увеличение $\times 1000$) по видам: I – клетки без видимых морфологических повреждений; II – клетки с деградацией хроматина. В данных клетках определяли два типа ядрышек по диаметру с помощью окуляр-микрометра МОВ – 1 \times 15: 1 тип – компактные и нуклеолонемные (отличаются крупными размерами, 2–4 мкм); 2 тип – плотные фибриллярные ядрышки (мелкие, до 1 мкм), что соответствует высокой (1 тип) и низкой (2 тип) функциональной активности ядрышек [10].

Для изучения восстановительного периода после однократного введения ксенобиотика в дозе 40 мг/кг исследования проводили через 24 ч, на 5-е и 10-е сутки после введения $ZnCl_2$.

Материалы обработаны методом вариационной статистики с использованием *t*-критерия Стьюдента ($P < 0,05$) [6].

Результаты исследования. Морфологический анализ гонадотоксического действия хлорида цинка показал, что при затравке животных ксенобиотиком в дозе 20 мг/кг через 24 ч наблюдалось недостоверное снижение относительного содержания морфологически нормальных форм спермиев до $21,3 \pm 0,32\%$ по сравнению с контрольной группой ($25,8 \pm 1,4\%$). Одновременно отмечается значительное увеличение относительного содержания сперматозоидов с патологическими изменениями хвоста $19,0 \pm 1,1\%$ ($P < 0,001$), причем в основном за счет сперматозоидов с закрученными хвостами $17,5 \pm 2,1\%$ ($P < 0,001$), по сравнению с контролем $15,7 \pm 1,9\%$ и $10,5 \pm 1,9\%$ соответственно. Пятисуточное введение ксенобиотика в той же дозе сопровождалось достоверным снижением количества морфологически нормальных форм сперматозоидов $18,9 \pm 1,3\%$ ($P < 0,001$) по сравнению с контролем, а относительного содержания сперматозоидов с патологическими изменениями хвоста достоверно увеличилось до $25,4 \pm 2,0\%$ ($P < 0,001$), при этом количество сперматозоидов с закрученными хвостами достоверно возросло в два раза по сравнению с контролем (рис.1).

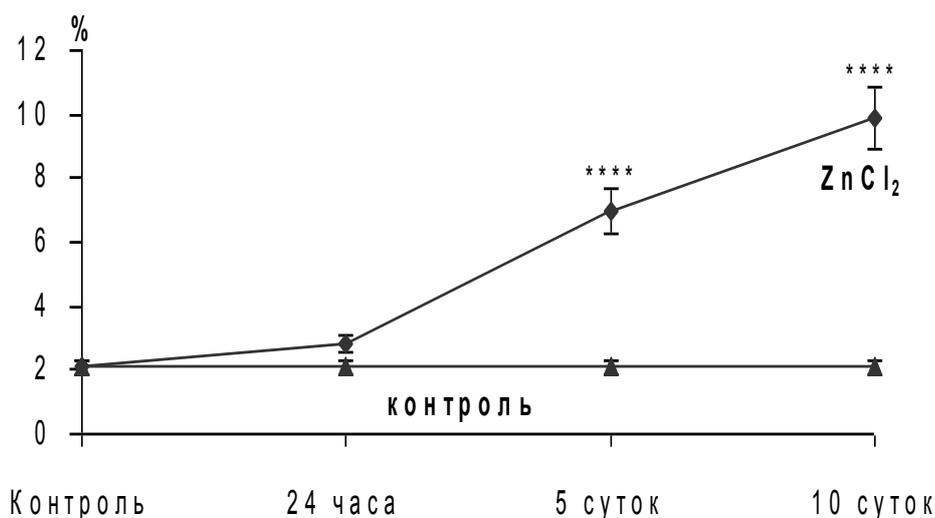


Рис. 1. Динамика формирования аномальных форм сперматозоидов при действии хлорида цинка в дозе 20 мг/кг

Десятисуточное введение ксенобиотика в той же дозе привело к снижению в два раза количества морфологически нормальных форм сперматозоидов, при этом отмечается достоверный рост числа спермиев с морфологическими аномалиями хвоста до $40,2 \pm 1,9\%$ ($P < 0,001$) и в три раза возросло количество сперматозоидов с закрученными хвостами.

Процентное содержание сперматозоидов с патологией шейки при затравке животных ксенобиотиком в дозе 20 мг/кг через 24 ч увеличилось незначительно по сравнению с контролем, а количество половых клеток с аномальными размерами головки достоверно возрастало с $0,9 \pm 0,18\%$ в контроле, до $2,1 \pm 0,1\%$ ($P < 0,001$) на 5-е сутки и $3,0 \pm 0,12\%$ ($P < 0,001$) на 10-е сутки соответственно (табл. 1).

Таблица 1

Морфологические формы сперматозоидов, индуцируемые хлоридом цинка в дозе 20 мг/кг, %

Серия	Морфологически нормальные сперматозоиды	Сперматозоиды с патологией шейки	Сперматозоиды с аномалиями хвоста	Сперматозоиды с закрученным хвостом	Сперматозоиды с другими видами патологии хвоста	Сперматозоиды с аномальными размерами головки
Контроль	$25,8 \pm 1,4$	$5,5 \pm 0,9$	$15,7 \pm 1,9$	$10,5 \pm 1,9$	$2,3 \pm 0,5$	$0,9 \pm 0,18$
24 часа	$21,3 \pm 0,3$	$5,6 \pm 0,7$	$19,0 \pm 1,1^*$	$17,5 \pm 2,1^{**}$	$2,8 \pm 0,3$	$1,7 \pm 0,3$
5 суток	$18,9 \pm 1,3^{**}$	$5,8 \pm 0,6$	$25,4 \pm 2,0^{**}$	$22,0 \pm 2,8^{**}$	$4,3 \pm 0,5^*$	$2,1 \pm 0,1^{**}$
10 суток	$14,4 \pm 1,7^{**}$	$5,9 \pm 0,5$	$40,2 \pm 1,9^{**}$	$32,0 \pm 0,8^*$	$5,1 \pm 0,4^*$	$3,0 \pm 0,12^*$

Здесь и далее: достоверность различий по сравнению с контролем: * $P < 0,05$; ** $P < 0,02$; *** $P < 0,01$; **** $P < 0,001$.

В восстановительном периоде к 10 суткам наблюдалась тенденция к снижению количества половых клеток (спермиев) с аномальной морфологией (табл. 2).

Таблица 2

Аномальные формы сперматозоидов в восстановительном периоде после однократного внутрибрюшинного введения хлорида цинка в дозе 40 мг/кг *in vivo*

Серия	Аномальные формы спермиев, %
Контроль	$2,10 \pm 0,14$
Через 24 часа	$4,10 \pm 0,19^{****}$
Через 5 суток	$4,90 \pm 0,19^{****}$
Через 10 суток	$3,0 \pm 0,32^*$

В ходе проведенных экспериментов выявлено, что подострое поступление хлорида цинка в организм животных вызывает проявление гонадотоксического эффекта ксенобиотика в отношении сперматозоидов мышей.

Известно, что размеры ядрышек определяют степень транскрипционной активности ядрышкового аппарата. Поэтому учет количества и размеров ядрышек в клетках сперматогенного эпителия является одним из методов оценки цитотоксической активности ксенобиотика [9]. При затравке животных хлоридом цинка в дозе 20 мг/кг через 24 ч 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 в 14 раз количества клеток с деградацией хроматина. При этом в клетках без видимых морфологических повреждений количество ядрышек 1-го и 2-го типов снижалось $86,40 \pm 0,27\%$ ($P < 0,001$) 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 де-

градацией 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 снижение 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. 2, А, Б).

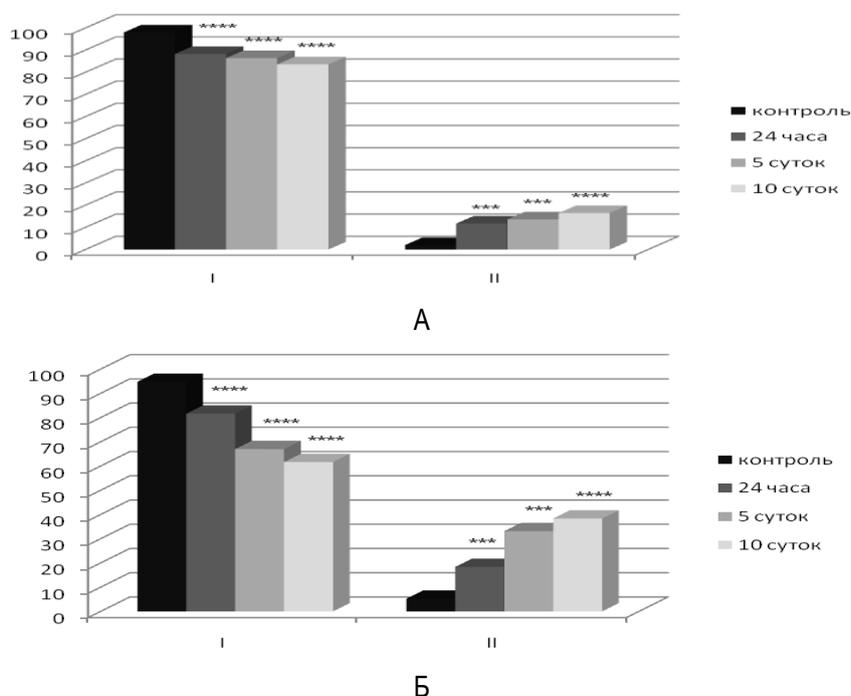


Рис. 2. Относительное количество ядрышек 1 типа (А) и 2 типа (Б) в клетках без морфологических признаков повреждения ядер (I) и в клетках с деградацией хроматина (II) при введении хлорида цинка в дозе 20 мг/кг

К концу восстановительного периода наблюдалась тенденция к нормализации всех исследуемых параметров (табл. 3), что отражает усиление транскрипционной активности и восстановление интенсивности белкового синтеза в клетках сперматогенного эпителия.

Таблица 3

Изменение ядерного материала в сперматогенном эпителии мышей в восстановительном периоде после однократного внутрибрюшинного введения хлорида цинка в дозе 40 мг/кг *in vivo*

Серия	Клетки без видимых морфологических повреждений ядра			Клетки с деградацией хроматина		
	% данного типа клеток	% ядрышек 1-го типа	% ядрышек 2-го типа	% данного типа клеток	% ядрышек 1-го типа	% ядрышек 2-го типа
Контроль	$98,24 \pm 0,24$	$97,98 \pm 0,27$	$94,76 \pm 0,46$	$1,76 \pm 0,23$	$2,02 \pm 0,27$	$5,24 \pm 0,46$
Через 24 ч	$81,14 \pm 0,14$ ****	$87,28 \pm 0,35$ ****	$75,40 \pm 0,51$ ****	$18,86 \pm 0,14$ ****	$12,72 \pm 0,35$ ****	$24,60 \pm 0,51$ ****
Через 5 суток	$92,84 \pm 0,27$ ****	$90,34 \pm 0,29$ ****	$86,30 \pm 0,29$ ****	$7,16 \pm 0,27$ ****	$9,66 \pm 0,29$ ****	$13,70 \pm 0,27$ ****
Через 10 суток	$96,60 \pm 0,25$ ***	$96,04 \pm 0,29$ ***	$93,64 \pm 0,21$	$3,40 \pm 0,25$ ***	$3,96 \pm 0,29$ ****	$6,36 \pm 0,25$

Данные экспериментов показывают, что при воздействии хлорида цинка отмечается рост числа клеток сперматогенного эпителия с низкой функциональной активностью ядрышек.

Таким образом, при действии хлорида цинка выявлена корреляция между активностью ядрышкового аппарата, наличием патоморфологических изменений клеток сперматогенного эпителия и сохранностью их ядерного материала.

Литература

1. Аглетдинов Э.Ф., Никоноров А.А., Камилев Ф.Х. Фармакологическая коррекция тестикулярных эффектов полихлорированных бифенилов в эксперименте // Гигиена и санитария. – 2009. – № 4. – С. 68–70
2. Авцын А.П., Жаворонков А.А., Риш М.А. Микроэлементозы человека. – М.: Медицина, 1991. – С. 164–166.
3. Анализ пролиферативной активности клеток с помощью новых моноклональных антител к ядрышковому белку B23 (нуклеофозмину) / Т.И. Бульчева [и др.] // Цитология. – 2000. – Т. 42. – № 10. – С. 944–953.
4. Вклад полиморфных вариантов генов ферментов биотрансформации ксенобиотиков, антиоксидантной защиты и репарации ДНК в формирование индивидуальной предрасположенности рабочих нефтехимических производств к патологии органов гепатобилиарной и репродуктивной систем / Т.В. Викторова [и др.] // Гигиена и санитария. – 2011. – № 6. – С. 54–57.
5. Иванов Ю.В. Сравнительная характеристика методов количественной оценки состояния сперматогоний // Гигиена и санитария. – 1984. – № 8. – С. 50–51.
6. Лакин Г.Ф. Биометрия. – М.: Высш. шк., 1990. – 352 с.
7. Обухова О.В. Влияние солей тяжелых металлов на рост и факторы патогенности условно-патогенных бактерий // Гигиена и санитария. – 2011. – № 1. – С. 37–39.
8. Погорелов В.М., Козинец Г.И. Морфологические маркеры пролиферации и апоптоза опухолевых клеток // Гематология и трансфузиология. – 2008. – Т. 53. – № 4. – С. 15–20.
9. Сетко Н.П., Захарова Е.А. Кинетика металлов в системе мать-плод-новорожденный при техногенном воздействии // Гигиена и санитария. – 2005. – № 6. – С. 65–67.
10. Челидзе П.В., Зацепина О.В. Морфофункциональная классификация ядрышек // Успехи современной биологии. – 1988. – Т. 10. – № 2. – С. 252–266.
11. Morphological examination of spermatozoa from male infertility patients with constitutional chromosome aberrations / G. Haide [et al.] // Abstracts of the 13th Annual Meeting of the ESHRE, Edinburgh, 1997. – P. 246.



УДК 502.211:599.742.4:591.147

П.П. Бердников, С.Е. Санжиева

ВЛИЯНИЕ ЭКОЛОГИЧЕСКИХ ФАКТОРОВ СРЕДЫ НА КОРТИКОСТЕРОИДНУЮ АКТИВНОСТЬ У АМЕРИКАНСКИХ НОРОК (*MUSTELA VIZON* SCHR.) И СЕРЕБРИСТО-ЧЕРНЫХ ЛИСИЦ (*VULPES VULPES* L.)

В статье представлены результаты исследований содержания кортикостероидов в сыворотке крови и моче американских норок и серебристо-черных лисиц в сравнительно-видовом аспекте.

Условия окружающей среды, в частности температура, влияют на уровень стрессированности животных и соответственно на концентрацию кортикостероидных гормонов.

Ключевые слова: американская норка, серебристо-черная лисица, кортикостероиды, стресс, сыворотка крови, экологический фактор.

P.P. Berdnikov, S.E. Sanzhiyeva

THE ENVIRONMENTAL ECOLOGICAL FACTORS INFLUENCE ON THE CORTICOSTEROID ACTIVITY OF AMERICAN MINKS (*MUSTELA VIZON* SCHR.) AND SILVER-BLACK FOXES (*VULPES VULPES* L.)

The research results of the corticosteroids content in American minks and silver-black fox blood serum and urine in comparative and specific aspect are presented in the article. Environmental conditions, temperature in particular, influence the animals stress level and respectively the corticosteroids hormones concentration.

Key words: American mink, silver-black fox, corticosteroids, stress, blood serum, ecological factor.

Введение. Изучение активности гипофизарно-надпочечниковой системы у американских норок и серебристо-черных лисиц представляет значительный интерес в связи с ее ролью в процессах адаптации организма к условиям обитания. В условиях резко континентального климата Забайкалья, в условиях гиподинамии в силу ограниченности пространства, невозможности укрыться от неблагоприятных условий в зимний период и в моменты высокой солнечной активности летом возникают стрессовые ситуации, вызывающие изменения физиологического статуса животных.